

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

PEDRO MARCOS GOMES SOARES

**MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL:  
PAPEL DE IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE  
DIGESTIVA**

FORTALEZA  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PEDRO MARCOS GOMES SOARES

**MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL:  
PAPEL DE IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE  
DIGESTIVA**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique  
Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA  
2008

S656m Soares, Pedro Marcos Gomes

Mucosite intestinal experimental induzida por 5-Fluorouracil : papel de IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF e avaliação das alterações da motilidade digestiva / Pedro Marcos Gomes Soares. – Fortaleza, 2008.

154 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza – CE, 2008

1.Mucosite. 2.Antimetabólicos antineoplásicos. 3.Citocinas. 4.Motilidade gastrointestinal. I. Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte (orient.) II. Título

CDD 616.994341

PEDRO MARCOS GOMES SOARES

**MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL:  
PAPEL DE IL-1 $\beta$ , IL-4 E PAF E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA  
MOTILIDADE DIGESTIVA**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

**Aprovada em: 28 / 02 / 2008**

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

---

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

---

Prof. Dr. Armênio Aguiar Santos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

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

Dedico esse trabalho ao Senhor meu Deus, por toda graça derramada durante a Tese;

Dedico também aos meus Pais, esposa e irmãos, pois com amor, carinho e atenção tornaram a realização dessa Tese mais agradável.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pelo seu compromisso, sua importante orientação e efetiva participação em todas as etapas deste trabalho. No decorrer desse trabalho, aprendi a tê-lo como amigo.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ter me aceito no seu laboratório e por ter tido o mesmo compromisso de orientador, me auxiliando no delineamento de vários experimentos. Sou muito grato.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pela sua disponibilidade, compromisso, e seriedade ao ter oferecido seu laboratório na USP de Ribeirão Preto para execução de vários experimentos que agora compõem essa Tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira, por ter me auxiliado e orientado nos experimentos de cintilografia, bem como, por ter me oferecido o serviço de Medicina Nuclear do HC da USP de Ribeirão Preto para a execução desse experimento.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar Santos, pelo seu companheirismo com seus alunos (assim eu me considero), isso torna o trabalho no laboratório sempre mais agradável.

A Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pelo seu incentivo, amizade e orientação nos experimentos de análise histológica.

A Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy pela sua lealdade e disposição em assumir o laboratório do Prof. David, laboratório que fez parte da minha formação e onde realizei os experimentos de contratilidade *in vitro* dessa pesquisa. Obrigado pela sua dedicação e amizade.

A Profa. Dra. Mariana Lima Vale, pelo seu compromisso com o laboratório e pela sua amizade.

A todos os outros profs. do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, na pessoa do Prof. Pedro Jorge Magalhães, por toda a ajuda nesse trabalho.

Aos estudantes de Iniciação Científica: Álvaro, Lorena, Cecília, Clóvis que contribuíram para a realização da presente pesquisa, e em especial ao Maurício que foi, sem dúvida, grande companheiro e amigo na execução de grande parte desses experimentos.

Aos amigos do LAFICA, especialmente Renata, Antoniella, Rosemary, Jand, André e etc, pela agradável convivência e solidariedade.

Aos amigos do LAFFIN (UECE), especialmente Alana, Rômulo, Albertina e demais, pela agradável e divertida convivência.

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

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia da Inflamação e da Dor da USP de Ribeirão Preto.

Aos técnicos do Programa de Clínica Médica da USP de Ribeirão Preto.

Aos técnicos do Laboratório de Gastroenterologia do HC da USP de Ribeirão Preto.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que direta e indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução dessa TESE.

“Aplica o teu coração à disciplina e teu ouvido às palavras do conhecimento”.

Prov. 23:12

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar os mediadores inflamatórios e as alterações motoras gastrointestinais no curso da mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU.

**Métodos:** Para avaliar as citocinas utilizamos camundongos balb-c ou c57/black (25-30g), tratados com IL-1Ra (100mg/Kg, i.p., diariamente) ou deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) ou para IL-18 (IL-18 -/-). A fim de estudar a participação de PAF e 5-LO, utilizamos o BN52021 (20mg/Kg, s.c., diariamente) ou camundongos deficientes para o receptor de PAF (PAF -/-) ou para 5-LO (5-LO -/-). Para avaliar a participação de NO, animais receberam aminoguanidina (50mg/Kg, i.p., diariamente), a fim de estudar o papel da morte celular: utilizaram-se animais deficientes para FAS (FAS -/-). Todos os camundongos receberam 5-FU (450mg/Kg, i.p., dose única) ou salina. Após 3 dias, os animais foram sacrificados e amostras do duodeno, do jejuno e do íleo foram obtidas para avaliação morfológica, da atividade de MPO e para dosagem de citocinas. Para estudar as alterações motoras gastrointestinais, ratos Wistar (250-350g) receberam 5-FU (150mg/Kg, i.p., dose única). Após 1, 3, 5, 15 ou 30 dias, foram sacrificados e o duodeno, o jejuno e o íleo foram obtidos para avaliação morfológica, para medida da atividade de MPO e para dosagem de GSH. Outro grupo de ratos recebeu salina glicosada + tecnécio (v.o). Após 3 ou 15 dias, o estômago e segmentos do intestino (P1-P5) foram obtidos para avaliar esvaziamento gástrico (cintilografia). A resposta mecânica foi obtida utilizando-se um transdutor de força isométrico acoplado a um sistema de aquisição de dados. Carbacol ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M) foi aplicado sobre músculo liso do estômago ou do duodeno de ratos tratados ou não com 5-FU.

**Resultados:** Em Camundongos balb-c e c57/black, 5-FU induziu diminuição na razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo, importante infiltrado neutrofílico e um aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC. O tratamento com IL-1Ra (100mg/kg) reverteu à diminuição da razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo, à infiltração de neutrófilos e o aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC induzida por 5-FU. IL-4 -/- tiveram uma menor redução da razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo em comparação aos animais selvagens tratados com 5-FU, bem como apresentaram menor infiltrado neutrofílico e diminuição de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC no duodeno. PAF -/- não tiveram alterações da razão vilo/cripta no duodeno, aumento na concentração de IL-1 $\beta$  e KC com o tratamento com 5-FU. O tratamento com BN 52021 (20mg/kg) reverteu à diminuição da razão vilo/cripta no duodeno de animais c57/black tratados. O tratamento com aminoguanidina (50mg/kg), bem como IL-18 -/-, 5-LO -/- e FAS -/- não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os camundongos selvagens em relação a mucosite por 5-FU. Em relação aos ratos, 5-FU (150mg/kg) induziu importante perda de peso, diminuição da razão vilo/cripta, infiltrado neutrofílico e redução dos níveis de GSH no duodeno, jejuno e íleo no 3º dia. No 15º dia após o tratamento com 5-FU as alterações encontradas foram restabelecidas. Encontrou-se significativo retarde no esvaziamento gástrico e no trânsito gastrointestinal em ratos tratados com 5-FU no 3º e 15º dias. Por fim, houve uma hipercontratibilidade no músculo liso do fundo gástrico e duodenal de ratos no 3º e 15º dia pós tratamento com 5-FU.

**Conclusão:** 5-Fluorouracil induz mucosite intestinal em camundongos com a participação de IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF, também, induz mucosite intestinal em ratos associada a dismotilidade gastrointestinal que persiste com a resolução da inflamação.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the inflammatory mediators and gastrointestinal motility during the experimental intestinal mucositis induced by 5-FU. **Methods:** To evaluate the cytokines, we used balb-c or c57/black (25-30g) mice, treated with IL-1Ra (100mg/Kg, i.p., daily) or deficient for IL-4 (IL-4 -/-) or for IL-18 (IL-18 -/-). In order to study the participation of PAF and 5-LO, we used BN52021 (20mg/Kg, s.c., daily), deficient mice for the PAF receptor (PAF -/-) or for 5-LO (5-LO -/-). To evaluate the participation of NO, animals received aminoguanidine (50mg/Kg, i.p., daily). In order to study the cellular death, deficient mice for FAS (FAS -/-) were used. All mice received 5-FU (450mg/Kg, i.p., dose only) or saline. After 3 days, mice were sacrificed and samples of the duodenum, jejunum and ileum were obtained for evaluation morphometric, MPO activity and for cytokines measurement. To study the gastrointestinal motility, Wistar rats (250-350g) received 5-FU (150mg/Kg, i.p., dose only). After 1, 3, 5, 15 or 30 days, were sacrificed and the duodenum, jejunum and ileum were obtained for evaluation morphometric, measure MPO activity of and GSH concentration. Another group of rats received saline + technetium (p.o). After 3 or 15 days, stomach and segments of the intestine (P1-P5) were obtained to evaluate gastric emptying (scintigraphic). Mechanical response was obtained used a transducer of force isometric coupled system of acquisition of data, carbachol ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M) was applied of the stomach and duodenum smooth muscle of rats treated or not with 5-FU. **Results:** In balb-c and c57/black mice, 5-FU induced decrease in the villus/crypt ratio in the duodenum, jejunum and ileum, important neutrophil infiltration and increase in the of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and KC concentrations. Treatment with IL-1Ra (100mg/kg) reversed the decrease of the villus/crypt ratio in the duodenum, jejunum and ileum, the neutrophil infiltration and increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and KC induced by 5-FU. IL-4 -/- had less reduction of the villus/crypt ratio in the duodenum, jejunum and ileum then the wild-type mice treated with 5-FU, as well as present less neutrophil infiltration and decrease TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and KC concentration in the duodenum. PAF -/- didn't have alterations of the villus/crypt ratio in the duodenum, increase in the concentration of IL-1 $\beta$  and KC treatment with 5-FU. BN 52021 treatment with reversed the decrease of the reason villus/crypt ratio in the duodenum. Aminoguanidine treatment, as well as IL-18 -/-, 5-LO -/- and FAS -/- have not differences when compared with the intestinal mucositis induced by 5-FU in wild-type. In rats, 5-FU (150mg/kg) induced important weight loss, decrease of the villus/crypt ratio, neutrophil infiltration and reduction in GSH concentration in the duodenum, jejunum and ileum in the 3<sup>o</sup> day. In the 15<sup>o</sup> day after the 5- FU treatment intestinal mucosa was reestablished. We observed a significant delay in the gastric emptying and in the gastrointestinal transit in rats treated with 5-FU in the 3<sup>o</sup> and 15<sup>o</sup> days. Finally, there were hypercontractility in the smooth muscle of the fundus gastric and duodenal of rats in the 3<sup>o</sup> and 15<sup>o</sup> day pos-treatment with 5-FU. **Conclusion:** 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis in mice with the participation of IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF, as well as, induced intestinal mucositis in rats associated with gastrointestinal dysmotility that outlast the inflammation resolution.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
5'-AMP	5'-Monofosfato de adenosina cíclico
5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-LO	5-lipoxigenase
ACh	acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
$\text{CH}_2\text{THF}$	5,10-metileno tetraidrofolato
COX-2	ciclooxigenase-2
CPT-11	Cloridrato de irinotecano
CXC	quimiocina
DAB	3,3'diaminobenzidina-peróxido
DHFU	diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos
DPD	diidropirimidina desidrogenase
dTMP	deoxitimidina monofosfato
dUMP	deoxiuridina monofosfato
dUTP	deoxiuridina trifosfato
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
FdUMP	monofosfato de fluordeoxiuridina
FdUTP	trifosfato de fluordeoxiuridina
FUTP	trifosfato de fluoruridina

FUMP	monofosfato de fluoruridina
FUDP	difosfato de fluoruridina
FUDR	fluordeoxiuridina
g	Gramma
GSH	glutathiona
HTAB	hexadecitrimetilamônio
IFN-	Interferon-
IL-	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor de IL-1
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LPS	lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
ml	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
OPD	O-fenilenediamine diidrocloreto
PAF	fator de agregação plaquetário
PBS	Solução tamponada de fosfato
pg	picograma
PG	Prostaglandina

QT	quimioterapia
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SP	Substância P
STAT-6	fator de transcrição-6
TGF-	Fator de crescimento transformador
Th	T <i>helper</i>
TNBS	2,4,6 – trinitrobenzenoasulfônico
TNF-	Fator de necrose tumoral
TP	timidina fosforilase
TS	timidilato sintase
TTX	tetrodotoxina
UDG	uracil-DNA glicosilase
v.o.	Via oral

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química do 5-Fluorouracil.....	24
FIGURA 2	Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.....	24
FIGURA 3	Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil sobre a enzima timidilato sintase.....	25
FIGURA 4	Representação esquemática do centro geométrico de uma refeição teste.....	51
FIGURA 5	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos balb-c tratados com salina ou 5-FU.....	56
FIGURA 6	Fotomicrografias de segmentos intestinais de camundongos balb-c tratados com salina ou 5-FU.....	57
FIGURA 7	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos c57/black tratados com salina ou 5-FU.....	58
FIGURA 8	Fotomicrografias de segmentos intestinais de camundongos c57/black tratados com salina ou 5-FU.....	59
FIGURA 9	5-FU induziu infiltração neutrofílica no duodeno de camundongos balb-c e c57/black.....	60
FIGURA 10	Efeito do tratamento com IL-1Ra sobre as alterações morfométricas dos segmentos intestinais de camundongos c57/black tratados com 5-FU.....	65
FIGURA 11	Fotomicrografias do duodeno de camundongos controle e submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU pré-tratados com salina e IL-1Ra.....	66
FIGURA 12	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para IL-4 (IL-4 +/+) e deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	68
FIGURA 13	Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para IL-4 (IL-4 +/+) e deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	69

FIGURA 14	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para IL-18 (IL-18 +/+) e deficientes para IL-18 (IL-18 -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	71
FIGURA 15	Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para IL-18 (IL-18 +/+) e deficientes para IL-18 (IL-18 -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	72
FIGURA 16	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para PAF (PAF +/+) e deficientes para o receptor de PAF (PAF -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	76
FIGURA 17	Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para PAF (PAF +/+) e deficientes para o receptor de PAF (PAF -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	77
FIGURA 18	Efeito do tratamento com BN 52021 sobre as alterações morfométricas do duodeno de camundongos c57/black tratados com 5-FU.....	79
FIGURA 19	Fotomicrografias do duodeno de camundongos controle e submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU pré-tratados com salina e BN 52021.....	80
FIGURA 20	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para 5-LO (5-LO +/+) e deficientes para 5-LO (5-LO -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	82
FIGURA 21	Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para 5-LO (5-LO +/+) e deficientes para 5-LO (5-LO -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	83
FIGURA 22	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para FAS-ligante (FAS +/+) e deficientes para FAS-ligante (FAS -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	85
FIGURA 23	Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para FAS-ligante (FAS +/+) e deficientes para FAS-ligante (FAS -/-) tratados com salina ou 5-FU.....	86
FIGURA 24	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a sobrevivência e a variação de peso em ratos.....	89

FIGURA 25	Fotomicrografias do duodeno de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	91
FIGURA 26	Fotomicrografias do jejuno de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	92
FIGURA 27	Fotomicrografias do íleo de ratos tratados com salina ou 5-FU...	93
FIGURA 28	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	94
FIGURA 29	Fotomicrografias do duodeno de ratos tratados com salina ou 5-FU para observar apoptose e mitose.....	99
FIGURA 30	Índice apoptótico e mitótico de tecidos intestinais de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	100
FIGURA 31	Retenção gástrica e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados tratados com salina ou 5-FU.....	102
FIGURA 32	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a distribuição do centro geométrico da refeição teste em ratos acordados.....	103
FIGURA 33	Contratilidade do músculo liso do fundo de estômago de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	105
FIGURA 34	Contratilidade do músculo liso duodenal de ratos tratados com salina ou 5-FU.....	106

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sangüíneos em camundongos balb-c.	55
TABELA 2	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sangüíneos em camundongos c57/black.	55
TABELA 3	Dosagem de citocinas no duodeno de camundongos balb-c e c57/black tratados com salina ou 5-FU.	61
TABELA 4	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sangüíneos de camundongos tratados com IL-1Ra e de camundongos deficientes para IL-4 e IL-18.	64
TABELA 5	O tratamento com IL-1Ra reduziu a infiltração de neutrófilos induzida por 5-FU no duodeno de camundongos c57/black.	67
TABELA 6	O tratamento com IL-1Ra reverteu o aumento da concentração de citocinas induzida por 5-FU no duodeno de camundongos c57/black.	67
TABELA 7	Camundongos deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) tratados com 5-FU apresentam uma menor infiltração de neutrófilos no duodeno quando comparado aos camundongos selvagens (IL-4 +/+) tratados com 5-FU.	70
TABELA 8	Camundongos deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) que foram tratados com 5-FU apresentam uma menor concentração de citocinas no duodeno quando comparado aos animais selvagens (IL-4 +/+) tratados com 5-FU.	70
TABELA 9	Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sangüíneos de camundongos tratados com BN 52021 e de camundongos deficientes para PAF e 5-LO.	75
TABELA 10	Camundongos deficientes para o receptor PAF (PAF -/-) tratados com 5-FU apresentam aumento de neutrófilos no duodeno.	78

TABELA 11	Camundongos deficientes para receptor de PAF (PAF $-/-$ ) que foram tratados com 5-FU apresentam uma menor concentração de citocinas no duodeno quando comparado aos animais selvagens (PAF $+/+$ ) tratados com 5-FU.	78
TABELA 12	O tratamento com BN 52021 não reduziu a infiltração de neutrófilos induzida por 5-FU no duodeno de camundongos.	81
TABELA 13	Efeito do 5-FU sobre a contagem dos leucócitos sangüíneos em ratos submetidos a mucosite intestinal.	90
TABELA 14	Efeito do 5-FU sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no duodeno de ratos.	97
TABELA 15	Efeito do 5-FU sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no jejuno de ratos.	97
TABELA 16	Efeito do 5-FU sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no íleo de ratos.	98

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1. 5-FLUOROURACIL.....	22
1.2. Mucosite por antineoplásicos.....	25
1.3. Mucosite Intestinal .....	27
<b>1.4. Mediadores presentes na inflamação intestinal</b> .....	30
1.4.1. Papel de citocinas na inflamação intestinal.....	31
1.4.2. Papel de PAF e 5-LO na inflamação intestinal.....	33
1.4.3. Morte celular e inflamação intestinal.....	34
<b>1.5. Inflamação intestinal X Alterações funcionais</b> .....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	41
3.1. Animais utilizados nos protocolos experimentais de mucosite intestinal.....	41
3.2. Modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU em camundongos.....	42
3.3. Leucograma.....	43
3.4. Análise morfométrica e histopatológica.....	44
3.5. Ensaio para mieloperoxidase.....	44
3.6. Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e KC) no duodeno de camundongos tratados com 5-FU.....	45

3.7. Modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU em ratos.....	46
3.8. Avaliação da sobrevivência.....	47
3.9. Análise ponderal.....	47
3.10. Análise morfométrica e histopatológica.....	47
3.11. Análise do índice de apoptose e mitose das criptas do duodeno, jejuno e íleo de ratos.....	48
3.12. Ensaio para mieloperoxidase.....	48
3.13. Determinação de glutathione.....	49
3.14. Avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal por cintilografia em ratos acordados.....	50
3.15. Medidas de contratilidade.....	52
3.16. Análise estatística.....	52
<b>4.0 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1. Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos c57/black e balb-c.....	53
4.2. 5-FU induz mucosite intestinal em camundongos com participação de IL-1 $\beta$ e IL-4, mas não de IL-18.....	62
4.3. 5-FU induz mucosite intestinal em camundongos com participação de PAF, mas não de 5-LO.....	73
4.4. O receptor FAS-ligante parece não participar da mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	84
4.5. Modelo de mucosite intestinal em ratos Wistar.....	87
4.6. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de infiltração de neutrófilos, intensa apoptose e consumo de glutathione.....	95

4.7. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de importante retarde no esvaziamento gástrico e no trânsito intestinal em ratos acordados.....	101
4.8. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de aumento na contratilidade do músculo liso do estômago e do duodeno.....	104
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>142</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A terapêutica antineoplásica é empregada fundamentalmente no tratamento de tumores não curáveis por cirurgia ou por radioterapia. Essa terapia também é utilizada naqueles casos em que se deseja reduzir a dimensão e a agressividade de cirurgias oncológicas através de um tratamento pré-operatório (quimioterapia neo-adjuvante). O objetivo primário da quimioterapia (QT), forma mais comum de terapia antineoplásica, é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto as células neoplásicas, quanto às células normais. No momento em que populações celulares normais são comprometidas, surgem os efeitos colaterais tóxicos. Conseqüentemente, estas substâncias podem provocar efeitos tóxicos graves (RANG; DALE; RITTER, 2001; CALABRESI; CHABNER, 2003), sendo um dos órgãos mais afetados o trato gastrointestinal (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Dentre os efeitos colaterais relacionados ao uso de antineoplásicos, destacam-se náusea, vômitos, diarreia, mielossupressão, alopecia, cardiotoxicidade, cistite hemorrágica, mucosite, dentre outros. No entanto, pouco tem sido descoberto para prevenir e controlar esses sintomas (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; CHU, 2005). Em relação à mucosite intestinal que será abordada no decorrer desse trabalho, vários autores demonstram o aparecimento dessa patologia após o uso de metotrexato (MTX) (GIBSON *et al.*, 2002; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004), 5-fluorouracil (5-FU) (SONIS *et al.*, 2004), ciclofosfamida (WOO *et al.*, 2000); gencitabina (APOSTOLIDOU *et al.*, 2003), capecitabina (BOEHMER; JAEGER,

2002) e cloridrato de irinotecano (CPT-11) (GIBSON *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 2004; ALIMONTI *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2007).

Alguns dos efeitos tóxicos da quimioterapia podem ser contornados através de tratamentos de suporte, outros evitados apenas pela redução da dose ou, até mesmo, a suspensão da quimioterapia. Estes problemas advêm principalmente do pouco conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos geradores desses efeitos colaterais, o que impossibilita o tratamento efetivo e não comprometedor da continuidade da terapia antineoplásica. Tendo em vista esses problemas apresentados, decidimos investigar a fisiopatologia da mucosite intestinal por 5-Fluorouracil.

### **1.1. 5-FLUOROURACIL**

5-Fluorouracil (5-FU; Figura 1) é uma droga antimetabólica da classe das fluoropirimidinas que foi desenvolvida a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para síntese e metabolismo de novas células. (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

5-Fluorouracil (5-FU) pode ser convertido em três metabólitos ativos, são eles: monofosfato de fluordeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluordeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluoruridina (FUTP). O mecanismo de ativação do 5-FU se dá pela conversão em monofosfato de fluoruridina (FUMP), que é então fosforilada em difosfato de fluoruridina (FUDP), que pode ser fosforilada no metabólito ativo, o trifosfato de fluoruridina (FUTP), ou pode ser convertido em difosfato de fluordeoxiuridina (FdUDP). Esse composto intermediário do metabolismo de 5-FU

pode ser fosforilado ou defosforilado dando origem aos metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Um caminho alternativo é catalisado pela timidina fosforilase (TP) que converte 5-FU em fluordeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilado em FdUMP pela timidina quinase. A conversão do 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU) pela diidropirimidina desidrogenase (DPD) é a etapa limitante do catabolismo de 5-FU, tanto em células normais como em células tumorais. Em torno de 80% do 5-FU é metabolizado no fígado (Figura 2) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O mecanismo de citotoxicidade atribuído ao 5-FU está na sua capacidade de incorporar fluoronucleotídeo na molécula de DNA e/ou RNA, bem como pela inibição da enzima timidilato sintase (TS). A timidilato sintase é importante no processo de fornecimento de grupos timidilatos para o reparo e síntese de DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Timidilato sintase catalisa a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-metileno tetraidrofolato ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) como um doador de grupos metil. O metabólito ativo do 5-FU que é o monofosfato de fluordeoxiuridina liga-se no sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS e  $\text{CH}_2\text{THF}$ . Esse complexo é capaz de bloquear o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo inibindo a síntese de dTMP. Isso resulta em um desequilíbrio nas concentrações de deoxinucleotídeos (dNTP) e também um aumento dos níveis de deoxiuridina trifosfato (dUTP), ambos podem causar destruição do DNA. A extensão ao dano do DNA causado pela dUTP é dependente dos níveis das enzimas pirofosfato dUTPase e uracil-DNA glicosilase (UDG) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; Figura 3).

5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o de coloretal, sendo de maior impacto nesse último tipo.

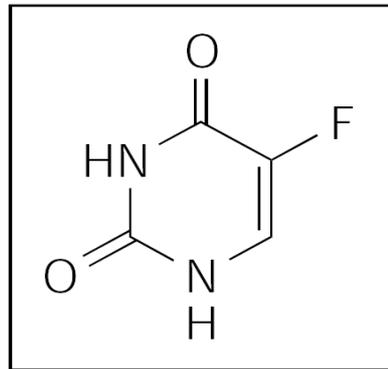


Figura 1. Estrutura química do 5-Fluorouracil (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

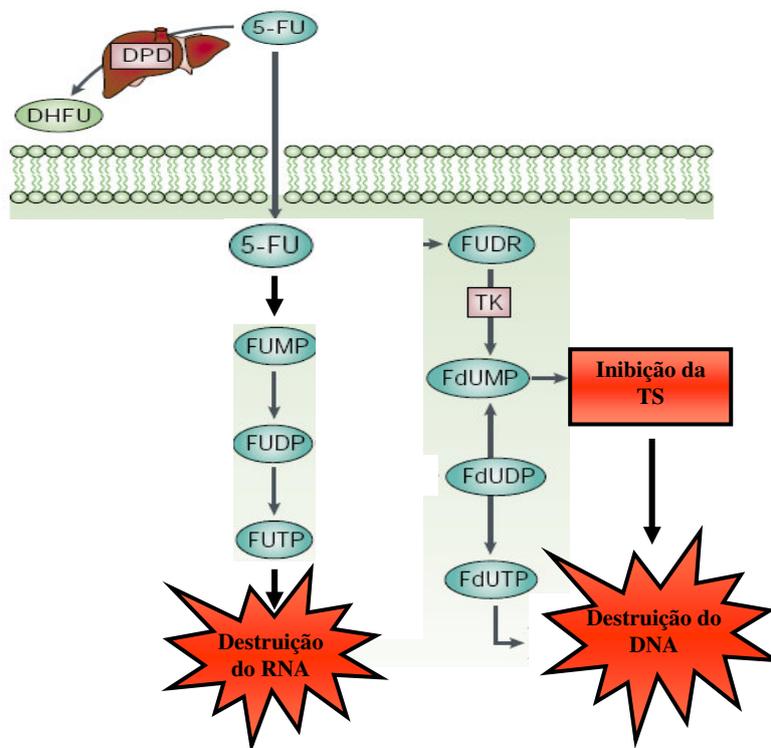


Figura 2. Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.

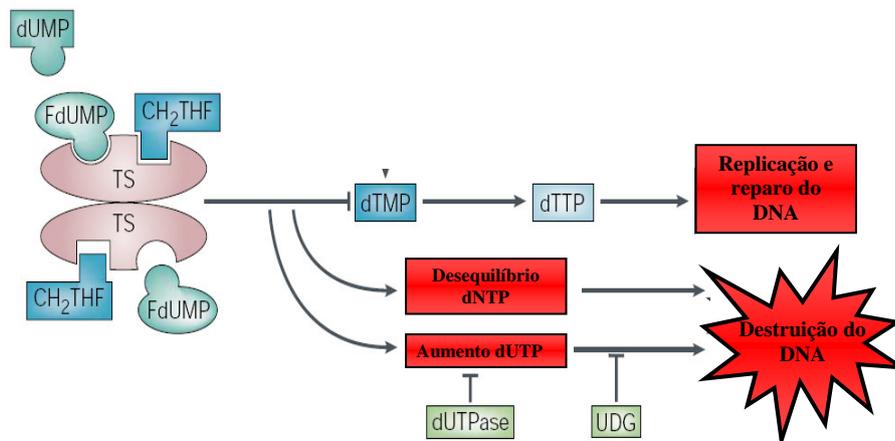


Figura 3. Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil sobre a enzima timidilato sintase.

## 1.2. Mucosite por antineoplásicos

A mucosite induzida por antineoplásicos é um fator limitante na terapia anticâncer. Mucosite é um termo clínico que descreve uma síndrome caracterizada por ulceração da mucosa de todo o trato digestivo e sintomas pertinentes (SONIS, 1993). A frequência da observação da mucosite varia e é influenciada pelo diagnóstico do paciente, idade, nível de saúde, tipo, dose e frequência da droga administrada (SONIS, 1997). Esse efeito colateral é bastante comum nos pacientes portadores de câncer submetidos a tratamento com agentes quimioterápicos diversos, em especial, os antimetabólitos, como por exemplo, o metotrexato e fluorouracil, mas também com outros agentes como cisplatina, doxorubicina, ifosfamida, etc. Têm sido descritas incidências de mucosite de aproximadamente 40% associada ao uso de antineoplásicos (CABALLERO; AUSMAN; QUEBBEMAN, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et al.*, 1991; MAGRATH *et al.*, 1984; BISHOP *et al.*, 1986), além de ser bastante comum em pacientes submetidos à radioterapia abdominal (ALTMANN, 1974).

As manifestações da mucosite gastrointestinal são dor abdominal e diarreia. O trato gastrointestinal é vulnerável por causa da alta proliferação e frequência de renovação celular (PARRILI *et al.*, 1989; PLEDGER *et al.*, 1988). Sonis (1998) caracterizou 4 fases fisiopatológicas da mucosite: uma fase inflamatória/vascular, uma fase epitelial, uma fase bacteriológica/ulcerativa e uma fase de resolução. Cada fase é independente e é consequência de uma série de ações, mediadas por citocinas e fatores de crescimento, sobre o efeito direto do antineoplásicos no epitélio, sobre a flora bacteriana, além de depender do “status” da medula óssea do paciente (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

Na primeira fase há liberação de citocinas (interleucina 1 [IL-1]) pelo epitélio e pelos tecidos conectivos devido ao efeito dos antineoplásicos (SONIS, 1998). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 podem iniciar uma resposta inflamatória que resulta em aumento da vascularização subepitelial (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). A segunda fase, ou fase epitelial é caracterizada pela redução da renovação epitelial que acarreta em atrofia. A fase ulcerativa, é a mais sintomática e complexa, dentre as 4 fases, ocorre falha na barreira da mucosa, juntamente com neutropenia, que pode levar o paciente ao risco de infecção. Por último, observa-se a fase de resolução da mucosite, com proliferação e diferenciação celular, retorno normal das células sanguíneas periféricas e controle da flora bacteriana (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

### 1.3. Mucosite Intestinal

O intestino exerce funções importantes para a saúde do organismo, tais como: digestão e absorção de macro e micronutrientes, produção de importantes hormônios reguladores. Ele pode funcionar ainda como órgão imune e agir como barreira contra agentes nocivos. O intestino é formado por três camadas básicas, a camada epitelial, a lâmina própria e a muscular da mucosa. O uso de antineoplásicos pode levar a defeitos na divisão celular e na renovação epitelial, o que ocasiona perda rápida da estrutura e função do intestino (DUNCAN; GRANT, 2003).

Uma das razões para a escassa informação a respeito da mucosite intestinal reside na dificuldade de se acessar a própria lesão, pois para isso utilizam-se meios invasivos como endoscopia digestiva com biópsia (SMITH *et al.*, 1979).

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

Um aspecto importante da enterocolite induzida por antineoplásicos consiste no fenômeno da translocação bacteriana através de um epitélio danificado funcionalmente e estruturalmente. Esse evento parece desempenhar papel relevante na toxicidade intestinal da quimioterapia e da radioterapia do câncer (FOX *et al.*, 1988; ALVERDY, 1990; SOUBA *et al.*, 1990). A destruição celular gastrintestinal observada na mucosite por antineoplásicos é resultado de hipoproliferação celular

(TRIER, 1962; ALTMAN, 1974), com atrofia das vilosidades, aprofundamento das criptas, que resulta de disfunção absorptiva, alteração na secreção de eletrólitos, principalmente Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, nesse caso, ocasionar diarreia (DONALDSON; LENON, 1979; KEEFE *et al.*, 1997; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). Atualmente, alguns autores descrevem a mucosite intestinal com o termo mucosite alimentar em que se observa inflamação, erosão e lesões ulcerativas no trato alimentar secundário à quimioterapia e/ou radioterapia do câncer (LALLA *et al.*, 2006). Publicações recentes de Keefe, Gibson e Hauer-Jensen (2004) e Bowen *et al.* (2006) afirmam que a fisiopatologia da mucosite intestinal é um processo tão complexo quanto o proposto para a mucosite oral.

Duncan e Grant (2003) descrevem os mecanismos da mucosite intestinal em quatro fases: período inicial, restituição, inflamação, recuperação. A fase inicial caracteriza-se pela ação das drogas antineoplásicas que bloqueiam a síntese do DNA por inibição da topoisomerase e síntese do timidilato. Pode também ocorrer alterações na molécula do ácido ribonucléico (RNA) e formação de radicais livres. Todas essas alterações inibem os processos mitóticos, que afetam a integridade celular e provocam o estímulo para o influxo de células inflamatórias e imunes da lâmina própria.

Durante a segunda fase, ocorre paralisação da divisão celular por algumas horas e apoptose. Há, portanto, uma indução da perda progressiva de células nas criptas e ativa os processos de restituição. Nesta etapa, há um colapso na profundidade e no número de criptas, encurtamento dos vilos e depleção de células caliciformes (XIAN *et al.*, 1999; KEEFE *et al.*, 2000). Esta fase caracteriza-se por perdas de fluidos e colonização bacteriana (DUNCAN; GRANT, 2003). Por fim, no processo de recuperação ocorre uma significativa proliferação, que leva a

restauração funcional das criptas. Conseqüentemente, ocorre uma recuperação na estrutura e função dos vilos, com retorno da superfície absorviva do intestino (XIAN *et al.*, 1999; DUNCAN; GRANT, 2003).

Estudos de Pritchard, Potten e Hickman (1998) mostram que p53 é responsável pela destruição de criptas decorrente do tratamento com 5-FU. Observou-se que camundongos deficientes para (p53<sup>-/-</sup>) tratados com 5-FU tiveram menor resposta apoptótica que camundongos selvagens (p53<sup>+/+</sup>). Nesta mesma linha, Gibson *et al.* (2005) observaram que o uso de MTX (5 mg/kg) induziu aumento da atividade pró-apoptótica, destruição grave das criptas e aumento da expressão de p53, sem aumento da expressão de p21.

Em estudos com inibidor da síntese de DNA (metotrexato), é observado alterações no epitélio intestinal (ALTMANN, 1974). Carneiro-Filho *et al.* (2003) mostraram que ratos tratados com MTX apresentavam perda de peso, o que pode está associado a uma diminuição da absorção e da atividade enzimática do epitélio, além da destruição da mucosa do duodeno, jejuno e íleo de ratos, com presença de infiltrado neutrofílico, o que reforça a hipótese da fase inflamatória da mucosite.

Além dessas observações os autores também demonstraram uma redução na excreção de manitol quando os ratos foram tratados com MTX, mostrando que a permeabilidade do intestino estava alterada. O manitol é absorvido transcelularmente através dos poros aquosos da membrana celular, e em relação à excreção da lactulose os autores não encontraram os mesmos achados, isso sugere uma ausência de alteração da permeabilidade paracelular. Esses dados diferem dos achados na literatura, pois estudos mostram que o tratamento com MTX altera a função da barreira paracelular. Essas alterações da permeabilidade intestinal a vários açúcares, sugerem que os efeitos deletérios sistêmicos como desnutrição e

desidratação possam advir principalmente dos danos causados à capacidade absorptiva da mucosa intestinal (KEEFE *et al.*, 1997).

O nosso grupo do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer descreveu vários moduladores farmacológicos para a mucosite intestinal e oral por antineoplásicos (5-FU, metotrexato, CPT-11), dentre esses podem citar: pentoxifilina, talidomida, aminoguanidina, L-arginina, em modelos animais (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2007).

Assim, a mucosite intestinal resulta de eventos inflamatórios. Os eventos inflamatórios intestinais podem estar associados com alterações funcionais tanto na fase inflamatória, como na fase pós-inflamatório. Porém, poucos dados da literatura demonstram de que maneira a mucosite intestinal pode estar associada com alterações de motilidade gastrointestinal, que são observadas na clínica de pacientes oncológicos.

#### **1.4. Mediadores presentes na inflamação intestinal**

O processo inflamatório tem um grande impacto sobre as células epiteliais intestinais e sobre células especializadas do intestino, tais como: as células enteroendócrinas e as células produtoras de muco. A inflamação intestinal pode apresentar importantes alterações na estrutura da mucosa, como a infiltração de polimornuclear com conseqüente prejuízo na função de barreira desempenhada pela mucosa intestinal, podendo haver aumento de permeabilidade e uma dificuldade na absorção (HAWKER; MCKAY; TURNBERG, 1980; WEILAND *et al.*, 1986; KOYAMA *et al.*, 1991; NUSRAT *et al.*, 1997). Essas alterações de barreira são provenientes da ação dos polimorfonuclares sobre as *tigh junctions* (MILKS; BRONTOLI; CRAMER,

1983; NASH; STAFFORD; MADARA, 1987; PARSONS *et al.*, 1987). Foi também demonstrado que os polimorfonucleares podem produzir 5'-AMP (MADARA *et al.*, 1993) que pode ser convertido em adenosina e ativar a secreção eletrogênica de cloreto e o movimento passivo de água para o lúmen intestinal (STROHMEIER *et al.*, 1995, 1997). Assim, pode-se explicar, em parte, a diarreia secretória presente em processos inflamatórios intestinais.

Dentre as células polimorfonucleares podemos destacar a importância do infiltrado neutrofílico e a migração neutrofílica transepitelial em doenças inflamatórias intestinais. Estudos *in vitro* da migração neutrofílica transepitelial no intestino mostram que ocorre uma liberação de quimiocinas (CXC) induzindo com isso um aumento do infiltrado pela superfície basolateral das células epiteliais (McCORMICK *et al.*, 1993, 1995; ECKMANN *et al.*, 1993a). Dentre essas quimiocinas, podemos destacar a importância da interleucina-8 (IL-8; designada como CXCL8 na nomenclatura moderna de quimiocinas) que é a maior quimiocina CXC humana e que é rapidamente induzida em células epiteliais intestinais depois da estimulação por bactérias (ECKMANN *et al.*, 1993b). IL-8 derivada das células epiteliais pode induzir infiltrado neutrofílico em vários tipos de inflamação de mucosas (IZZO *et al.*, 1992, MAZZUCHELLI *et al.*, 1994).

#### **1.4.1. Papel de citocinas na inflamação intestinal**

Citocinas podem induzir apoptose e têm contribuído para a disfunção de barreira presente nos processos inflamatórios intestinais (STRATER *et al.*, 1997). Citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 e citocinas antiinflamatórias, tais como IL-1ra, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-11 podem estar envolvidas

na lesão e reparo da mucosa (WILSON; GIBSON, 1997). IL-1 possui influência marcante no desenvolvimento de lesões e na secreção intestinal por estimular a síntese de PGs (THEODOROU *et al.*, 1994) e IL-8 (SARTOR, 1994).

Citocinas como: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e TGF- $\beta$  também podem ser expressas no plexo mioentérico em ratos infectados por nematóides e serem responsáveis por alterações na motilidade (COLLINS, 1996). IL-6 pode ser produzida diretamente pelas células musculares lisas durante a inflamação intestinal (SCHWARZ *et al.*, 2004; WEHNER *et al.*, 2005).

Também é descrito que IL-4 pode ser um mediador importante na inflamação intestinal e na regulação do músculo liso gastrintestinal durante processos inflamatórios (FINKELMAN *et al.*, 2004). IL-4 é descrito como uma citocina com várias funções, como: regulação das células de crescimento, regulação das células T e regulação de células tumorais (PAUL, 1991). Existem evidências tanto da sua ação antiinflamatória como pró-inflamatória em modelos de inflamação intestinal (KAMPEN; GAULDIE; COLLINS, 2005). Está demonstrado que parte da ação pró-inflamatória da IL-4 na inflamação intestinal pode ser devido à produção de IFN- $\gamma$  (BAMIAS *et al.*, 2005). Recentemente, Akiho *et al.* (2005) demonstraram a presença de receptores de IL-4 no músculo liso intestinal. Também foi demonstrado que a exposição do músculo liso intestinal a IL-4 aumenta a contratilidade quando estimulado por carbacol (AKIHO *et al.*, 2005). Esses dados revelam que IL-4 pode ter um papel na inflamação intestinal e possivelmente nas alterações funcionais decorrentes dos processos inflamatórios intestinais.

Outra citocina de interesse nos processos inflamatórios intestinais é a IL-18 (REUTER; PIZARRO, 2004). Esses mesmos autores descrevem que IL-18 é produzida em vários tipos de células, como: fibroblastos, osteoblastos, células

epiteliais intestinais. Quando a IL-18 liga-se ao seu receptor pode mediar respostas do tipo Th1 e Th2 (NAKANISHI *et al.*, 2001), pode induzir a liberação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 (PUREN *et al.*, 1998) e ativar a migração de neutrófilos (GRACIE *et al.*, 1999).

Dados da literatura demonstram que IL-18 está aumentada em pacientes com doença de Crohn (KANAI *et al.*, 2001). Trabalhos de Chikano *et al.* (2000), demonstraram que IL-18 juntamente com IL-12 podem induzir importantes lesões hepática e intestinal em animais. Esses autores sugerem que parte da ação dessas citocinas é dependente de IFN- $\gamma$  e independente de TNF- $\alpha$  e NO.

#### **1.4.2. Papel do PAF e da 5-LO na inflamação intestinal**

O fator de agregação plaquetário (PAF) é produzido endogenamente no intestino durante inflamação intestinal (SUN; HSUEH, 1988). O PAF participa na patogênese da enterocolite necrozante (HSUEH *et al.*, 2003) e da lesão intestinal associada ao choque endotóxico (HSUEH; GONZALEZ-CRUSSI; ARROYAVE, 1987). Outros autores demonstraram que a injeção sistêmica de PAF em ratos induziu necrose intestinal de maneira dose-dependente (HSUEH; GONZALEZ-CRUSSI; ARROYAVE, 1987).

Outras evidências demonstram a participação do PAF em modelos de colite em animais (CAPLAN *et al.*, 1997). Ademais, é demonstrado que o tratamento com antagonistas do receptor de PAF diminuem a inflamação da mucosa no modelo de colite em animais (MEENAN *et al.*, 1996). Ainda é possível encontrar a participação de PAF na produção de prostaglandina E<sub>2</sub> e na secreção de cloreto pela mucosa intestinal humana (BORMAN; JEWELL; HILLIER, 1998).

Pode-se destacar que o PAF além de participar dos eventos inflamatórios, participa também de alterações de motilidade gastrointestinal. Deshpande *et al.*, (1994), demonstraram que ao tratar com antagonista do receptor de PAF animais com colite as alterações de motilidade colônica eram revertidas.

Outro mediador eicosanóide presente na inflamação intestinal são os produtos da via da 5-lipoxigenase. Trabalhos mostram que existe produção de leucotrienos derivados da via da 5-lipoxigenase em modelos animais de colite aguda. Também afirmam que o tratamento com drogas inibidoras da 5-lipoxigenase podem ser eficazes na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais (RASK-MADSEN *et al.*, 1992). Entretanto, outros trabalho demonstram não haver participação de 5-lipoxigenase em indivíduos com colite ou doença de Crohn (HENDEL; AHN FELT-RØNNE; NIELSEN, 2002).

#### **1.4.3. Morte celular e inflamação intestinal**

A quimioterapia do câncer pode causar apoptose nas células das criptas do intestino de animais e humanos (PRITCHARD; POTTEN; HICKMAN, 1998; KEEFE *et al.*, 2000). As modificações nas células decorrentes da apoptose devem-se à ativação de caspases (BOWEN *et al.*, 2006). O controle da apoptose depende da expressão de genes da família Bcl-2 (THORNBERRY, 1998; BOWEN *et al.*, 2006). Parte da ativação dos genes da família Bcl-2 deve-se à quimioterapia do câncer (BOWEN *et al.*, 2006). É descrito que fatores produzidos pela família Bcl-2 possam participar da mucosite observada no trato gastrointestinal (KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004).

Outros achados da literatura demonstram que a expressão dos fatores de transcrição p53 e p21 pode estar relacionada com a apoptose e a proliferação intestinal (GIBSON *et al.*, 2005; BOWEN *et al.*, 2006). Pritchard *et al.* (1998) observou que camundongos deficientes para p53 (p53<sup>-/-</sup>) tratados com 5-FU tiveram menor resposta apoptótica quando comparado aos camundongos selvagens (p53<sup>+/+</sup>). Trabalhos de Gibson *et al.* (2005) demonstraram que MTX induziu aumento de apoptose nas criptas com aumento da expressão de p53.

Pode-se destacar o receptor FAS como participante da apoptose de vários tipos celulares (NAGATA, 1999). A ligação ao receptor FAS induz apoptose de células através da ativação de caspase 8 (STENNICKE; SALVESEN, 2000). Caspase 8 também pode ativar apoptose mediada via mitocondrial pela ativação do BID, que é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (LUO *et al.*, 1998)

### **1.5. Inflamação intestinal X Alterações funcionais**

No decorrer dos últimos anos, muitos autores tentaram buscar uma explicação para as alterações de motilidade observadas durante e após os processos inflamatórios da mucosa intestinal. Esses distúrbios são advindos de mudanças tanto na estrutura, como na função do intestino, além de serem também observados na fase pós-inflamatória (COLLINS, 1996; GROSSI; MCHUGH; COLLINS, 1993; HOSSEINI *et al.*, 1999). Esses autores demonstraram que após colite experimental induzida por ácido 2,4,6 – trinitrobenzenoasulfônico (TNBS), havia alteração na contratilidade tanto do músculo circular como do longitudinal do intestino. Porém, essas alterações não estão bem compreendidas. Observa-se na literatura que essas alterações de motilidade induzidas por inflamação podem

ocorrer por distúrbios de liberação de neurotransmissores do plexo mioentérico (JACOBSON; MCHUGH; COLLINS, 1997) e/ou por hipertrofia e hiperplasia muscular (MOREELS *et al.*, 2001).

Na tentativa de entender as mudanças na motilidade gastrointestinal advinda de processos inflamatórios vários modelos foram propostos. Depoortere *et al.* (1999) mostraram que colite induzida por TNBS, em coelhos, levava a um aumento de infiltrado celular na lâmina própria e era acompanhada da produção de leucotrieno B<sub>4</sub> e C<sub>4</sub>. Em relação ao músculo liso intestinal, observou-se uma menor responsividade a acetilcolina (ACh) e ao KCl, bem como a substância P (SP) e a motilina, porém em menor proporção. Em experimentos onde a inflamação intestinal foi induzida por *Schistosoma mansoni*, Moreels *et al.* (2001) demonstraram aumento da liberação de IL-1 $\beta$  em intestino de camundongos inflamados pelo *Schistosoma*. Essa liberação não foi observada na fase crônica. Collins (1996) já demonstrou que IL-1 $\beta$  tem grande importância na modulação da função neuromuscular durante inflamação gastrointestinal.

O aumento da contratilidade de tiras de intestino de camundongos infectados por *Schistosoma* foi observado quando induzidos por ACh, KCl, SP ou 5-HT. Esse aumento da contratilidade era percebido na 12<sup>a</sup> semana depois da infestação, ou seja, na fase de resolução. Quando na presença de indometacina, a atividade espontânea do músculo liso intestinal era diminuída, sugerindo atividade moduladora de prostaglandina na manutenção do tônus intestinal (MOREELS *et al.*, 2001).

Outros estudos de Moreels *et al.* (2001) utilizavam TNBS para induzir ileite em ratos, demonstraram que, no período da fase inflamatória, havia uma menor responsividade do músculo a agonistas, como acetilcolina (ACh). Enquanto,

no período pós-inflamatório, havia um aumento da responsividade, ou seja, hipercontração. Essa contração era bloqueada por 1  $\mu$ M de tetrodotoxina (TTX) e 1  $\mu$ M de atropina. Dessa forma, demonstra o bloqueio do plexo mioentérico é importante para a modulação do processo contrátil do músculo intestinal. Essa disfunção de motilidade resulta em risco maior para o desenvolvimento de síndrome do intestino irritável, sendo observado por Garcia-Rodriguez e Ruigomez (1999). Esses autores demonstraram que pacientes com episódios de gastroenterites têm o risco aumentado em 10 vezes para o aparecimento de síndrome do intestino irritável.

Existe evidência de que a hipercontratibilidade, observada em células de músculo liso intestinal de camundongos infectado por *Trichinella spirallis*, pode ser mediada por citocinas liberadas de células de células Th2. Isso foi observado quando essas células musculares, na presença de interleucina-13 (IL-13) e interleucina-4 (IL-4), apresentaram uma contração maior ao carbacol, comparada com a contração das células sem interleucinas. Essa ação pode ser mediada ou não pelo fator de transcrição 6 (STAT-6) (AKIHO *et al.*, 2002).

Na tentativa de esclarecer a disfunção da mucosa e da secreção colônica no período pós-inflamatório, Zamuner *et al.* (2003) encontraram dados de que ratos tratados com TNBS apresentavam, no período pós-colite, um aumento na expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2). Isso foi observado quando o cólon era tratado com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), onde a expressão de COX-2 estava aumentada em quase 700%, quando comparado ao cólon controle só tratado com LPS e sem colite. Essas observações sugerem a COX-2, como uma enzima chave na mediação da disfunção epitelial pós-colite, além do fato de que também o óxido nítrico (NO) juntamente com a COX-2 poderiam estar mediando as alterações observadas no

transporte e na barreira da mucosa intestinal, como foi mostrado por Resta-Lenert e Barrett (2002).

Trabalhos de Barbara, Vallance e Collins *et al.* (1997) mostraram uma persistente disfunção muscular depois da infecção de camundongos por *T. spirallis*. Foi observado que 28 dias após a infecção não havia atividade induzida de MPO e nem mudanças na morfologia da mucosa, porém a contração induzida pelo carbacol estava aumentada e continuava até 42 dias pós-infecção. Esse aumento da responsividade também foi observado pela contração promovida pela estimulação elétrica. Os autores sugerem que mediadores produzidos na fase inflamatória persistam na fase pós-inflamatória e que eles induzem essa disfunção de motilidade, porém, esse mecanismo ainda está desconhecido.

Além desses dados, há estudos na literatura demonstrando sintomas gastrintestinais decorrentes da terapia antineoplásica. Depois da introdução dos antagonistas dos receptores de serotonina, o cuidado desses problemas teve uma boa resolução (HICKOK *et al.*, 2003). Entretanto, pacientes sob terapia antineoplásica podem sofrer de outros sintomas, como dispepsia, disfagia e diarreia que não são controlados por drogas antieméticas (RIEZZO *et al.*, 2005). O conjunto desses sintomas foi denominado de síndrome dispéptica associado à quimioterapia do câncer. Recentemente, pesquisadores sugeriram que a causa dessa síndrome pode estar associadas às anormalidades da motilidade do trato gastrintestinal (RIEZZO *et al.*, 2001).

Os dados da literatura mostram, em parte, que as alterações da motilidade gastrintestinal, provenientes da inflamação intestinal, podem ser associadas ou causadas por eventos inflamatórios. Os mesmos resultados obtidos da literatura reforçam a hipótese de que as alterações funcionais advindas de

processos inflamatórios e pós-inflamatórios podem estar relacionadas às alterações estruturais do músculo liso gastrintestinal e/ou alterações neuronais, principalmente do plexo mioentérico. Essas observações sugerem que a inflamação do trato gastrintestinal pode causar significativas alterações funcionais, sendo que os possíveis mecanismos ainda não foram elucidados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar os mediadores inflamatórios e as alterações motoras gastrintestinais no curso da mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Reproduzir os modelos de mucosite intestinal por 5-FU em camundongos e ratos;
- Estudar o envolvimento de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-18, PAF, produtos da 5-LO na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos;
- Investigar o possível papel do FAS na mucosite intestinal por 5-FU em camundongos;
- Verificar, no rato, os efeitos da mucosite intestinal por 5-FU sobre o esvaziamento gástrico de líquidos, correlacionando com as alterações inflamatórias.

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais utilizados nos protocolos experimentais de mucosite intestinal**

- Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando entre 150 a 180g, procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC;
  
- Foram utilizados camundongos balb-c e c57/black machos, pesando entre 25 – 30g, e camundongos machos deficientes para: IL-4, IL-18, o receptor de PAF, 5-lipoxigenase e para FAS-ligante. Todos os animais foram procedentes do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com água e comida à vontade.
  
- Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e esse projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa com Animais das universidades envolvidas nesse trabalho.

### **3.2. Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos (adaptado por Carneiro-Filho *et al.*, 2004)**

Camundongos foram tratados com dose única de 150 e 450 mg/kg de 5-FU (i.p) (ICN Farmacêutica) e sacrificados após 3 dias. Os animais controles foram tratados com salina. Depois do sacrifício dos animais, amostras do duodeno, jejuno e íleo foram retiradas para análise histológica. Amostras do duodeno foram retiradas e congeladas em freezer -70°C para posterior avaliação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-6) e avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Amostras de sangue também foram coletadas para determinação da contagem total de leucócitos plasmáticos.

Para os camundongos os seguintes grupos experimentais foram construídos:

#### **3.2.1. Para avaliação do papel de IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-18 no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU.**

- Camundongos foram pré-tratados diariamente com antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  (100 mg/kg; IL-1Ra) e posteriormente tratados com 5-FU (450 mg/kg);
- Camundongos deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg);
- Camundongos deficientes para IL-18 (IL-18 -/-) foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg);

### **3.2.2. Para avaliação do papel do PAF e de 5-lipoxigenase (5-LO) no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU.**

- Camundongos foram pré-tratados diariamente com antagonista do receptor de PAF (BN 52021-s.c.; 20 mg/kg) e posteriormente tratados com 5-FU (450 mg/kg);
- Camundongos deficientes para 5-LO (5-LO -/-) foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg);

### **3.2.3. Para avaliação do papel de FAS no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU.**

- Camundongos deficientes para FAS (FAS-ligante -/-) foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg);

### **Parâmetros avaliados na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.**

### **3.3. Leucograma**

O método de avaliação dos leucócitos plasmáticos foi comum para os camundongos e ratos. Esses animais foram anestesiados com éter e amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital ou da punção cardíaca. O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado depois da diluição com solução de Turk. A contagem dos leucócitos plasmáticos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso de microscópio ótico (100X; Nikon). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contado 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<sup>o</sup> células/mm<sup>3</sup>.

### **3.4. Análise morfométrica e histopatológica**

Os segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos e fixados em formol a 10%, depois, processados de acordo com os protocolos histológicos, e, ao final, foram cortados (5  $\mu$ m) e fixados em hematoxilina e eosina.

Os segmentos intestinais foram avaliados para obtenção da altura dos vilos e da profundidade das criptas, utilizou-se microscópio ótico acoplado ao um sistema de aquisição de imagens (LEICA). Foram obtidas as medidas de 10 vilos e de 10 criptas para se obter a medida estimada da altura dos vilos e da profundidade das criptas dos camundongos controle (salina) e dos camundongos tratados com 5-FU.

### **3.5. Ensaio para mieloperoxidase**

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. Resumidamente, 50 a 100 mg do duodeno de camundongos submetidos ao tratamento com 5-FU e dos animais controle (salina), foram colocados num tampão 1 (NaCl 0,1 M + NaEDTA 0,015 M/L de NaPO<sub>4</sub> 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, homogeneizados num Politron (13000 rpm). Sendo centrifugado a 15 minutos (3000 rpm). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado no tampão 1 e colocado para centrifugar nas mesmas condições. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado (Politron - 13000 rpm) em um

tampão 2 [HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO<sub>4</sub> 0,05M]. A próxima etapa foi colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2X).

Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado na placa (5-10 µl) + 45 µl de NaPO<sub>4</sub> 0,08M e mais a solução de leitura [TMB 25 µl (5 min) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µl (5 min)]. A reação foi terminada com o acréscimo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450nm. Assim, o infiltrado neutrofílico foi obtido a partir de uma curva padrão de neutrófilos.

### **3.6. Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e KC) no duodeno de camundongos tratados com 5-FU**

A concentração de citocinas foi determinada através do seu conteúdo no duodeno de camundongos controle (salina) e tratado com 5-FU. Após o sacrifício dos camundongos (3<sup>o</sup> dia experimental), o duodeno foi removido e congelado a -70°C para posterior homogeneização e coleta do sobrenadante para dosagem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e KC (SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995). A detecção das concentrações dessas citocinas foi realizada por ELISA, conforme protocolo de Cunha et al. (1993), o qual seguiu as seguintes etapas:

**3.6.1.** incubação com 2 µg/mL de anticorpo anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-IL-4 ou anti-KC diluídos em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100 µL/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C;

**3.6.2.** lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v;

**3.6.3.** bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 µL/poço por duas horas à temperatura ambiente;

**3.6.4.** lavagem da placa (3x);

**3.6.5.** incubação com a curva padrão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 ou KC diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100  $\mu$ L/poço por 16-24h a 4°C);

**3.6.6.** lavagem da placa (3x);

**3.6.7.** incubação com anticorpo biotilado diluído 1:1.000 em tampão de lavagem contendo 1% de BSA por uma hora à temperatura ambiente;

**3.6.8.** lavagem da placa (3x);

**3.6.9.** incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5.000 em tampão de lavagem, 100  $\mu$ L/poço por 15 minutos à temperatura ambiente;

**3.6.10.** lavagem da placa (3x);

**3.6.11.** incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100  $\mu$ L/poço, cobriu-se a placa e deixou-se no escuro por 5-20 minutos na temperatura ambiente;

**3.6.12.** a reação foi paralisada com 150  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M;

**3.6.13.** leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

Os resultados foram expressos em pg/mL como a curva padrão.

### **3.7. Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos**

Os ratos foram tratados com dose única de 5-FU (150 mg/kg, ICN Farmacêutica). Os animais controles foram tratados com salina. Os ratos foram sacrificados depois 1, 3, 5, 15 ou 30 após a administração de 5-FU. Depois do sacrifício, amostras do estômago e do duodeno, jejuno e íleo de ratos foram retiradas para análise histológica. Partes dessas amostras foram retiradas e

congeladas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e dosagem de glutathiona (GSH). Amostras de sangue também foram coletadas para determinação da contagem total de leucócitos plasmáticos.

### **Parâmetros avaliados na mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos.**

#### **3.8. Avaliação da sobrevida**

Diariamente registrou-se a mortalidade dos animais para se avaliar a taxa de sobrevida após o tratamento com 5-FU.

#### **3.9. Análise ponderal**

Os ratos foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em variável de peso, em relação ao peso inicial.

#### **3.10. Análise morfométrica e histopatológica**

Os segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos e fixados em formol a 10%. Depois, foram processados de acordo com os protocolos histológicos e, por fim, foram cortados ( $5\ \mu\text{m}$ ) e fixados em hematoxilina e eosina.

Os segmentos intestinais foram avaliados para obtenção da altura dos vilos e da profundidade das criptas, utilizando-se microscópio ótico com ocular milimetrada ou sistema de aquisição de imagens e posteriormente houve a utilização do software de medida (LEICA). Foram obtidas a medida de 10 vilos e criptas para

obter a medida estimada da altura dos vilos e da profundidade das criptas dos animais controle e dos animais com mucosite intestinal nos dias avaliados.

### **3.11. Análise do índice de apoptose e mitose das criptas do duodeno, jejuno e íleo de ratos**

As criptas obtidas do duodeno, jejuno e íleo de ratos também foram avaliadas para os índices de apoptose e mitose nos dias 1, 3, 5 e 15 após o tratamento com 5-FU. O mesmo procedimento foi realizado para os animais controle. A razão entre as células das criptas com achados apoptóticos (segmentação e condensação nuclear, corpos apoptóticos) do total de células na cripta foi obtida pela determinação de um número de 20 criptas analisadas para cada amostra. Para a avaliação da recuperação da mucosa intestinal após a mucosite, foi avaliado o índice de mitose nas células da base da cripta. Os achados de mitose foram obtidos de um número de 20 criptas analisadas do total de células na cripta. A medida foi obtida através de um microscópio ótico com uma resolução de 400X. Os valores absolutos foram obtidos e, assim, produzimos os índices de apoptose e mitose para cada grupo experimental (controle e tratado com 5-FU).

### **3.12. Ensaio para mieloperoxidase**

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. Resumidamente, 50 a 100 mg do duodeno, jejuno e íleo dos animais submetidos a mucosite induzida por 5-FU. Depois de os

segmentos serem pesados, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados num Politron. A seguir, o homogenato será centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos. A atividade da MPO por mg de tecido foi determinada através da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982), utilizou-se 0,0005% de peróxido de nitrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO será definida como aquela capaz de converter 1 mM de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto.

### **3.13. Determinação de glutathiona**

A concentração de GSH nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foi avaliada utilizando-se o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As amostras obtidas de intestinos (100 mg/ml) foram homogeneizadas em 0.02 M EDTA. Alíquotas de 400 µl do homogenato foram misturadas com 320 µl de H<sub>2</sub>O destilada e 80 µl de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa, o material foi centrifugado por 15 min em rotação de 3,000g a uma temperatura de 4°C. Depois da centrifugação, novas alíquotas de 400 µl do sobrenadante foram misturadas com 800 µl de tampão TRIS com concentração de 0.4 M, pH 8.9 e com 20 µl 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoic acid (DTNB, Fluka) e agitadas por 3 min. A absorbância foi lida depois do acréscimo de DTNB e da agitação em 412 nm contra um reagente branco (sem o homogenato). A concentração de GSH era expressa por µg/mg de tecido.

### **3.14. Avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal por cintilografia em ratos acordados**

Para esse teste, foram obtidos três grupos de ratos: um controle, outro com mucosite intestinal e sacrificados 3 dias após a administração de 5-FU e um grupo com mucosite intestinal e sacrificado 15 dias após a administração de 5-FU. A partir disso, passados 3 dias ou 15 dias, os animais foram deixados em jejum por 18 horas antes do experimento. No dia do experimento, receberam uma solução de salina glicosada (5%) no volume de 1 ml da solução/por 100 g de peso contendo 500  $\mu\text{Ci}$  de  $^{99\text{m}}$ tecnécio (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo, SP, Brasil), por gavagem. Passados 30 min da gavagem, os animais foram sacrificados por decapitação e o estômago e intestino delgado e grosso foram isolados pelas seguintes junções: esôfago-gástrica, gastroduodenal, íleo-cecal e retosigmoidal. Depois da exposição, o estômago e o intestino delgado (separado em 5 segmentos similares e consecutivos P1- P5) foram colocados dentro de dedos de luvas até a contagem da atividade radioativa em ordem para evitar mistura dos conteúdos. A radioatividade dos tecidos isolados foi contada com a utilização de uma gama câmara (Orbiter Stand; Siemens Gamasonics, Hoffman Estates, IL, USA). Os resultados foram construídos a partir do número de pixels por minuto, depois de retirado do cálculo a atividade do “background”.

A retenção da radioatividade gástrica foi expressa em percentagem, de acordo com o seguinte cálculo: retenção gástrica = total da radioatividade recuperada do estômago e o total da radioatividade recuperada do trato gastrintestinal de todos os segmentos (P1-P5).

A retenção da radioatividade intestinal foi expressa em percentagem, de acordo com o seguinte cálculo: retenção de cada segmento intestinal (P1-P5) = total da radioatividade recuperada de cada segmento / diminuída do total da radioatividade recuperada de todos os segmentos intestinais (P1-P5) (SOUZA *et al.*, 2003).

O trânsito intestinal da refeição foi estimado de acordo com o método do centro geométrico (MILLER; GALLICAN; BURKS, 1981). De acordo com este princípio, obtivemos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago, delgado 2, delgado 3, delgado 4, delgado 5, delgado 6 e cólon) pelo dígito identificador de cada segmento: (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente). A somatória desses valores indica o centro geométrico da refeição radioativa propelida ao longo do intestino, aos moldes do centro de massa dos objetos (Figura 4).

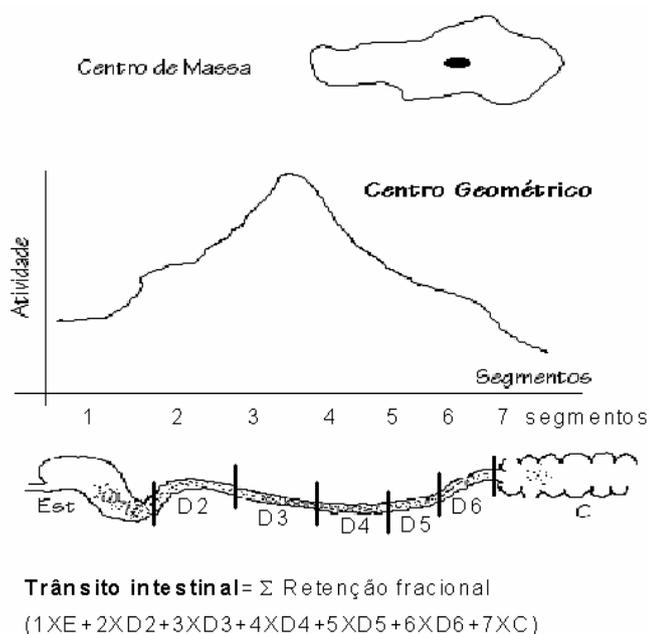


Figura 4. Representação esquemática do centro geométrico de uma refeição teste.

### **3.15. Medidas de contratilidade**

Foram utilizados tiras longitudinais do fundo de estômago e duodeno de ratos com e sem mucosite intestinal (1-5 cm) no 3° e 15° dia experimental. Essas tiras foram lavadas para limpeza e retirada de resíduos com solução nutritora de Tyrode Normal (pH= 7.4), composição (mmol/l): 128 NaCl, 4,5 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125 NaHCO<sub>3</sub> e 5,55 glicose. As tiras foram montadas em câmaras orgânicas com volume de 25 ml, com solução de Tyrode, a temperatura de 37°C, pH= 7.4, oxigenadas com mistura de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> (AUBÉ *et al.*, 1996). Uma das extremidades da tira foi presa à base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico (modelo Panlab S.L, Barcelona, Espanha). Foram aplicadas aos tecidos uma tensão de 1 g por um período de equilíbrio de 60 minutos. Para avaliar a responsividade do tecido, utilizou-se carbacol (0,1 nM – 1 mM) e KCl na concentração de 60 mM.

### **3.16. Análise Estatística**

De todos os experimentos foram calculadas as médias  $\pm$  EPM de um certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Bonferroni. Uma diferença de  $p < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos c57/black e balb-c.**

Tanto a dose 150 mg/kg como a de 450 mg/kg de 5-FU induziu intensa leucopenia nos camundongos balb-c e c57/black, sacrificados após três dias do tratamento com 5-FU (Tabela 1 e 2).

A dose 150 mg/kg de 5-FU induziu diminuição na altura dos vilos e da razão vilo/cripta no jejuno (Figura 5A e C) e aprofundamento das criptas no íleo de camundongo balb-c (Figura 5B). Para o camundongo c57/black, essa dose de 5-FU causou diminuição da altura dos vilos e da razão vilo/cripta no íleo (Figura 7A e C). Na dose de 450 mg/kg de 5-FU, encontraram-se lesões intestinais mais importantes do que as observadas na dose de 150mg/kg de 5-FU. A dose de 450 mg/kg de 5-FU induziu diminuição na altura dos vilos e na razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 5A, C). Em relação ao aprofundamento das criptas, observou-se aumento no duodeno e íleo dos animais balb-c tratados com 5-FU quando comparado aos animais controle (Figura 5B). Para o camundongo c57/black, essa dose de 5-FU induziu diminuição na altura dos vilos e na razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 7A, C), bem como um aprofundamento das criptas no duodeno e íleo dos animais c57/black tratados com 5-FU comparado aos animais controle (Figura 7B).

Na fotomicrografia 6B, D e F observou-se que o 5-FU (450 mg/kg) alterou a morfologia do duodeno, jejuno e íleo, respectivamente, dos camundongos balb-c. Pode-se destacar diminuição dos vilos, aprofundamento e vacuolização das criptas e perda da arquitetura dos enterócitos para os três segmentos estudados, em comparação aos segmentos dos animais controle (Figura 6A, C e E). Encontraram-

se alterações semelhantes no duodeno (Figura 8B), no jejuno (Figura 8D) e no íleo (Figura 8F) dos camundongos c57/black tratados com 5-FU (450 mg/kg), quando comparado aos segmentos dos animais controle (Figura 8A, C e E).

Percebeu-se que o tratamento com 5-FU na dose de 450 mg/kg induziu um importante aumento da infiltração de neutrófilos para o duodeno tanto nos camundongos balb-c (Figura 9A) como nos camundongos c57/black (Figura 9B), sacrificados após 3 dias do tratamento com 5-FU.

Também se observou que o tratamento com 5-FU na dose de 450 mg/kg induziu aumento na concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC no duodeno tanto dos camundongos balb-c como dos camundongos c57/black (Tabela 3). Em relação à IL-4, observamos um aumento da concentração desta citocina, somente no duodeno dos camundongos balb-c, mas não nos camundongos c57/black (Tabela 3).

**Tabela 1 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sanguíneos em camundongos balb-c.**

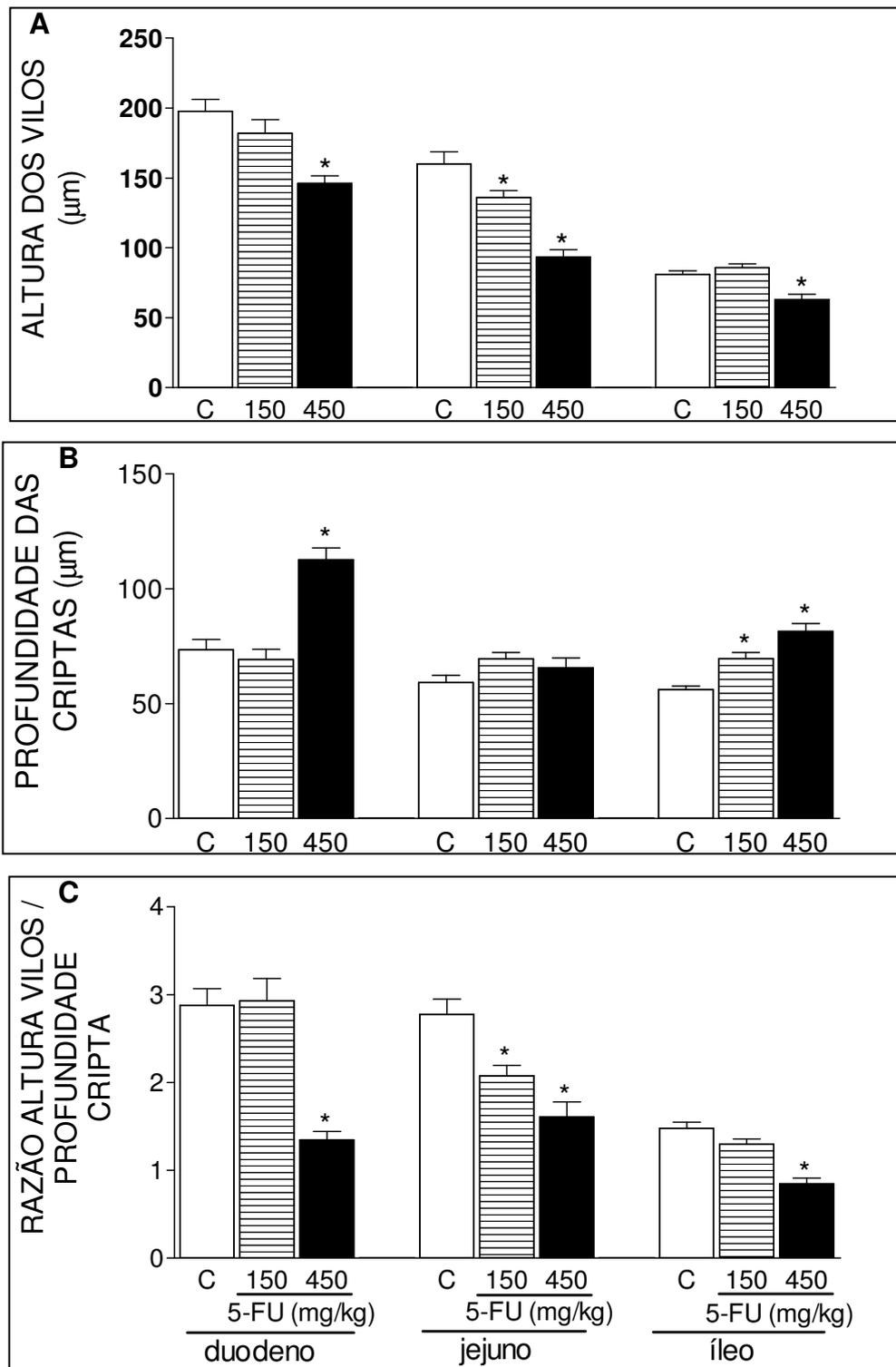
<b>Grupos Experimentais (n=8)</b>	<b>nº células/mm<sup>3</sup></b>
Salina (controle)	6768,00±1002,00
balb-c + 5-FU (150 mg/kg)	2086,00 ±463,50*
balb-c + 5-FU (450 mg/kg)	1746,00±371,00*

Os valores representam a média ± E.P.M. \*p<0,05 quando comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

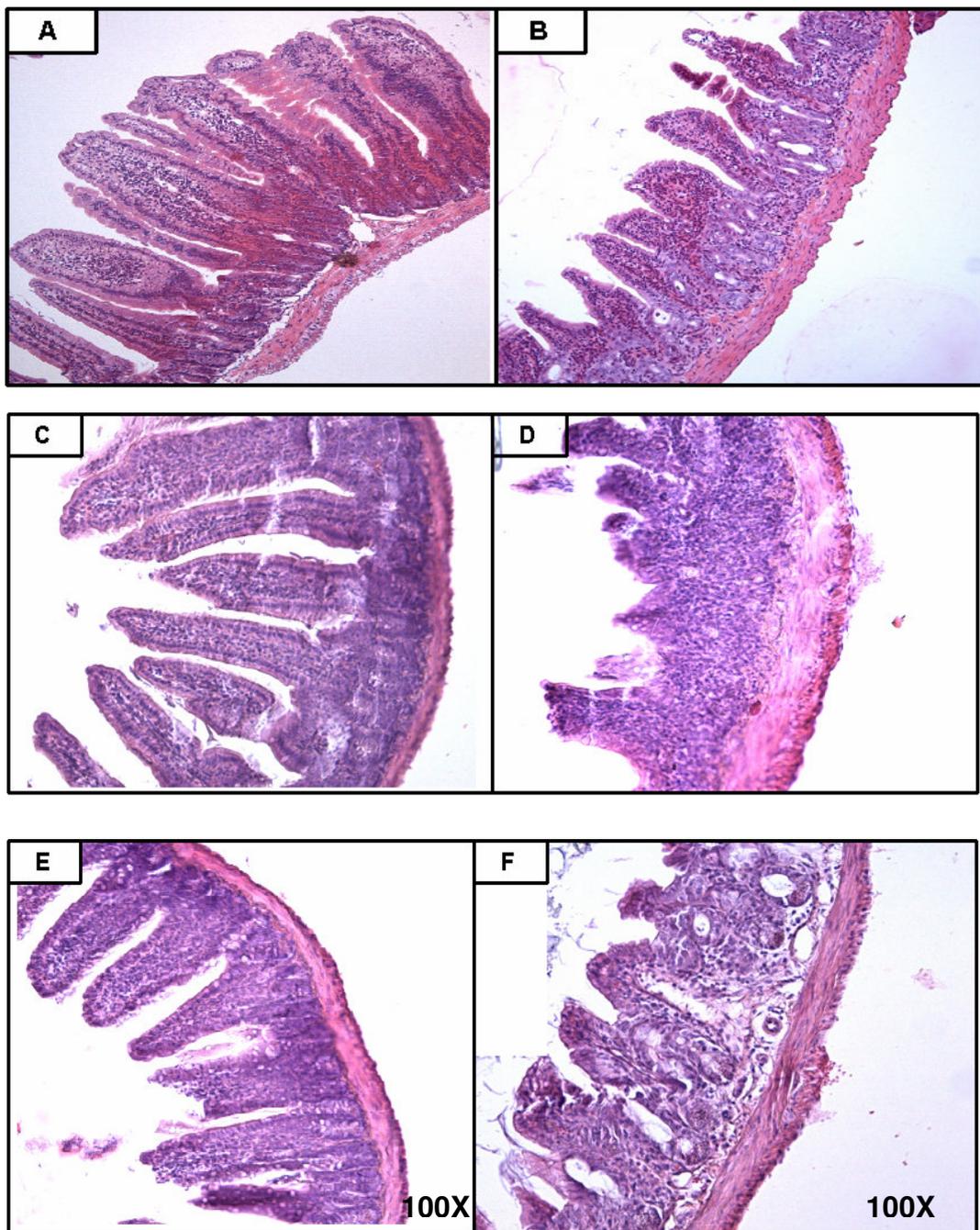
**Tabela 2 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sanguíneos em camundongos c57/black.**

<b>Grupos Experimentais (n=8)</b>	<b>nº células/mm<sup>3</sup></b>
Salina (controle)	7578,00±1063,00
c57/black + 5-FU (150 mg/kg)	1625,00±340,50*
c57/black + 5-FU (450 mg/kg)	1585,00±247,30*

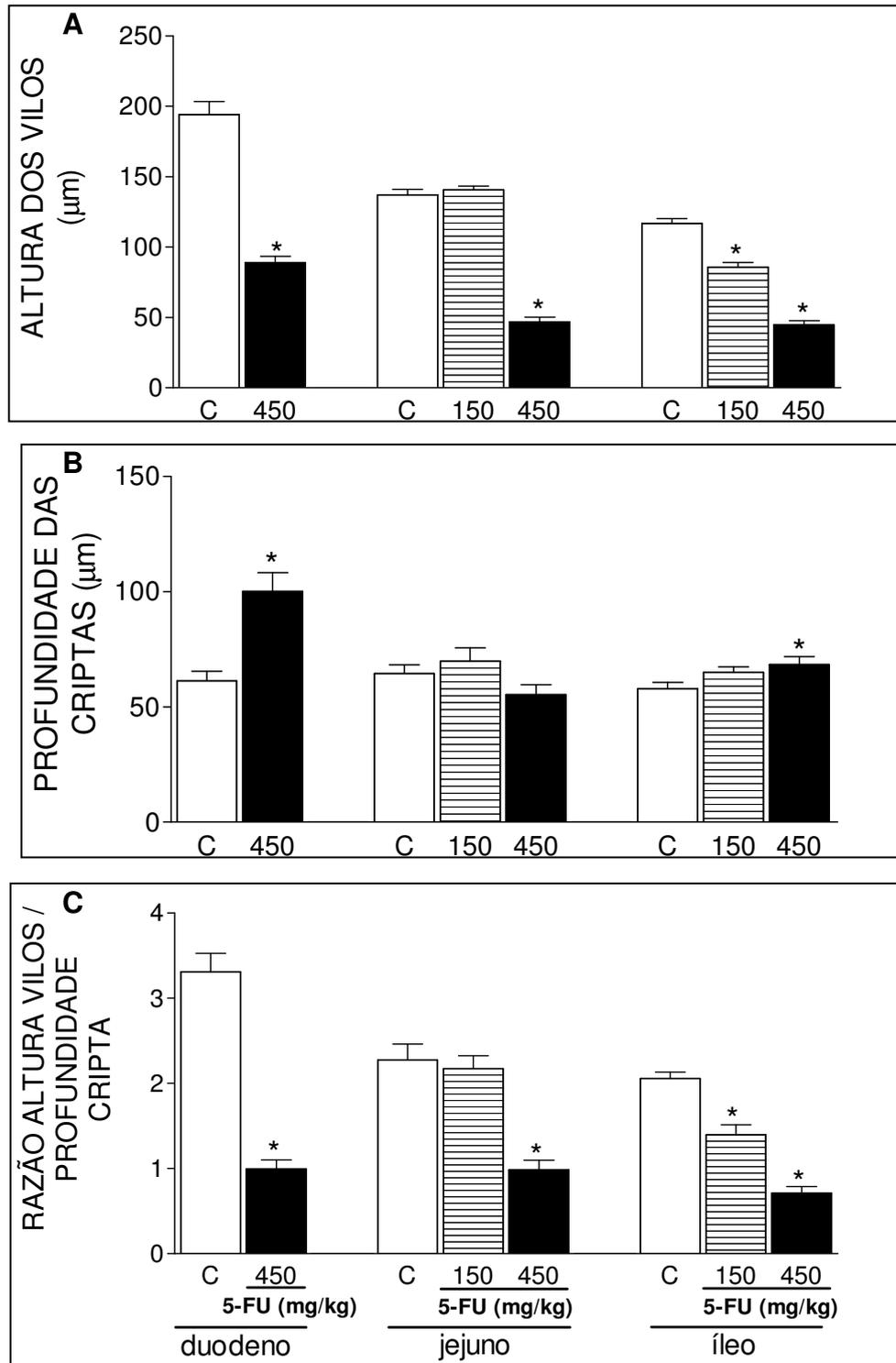
Os valores representam a média ± E.P.M. \*p<0,05 quando comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



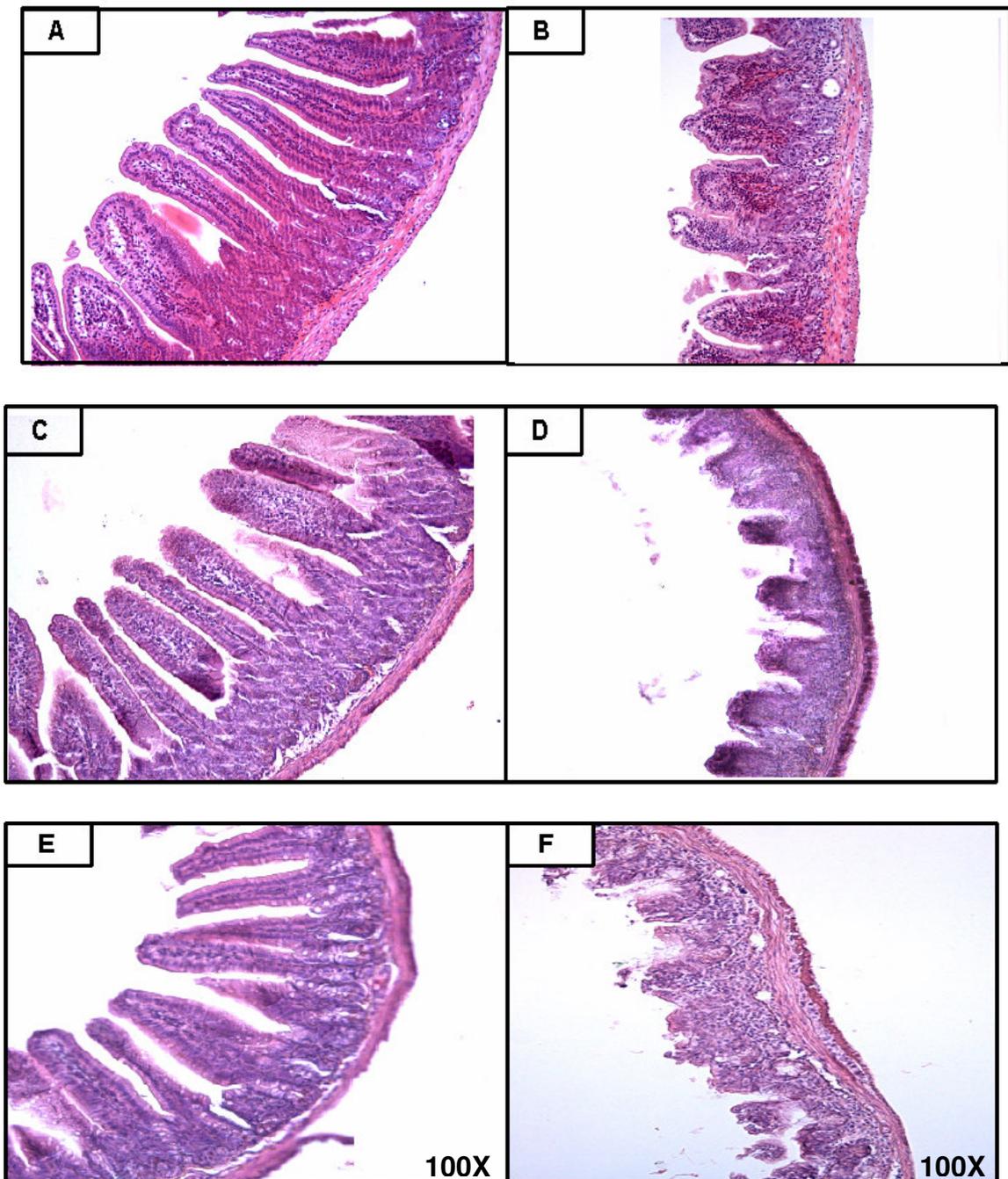
**FIGURA 5 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos balb-c (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (150 e 450 mg/kg) e sacrificados após três dias. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (C), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



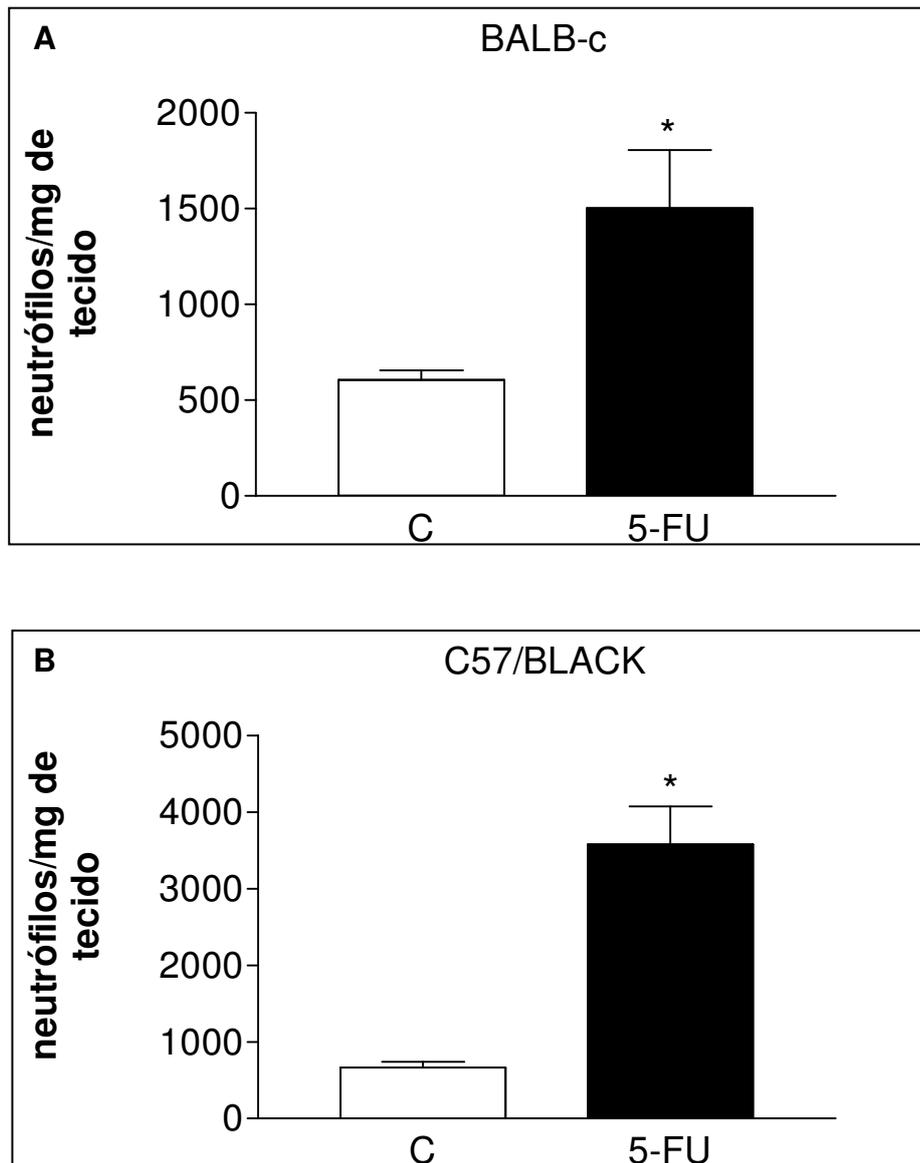
**FIGURA 6 – Fotomicrografias de segmentos intestinais de camundongos balb-c tratados com salina ou 5-FU.** Os animais foram tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg) dose única (i.p.), e sacrificados após três dias. Segmentos intestinais foram removidos e processados (A-duodeno; C-jejuno; E-íleo, dos animais salina (controle) e B-duodeno; D-jejuno; F-íleo, dos animais com mucosite intestinal, 100x). Segmentos intestinais de animais controle mostrando vilos e criptas (A, C, E) preservados. Segmentos intestinais de animais que receberam 5-FU, mostrando encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas (B, D, F).



**FIGURA 7 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos c57/black (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (150 e 450 mg/kg) e sacrificados após três dias. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (C), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 8 – Fotomicrografias de segmentos intestinais de camundongos c57/black tratados com salina ou 5-FU.** Os animais foram tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg) dose única (i.p.), e sacrificados após três dias. Segmentos intestinais foram removidos e processados (A-duodeno; C-jejuno; E-íleo, dos animais salina (controle) e B-duodeno; D-jejuno; F-íleo, dos animais com mucosite intestinal, 100x). Segmentos intestinais de animais controle mostrando vilos e criptas (A, C, E) preservados. Segmentos intestinais de animais que receberam 5-FU, mostrando encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas (B, D, F).



**FIGURA 9 – 5-FU induziu infiltração neutrofílica no duodeno de camundongos balb-c (n=8) e c57/black (n=8).** Os animais foram tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) dose única (i.p.), e sacrificados após três dias. Uma porção do duodeno foi retirada para determinar o n° de neutrófilos. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do n° de neutrófilos do tecido sendo analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni. \* $p < 0,05$  quando comparados ao grupo salina (C).

**Tabela 3 – Dosagem de citocinas no duodeno de camundongos balb-c e c57/black tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg).**

Grupos (n=8)	Citocinas (pg/300µl)				
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	KC	IL-4
Salina+balb-c	6,90 $\pm$ 0,96	21,51 $\pm$ 13,53	2,50 $\pm$ 0,64	98,58 $\pm$ 21,67	37,80 $\pm$ 4,48
Salina+c57/black	7,43 $\pm$ 0,97	134,80 $\pm$ 31,94	19,42 $\pm$ 1,11	86,92 $\pm$ 21,19	43,20 $\pm$ 4,87
5-FU+balb-c	16,62 $\pm$ 4,27 <sup>#</sup>	553,90 $\pm$ 204,60 <sup>#</sup>	35,68 $\pm$ 7,23 <sup>#</sup>	357,10 $\pm$ 108,40 <sup>#</sup>	56,14 $\pm$ 5,83 <sup>#</sup>
5-FU+c57/black	12,13 $\pm$ 1,17 <sup>*</sup>	280,30 $\pm$ 41,53 <sup>*</sup>	29,67 $\pm$ 3,93 <sup>*</sup>	177,20 $\pm$ 28,16 <sup>*</sup>	48,09 $\pm$ 5,10

Os valores representam a media  $\pm$  E.P.M.

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo salina (balb-c);

<sup>\*</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo salina (c57/black);

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.2. 5-FU induz mucosite intestinal em camundongos com participação de IL-1 $\beta$ e IL-4, mas não de IL-18.**

O tratamento com IL-1Ra (100 mg/kg), em camundongos c57/black com mucosite intestinal induzida por 5-FU (450 mg/kg), não reverteu a leucopenia (Tabela 4), mas foi capaz de reverter à diminuição da altura dos vilos e da razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 10A e C). Ademais, esse tratamento reverteu o aprofundamento das criptas do duodeno dos camundongos c57/black tratados com 5-FU após três dias (Figura 10B). Na fotomicrografia da Figura 11E e F observou-se que o tratamento com IL-1Ra protegeu o duodeno dos camundongos c57/black das alterações morfológicas já descritas e observadas na Figura 10 C e D, que demonstrou um duodeno semelhante aos dos camundongos controle (Figura 11A e B). Além desses dados, observamos que o tratamento com IL-1Ra reverteu a infiltração de neutrófilos (Tabela 5) e o aumento da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC (Tabela 6) no duodeno dos camundongos c57/black tratados com 5-FU.

Os camundongos IL-4 (-/-) apresentaram leucopenia após o tratamento com 5-FU (450 mg/kg) semelhante aos camundongos selvagens (IL-4 +/+) que receberam o mesmo tratamento (Tabela 4). Porém, os camundongos IL-4 (-/-) tiveram uma menor redução da altura dos vilos e da razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo após o tratamento com 5-FU em comparação aos camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 12A e C). Os camundongos IL-4 (-/-) tratados com 5-FU também tiveram um menor aprofundamento das criptas do duodeno e íleo, em relação aos camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 12B). Na fotomicrografia da Figura 13 E e F, observou-se que o duodeno dos camundongos IL-4 (-/-) tratados com 5-FU não apresentam diminuição da altura dos vilos e nem

aprofundamento das criptas, como foi observado nos camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 13C e D). Além desses dados, observou-se que os camundongos IL-4 (-/-) tratados com 5-FU apresentaram menor infiltração de neutrófilos (Tabela 7) e menor aumento na concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC (Tabela 8) no duodeno em comparação ao duodeno dos animais selvagens tratados com 5-FU.

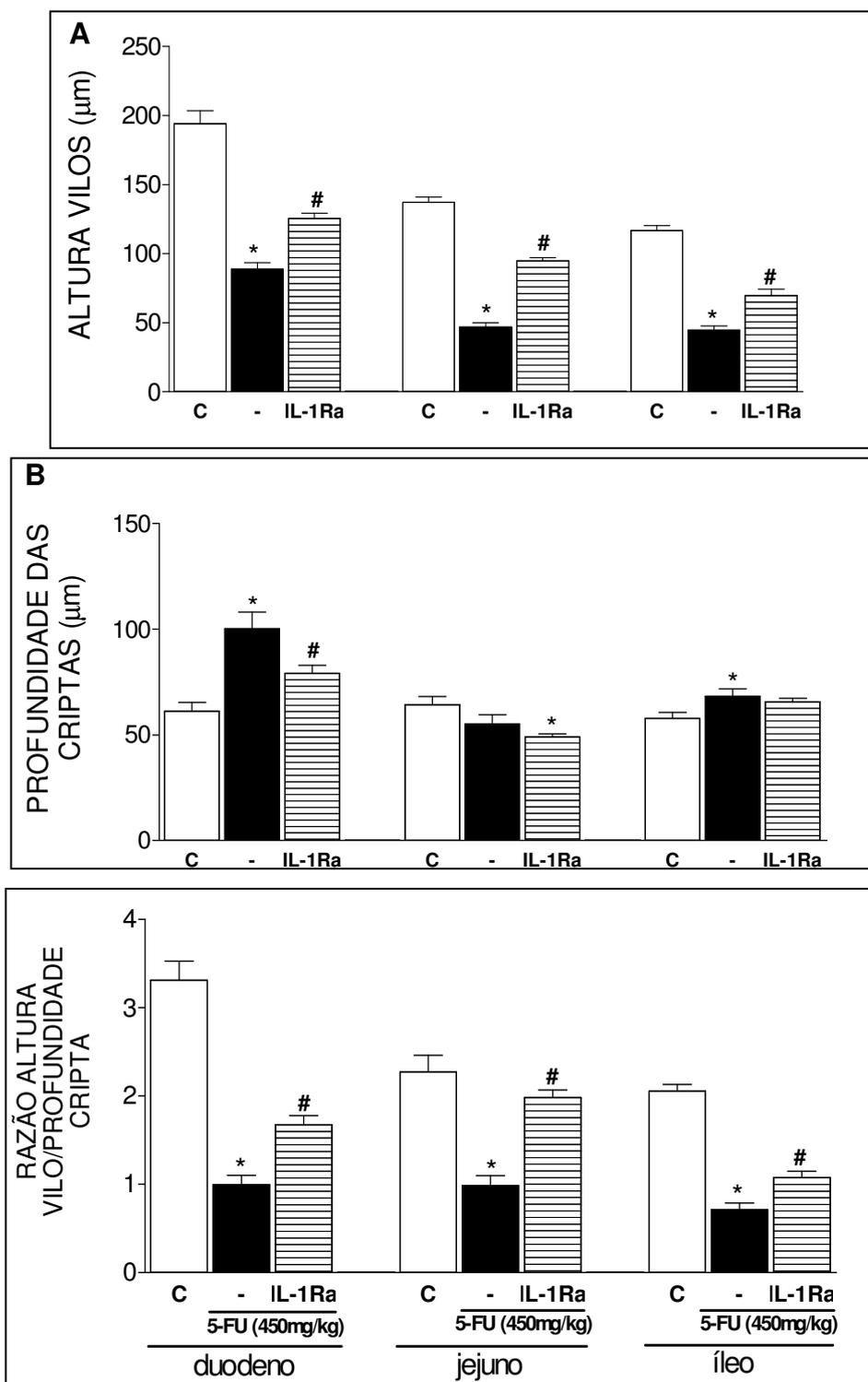
Os camundongos IL-18 (-/-) apresentaram leucopenia após o tratamento com 5-FU (450 mg/kg) semelhante aos camundongos selvagens (IL-18 +/+) tratados com 5-FU (Tabela 4). Bem como, observou-se importante redução na altura dos vilos no duodeno, jejuno (Figura 14A), e na razão vilo/cripta do duodeno e jejuno (Figura 14C). Essas alterações foram mais acentuadas do que as observadas nos animais selvagens tratados com 5-FU (Figura 14A e C). Mas no íleo a redução da razão vilo/cripta foi menos acentuada (Figura 14C). Observou-se aprofundamento das criptas do duodeno (Figura 14B), no jejuno e íleo. O aprofundamento foi menos acentuado após o tratamento com 5-FU em relação aos camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 14A, B e C). Observando a fotomicrografia do duodeno dos camundongos IL-18 (-/-) tratados com 5-FU podemos encontrar diminuição dos vilos, aprofundamento e vacuolização das criptas, vacuolização e perda da arquitetura dos enterócitos (Figura 15E e F), achados semelhantes aos encontrados no duodeno de camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 15C e D).

**Tabela 4 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sanguíneos de camundongos tratados com IL-1Ra e de camundongos deficientes para IL-4 e IL-18.**

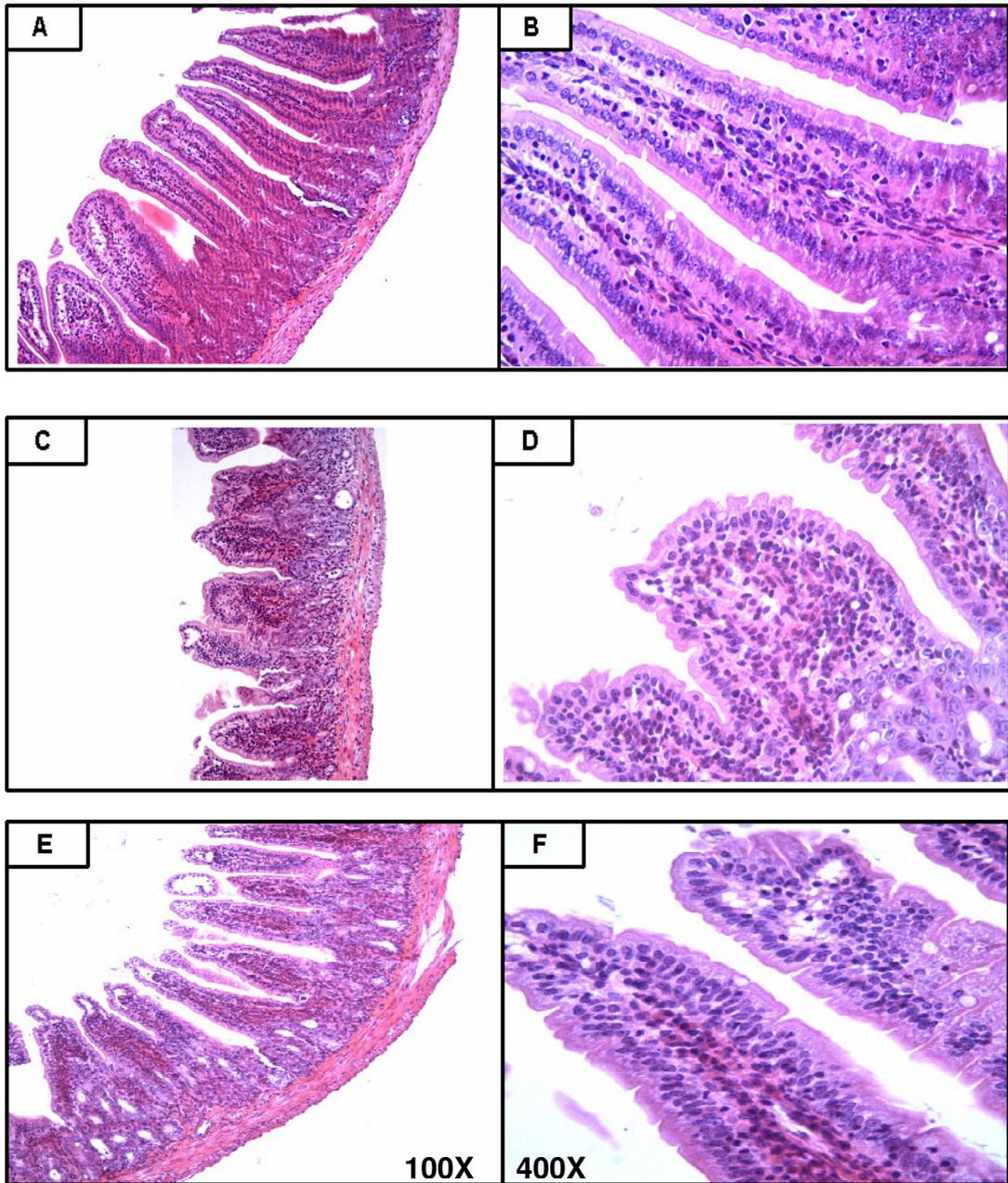
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>nº células/mm<sup>3</sup></b>
controle (selvagem)	7173,00±1032,50
IL-1Ra (100mg/kg) + 5-FU (450 mg/kg)	1880,00±421,50*
IL-4 (-/-) + 5-FU (450 mg/kg)	2513,00±166,30*
IL-18 (-/-) + 5-FU (450 mg/kg)	2238,00±268,00*

Os valores representam a média ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle (balb-c). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 10 – Efeito do tratamento com IL-1Ra sobre as alterações morfométricas dos segmentos intestinais de camundongos c57/black (n=8) tratados com 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) + salina ou 5-FU + IL-1Ra (100 mg/kg). Após o sacrifício, segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilo/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (C); # $p < 0,05$  comparado ao grupo 5-FU + salina (-), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 11 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos controle (A-B), e submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU pré-tratados com salina (C-D) e IL-1Ra (E-F).** Os animais receberam salina (controle) ou 5-FU (450 mg/kg) + salina ou 5-FU + IL-1Ra (100 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado (A-B; duodeno controle); (C-D; duodeno + 5-FU); (E-F; duodeno + 5-FU + IL-1Ra). O duodeno dos animais que receberam IL-1Ra mostrando vilos e criptas semelhantes ao duodeno controle. (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

**Tabela 5 – O tratamento com IL-1Ra reduziu a infiltração de neutrófilos induzida por 5-FU no duodeno de camundongos c57/black.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>n °neutrófilos/mg de tecido</b>
Controle (salina)	663,50±76,50
5-FU+salina	3579,00±492,00*
5-FU+IL-1Ra (100 mg/kg)	2061,00±308,20 <sup>#</sup>

Os valores representam a media ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle (salina);

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+salina;

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni..

**Tabela 6 – O tratamento com IL-1Ra reverteu o aumento da concentração de citocinas induzida por 5-FU no duodeno de camundongos c57/black.**

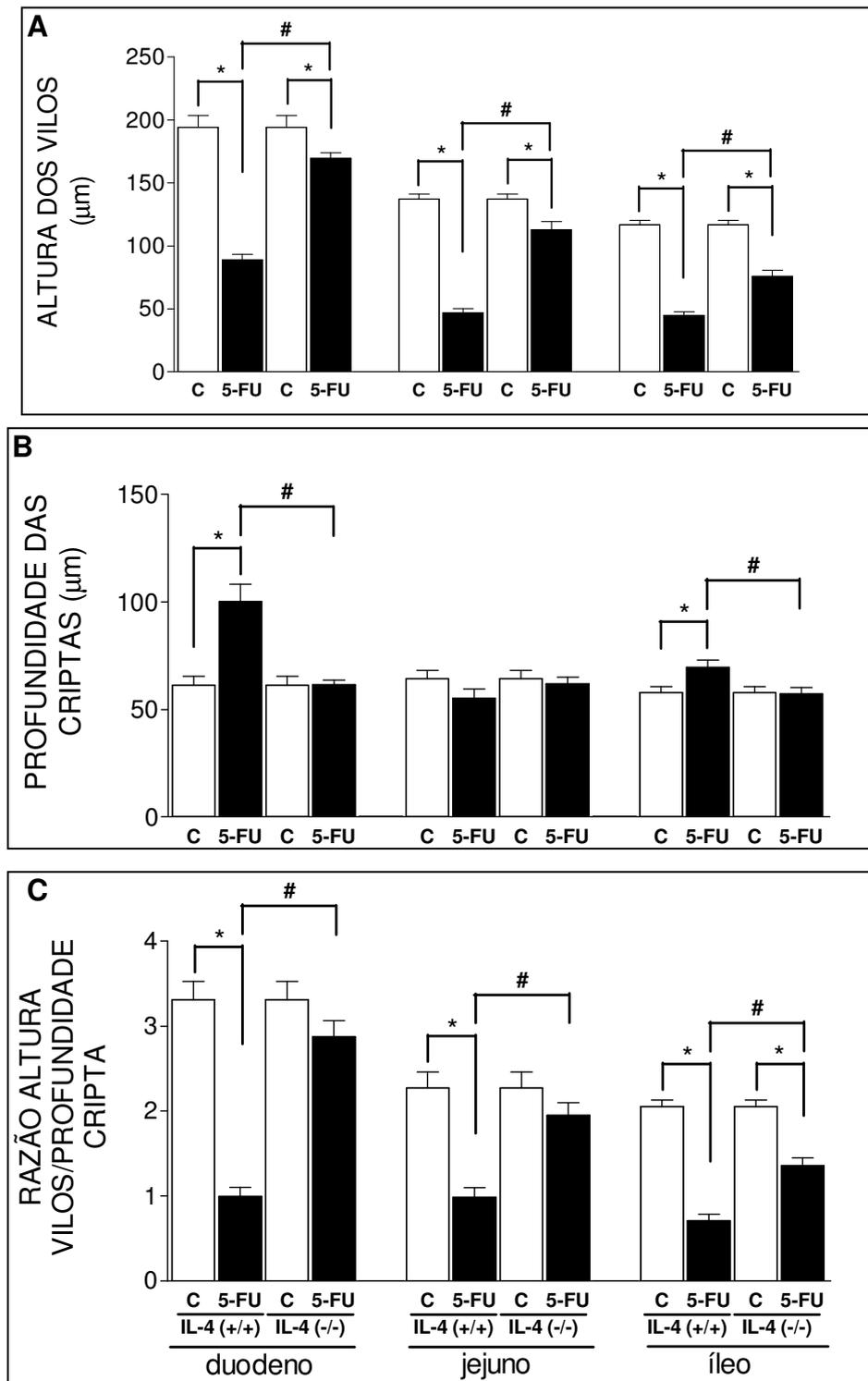
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>Citocinas (pg/300µl)</b>			
	<b>TNF-α</b>	<b>IL-1β</b>	<b>IL-6</b>	<b>KC</b>
Controle (salina)	7,43±0,97	134,80±31,94	19,42±1,11	86,92±21,19
5-FU+salina	12,13±1,17*	280,30±41,53*	29,67±3,93*	177,20±28,16*
5-FU+IL-1Ra (100 mg/kg)	6,97±1,11 <sup>#</sup>	98,64±41,70 <sup>#</sup>	23,60±2,82	100,00±17,11 <sup>#</sup>

Os valores representam a media ± E.P.M.

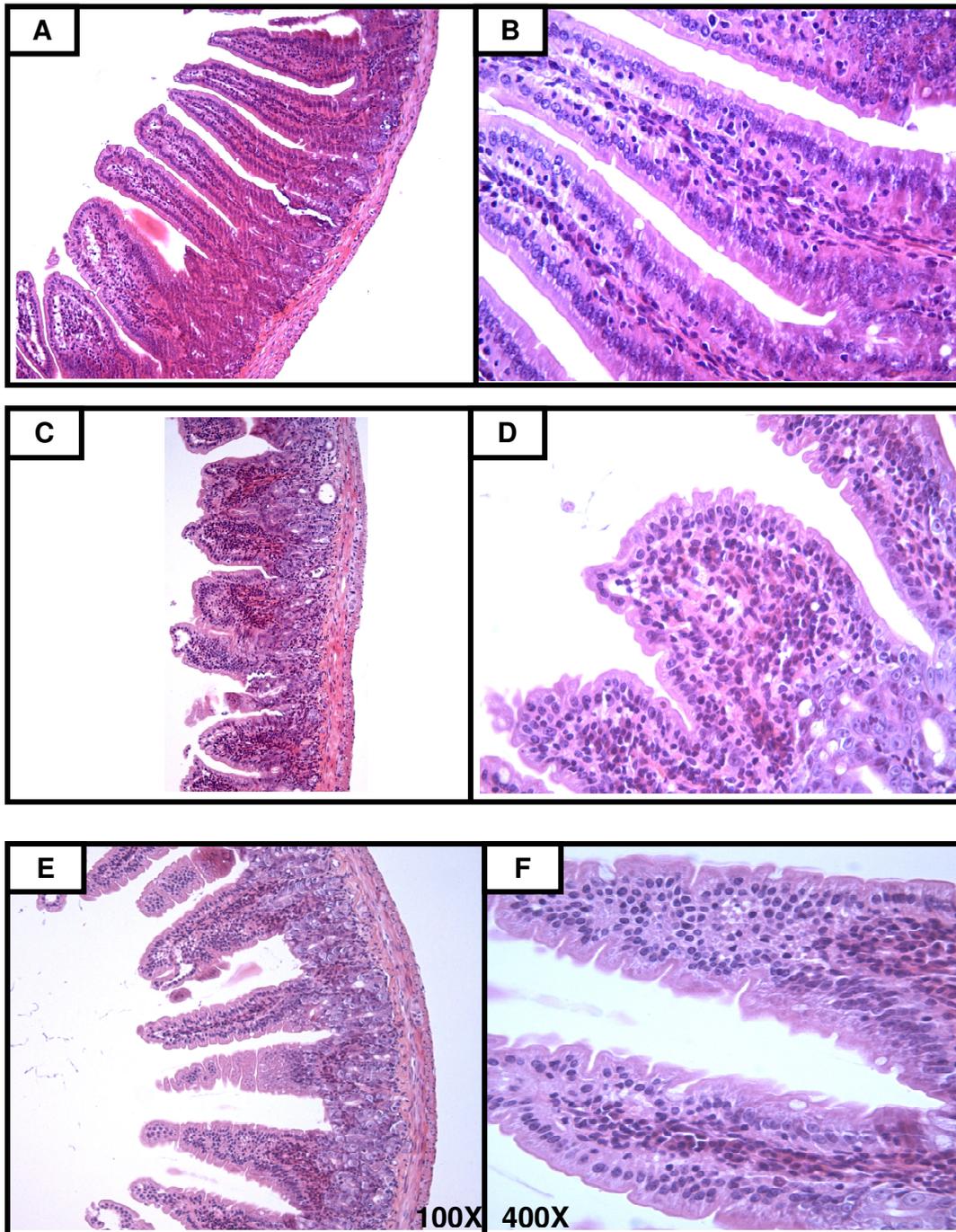
\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle (salina);

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+salina;

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 12 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para IL-4 (IL-4 +/+) (n=8) e deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais IL-4 (+/+) e IL-4 (-/-) foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) após 3 dias, segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+IL-4 (+/+), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 13 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para IL-4 (IL-4 +/+) e deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) tratados com salina ou 5-FU.** Animais IL-4 (+/+) e IL-4 (-/-) foram pré-tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado. (A-B) salina+IL-4 (+/+); (C-D) 5-FU+ IL-4 (+/+); (E-F) 5-FU+IL-4 (-/-). O duodeno dos animais IL-4 (-/-) que receberam 5-FU mostram vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais IL-4 (+/+) que receberam salina. (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

**Tabela 7 – Camundongos deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) tratados com 5-FU apresentam uma menor infiltração de neutrófilos no duodeno quando comparado aos camundongos selvagens (IL-4 +/+) tratados com 5-FU.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>n°neutrófilos/mg de tecido</b>
IL-4 (+/+)	663,5±76,5
IL-4 (+/+)+5-FU	3579,0±492,0*
IL-4 (-/-)+5-FU	1702,0±315,8 <sup>#</sup>

Os valores representam a media ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo IL-4 (+/+);

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo IL-4 (+/+)+5-FU;

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

**Tabela 8 – Camundongos deficientes para IL-4 (IL-4 -/-) que foram tratados com 5-FU apresentam uma menor concentração de citocinas no duodeno quando comparado aos animais selvagens (IL-4 +/+) tratados com 5-FU.**

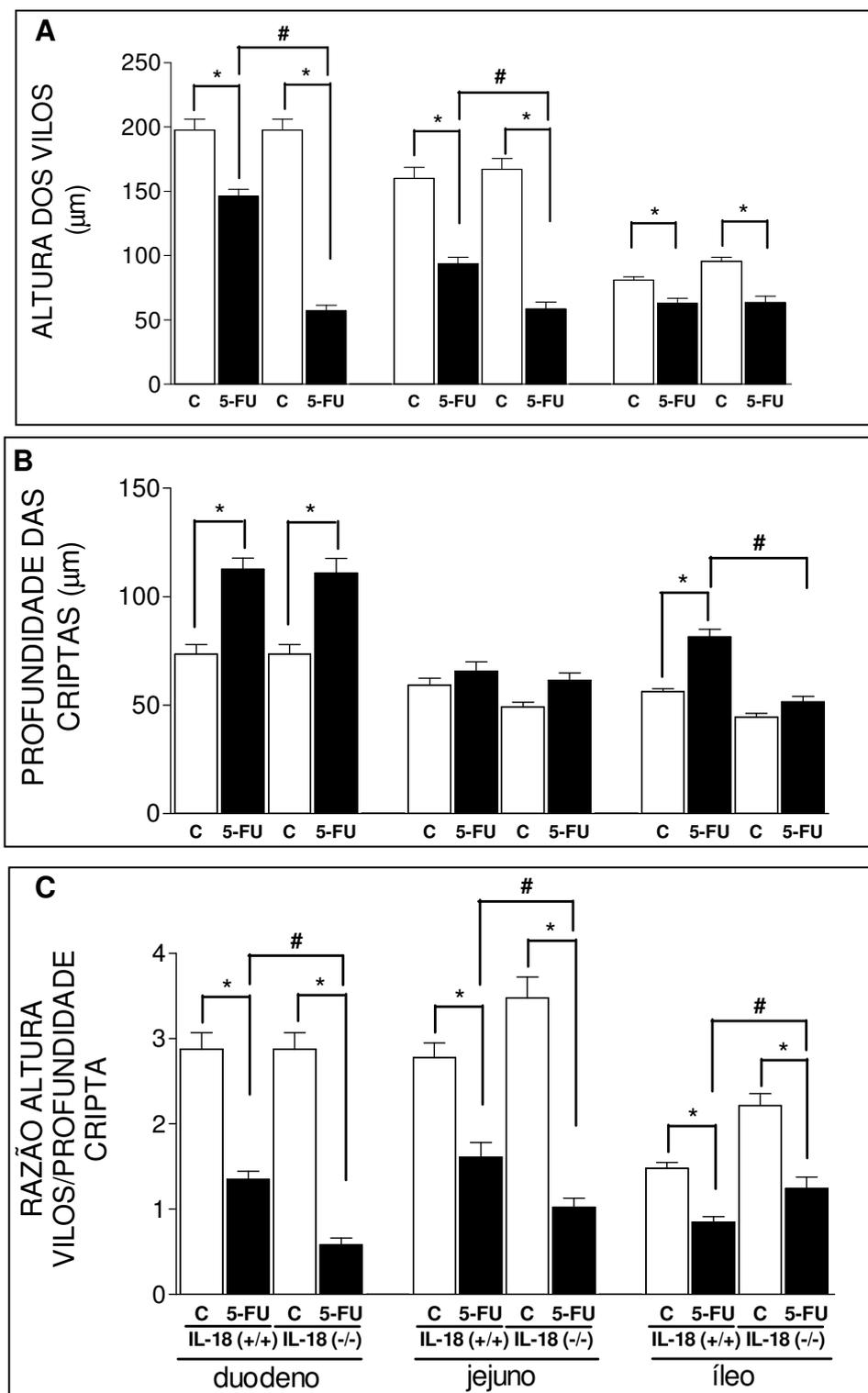
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>Citocinas (pg/300µl)</b>			
	<b>TNF-α</b>	<b>IL-1β</b>	<b>IL-6</b>	<b>KC</b>
IL-4 (+/+)	7,43±0,97	134,8±31,94	19,42±1,11	86,92±21,19
IL-4 (+/+)+5-FU	12,13±1,17*	280,3±41,53*	29,67±3,93*	177,2±28,16*
IL-4 (-/-)+5-FU	7,36±0,52 <sup>#</sup>	86,47±29,61 <sup>#</sup>	1,31±0,76 <sup>#</sup>	105,6±21,57 <sup>#</sup>

Os valores representam a media ± E.P.M.

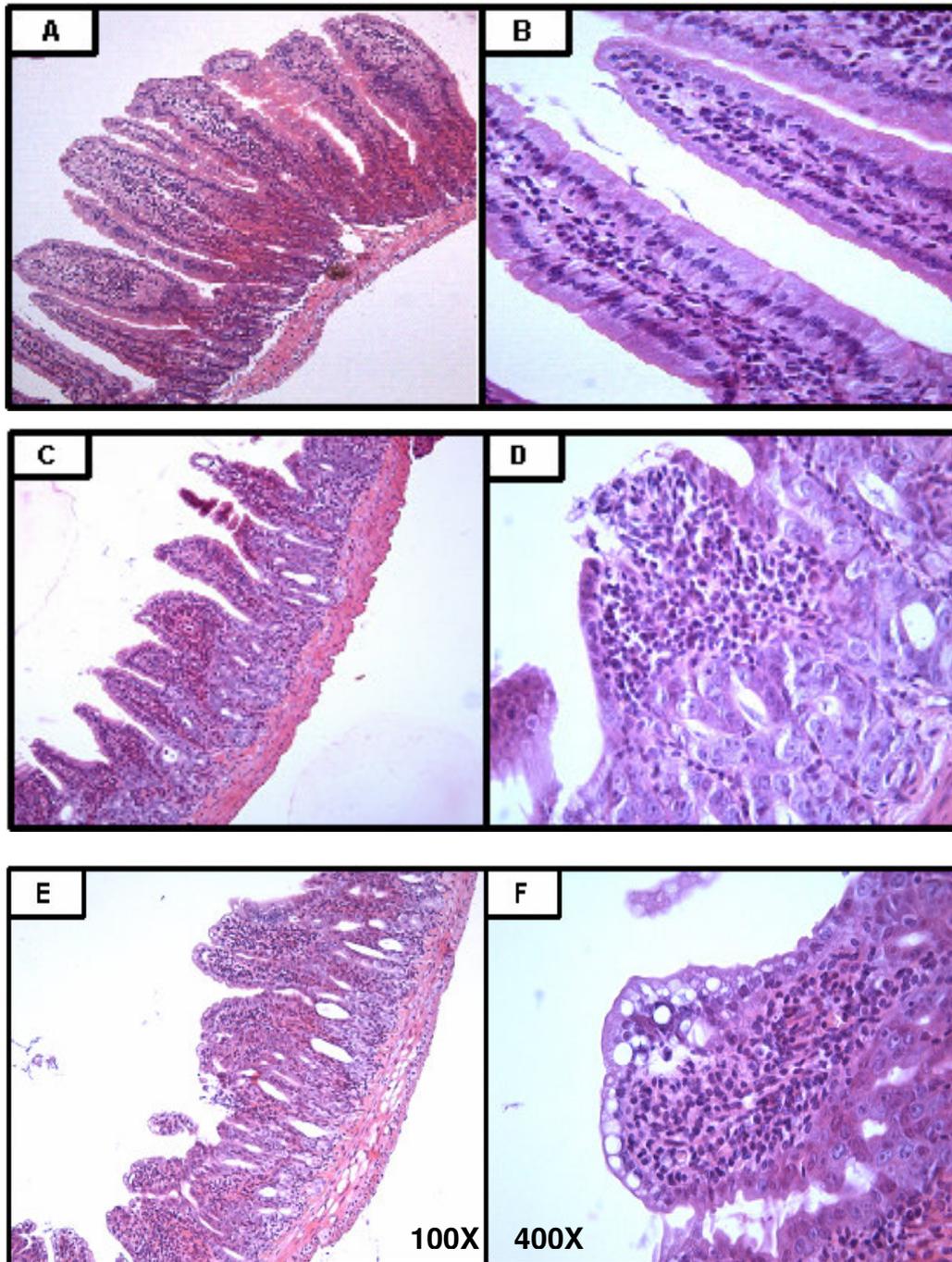
\*p<0,05 quando comparado ao grupo IL-4 (+/+);

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo IL-4 (+/+)+5-FU;

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 14 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para IL-18 (IL-18 +/+) (n=8) e deficientes para IL-18 (IL-18 -/-) (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais IL-18 (+/+) e IL-18 (-/-) foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) após 3 dias, segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+IL-18 (+/+), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 15 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para IL-18 (IL-18 +/+) e deficientes para IL-18 (IL-18 -/-) tratados com salina ou 5-FU.** Animais IL-18 (+/+) e IL-18 (-/-) foram pré-tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado. (A-B) salina+IL-18 (+/+); (C-D) 5-FU+ IL-18 (+/+); (E-F) 5-FU+IL-18 (-/-). O duodeno dos animais IL-18 (-/-) que receberam 5-FU mostram vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais 5-FU+ IL-18 (+/+). (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

### **4.3. 5-FU induz mucosite intestinal em camundongos com participação de PAF, mas não de 5-LO.**

Os camundongos deficientes para o receptor de PAF (PAF<sup>-/-</sup>) apresentaram leucopenia após o tratamento com 5-FU (450 mg/kg) semelhante aos camundongos selvagens (PAF<sup>+/+</sup>) que receberam o mesmo tratamento (Tabela 9). Os camundongos PAF<sup>-/-</sup> tiveram redução da altura dos vilos no duodeno e íleo (Figura 16A e B) e redução da razão vilo/cripta no íleo após o tratamento com 5-FU (Figura 16C), porém não tiveram nenhuma alteração da razão vilo/cripta no duodeno em comparação aos animais selvagens que receberam o mesmo tratamento (Figura 16C). Os camundongos PAF<sup>-/-</sup> tratados com 5-FU também não apresentaram aprofundamento das criptas do duodeno em relação aos camundongos selvagens tratados com 5-FU na mesma dose (Figura 16B). Na fotomicrografia da Figura 17E e F, observou-se que o duodeno dos camundongos PAF<sup>-/-</sup> tratados com 5-FU não apresentam diminuição da altura dos vilos e nem aprofundamento das criptas, como observado nos camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 17C e D).

Além desses dados, também foi demonstrado que os camundongos PAF<sup>-/-</sup> tratados com 5-FU apresentam infiltração de neutrófilos (Tabela 10). Porém, esses mesmos camundongos apresentam um menor aumento na concentração de IL-1 $\beta$ , e KC (Tabela 11) no duodeno em comparação ao duodeno dos camundongos selvagens tratados com 5-FU.

O tratamento com BN 52021 (20mg/kg) em camundongos c57/black com mucosite intestinal induzida por 5-FU (450mg/kg) não alterou a leucopenia (Tabela 9), mas reverteu a diminuição da altura dos vilos e da razão vilo/cripta no duodeno (Figura 18A e C). Por outro lado, não reverteu o aprofundamento das criptas do duodeno dos camundongos c57/black que foram tratados com 5-FU (Figura 18B).

Na fotomicrografia da Figura 19 E e F, observou-se que o tratamento com BN 52021 foi capaz de proteger o duodeno dos camundongos c57/black das alterações morfológicas já descritas e observadas na Figura 19 C e D, demonstra um duodeno semelhante ao dos camundongos controle (Figura 19A e B). Além desses dados, também observamos que o tratamento com BN 52021 não foi capaz de reverter a infiltração de neutrófilos (Tabela 12) no duodeno dos camundongos c57/black tratados com 5-FU.

Os camundongos deficientes para 5-LO (5-LO  $-/-$ ) apresentaram leucopenia após o tratamento com 5-FU (450mg/kg) semelhante aos camundongos selvagens (5-LO  $+/+$ ) que receberam o mesmo tratamento (Tabela 9). Observou-se importante redução na altura dos vilos e na razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 20A e C). Essas alterações eram igualmente observadas nos camundongos selvagens para 5-LO (IL-18  $+/+$ ), que foram tratados com 5-FU na mesma dose (Figura 20A, B e C). Além disso, houve um aprofundamento mais acentuado das criptas do duodeno, jejuno e íleo (Figura 20B) dos camundongos 5-LO ( $-/-$ ) tratados com 5-FU em relação aos animais selvagens tratados.

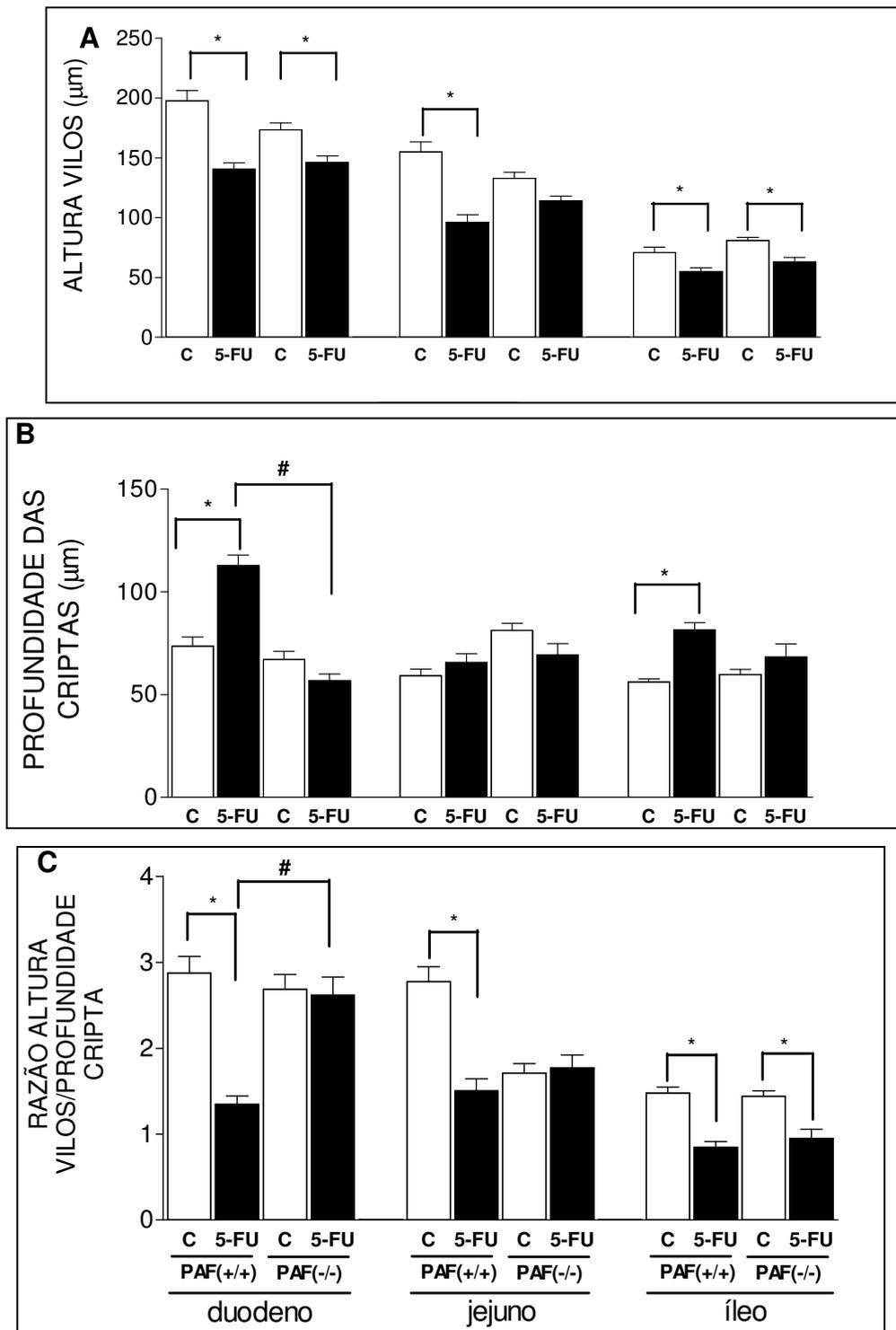
Assim, quando se observa a fotomicrografia do duodeno dos camundongos 5-LO ( $-/-$ ) tratados com 5-FU pode-se encontrar diminuição dos vilos e aprofundamento das criptas (Figura 21E e F), achados semelhantes aos encontrados no duodeno de camundongos selvagens (5-LO  $+/+$ ) tratados com 5-FU (Figura 21C e D).

**Tabela 9 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a contagem total de leucócitos sanguíneos de camundongos tratados com BN 52021 e de camundongos deficientes para PAF e 5-LO.**

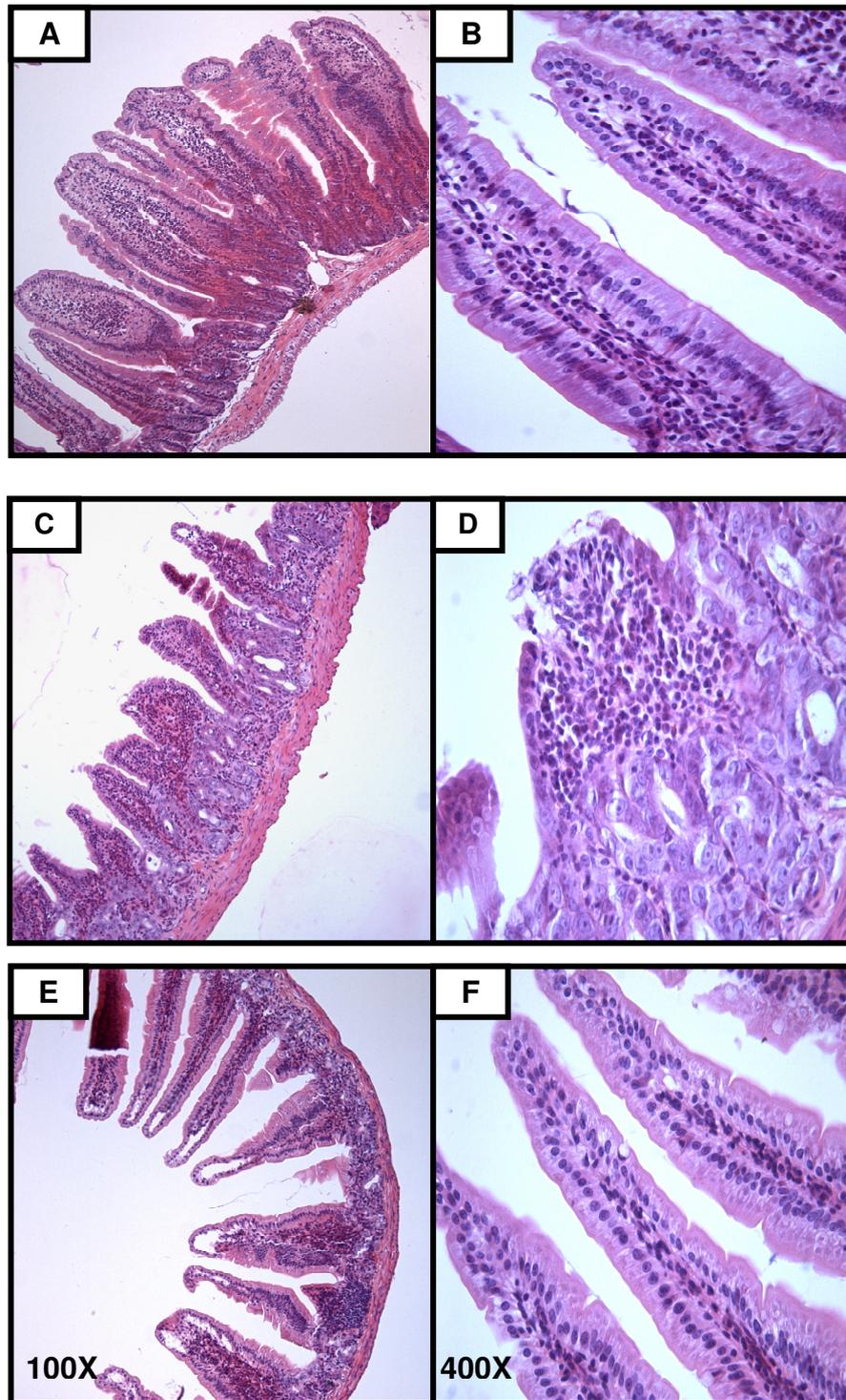
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>nº células/mm<sup>3</sup></b>
controle (selvagem)	7173,00±1032,50
PAF (-/-) + 5-FU (450 mg/kg)	1788,00±456,20*
BN 52021 (20mg/kg) + 5-FU (450 mg/kg)	2250,00±484,90*
5-LO (-/-) + 5-FU (450 mg/kg)	1640,00±263,30*

Os valores representam a média ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle (balb-c). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 16 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para PAF (PAF +/+) (n=8) e deficientes para o receptor de PAF (PAF -/-) (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais PAF (+/+) e PAF (-/-) foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) após 3 dias, segmentos do duodeno, jejunum e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+PAF (+/+), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 17 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para PAF (PAF +/+) e deficientes para o receptor de PAF (PAF -/-) tratados com salina ou 5-FU. Animais PAF (+/+) e PAF (-/-) foram pré-tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado. (A-B) salina+PAF (+/+); (C-D) 5-FU+ PAF (+/+); (E-F) 5-FU+PAF (-/-). O duodeno dos animais PAF (-/-) que receberam 5-FU mostram vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais PAF (+/+) que receberam salina. (A, C, E 100X; B, D, F 400X).**

**Tabela 10 – Camundongos deficientes para o receptor PAF (PAF -/-) tratados com 5-FU apresentam aumento de neutrófilos no duodeno.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>n°neutrófilos/mg de tecido</b>
PAF (+/+)	988,40±204,50
PAF (+/+) + 5-FU	1746,00±204,50*
PAF (-/-) + 5-FU	6719,00±1008,00*

Os valores representam a media ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo PAF (+/+);

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

**Tabela 11 – Camundongos deficientes para receptor de PAF (PAF -/-) que foram tratados com 5-FU apresentam uma menor concentração de citocinas no duodeno quando comparado aos animais selvagens (PAF +/+) tratados com 5-FU.**

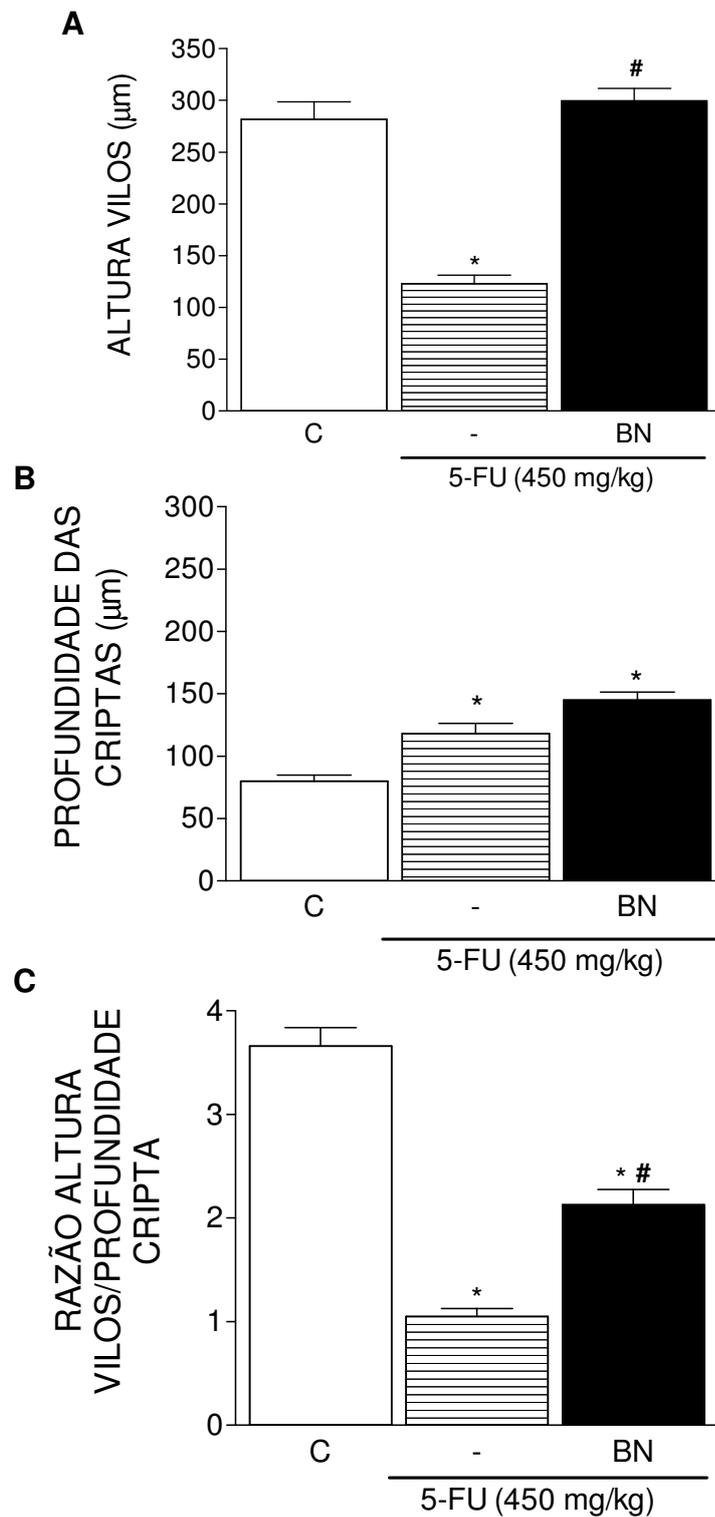
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>Citocinas (pg/300µl)</b>			
	<b>TNF-α</b>	<b>IL-1β</b>	<b>IL-6</b>	<b>KC</b>
PAF (+/+)	6,90±0,96	21,51±13,53	2,50±0,64	98,58±21,67
PAF (+/+) + 5-FU	16,62±4,27*	553,90±204,60*	35,68±7,23*	357,10±108,40*
PAF (-/-) + 5-FU	9,98±1,42	159,30±72,31 <sup>#</sup>	26,89±5,90	145,20±44,04 <sup>#</sup>

Os valores representam a media ± E.P.M.

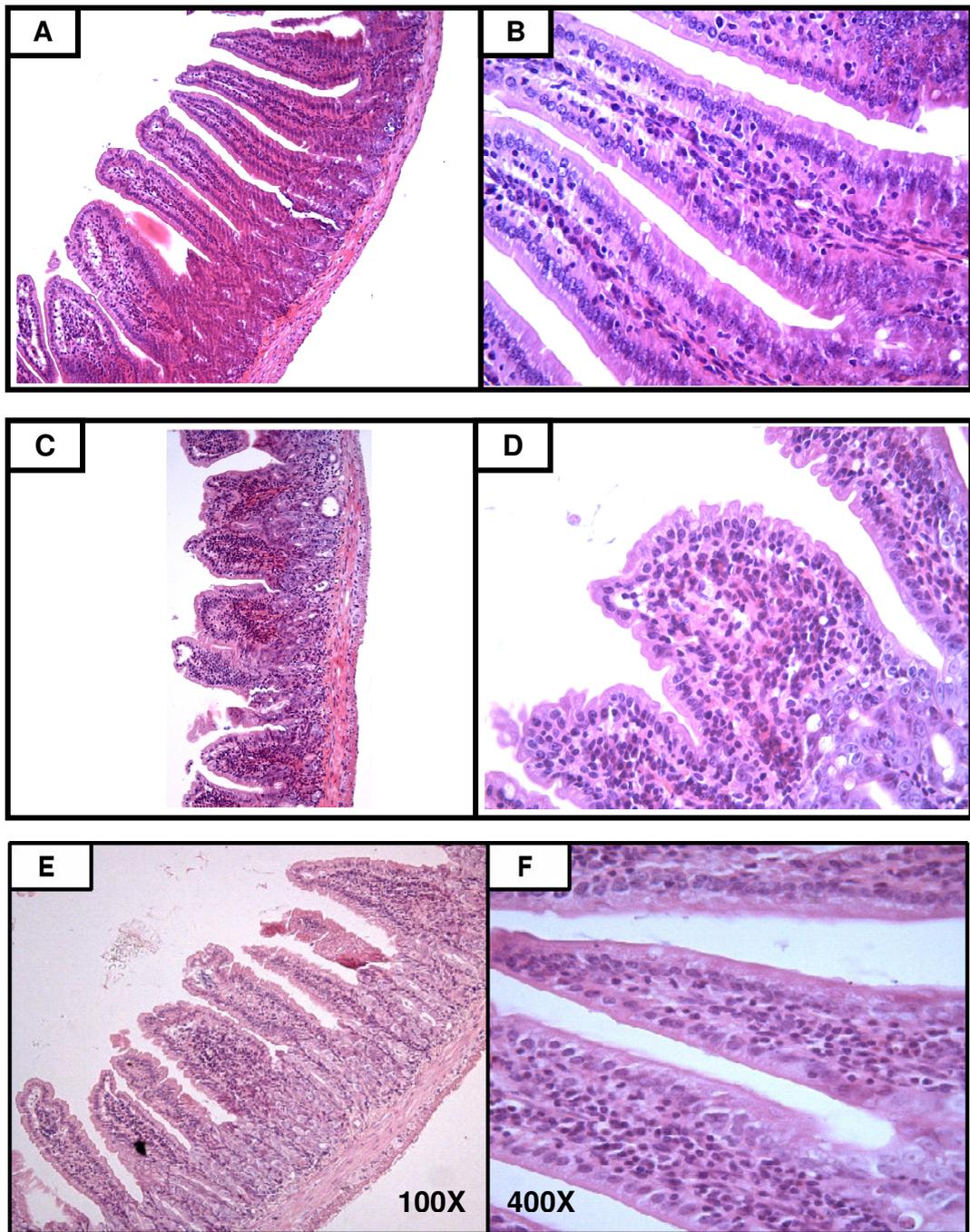
\*p<0,05 quando comparado ao grupo PAF (+/+);

<sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo PAF (+/+) + 5-FU;

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 18 – Efeito do tratamento com BN 52021 sobre as alterações morfométricas do duodeno de camundongos c57/black (n=8) tratados com 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450 mg/kg) + salina ou 5-FU + BN 52021 (20 mg/kg). Após o sacrifício, segmentos do duodeno foi obtido para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 comparado ao grupo 5-FU + salina (-), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 19 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos controle (A-B), e submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU pré-tratados com salina (C-D) e BN 52021 (E-F).** Os animais receberam salina (controle) ou 5-FU (450 mg/kg) + salina ou 5-FU + BN 52021 (20 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado (A-B; duodeno controle); (C-D; duodeno + 5-FU); (E-F; duodeno + 5-FU + BN 52021). Mucosa intestinal dos animais que receberam BN 52021 mostrando vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais controle. (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

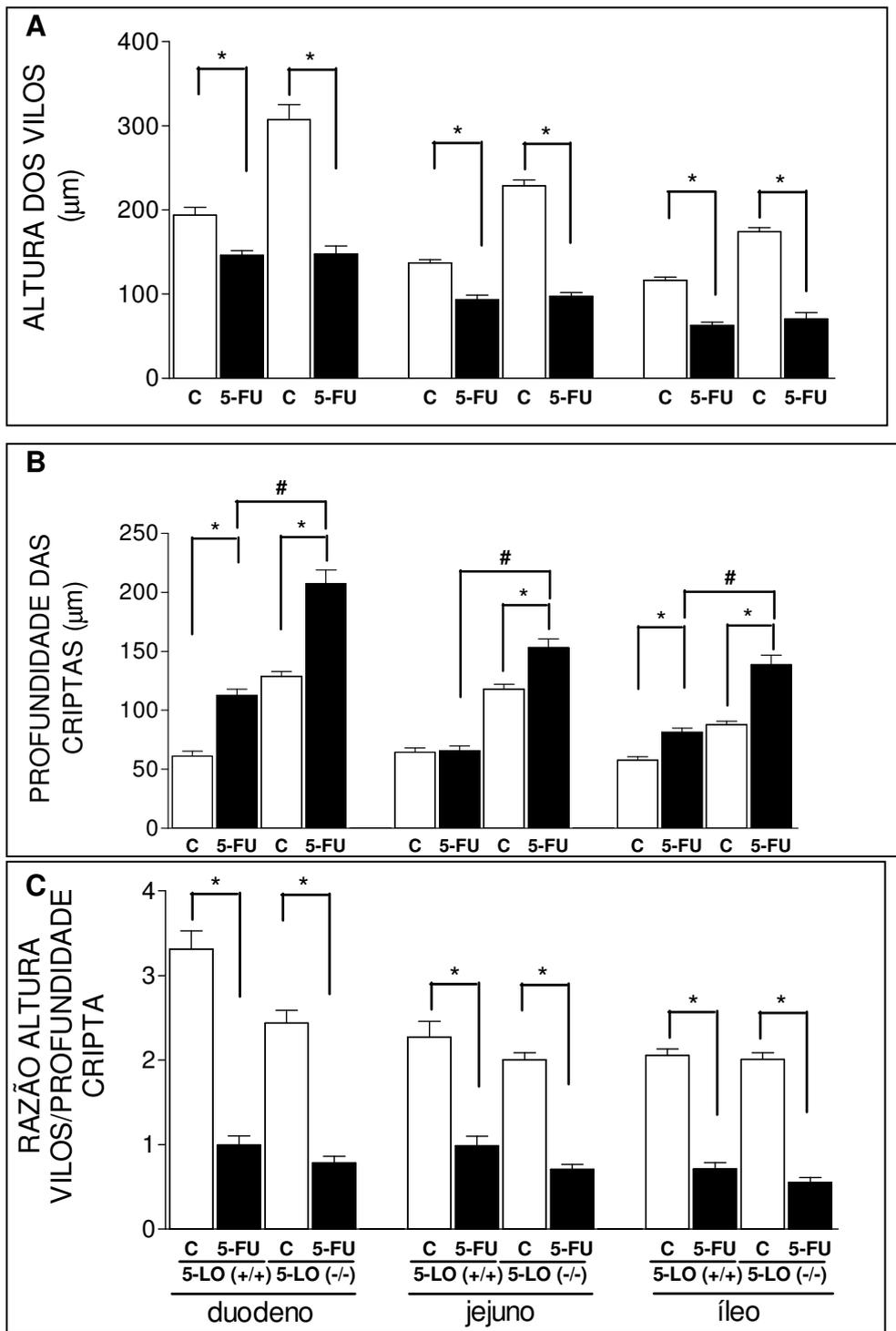
**Tabela 12 – O tratamento com BN 52021 não reduziu a infiltração de neutrófilos induzida por 5-FU no duodeno de camundongos.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>U MPO/mg de tecido</b>
Salina (controle)	1,45±0,25
Salina + 5-FU	5,64±0,80*
BN 52021 (20 mg/kg) + 5-FU	4,45±1,05*

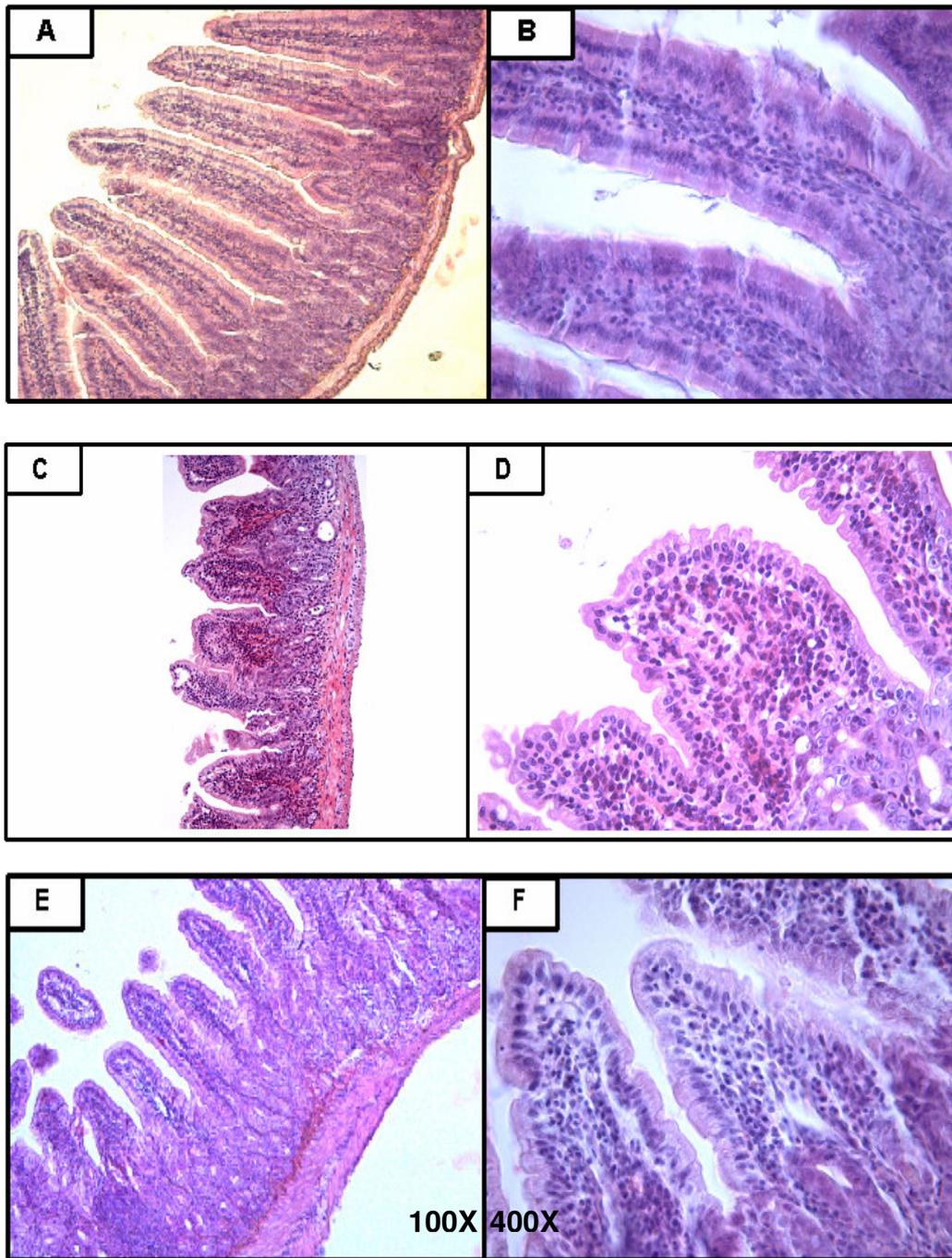
Os valores representam a média ± E.P.M.

\*p<0,05 quando comparado ao grupo salina (controle);

Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 20 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para 5-LO (5-LO +/+) (n=8) e deficientes para 5-LO (5-LO -/-) (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais 5-LO (+/+) e 5-LO (-/-) foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450mg/kg) após 3 dias, segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+5-LO (+/+), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

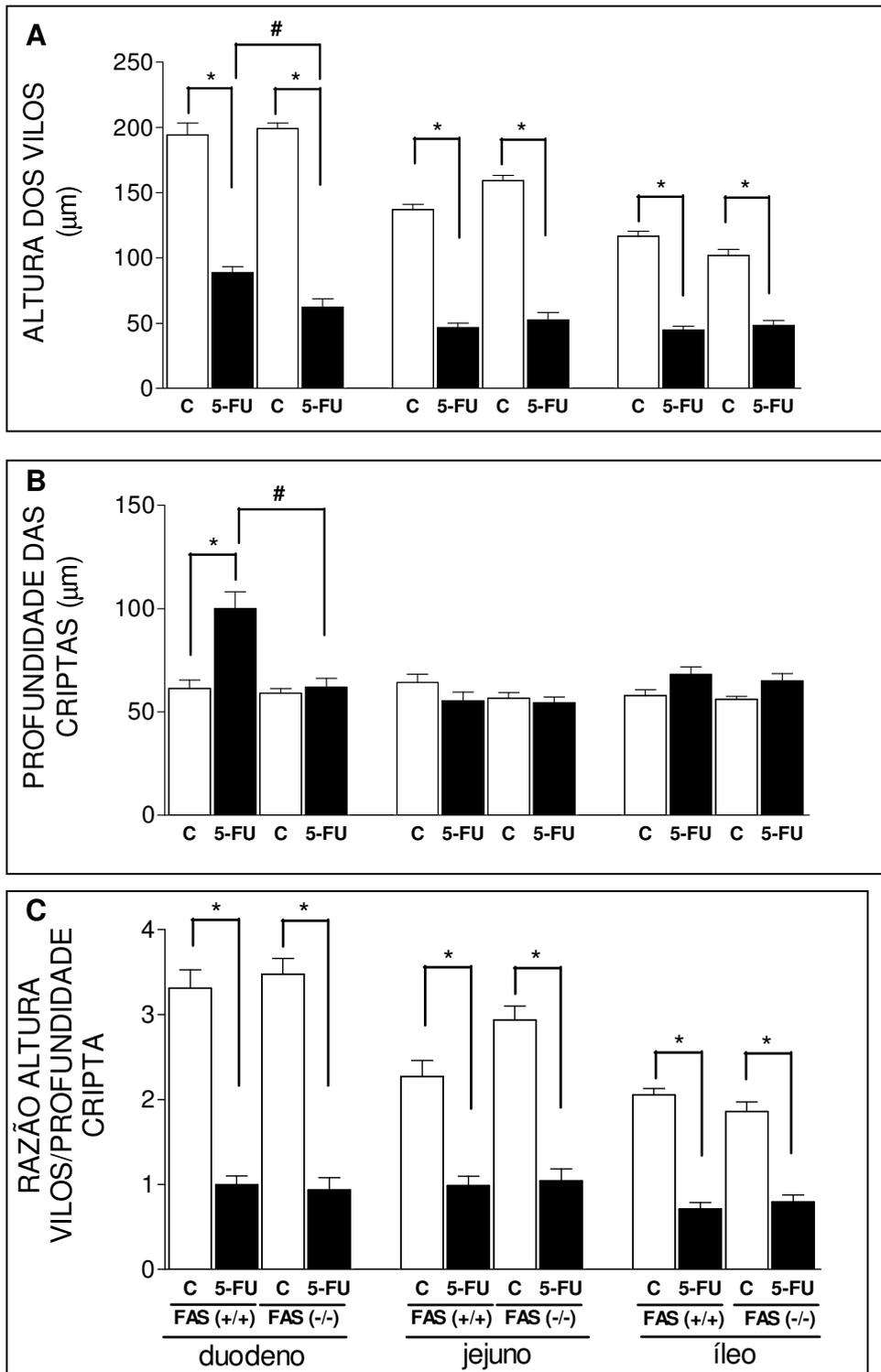


**FIGURA 21 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para 5-LO (5-LO +/+) e deficientes para 5-LO (5-LO -/-) tratados com salina ou 5-FU.** Animais 5-LO (+/+) e 5-LO (-/-) foram pré-tratados com salina ou 5-FU (450 mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado. (A-B) salina+5-LO (+/+); (C-D) 5-FU+ 5-LO (+/+); (E-F) 5-FU+5-LO (-/-). O duodeno dos animais 5-LO (-/-) que receberam 5-FU mostram vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais 5-FU+ 5-LO (+/+). (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

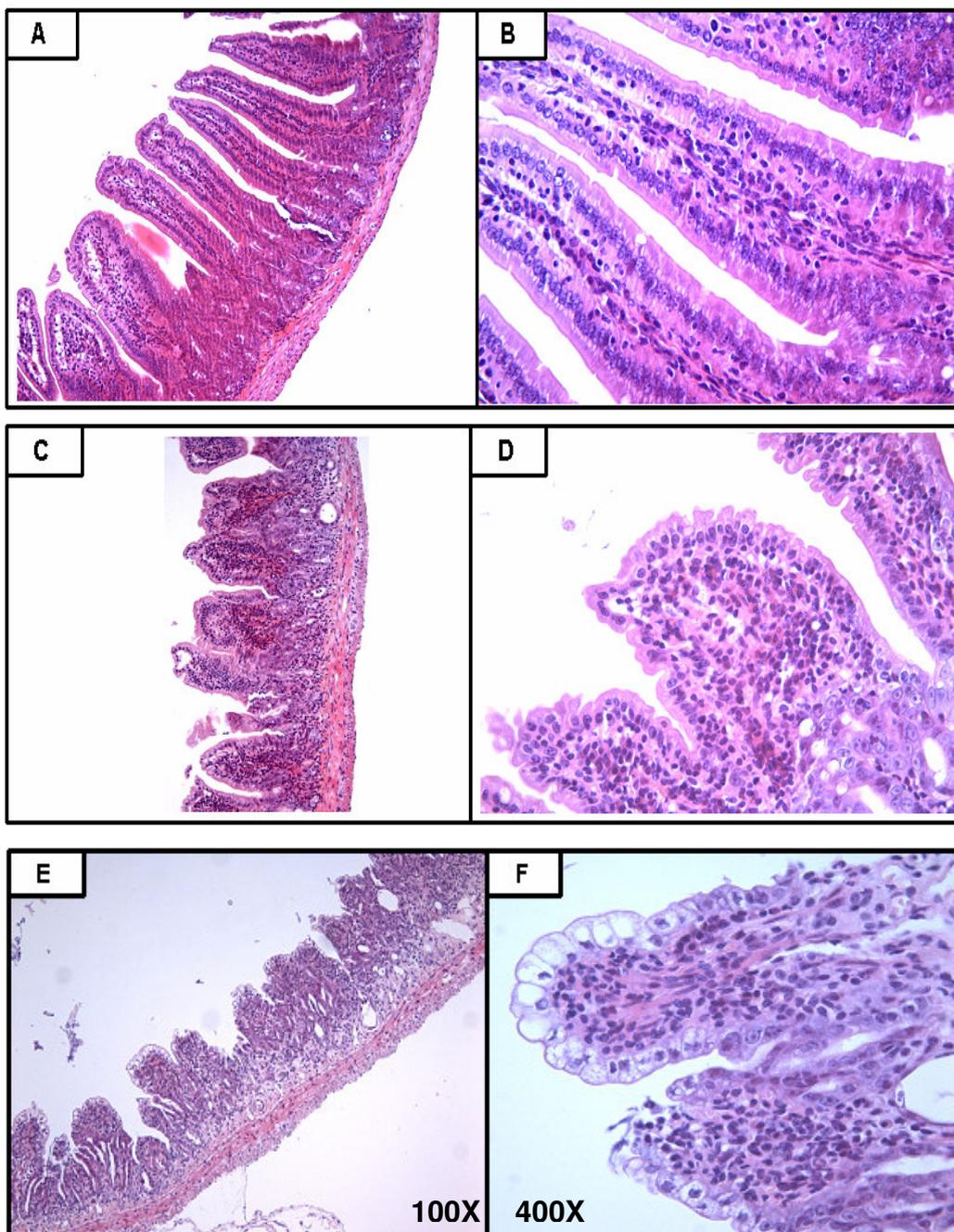
#### **4.4. O receptor FAS-ligante parece não participar da mucosite intestinal induzida por 5-FU.**

Os camundongos deficientes para FAS-ligante (FAS  $-/-$ ) apresentaram leucopenia após o tratamento com 5-FU (450mg/kg) semelhante aos camundongos selvagens (FAS  $+/+$ ) que receberam o mesmo tratamento (controle (selvagem)=  $7173,00 \pm 1032,50$  células/ $\text{mm}^3$ ; FAS  $-/-$  + 5-FU (450 mg/kg)=  $650,00 \pm 104,10$  células/ $\text{mm}^3$ ). Além disso, houve importante redução na altura dos vilos e na razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 22A e C) dos camundongos FAS  $-/-$  tratados com 5-FU. Essas alterações eram igualmente observadas nos camundongos selvagens, tratados com 5-FU na mesma dose (Figura 22A e C). Dentre essas alterações, a diminuição da altura dos vilos foi mais acentuada nos camundongos FAS  $-/-$  tratados com 5-FU em relação aos camundongos selvagens tratados (Figura 22A). Foi observado ainda, um menor aprofundamento das criptas somente no duodeno (Figura 22B) após o tratamento com 5-FU (450mg/kg).

Assim, quando foi observado a fotomicrografia do duodeno dos camundongos FAS  $-/-$  tratados com 5-FU pode-se encontrar diminuição dos vilos, aprofundamento e vacuolização das criptas, vacuolização e perda da arquitetura dos enterócitos (Figura 23E e F), achados semelhantes aos encontrados no duodeno de camundongos selvagens tratados com 5-FU (Figura 23C e D).



**FIGURA 22 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos selvagens para FAS-ligante (FAS +/+) (n=8) e deficientes para FAS-ligante (FAS -/-) (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais FAS (+/+) e FAS (-/-) foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (450mg/kg) após 3 dias, segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilos/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05 comparado ao grupo salina (C); #p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+FAS (+/+), foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 23 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos selvagens para FAS-ligante (FAS +/+) e deficientes para FAS-ligante (FAS -/-) tratados com salina ou 5-FU.** Animais FAS (+/+) e FAS (-/-) foram pré-tratados com salina ou 5-FU (450mg/kg). Após o sacrifício, o duodeno foi removido e processado. (A-B) salina+FAS (+/+); (C-D) 5-FU+ FAS (+/+); (E-F) 5-FU+FAS (-/-). O duodeno dos animais FAS (-/-) que receberam 5-FU mostram vilos e criptas semelhantes ao duodeno dos animais 5-FU+ FAS (+/+). (A, C, E 100X; B, D, F 400X).

#### **4.6. Modelo de mucosite intestinal em ratos Wistar.**

A dose 150 mg/kg de 5-FU induziu nos ratos uma mortalidade de aproximadamente 20% (sobrevida 80%) a partir do 4° dia experimental que continuou-se até o 15° dia experimental da indução da mucosite intestinal (Figura 24A).

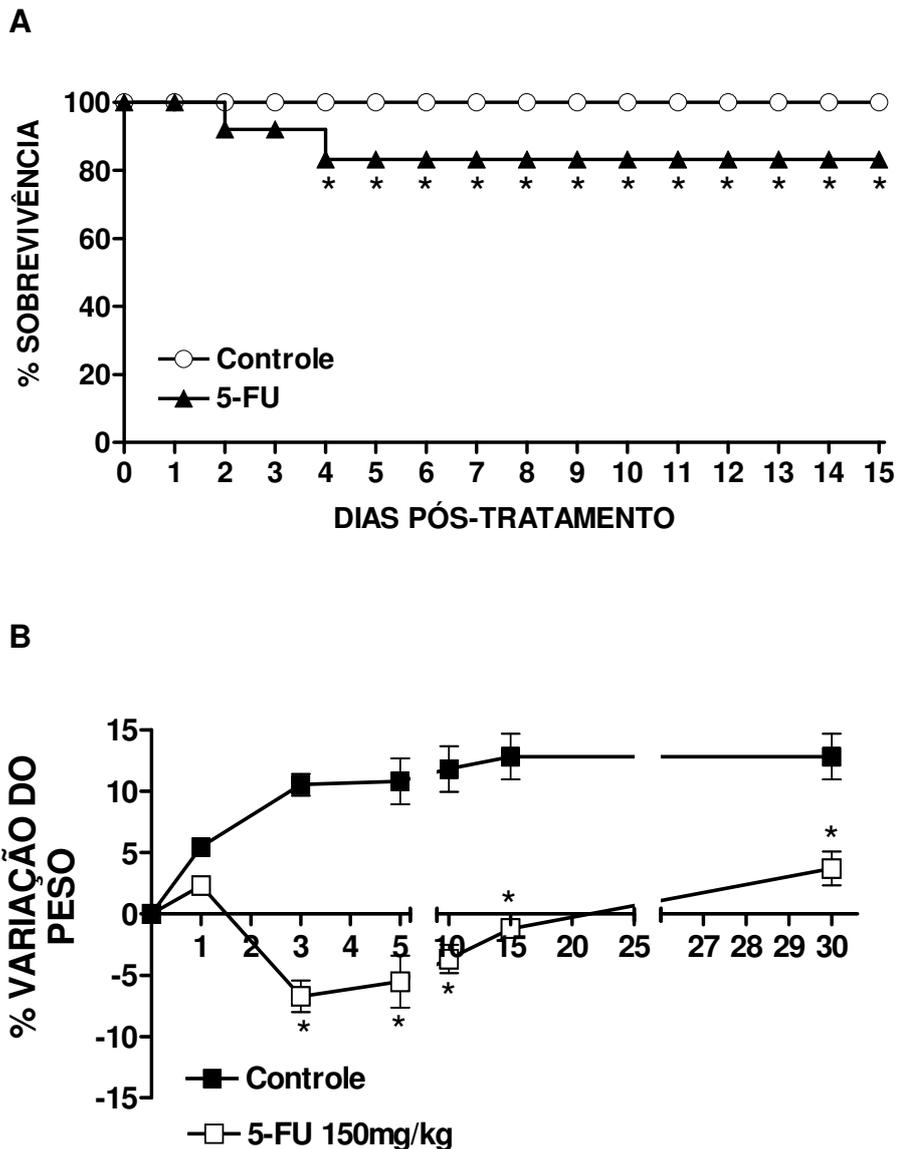
Observou-se ainda, uma importante perda de peso a partir do 1° dia experimental ( $3,15 \pm 0,06\%$ ), que foi máxima no 3° dia experimental ( $17,24 \pm 2,16\%$ ).

A partir do 5° dia experimental, houve uma discreta recuperação do ganho ponderal que continuou até o 30° dia experimental, porém essa recuperação ainda era significativamente menor que a do controle (Figura 24B). Houve uma importante leucopenia com o tratamento com 5-FU, que foi máxima no 3° dia após o tratamento (Tabela 13). No 15° dia, experimental foi observado um restabelecimento da contagem dos leucócitos plasmáticos dos animais tratados com 5-FU (Tabela 13).

Nas fotomicrografias das figuras 25, 26 e 27, constatou-se importantes alterações morfológicas do duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Na Figura 25D, E e F, pode-se destacar encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial de criptas, achatamento e vacuolização de enterócitos, presença de infiltrado mono e polimorfonucleares e redução de células caliciformes do duodeno de ratos tratados com 5-FU (150mg/kg) em comparação aos animais controle. Nos animais controle observa-se vilosidades e criptas íntegras, com epitélio cilíndrico recobrando os vilos intestinais e a estrutura intacta das criptas com células de Paneth (Figura 25A, B e C). Essas alterações morfológicas encontradas no duodeno de ratos tratados com 5-FU, também podem ser evidenciadas no jejuno (Figura 26C e D) e no íleo (Figura 27C eD) de ratos tratados com 5-FU na mesma dose. Foi observado que as fotomicrografias do 15° dia após o tratamento com 5-FU

mostram uma recuperação das alterações morfológicas anteriormente descritas no duodeno (Figura 25G, H e I), no jejuno (26E e F) e no íleo (Figura 27E e F).

Ao quantificar-se essas alterações histológicas pela análise morfométrica, os resultados mostram que o tratamento com 5-FU induziu diminuição da altura dos vilos e da razão vilo/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figura 28A e C) de ratos no 3° dia após o tratamento. Também induziu um aprofundamento das criptas no 3° e 5° dia no duodeno, no 3° dia no jejuno e no 3°, 5° e 30° dia no íleo (Figura 28B) em comparação aos segmentos intestinais dos animais controle. Essas alterações foram mais importantes no 3° dia após o tratamento com 5-FU. Podemos ainda destacar que a redução no tamanho dos vilos foi de aproximadamente 64,50% no duodeno, de 42,43% no jejuno e de 27,89% no íleo. Observa-se também que no 5°, 15° e 30° dia após o tratamento com 5-FU houve recuperação na altura dos vilos e na razão vilo/cripta (Figura 28A e C), bem como na profundidade das criptas (Figura 28B).

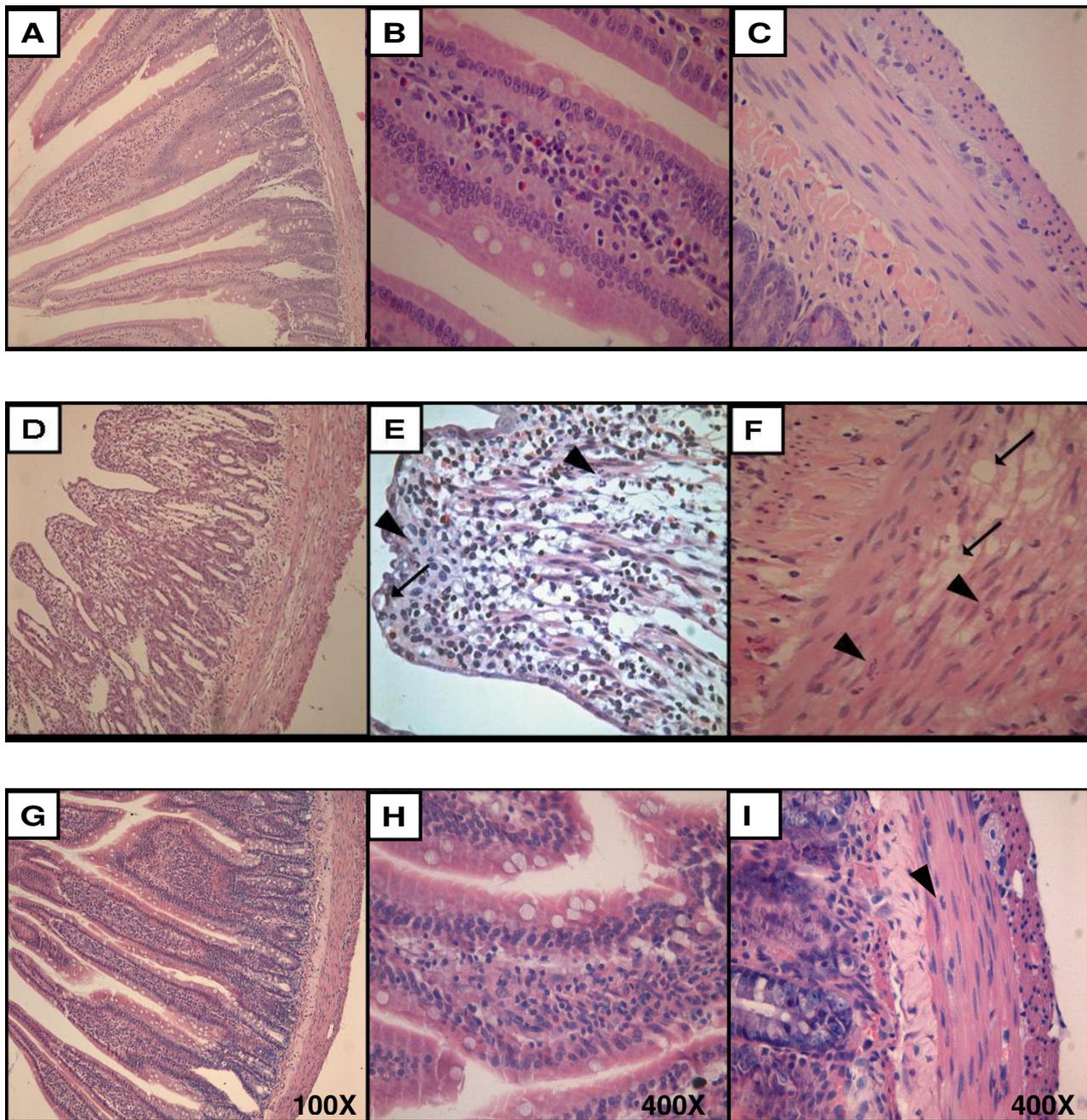


**FIGURA 24 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a sobrevivência e a variação de peso em ratos.** Animais foram pré-tratados com salina (controle) ou 5-FU (150 mg/kg). As taxas de sobrevivência foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de logrank (A). O peso foi avaliado diariamente até o trigésimo dia após o tratamento, os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação de peso (%), calculado através das diferenças do peso obtido diariamente e do peso obtido antes da administração de 5-FU (B). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

**Tabela 13 – Efeito do 5-FU (150 mg/kg) sobre a contagem dos leucócitos sangüíneos em ratos submetidos a mucosite intestinal.**

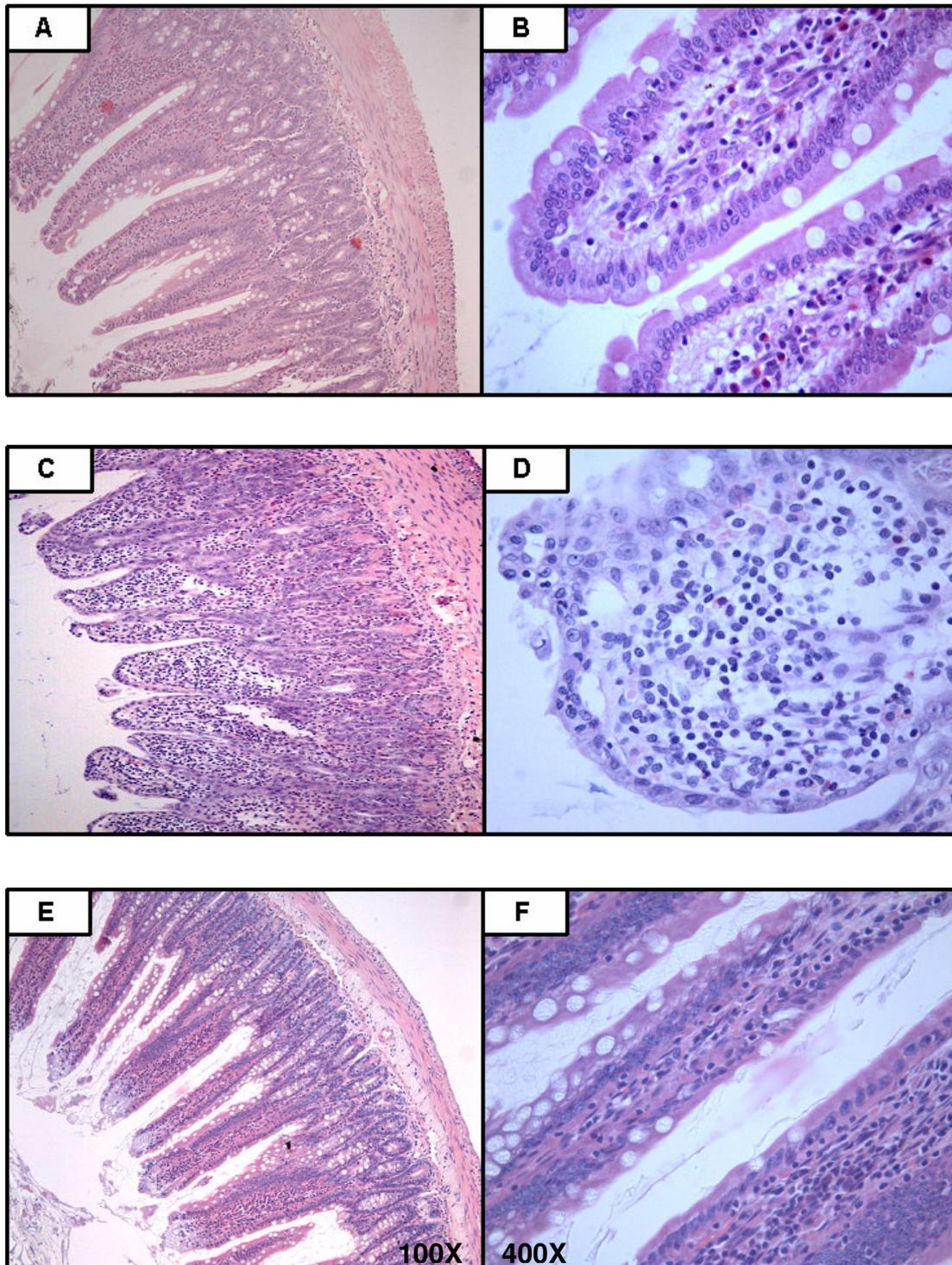
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>nº células/mm<sup>3</sup></b>
Salina (controle)	10730,00± 518,20
5-FU (1º dia)	5733,00±1013,00*
5-FU (3º dia)	2917,00±904,30*
5-FU (5º dia)	5308,00±1202,00*
5-FU (15º dia)	12230,00±886,40

Os valores representam a média ± E.P.M. \*p<0,05 quando comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

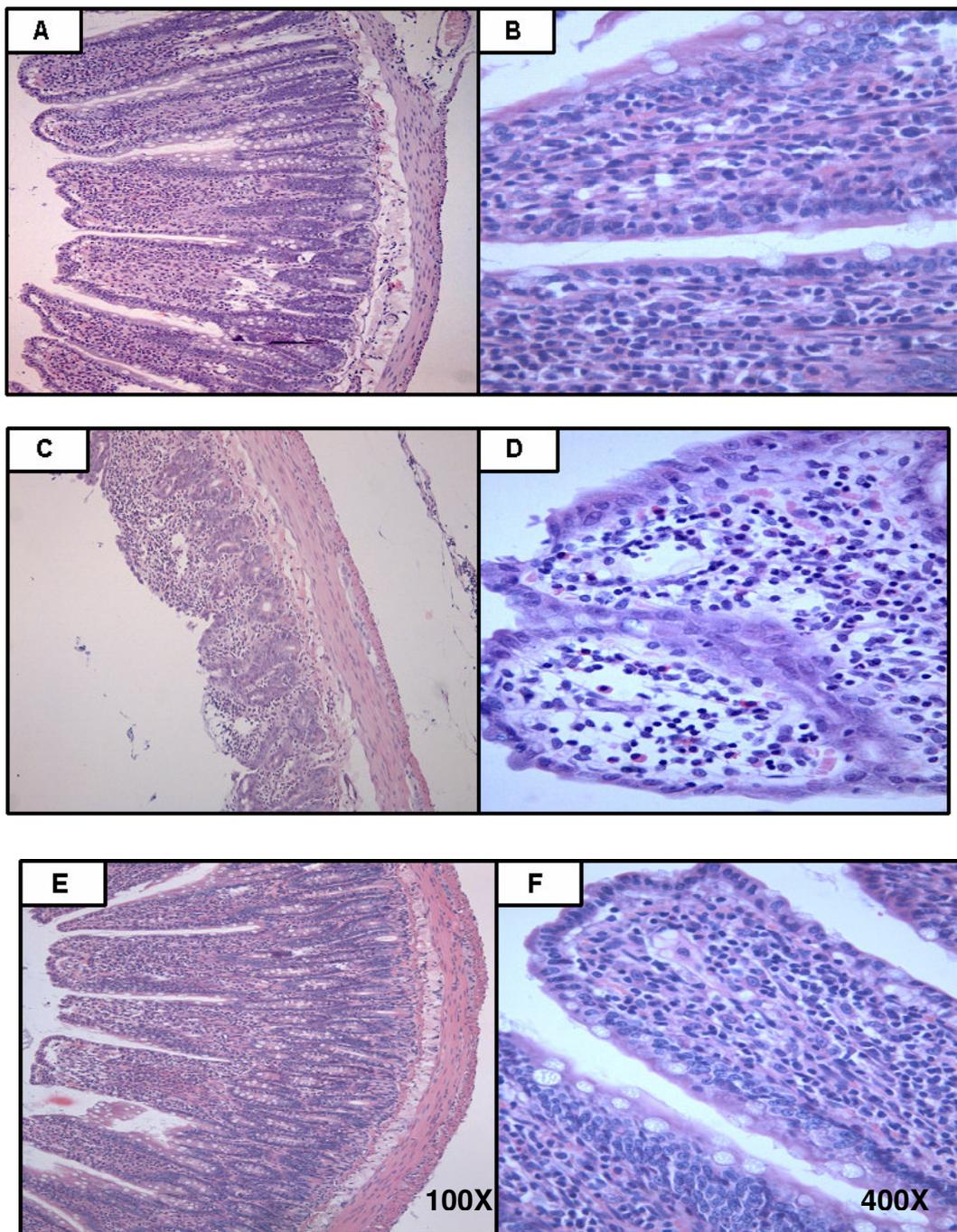


**FIGURA 25 – Fotomicrografias do duodeno de ratos tratados com salina ou 5-FU.**

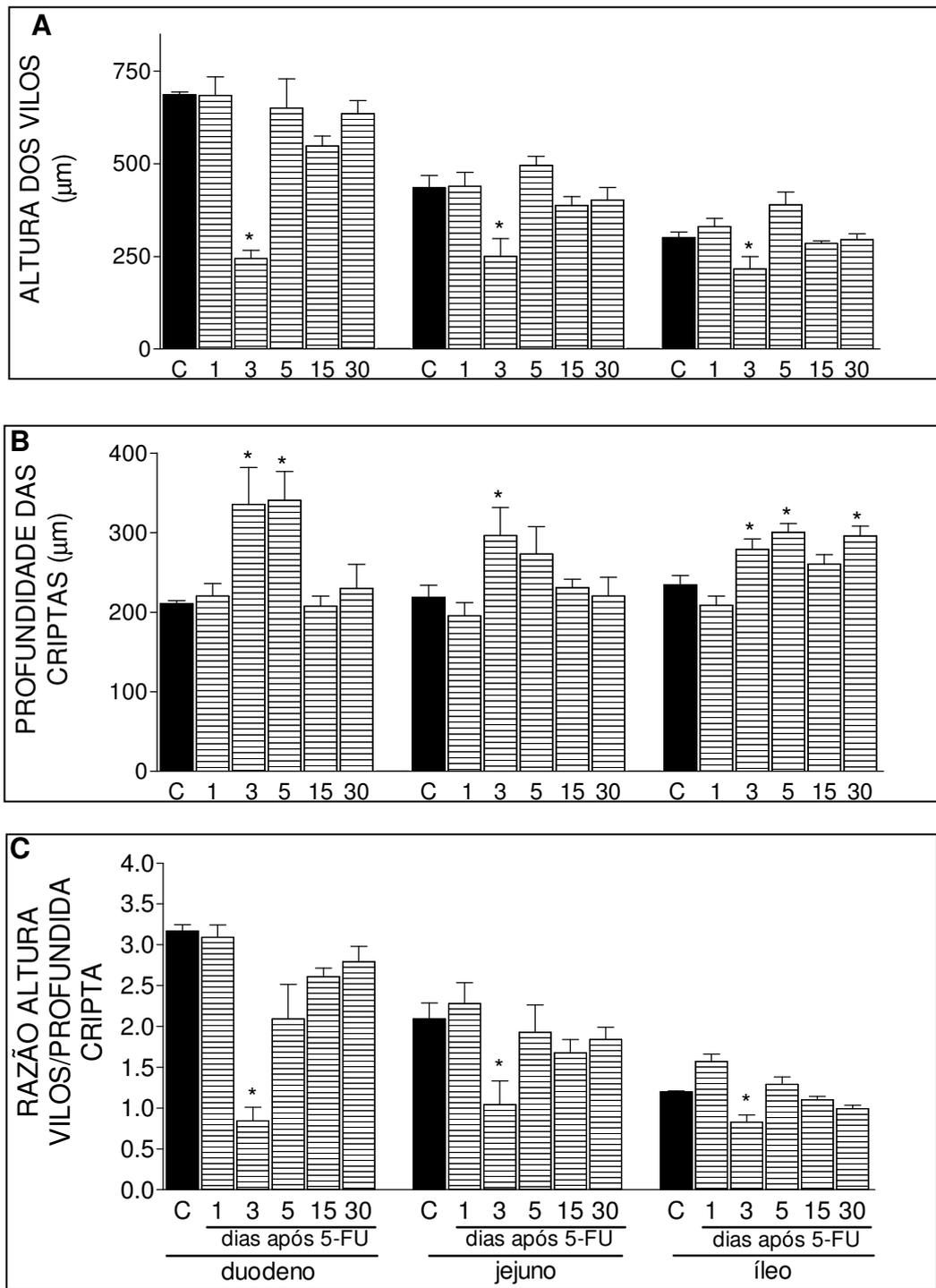
Nos animais tratados com salina demonstram vilos, criptas e muscular normais (A, B, C). Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (3° dia experimental) (D, E, F), observamos: encurtamento dos vilos, e vacuolização dos enterócitos (E; seta), e infiltrado de mono e polimorfonuclear na lamina própria (E; cabeça de seta), perda da arquitetura das criptas (D), presença de vacuolização (seta) e infiltrado neutrofílico (cabeça de seta) na camada muscular (F). Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (15° dia experimental) (G, H, I), observamos preservação dos vilos (G, H), criptas (G), e pouco infiltrado neutrofílico na camada muscular (I, cabeça de seta). Fixação em HE (A,D,G; 100X; B,C,E,F,H,I; 400X).



**FIGURA 26 – Fotomicrografias do jejuno de ratos tratados com salina ou 5-FU.** Nos animais tratados com salina (controle), observamos vilos e criptas normais (A, B). Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (3° dia experimental) (C, D), observamos encurtamento dos vilos, e vacuolização dos enterócitos, infiltrado de mono e polimorfonuclear, e perda da arquitetura das criptas. Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (15° dia experimental), observamos preservação dos vilos e das criptas (E, F). (A,C,E; 100X; B,D,F; 400X).



**FIGURA 27 – Fotomicrografias do íleo de ratos tratados com salina ou 5-FU.** Nos animais tratados com salina (controle), observamos vilos e criptas normais (A, B). Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (3° dia experimental) (C, D), observamos encurtamento dos vilos, vacuolização dos enterócitos, infiltrado de mono e polimorfonuclear e perda da arquitetura das criptas. Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (15° dia experimental), observamos preservação dos vilos ed as criptas (E, F). Fixação em HE (A,C,E; 100X; B,D,F; 400X).



**FIGURA 28 – Análise morfométrica dos segmentos intestinais de ratos (n=8) tratados com salina ou 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (150 mg/kg) e sacrificados depois de 1, 3, 5, 15 e 30 dias. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para medida da altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e razão vilo/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (C). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.7. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de infiltração de neutrófilos, intensa apoptose e consumo de glutatona.**

Foi encontrado um importante aumento do infiltrado neutrofílico no duodeno no 1º, 3º e 5º dia, no jejuno no 1º e 3º dia e no íleo no 1º e 3º dia de ratos após o tratamento com 5-FU (150mg/kg). A infiltração de neutrófilos foi máxima no terceiro dia após o tratamento, com valores de 658,37% para o duodeno, 353,91% para o jejuno e 492,19% para o íleo quando comparado aos segmentos dos animais controle (100%) (Tabela 14, 15 e 16). Também houve uma redução dos níveis de GSH no 1º e 3º dia no duodeno, jejuno e íleo de ratos após o tratamento com 5-FU. Este consumo de GSH foi máximo no 3º dia após o tratamento com valores de 37,66% para duodeno, 40,41% para jejuno e 26,95% para íleo quando comparado aos segmentos dos animais controle (100%) (Tabela 14, 15 e 16). Além desses dados, observamos que no 15º dia após o tratamento com 5-FU houve uma recuperação nos níveis de neutrófilos no duodeno, jejuno e íleo dos ratos tratados com 5-FU (Tabela 14, 15 e 16).

Na figura 29B, observa-se intensa apoptose das células das criptas do duodeno de ratos tratados com 5-FU no 1º dia após o tratamento, em que foi verificado núcleos picnóticos, em comparação as criptas do duodeno dos ratos controle (Figura 29A).

Na figura 29D, foram encontradas células da cripta do duodeno de ratos em mitose no 5º dia após o tratamento com 5-FU, esse achado era semelhante ao encontrado na cripta do duodeno de ratos controle (Figura 29C).

Na figura 30, ao quantificarem-se os achados de apoptose e mitose, observa-se que o tratamento com 5-FU (150mg/kg) induziu aumento do nº de

células da cripta em apoptose no duodeno, jejuno e íleo, no 1º dia após o tratamento (Figura 30A).

Esse tratamento também induziu diminuição da mitose das células da cripta no 1º e 3º dia no duodeno, e no 1º dia no jejuno e íleo após o tratamento com 5-FU (Figura 30B).

Por fim, constata-se que no 15º dia após o tratamento com 5-FU os níveis de apoptose e mitose foram restabelecidos no duodeno, jejuno e íleo de ratos (Figura 30A e B).

**Tabela 14 – Efeito do 5-FU (150 mg/kg) sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no duodeno de ratos.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>U MPO/mg de tecido</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{g}/100\text{mg}</math> de tecido)</b>
Salina (controle)	1,85 $\pm$ 0,15	371,40 $\pm$ 26,70
5-FU (1 $^{\circ}$ dia)	7,90 $\pm$ 1,23*	347,10 $\pm$ 27,97*
5-FU (3 $^{\circ}$ dia)	12,18 $\pm$ 1,07*	231,50 $\pm$ 40,25*
5-FU (5 $^{\circ}$ dia)	5,22 $\pm$ 0,95*	343,40 $\pm$ 33,72
5-FU (15 $^{\circ}$ dia)	0,69 $\pm$ 0,28	-

Os valores representam a media  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparados ao grupo salina (controle). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

**Tabela 15 – Efeito do 5-FU (150mg/kg) sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no jejuno de ratos.**

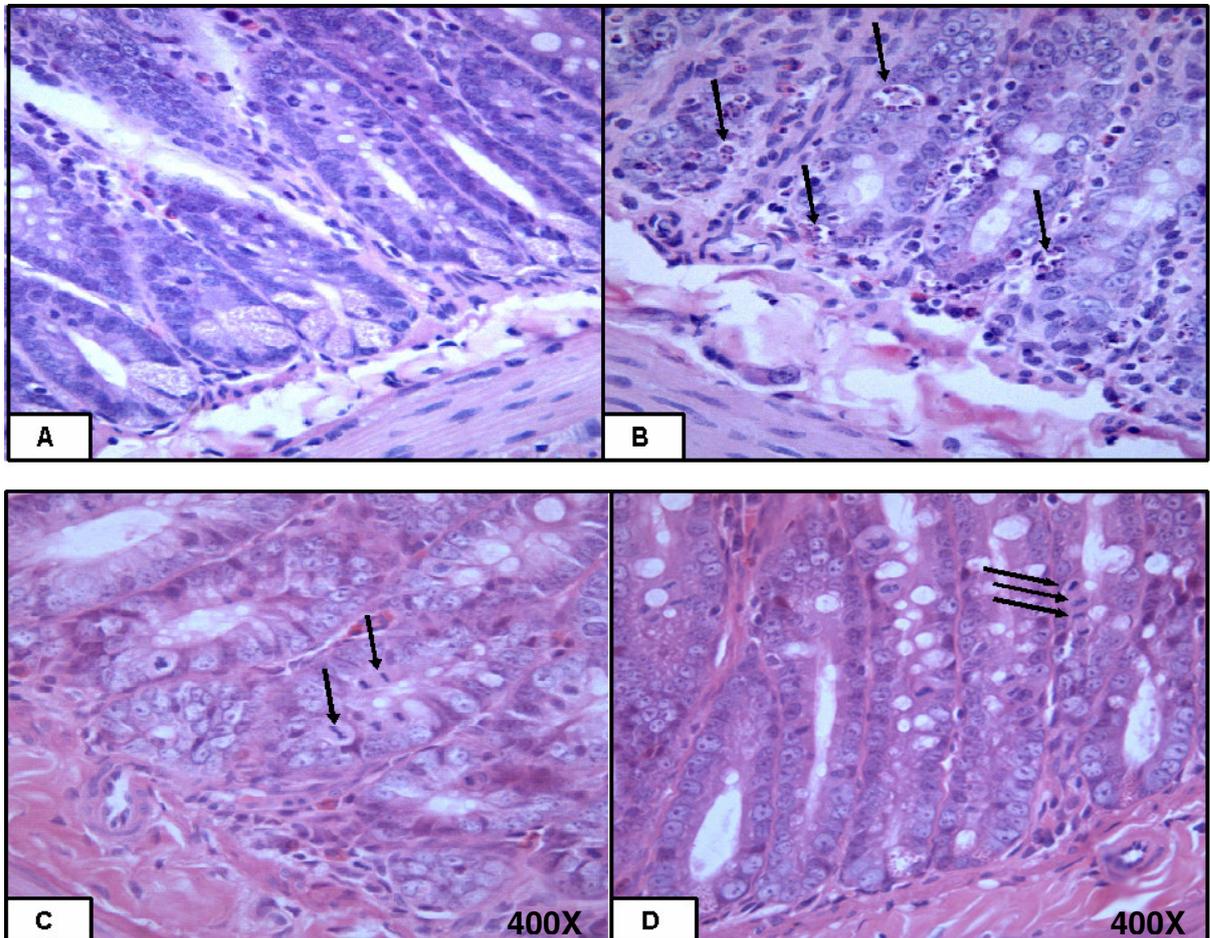
<b>Grupos (n=8)</b>	<b>U MPO/mg de tecido</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{g}/100\text{mg}</math> de tecido)</b>
Salina (controle)	3,19 $\pm$ 0,82	413,50 $\pm$ 31,26
5-FU (1 $^{\circ}$ dia)	8,26 $\pm$ 1,48*	377,20 $\pm$ 32,94*
5-FU (3 $^{\circ}$ dia)	11,29 $\pm$ 1,44*	246,40 $\pm$ 20,94*
5-FU (5 $^{\circ}$ dia)	1,89 $\pm$ 0,30	417,90 $\pm$ 32,02
5-FU (15 $^{\circ}$ dia)	0,28 $\pm$ 0,16	-

Os valores representam a media  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparados ao grupo salina (controle). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

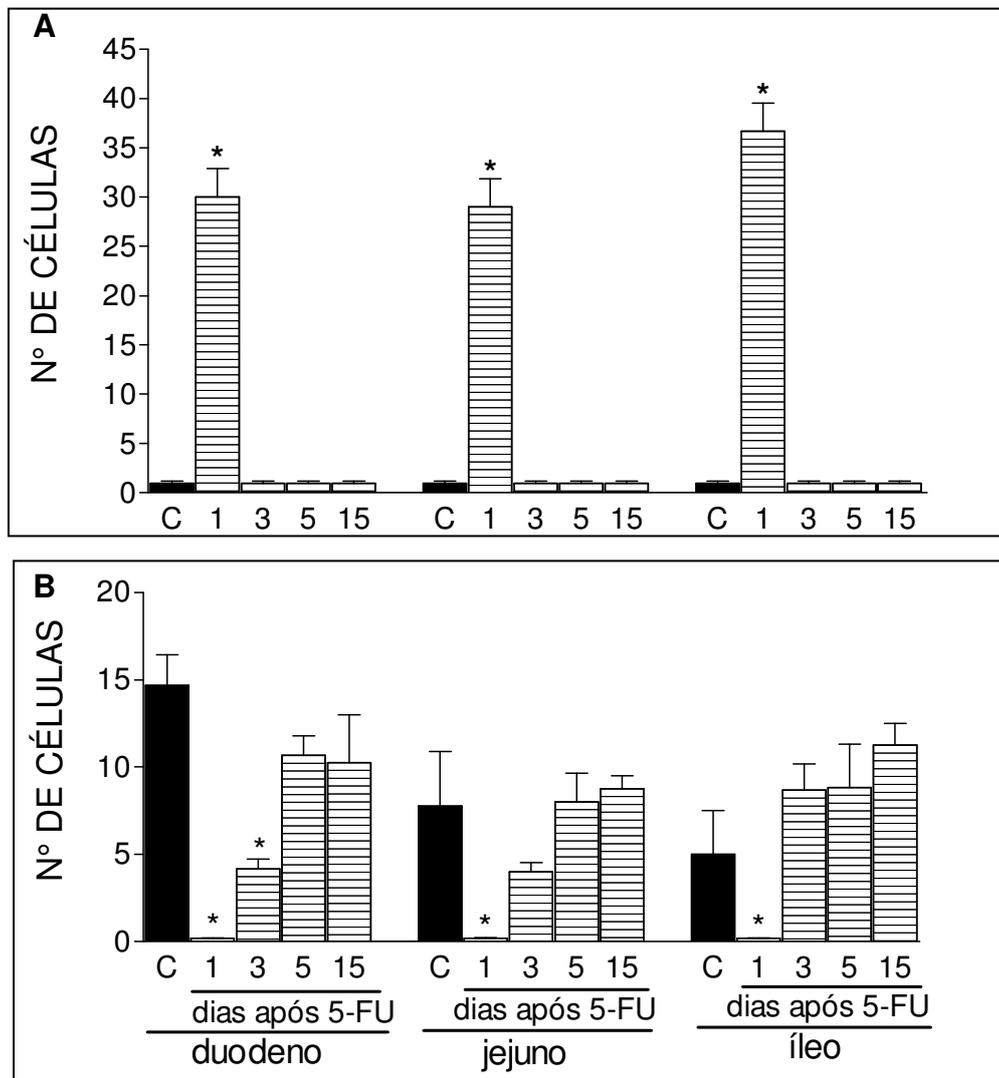
**Tabela 16 – Efeito do 5-FU (150mg/kg) sobre a atividade de MPO e a concentração de GSH no íleo de ratos.**

<b>Grupos (n=8)</b>	<b>U MPO/mg de tecido</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{g}/100\text{mg}</math> de tecido)</b>
Salina (controle)	2,05 $\pm$ 0,67	336,50 $\pm$ 38,68
5-FU (1 $^{\circ}$ dia)	4,93 $\pm$ 0,68*	242,80 $\pm$ 17,17*
5-FU (3 $^{\circ}$ dia)	10,09 $\pm$ 2,00*	245,80 $\pm$ 28,49*
5-FU (5 $^{\circ}$ dia)	1,93 $\pm$ 0,69	332,50 $\pm$ 27,79
5-FU (15 $^{\circ}$ dia)	0,80 $\pm$ 0,67	-

Os valores representam a media  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparados ao grupo salina (controle). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 29 – Fotomicrografias do duodeno de ratos tratados com salina ou 5-FU para observar apoptose e mitose.** Nos animais tratados com salina (controle; A, C), observa-se poucas células em apoptose e células em mitose. Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (3° dia experimental), observa-se células da cripta em intenso processo de apoptose (B; seta) e poucas células em mitose. Nos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU (5° dia experimental) verifica-se células da cripta em mitose (metáfase) (D, seta) e poucas células em apoptose. (A,B,C,D; 400X).



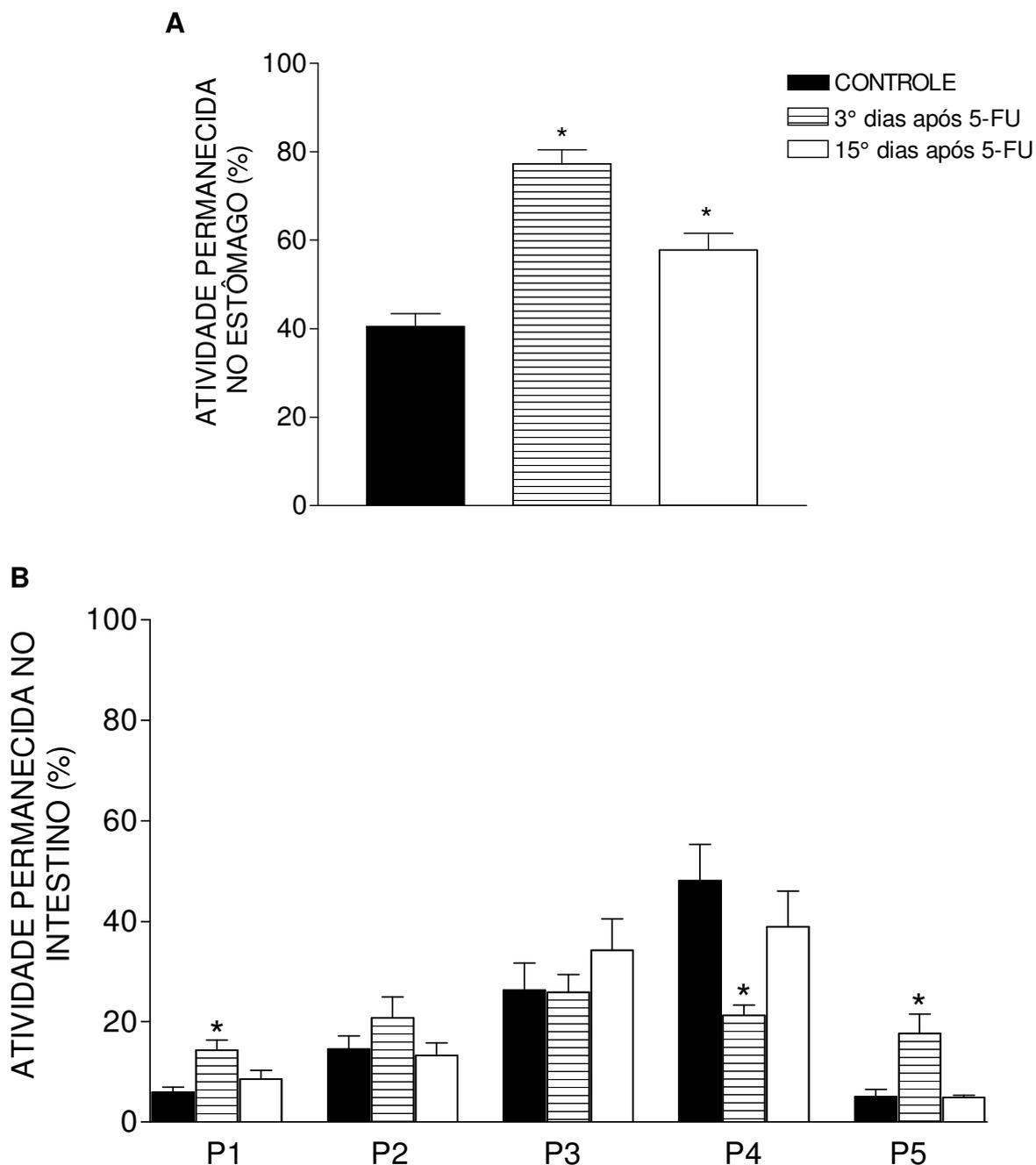
**FIGURA 30 – Índice apoptótico e mitótico de tecidos intestinais de ratos (n=6) tratados com salina ou 5-FU.** Animais foram pré-tratados com salina (C) ou 5-FU (150mg/kg) e sacrificados no 1, 3, 5, 15 dias. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para avaliação de apoptose (A) e mitose (B) por cripta, em um total de 20 criptas. Observa-se intensa apoptose no 1 dia após tratamento em todos os segmentos (A) e verifica-se aumento de mitose somente a partir do 3 após tratamento (B). Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  comparados ao grupo salina (C). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.8. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de importante retarde no esvaziamento gástrico e no trânsito intestinal em ratos acordados.**

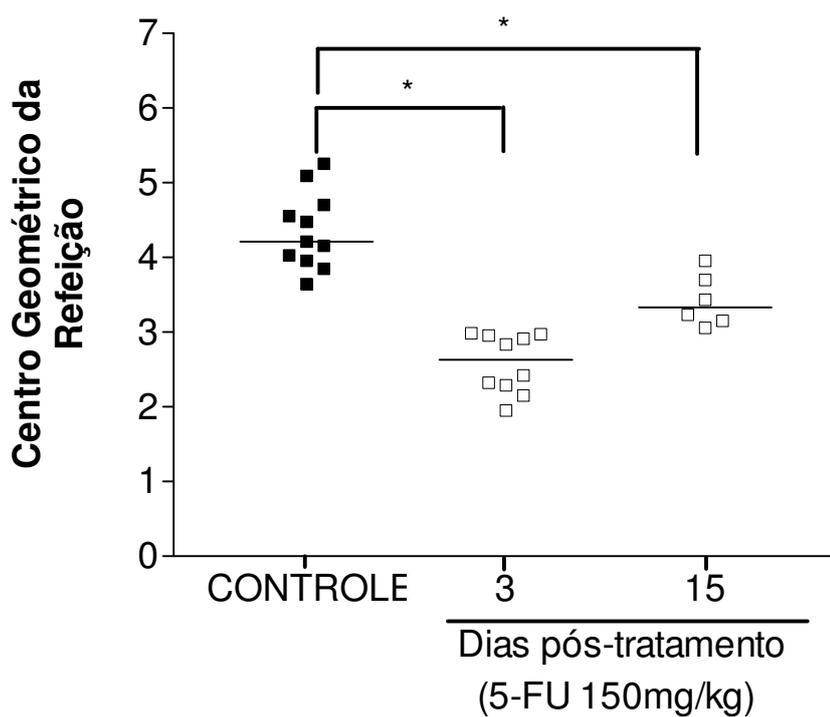
Na Figura 31A, foi encontrado significativo retarde no esvaziamento gástrico em ratos acordados tanto na após 3 dias (fase inflamatória) como após 15 dias (fase pós-inflamatória) do tratamento com 5-FU (150 mg/kg), quando comparado aos animais controle, com valores de  $77,3\pm 23,16\%$  no 3 dia; de  $57,76\pm 3,83$  no 15 dia, comparado a retenção de  $40,5\pm 2,90$  para os animais controle.

Quando se observou o trânsito intestinal (Figura 31B), houve um retarde nos segmentos P1 e P5 e uma aceleração no segmento P4 no 3° dia experimental em comparação aos animais controle (salina). No 15° dia, não foi observada diferença significativa em nenhum segmento intestinal quando comparado aos animais controle.

Na Figura 32, verificou-se a distribuição do isótopo radioativo ao longo do TGI dos animais tratados com salina ou 5-FU durante a fase inflamatória e pós-inflamatória. Nos animais controle que receberam salina, a maior parte do marcador ficou retido entre os segmento 4 e 5. Ao passo que, nos animais tratados com 5-FU (150 mg/kg) e sacrificados no 3° dia, a maior parte do marcador ficou entre os segmentos 2 e 3. Nos animais tratados com 5-FU e sacrificados no 15° dia, a maior parte do marcador ficou entre os segmentos 3 e 4.



**FIGURA 31 – Retenção gástrico e trânsito intestinal de líquidos em ratos acordados tratados com salina (controle) ou 5-FU (150 mg/kg).** Atividade remanescente no estômago (A) e segmentos intestinais (P1-P5, B), 30min depois da gavagem de 5% de soro glicosado (1.0 ml/kg) com <sup>99m</sup>tecnécio (500μCi). Os valores foram expressos como porcentagem da atividade total no trato gastrointestinal e como média ± E.P.M. \* p<0,05 comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



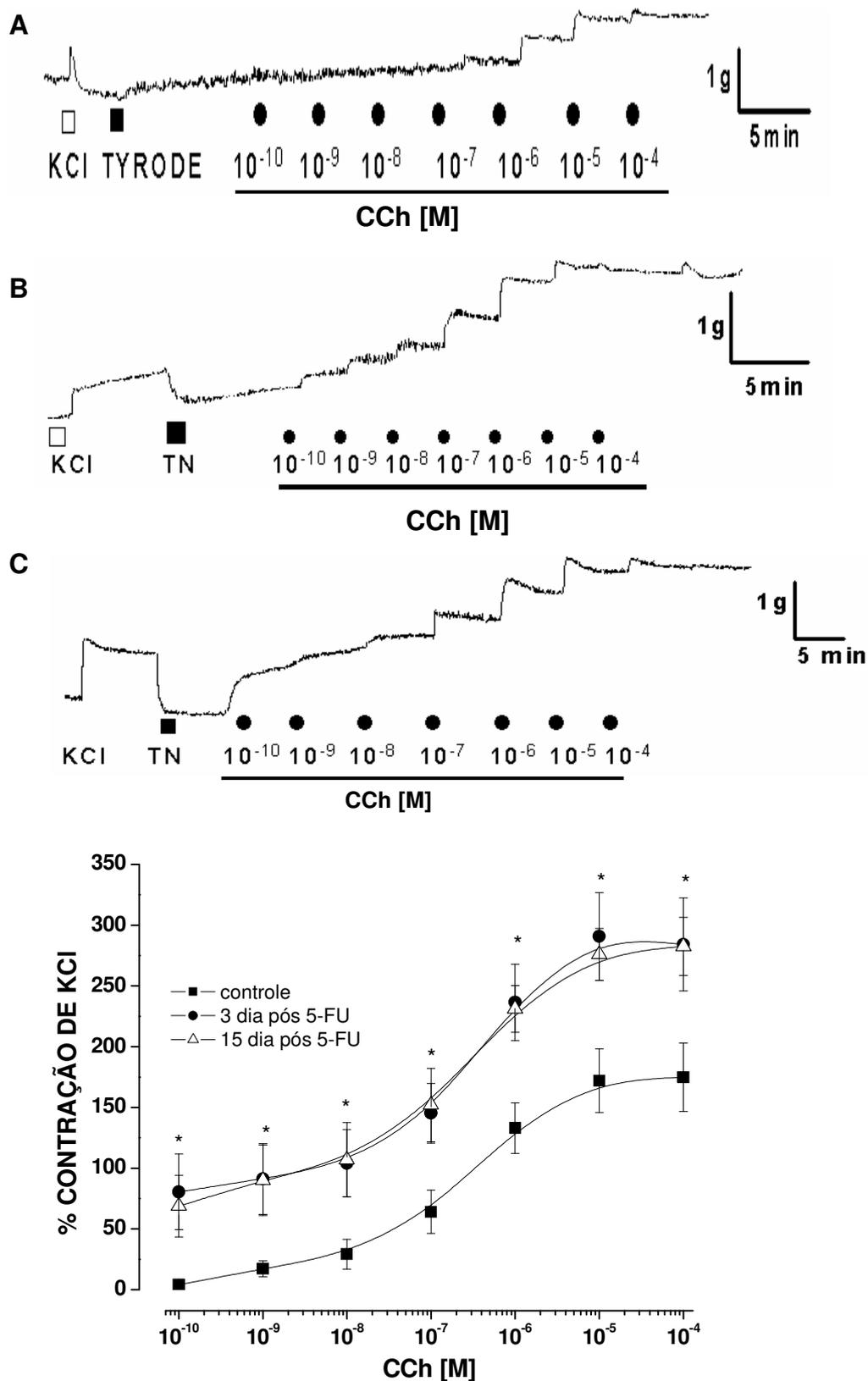
**FIGURA 32 – Efeito do tratamento com 5-FU sobre a distribuição do centro geométrico da refeição teste em ratos acordados.** A progressão da refeição se prestou para determinação do centro geométrico da refeição, índice do trânsito intestinal. Esse índice foi obtido pela contagem radioativa de cada segmento do TGI [(Estômago (1) intestino delgado (2,3,4,5,6) e cólon (7)], 30min depois da gavagem de 5% de soro glicosado (1.0 ml/kg) com <sup>99m</sup>tecnécio (500 μCi). Os valores foram expressos na forma de “scatter”, com a linha horizontal representando a mediana. \* p<0,05 comparado ao grupo controle. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.9. Mucosite intestinal em ratos é acompanhada de aumento na contratilidade do músculo liso do estômago e do duodeno.**

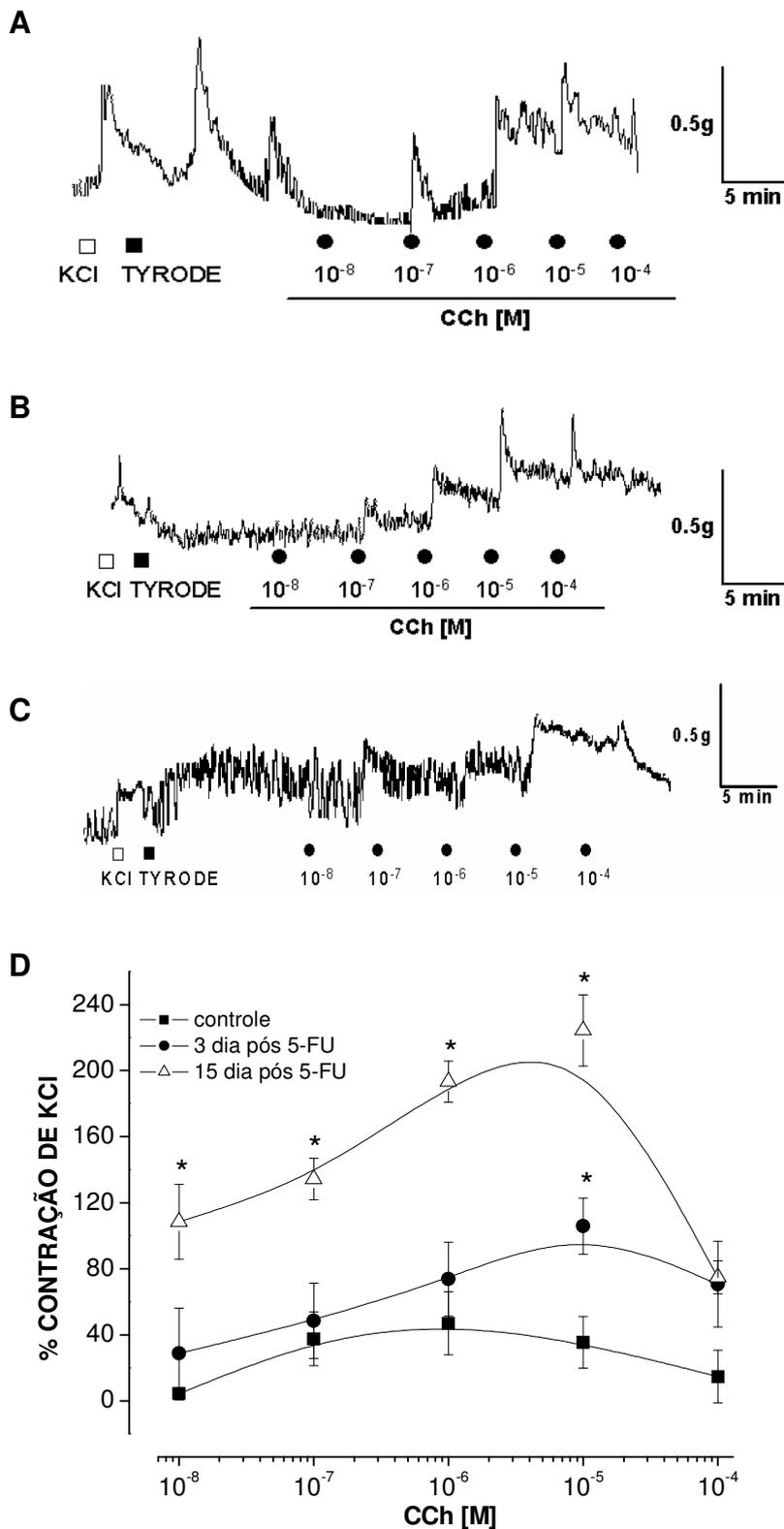
Nos experimentos para avaliarmos a atividade mecânica do músculo liso gastrointestinal, foi observado que o 5-FU induziu uma hipercontratilidade no músculo liso do fundo gástrico de animais submetidos a mucosite intestinal quando estimulados pelo carbacol em concentrações cumulativas ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M) (Figura 33A, B e C).

A contração máxima ocorreu na concentração de  $10^{-5}$ M no 3° dia experimental (CCh  $10^{-5}$ M, controle =  $171.90 \pm 26.22\%$ , 5-FU =  $290.78 \pm 36.17\%$ ). Na concentração de  $10^{-4}$ M no 15° dia experimental (CCh  $10^{-4}$ M, controle =  $174.78 \pm 28.24\%$ , 5-FU =  $282.55 \pm 23.83\%$ ), quando comparada a contrações controle de KCl (Figura 33D).

Resultados semelhantes foram observados no músculo liso duodenal quando estimulados com carbacol (Figura 34A e B), com valores máximos na concentração de  $10^{-5}$ M, no 3° dia experimental (controle =  $35.41 \pm 15.63\%$ , 5-FU =  $105.80 \pm 16.87\%$ ) e no 15° dia experimental (controle =  $35.41 \pm 15.63\%$ , 5-FU =  $224.38 \pm 21.61\%$ ) quando comparada a contrações controle de KCl (Figura 34C).



**FIGURA 33 – Contratilidade do músculo liso do fundo de estômago de ratos tratados com salina ou 5-FU.** (A) Registro típico da contratilidade do fundo de estômago dos animais controle (salina-A), e de animais tratados com 5-FU e sacrificados no 3 dia (B), ou no 15 dia (C). (D) Representa os dados médios  $\pm$  E.P.M das curvas de CCh + salina (■, n=8), CCh + 5-FU no 3 dia experimental (●, n=6), e CCh + 5-FU no 15 dia experimental (△, n=5). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (salina). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**FIGURA 34 – Contratilidade do músculo liso duodenal de ratos tratados com salina ou 5-FU.** Registro típico da contratilidade do duodeno de animais controle (salina-A), e de animais tratados com 5-FU e sacrificados no 3º dia (B) e no 15º dia (C). (D) Representa os dados médios  $\pm$  E.P.M das curvas de CCh + salina (■, n=7), CCh + 5-FU no 3º dia experimental (●, n=4), e CCh + 5-FU no 15º dia experimental (△, n=4). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (salina). Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Bonferroni.

## 5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstra que IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF têm importância no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Ademais, nosso trabalho também sugere que a mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos está associada a desordens da motilidade gastrointestinal (alterações no esvaziamento gástrico e na contratilidade do músculo liso gastrointestinal), tanto na fase inflamatória, como na fase pós-inflamatória da mucosite intestinal.

Baseado em dados da literatura, utilizamos duas doses de 5-FU (150 ou 450mg/kg) para induzir mucosite em duas espécies de camundongos (balb-c e c57/black). Observamos que, principalmente na dose de 450mg/kg, houve o desenvolvimento da mucosite intestinal tanto nos camundongos balb-c como c57/black.

Podemos destacar como alterações histológicas importantes encontradas nos camundongos tratados com 5-FU, as seguintes: encurtamento dos vilos, aprofundamento das criptas e diminuição da razão vilo/cripta.

Também encontramos intenso infiltrado neutrofílico e aumento de citocinas, como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC, IL-6 e IL-4 no duodeno dos camundongos estudados.

Nossos dados estão de acordo com vários estudos que mostram que a injúria epitelial com infiltração de neutrófilos na mucosa configura a fase inflamatória da mucosite (SONIS *et al.*, 2004) também descrita por Duncan e Grant (2003).

Assim, a mucosite induzida por antineoplásicos provoca destruição das células epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (SONIS *et al.*, 2004; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004).

Os neutrófilos representam um componente central da resposta imune, que é importante nos mecanismos como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da ativação da produção de mediadores inflamatórios (REAVES; CHIN; PARKOS, 2005).

Trabalhos de Edens *et al.* (2002) que usam o modelo *ex vivo*, mostram que a migração de neutrófilo para as células epiteliais pode induzir alterações de permeabilidade do epitélio intestinal. Essas alterações da permeabilidade do epitélio intestinal poderiam estar relacionadas a eventos diarréicos.

Nossos resultados mostram que a dose de 450mg/kg causou mais lesões intestinais, tanto nos camundongos balb-c como nos c57/black. Porém, trabalhos de Carneiro-Filho *et al.* (2004) demonstraram que a dose única de 150mg/kg em animais balb-c já era suficiente para produzir mucosite intestinal. Essa mucosite era acompanhada de importante perda de peso, redução da altura dos vilos e aprofundamento das criptas. Sendo essas alterações observadas a partir do quarto dia após o tratamento com 5-FU, continuando até o sexto dia. Possivelmente a cepa de animais que utilizamos e o ambiente diferente possam ter alterado a sensibilidade destes animais ao 5-FU.

O estabelecimento do modelo de mucosite intestinal em animais é importante. Tendo em vista, que muitos eventos histopatológicos que acompanham a mucosite intestinal em modelo animal são idênticos aos observados em humanos. KEEFE *et al.* (2000), em um estudo clínico utilizando regimes de múltiplas drogas antineoplásicas, observaram redução na área dos vilos em 24% e redução no tamanho das criptas em 26%, no terceiro dia após a quimioterapia, sendo que no 16º dia estas medidas retornaram aos valores iniciais. A contagem mitótica também se

reduziu em 72% no terceiro dia após quimioterapia, retornando a valores normais no 16º dia.

Parte dessas alterações encontradas na mucosa intestinal induzida por antineoplásicos tem a participação de citocinas. Dentre essas podemos citar a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  que estimulam a produção de outras citocinas, dos metabólitos do ácido araquidônico e das proteases por macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, fibroblastos e células epiteliais (SARTOR, 1994).

Williams (2001) destaca que as citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 contribuem para a gravidade e manutenção da mucosite intestinal induzida por antineoplásicos. Trabalhos de Lima *et al.* (2005) demonstraram que a administração de talidomida e pentoxifilina protegiam a mucosa oral de hamster dos efeitos provocados pelo tratamento com 5-FU, ambas substâncias agem por inibição de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1).

Para reforçar a participação de citocinas no desenvolvimento da mucosite oral e intestinal, dados da literatura demonstram aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em modelos animais de mucosite oral induzida por radioterapia (SONIS *et al.*, 2000). Essas evidências mostram a importância de citocinas no desenvolvimento da mucosite gastrointestinal por radioterapia e quimioterapia. Nossos dados corroboram com os dados encontrados na literatura, pois o tratamento de camundongos balb-c e c57/black com 5-FU (450 mg/kg) aumentaram a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC, IL-6 e IL-4.

Semelhante aos nossos resultados, dados da literatura mostram que outras drogas utilizadas na quimioterapia do câncer podem levar a mucosite intestinal com a participação de citocinas.

De Koning *et al.* (2006) demonstram que TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 estão aumentadas nas células da lamina própria de camundongos balb-c tratados com metotrexato e Melo *et al.* (2007) demonstram que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC estão aumentadas no duodeno de camundongos c57/black tratados com irinotecano.

Tendo em vista os achados anteriormente descritos, objetivou-se nesse trabalho avaliar a participação de IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  utilizando um antagonista do receptor solúvel de IL-1 (IL-1Ra). Observamos que o tratamento com o antagonista IL-1Ra foi capaz de proteger significativamente o duodeno, jejuno e íleo de camundongos balb-c e c57/black das alterações intestinais provocadas 5-FU, como: recuperação da altura dos vilos, recuperação da profundidade das criptas, diminuição do infiltrado neutrofílico e diminuição do aumento de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC.

Encontramos na literatura que IL-1 está aumentada na mucosa intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e em tecidos intestinais de animais submetidos à colite experimental. Com isso, acredita-se que IL-1 possa ter importância no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (YOUNGMAN *et al.*, 1993). Yan *et al.* (2006) demonstraram que IL-1 estimula a expressão de genes responsáveis pela produção de fatores inflamatórios COX-2, MCP-1, MIP-2, iNOS, e RANTES em cultura de células epiteliais. De acordo com Yan *et al.* (2006) o aumento da expressão desses genes ocorre possivelmente pela ação de NF- $\kappa$ B.

Outra citocina que despertou nosso interesse foi a IL-4, parte desse interesse está na sua característica de poder ser anti e pró-inflamatória em modelos de inflamação intestinal (KAMPEN; GAULDIE; COLLINS, 2005; BAMIAS *et al.*, 2005; VALLANCE *et al.*, 2007). Assim, utilizamos animais knockout para IL-4 e procuramos induzir mucosite intestinal como anteriormente descrito. Observamos que os animais

deficientes para IL-4 tiveram menor lesão intestinal quando tratados por 5-FU em comparação aos animais selvagens.

Podemos descrever que os animais deficientes para IL-4 quando tratados apresentaram uma menor redução da altura dos vilos e da razão vilo/cripta em todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo), o que nos mostra uma menor lesão induzida pelo 5-FU.

Além disso, verificou-se um menor infiltrado neutrofílico e uma diminuição de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-6 no duodeno de animais deficientes para IL-4 e tratados com 5-FU em comparação ao duodeno dos animais selvagens que receberam o mesmo tratamento. Esses dados sugerem que IL-4 pode ter um papel pró-inflamatório na mucosite intestinal por 5-FU.

Nos reportando novamente a literatura, encontramos dados que reforçam a constatação do papel da IL-4 como citocina pró-inflamatória em modelos de inflamação intestinal. Trabalhos de Kampen, Gauldie e Collins (2005) demonstraram que camundongos transfectados com cDNA de IL-4 para murinos (Ad5IL-4) desenvolviam colite que era independente de células mastocitárias e células T, caracterizada pela infiltração de mononucleares e granulócitos, TNF- $\alpha$  era um mediador importante dessa colite. Também podemos encontrar o papel de IL-4 como pró-inflamatória em modelos de colite induzida por oxazolone (BOIRIVANT *et al.*, 1998). Foi demonstrada ainda a associação de IL-4 com inflamação intestinal produzida por helmintos (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000).

Outros autores mostraram que IL-4 pode exacerbar os achados inflamatórios em modelos de colite do tipo Th1, mostraram que o efeito pró-inflamatório da IL-4 pode ocorrer em lesões intestinais mediadas por célula T (FORT *et al.*, 2001). Alguns mecanismos utilizados pela IL-4 são a fosforilação e a

ativação de STAT-6 pelas proteínas JAK1 e 3, em situações de inflamação intestinal como colite e parasitoses (SCHINDLER; DARNELL, 1995; KHAN *et al.*, 2001; OKUDA *et al.*, 2003).

Tendo em vista a ação da IL-4 sobre STAT-6, tentamos induzir mucosite intestinal por 5-FU em camundongos deficientes em STAT-6. Os dados pré-liminares mostram que esses animais apresentam menos mucosite intestinal em comparação aos animais selvagens tratados com 5-FU (dados não mostrados).

Assim, os dados obtidos avaliando a IL-4 nos levam a sugerir que essa citocina tem importância no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU.

Outra citocina que despertou nosso interesse foi a IL-18, pois é demonstrado o aumento de IL-18 na mucosa intestinal em doença de Crohn (PIZZARO *et al.*, 1999; PAPADAKIS *et al.*, 2005). Em nosso Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, Freitas (2007) observou que camundongos deficientes para IL-18 ou pré-tratados com IL-18bp apresentavam melhoria na mucosite intestinal induzida por irinotecano em comparação aos animais selvagens tratados com irinotecano. Porém no presente estudo, camundongos deficientes para IL-18 continuaram a apresentar mucosite intestinal induzida por 5-FU, semelhante aos animais selvagens.

Em parte, podemos sugerir que o papel de IL-18 deva ser menos importante no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Ainda baseado nesses resultados, podemos inferir que provavelmente os antineoplásicos que causam lesão intestinal como 5-FU e irinotecano devam induzir mucosite por mecanismos diferentes.

Outro importante mediador investigado foi o fator de ativação plaquetário (PAF). Com esse intuito, utilizamos duas abordagens: 1<sup>a</sup> utilizamos camundongos

deficientes para o receptor de PAF e procuramos induzir mucosite intestinal com 5-FU; na 2ª abordagem, fizemos o pré-tratamento de outro grupo de camundongos com um antagonista do receptor de PAF, o BN 52021 (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997). Os nossos resultados mostram que tanto os animais deficientes para o receptor de PAF como os tratados com BN 52021 tiveram significativamente menos mucosite intestinal induzida por 5-FU em comparação aos animais selvagens tratados com 5-FU.

Com relação aos achados microscópicos observou-se uma preservação histológica principalmente no duodeno. Os animais deficientes para o receptor PAF quando tratados com 5-FU não apresentarem aumento de citocinas, tais como: IL-1 $\beta$ , KC. Entretanto, não observamos nesses animais uma diminuição do infiltrado neutrofílico no duodeno induzido por 5-FU.

Dados semelhantes nós obtivemos com o pré-tratamento com o BN 52021, isso mostra que o PAF pode ter participação no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos, por um mecanismo independente da inibição da migração de neutrófilos.

Dados da literatura demonstram que o PAF é um mediador inflamatório produzido pelo intestino durante lesões aguda (SUN; HSUEH, 1988) e é um mediador importante na patogênese da enterocolite necrozante (HSUEH *et al.*, 2003). Ele pode estar associado a lesões intestinais provocadas por choque com endotoxinas (HSUEH; GONZALEZ-CRUSSI; ARROYAVE, 1987) e pode estar associado à lesão por isquemia/reperfusão (CAPLAN; SUN; HSUEH, 1990).

Outros trabalhos demonstram que células epiteliais da mucosa intestinal humana contribuem para produção de PAF, tanto em tecidos intestinais normais como em tecidos intestinais inflamados (FERRARIS *et al.*, 1993). Esses trabalhos

demonstram que não só os leucócitos, mas também as células epiteliais intestinais, devam ser importantes nos eventos inflamatórios. Nosso trabalho demonstra pela primeira vez a participação de PAF na mucosite intestinal por 5-FU em camundongos.

Ainda no sentido de avaliar a participação de outro mediador eicosanóide na patogênese da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos, avaliamos a via da lipoxigenase na patogênese dessa doença. Induzimos mucosite intestinal em animais deficientes para 5-lipoxigenase (5-LO). Nossos resultados mostram que esses animais continuam a apresentar lesões intestinais provadas pela 5-FU de maneira semelhante aos animais selvagens tratados com 5-FU.

Esses resultados sugerem que essa via não deva ser de tanta importância para o desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos.

Dados da literatura sobre a importância da via 5-lipoxigenase no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais são contraditórios. Trabalho de Hendel, Ahnfelt-Rønne e Nielsen (2002) demonstraram não haver aumento de RNAm para enzima 5-LO em estágios agudos e crônicos de doenças inflamatórias intestinais em indivíduos com colite ou doença de Crohn, em comparação a indivíduos sem doença. Outros trabalhos mostram que derivados da 5-LO não são importantes no desenvolvimento da colite por antiinflamatório não esterodais em modelos de doença inflamatória intestinal experimental (NARUSHIMA *et al.*, 2007). Todavia, outros trabalhos mostram que existe produção de leucotrienos derivados da via da 5-lipoxigenase em modelos animais de colite aguda, bem como o tratamento com drogas que inibam a 5-LO pode ser eficaz na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais (RASK-MADSEN *et al.*, 1992).

Outra possibilidade testada nesse estudo foi o papel do receptor da morte (receptor FAS/CD95) no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos. Está demonstrado que o 5-FU pode agir via receptor que induz a ativação de caspase 8. A ativação de caspase 8 pode levar a morte celular de células neoplásicas em modelos de câncer de mama e de cólon (NAGATA *et al.*, 1999; STENNICKE; SALVESEN, 2000; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2004).

Assim, uma hipótese avaliada por nós era de que esse receptor da morte também pudesse estar induzindo morte celular das células epiteliais intestinais pela ação do 5-FU. Para isso, utilizaram-se camundongos deficientes para FAS e tentamos induzir mucosite intestinal por 5-FU. Entretanto, os camundongos deficientes para FAS (-/-) persistiram apresentando importantes lesões intestinais, semelhantes às lesões encontradas nos camundongos selvagens tratados com 5-FU. Possivelmente, nossa hipótese não se confirmou porque não deve ocorrer aumento da expressão desse receptor em células sem neoplasia. Diferentemente do que ocorre nas células neoplásicas em que existe um aumento da expressão do receptor FAS (NAGATA *et al.*, 1999; STENNICKE; SALVESEN, 2000; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2004).

A partir dos dados que obtivemos, sugerimos que IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF devam ser importantes no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU. Também sugerimos que IL-18, 5-LO não participem no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos. Sugerimos, ainda, que parte desses mediadores possa ser produzida pela mucosa intestinal ou pelo infiltrado neutrofílico observado nos segmentos intestinais dos camundongos submetidos a mucosite intestinal por 5-FU.

Outro objetivo do nosso trabalho era fazer um estudo funcional dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU, tendo em vista que os efeitos colaterais mais freqüentes da quimioterapia antineoplásica são os sintomas gastrintestinais.

Nossos dados demonstram, pela primeira vez, que os efeitos da mucosite intestinal induzida por 5-FU em rato está associada a desordens da motilidade gastrintestinal (retarde no esvaziamento gástrico e hipercontratilidade do músculo liso gastrintestinal) tanto na fase inflamatória como na fase pós-inflamatória da mucosite intestinal por 5-FU em ratos.

Os pacientes com câncer podem sofrer de vários sintomas gastrintestinais, tais como, dispepsia, disfagia e diarréia (RIEZZO *et al.*, 2005). Esse conjunto de sintomas foi denominado síndrome dispéptica associado à quimioterapia do câncer (CADS). Recentemente, dados da literatura sugerem que as desordens da motilidade gastrintestinal podem ser uma das causas de CADS (NELSON *et al.*, 2002, RIEZZO *et al.*, 2005). 5-FU é uma das drogas antineoplásicas mais importantes e pode induzir mucosite intestinal que está associado à síndrome dispéptica (BAERG *et al.*, 1999).

Como as técnicas que nos dispúnhamos para fazer a avaliação funcional haviam sido validados em ratos, tivemos que estabelecer o modelo de mucosite intestinal nesses animais. Nosso trabalho demonstra que a administração de 5-FU nos ratos resultou em perda importante de peso, leucopenia, diminuição na relação vilo/cripta, infiltração neutrofílica, diminuição na concentração intestinal de GSH, que pode ser secundária ao consumo por espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses achados foram observados para o duodeno, jejuno e íleo após 3 dias da

administração de 5- FU (fase inflamatória), com reversão completa após 15 dias após o tratamento (fase pós-inflamatória).

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que mostrou que a mucosite é um processo complexo sendo iniciada por injúria das células do epitélio basal da mucosa e de tecido subjacente. A injúria não ligada ao DNA é iniciada por uma variedade de mecanismos, incluindo a geração de ROS (SONIS *et al.*, 2004).

A injúria intestinal inclui alteração na atividade da enzima hidrolase da borda em escova do epitélio das mucosas oral e intestinal (PETSCHOW; CARTER; HUTTON, 1993), em encurtamento dos vilos, em aprofundamento das criptas, e no aumento de apoptose nas células das criptas intestinais com diminuição da sua proliferação (DU *et al.*, 1994; ORAZI *et al.*, 1996; FARRELL *et al.*, 1998; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Nossos dados também demonstram alterações no ciclo celular das criptas intestinais, com intensa apoptose no 1<sup>o</sup> dia experimental, associado à redução da mitose. Estas evidências não foram observadas após o 5<sup>o</sup> dia experimental. Como demonstrado por Pritchard, Potten e Hickman (1998), 5- FU induz máxima expressão de proteína p53 em criptas intestinais de camundongos após 24h do tratamento, com 5-FU e diminuição da expressão de p53 após 3 dias de tratamento. Este mecanismo pode estar envolvido no aumento da apoptose das células das criptas intestinais após a indução da mucosite intestinal pelo 5-FU, porém essa relação não foi avaliada no presente trabalho.

O retarde no esvaziamento gástrico observado nos ratos tratados com 5-FU pode ser devido a um aumento na complacência gástrica e/ou a um aumento na resistência antro-duodenal (HABA; SARNA, 1993). Esta informação nos auxilia no entendimento do possível mecanismo pelo qual a mucosite intestinal induzida por 5-

FU desencadeia importante retarde no esvaziamento gástrico tanto na fase inflamatória (3° dia experimental) como na fase pós-inflamatória (15° dia experimental). Observamos também um importante retarde do trânsito gastrintestinal quando avaliamos o centro geométrico da refeição nos ratos tratados com 5-FU na fase inflamatória e pós-inflamatória.

Até o presente momento, não havia nenhum dado na literatura que demonstrasse que a mucosite intestinal induzida por 5-FU está associada com desordens de motilidade. Assim, duas hipóteses foram propostas para confirmar nossos achados: 1ª é que a diminuição da motilidade gástrica após a mucosite intestinal induzida por 5-FU pode ser resultante da inflamação gástrica; 2ª refere-se à inflamação intestinal induzida pelo 5-FU que pode conduzir alterações na motilidade gastrintestinal.

A primeira hipótese parece ser menos provável, desde que em nosso modelo o tratamento com 5-FU não induziu danos nem macroscópico e nem microscópico na mucosa gástrica, e nem aumentou a atividade de MPO no estômago [controle (salina)=  $1,74 \pm 0,28$  UMPO/mg; 5-FU=  $1,26 \pm 0,22$  UMPO/mg].

Por outro lado, a segunda hipótese parece ser mais aceitável, desde que os parâmetros inflamatórios intestinais estudados (morfometria, atividade de MPO e dosagem de GSH) estavam presentes no 3° dia após o tratamento com 5-FU.

Esse resultado está de acordo com dados da literatura, pois foi demonstrado que a inflamação intestinal está associada com anormalidades do controle da motilidade gastrintestinal, não somente na fase inflamatória, mas também na fase pós-inflamatória em órgãos distantes em modelos de lesão inflamatória (MARTINOLLE *et al.*, 1995; ANNESE *et al.*, 1997; MOREELS *et al.*, 2001; AKIHO *et al.*, 2005).

Mais recentemente, Demedts *et al.* (2006) demonstraram que a inflamação intestinal induz alterações agudas e crônicas na contratilidade do músculo liso intestinal. Além, de diversos resultados experimentais mostrarem claramente uma interação entre a inflamação e a motilidade. Como exemplo, foi mostrado que a sepse inibe a motilidade gastrintestinal podendo ser influenciada pela produção de óxido nítrico (DE WINTER *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que a hipomotilidade intestinal e o retarde do esvaziamento gástrico podem ser encontrados em um modelo de íleo paralítico em rato (DE JONGE *et al.*, 2003).

Nossos resultados também demonstraram uma aceleração no trânsito intestinal somente no 3º dia experimental (fase inflamatória), isso, pode estar associado com a diarréia observada nos pacientes sob tratamento com 5- FU.

Nossos resultados mostram hipercontratilidade do músculo liso tanto do fundo gástrico como do duodeno após estimulados pelo carbacol (agonista muscarínico), tanto na fase inflamatória (3º dia) como na fase pós-inflamatória (15º dia) da mucosite intestinal por 5-FU.

Similarmente dados da literatura mostram que pacientes com dispepsia funcional (TACK *et al.*, 1998; SIMRÉN *et al.*, 2003) apresentam aumento no tônus do fundo gástrico. Esse fato pode determinar uma diminuição da acomodação gástrica e levar a sintomas dispépticos.

Além desses estudos, outros estudos também demonstram um aumento significativo na contratilidade do músculo gastrintestinal em resposta ao carbacol em situações de infecção, como na infecção por *T. spiralis* (VERMILLION; COLLINS, 1988) em ratos ou durante a fase crônica da inflamação induzida por *Schistosoma* em camundongos (MOREELS *et al.*, 2001).

Em modelos de doenças inflamatórias intestinais, foram observadas mudanças na contratilidade do músculo liso colônico (DEPOORTERE *et al.*, 1999). Todas estas alterações associadas a situações de inflamação e/ou infecção podem ser resultado da produção de mediadores contraturantes. Nesta linha, foi demonstrado que no músculo liso gastrintestinal há uma resposta aumentada dos canais iônicos as citocinas Th1/Th2 (DEPOORTERE *et al.*, 1999; AKIHO *et al.*, 2005, 2007), bem como uma resposta diminuída a mediadores não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) (MOREELS *et al.*, 2001).

Estes distúrbios acima mencionados da motilidade gastrintestinal podem contribuir para o aparecimento dos sintomas dispépticos relacionados com a quimioterapia do câncer. Assim, é possível inferir que a persistente dismotilidade gastrintestinal pode estar relacionada à síndrome dispéptica presente na quimioterapia do câncer (ISGAR *et al.*, 1983; NELSON *et al.*, 2002; RIEZZO *et al.*, 2005).

Adicionalmente, diversos trabalhos demonstram que persistente alteração na motilidade gastrintestinal pode ser relacionada com doenças funcionais, tais como síndrome do intestino irritável e com a dispepsia funcional (TACK; DEMEDTS; DEHONDT, 2002; SPILLER, 2004).

A associação de lesão intestinal com alterações de motilidade em ratos demonstradas nesse trabalho pode dá subsídios para a compreensão de como a quimioterapia antineoplásica induz sintomas dispépticos nos pacientes que utilizam essa terapêutica e entender como após a interrupção do tratamento muito pacientes relatam sintomas como: náusea, disfagia, dispepsia. Esses sintomas podem persistir por um período prolongado ou até por toda vida (TACK; DEMEDTS; DEHONDT, 2002; SPILLER, 2004).

Entretanto, não conseguimos demonstrar nesse trabalho qual o papel de IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF no desenvolvimento de alterações funcionais encontradas na mucosite intestinal experimental por 5-FU. Apesar disso, podemos destacar na literatura evidências da participação de IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF tanto em eventos inflamatórios como funcionais. Assim, nos permitimos fazer algumas inferências que podem nos ajudar em experimentos futuros.

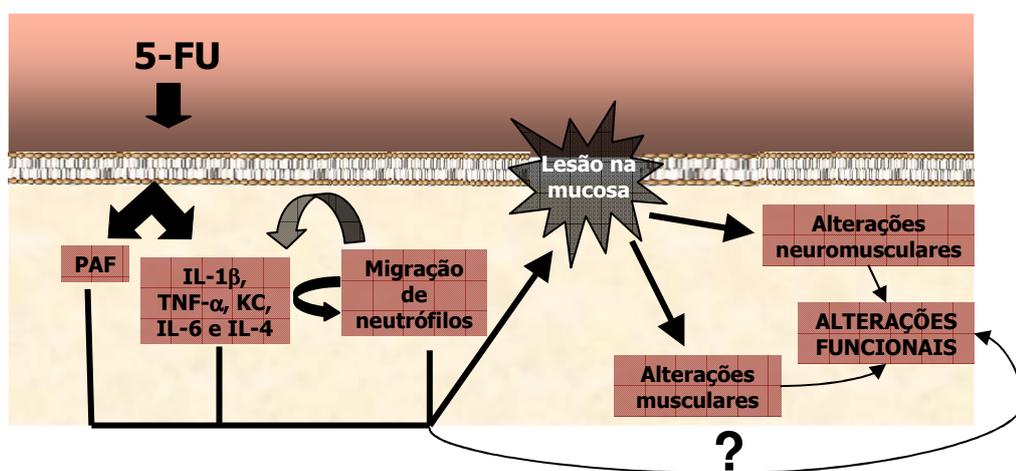
Encontramos dados na literatura que mostram que IL-4 é uma citocina chave na regulação da musculatura lisa intestinal durante processos inflamatórios (ZHAO *et al.*, 2003; FINKELMAN *et al.*, 2004). Essas influências da IL-4 nas alterações motoras do músculo liso intestinal também são descritas por Vallance *et al.* (2007). Esses autores demonstraram que animais transfectados com adenovírus (Ad5CAIL-4) podem induzir aumento de expressão de IL-4 e isso estava relacionado com a presença de hiperresponsividade das células musculares intestinais dos animais transfectados.

Também animais transfectados com adenovírus (Ad5CAIL-4) conseguem modular células inflamatórias no mesentério e na serosa intestinal. Outro autor Akiho *et al.* (2005) demonstraram aumento de IL-4 em tecidos inflamados e na camada muscular de segmentos intestinais de pacientes com Doença de Crohn.

Pode-se destacar que o PAF além de participar dos eventos inflamatórios de diversas patologias intestinais (DENIZOT *et al.*, 1991, 1992; DE BOISSIEU *et al.*, 1992) participa de alterações de motilidade gastrintestinal como foi demonstrado por Deshpande *et al.* (1994) que, ao tratar animais com colite induzida por TNBS com antagonista do receptor de PAF, as alterações de motilidade colônica eram revertidas. Esse achado é corroborado com a demonstração da presença de receptores para PAF no músculo liso intestinal (JEANNETON *et al.*, 1993).

Assim, é possível que haja participação de IL-4 e PAF nas alterações motoras demonstradas na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Porém são necessários experimentos para caracterizar a participação desses mediadores com as alterações motoras da mucosite intestinal por 5-FU, bem como para investigar as suas correlações.

Com base nos dados, que obtivemos sugerimos o seguinte modelo hipotético:



Por fim, concluímos que o 5-Fluorouracil induz mucosite intestinal em camundongos com a participação de IL-1β, IL-4, PAF, bem como induz mucosite intestinal em ratos associada à dismotilidade gastrointestinal no período inflamatório e pós-inflamatório.

Nossos achados, em parte, poderiam explicar os sintomas persistentes de CADs nos pacientes sob o tratamento 5-FU, além de contribuir no entendimento da patogênese da mucosite intestinal. Assim, auxiliar na descoberta de novas abordagens terapêuticas.

## 6. CONCLUSÃO

- ✓ Os modelos de mucosite intestinal por 5-FU em camundongos e ratos foram facilmente reprodutíveis;
- ✓ IL-1 $\beta$ , IL-4 parecem ser importantes no desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos, por um mecanismo que depende da infiltração de neutrófilos e da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC;
- ✓ PAF, por um mecanismo independente da migração de neutrófilos, pode está envolvido na mucosite intestinal por 5-FU em camundongos;
- ✓ IL-18, FAS, produtos da 5-LO parece não participar do desenvolvimento da mucosite intestinal por 5-FU em camundongos;
- ✓ A mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos está associada a uma dismotilidade gastrintestinal, que persiste com a resolução do processo inflamatório.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHO, H.; BLENNERHASSETT, P.; DENG, Y.; COLLINS, S. M. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. G226-G232, 2002.

AKIHO, H.; KHAN, W.I.; AL-KAABI, A.; BLENNERHASSETT, P.; DENG, Y.; COLLINS, S.M. Cytokine modulation of muscarinic receptors in the murine intestine. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 293: p. 250 – 255, 2007.

AKIHO, H.; LOVATO, P.; DENG, Y.; CEPONIS, P.J.; BLENNERHASSETT, P.; COLLINS, S.M. Interleukin-4- and -13-induced hypercontractility of human intestinal muscle cells—implication for motility changes in Crohn's disease. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 288: p. G609–G615, 2005.

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

ALTMANN, G. G. Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. **Am. J. Anat.**, v. 140 (2), p. 263-280, 1974.

ALVERDY, J. C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. **JPEN.**, v. 14 (4 Suppl), p. 109S-113S, 1990.

ANNESE, V.; BASSOTTI, G.; NAPOLITANO, G.; USAI, P.; ANDRIULLI, A.; VANTRAPPEN, G. Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 32: p. 1107 – 1117, 1997.

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

AUBÉ, A. C.; BLOTTIERE, H. M.; SCARPIGNATO, C.; CHERBUT, C.; ROZÉ, C.; GALMICHE, J. P. Inhibition of acetylcholine induced intestinal motility by interleukin 1 $\alpha$  in the rat. **Gut.**, v. 39, p. 470-474, 1996.

BAERG, J.; MURPHY, J.J.; ANDERSON, R.; MAGEE, J.F. Neutropenic enteropathy: a 10-year review. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34: p. 1068 – 1071, 1999.

BALIS, F. M.; SAVITCH, J. L.; BLEYER, W. A.; REAMAN, G. H.; POPLACK, D. G. Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. **J. Clin. Oncol.**, v. 3 (4), p. 485-489, 1985.

BAMIAS, G.; MARTIN III, C.; MISHINA, M.; ROSS, W. G.; RIVERA–NIEVES, J.; MARINI, M.; COMINELLI, F. Proinflammatory effects of T<sub>H</sub>2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. **Gastroenterology.**, v. 128, p. 654–666, 2005.

BARBARA, G.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. M. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. **Gastroenterology.**, v. 113, p. 1224-1232, 1997.

BISHOP, J. F.; JOSHUA, D. E.; LOWENTHAL, R. M.; KRONENBERG, H.; WHITESIDE, M. G.; COBCROFT, R.; DODDS, A.; WOLF, M.; MANOHARAN, A. A phase I-II study of cytosine arabinoside, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust. N. Z. J. Med.**, v. 16 (1), p. 48-51, 1986.

BOEHMER, C. H.; JAEGER, W. Capecitabine in treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 1A, p. 439-443, 2002.

BOIRIVANT, M.; FUSS, I. J.; CHU, A.; STROBER, W. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1929–1939, 1998.

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

BORMAN, R. A.; JEWELL, R.; HILLIER, K.. Investigation of the effects of platelet-activating factor (PAF) on ion transport and prostaglandin synthesis in human colonic mucosa in vitro. **Br. J. Pharmacol.** v. 123, p. 231–236, 1998.

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

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

CABALLERO, G. A.; AUSMAN, R. K.; QUEBBEMAN, E. J. Long-term, ambulatory continuous iv infusion of 5-FU for the treatment of advanced adenocarcinomas. **Cancer Treat. Rep.**, v. 69 (1), p. 13-15, 1985.

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

CAPLAN, M. S.; HEDLUND, E.; ADLER, L.; LICKERMAN, M.; HSUEH, W. The platelet-activating factor receptor antagonist WEB 2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis in rats. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 24, p. 296–301, 1997.

CAPLAN, M. S.; SUN, X. M.; HSUEH, W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet- activating factor (PAF-acether). **Gastroenterology.**, v. 99, p. 979–986, 1990.

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

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

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

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology.**, v. 111, p. 1683-1699, 1996.

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

DE BOISSIEU, D.; DENIZOT, Y. PAF in stools of children: correlations with gut inflammatory states. **Foods, Nutrition and Immunology.**, 1:35–43, 1992.

DE JONGE, W.J.; VAN DEN WIJINGARD, R.F.; THE FO TER BEEK, M.L.; BENNINK, R.J.; TYTGAT, G.; BUIJS, R.; REITSMA, P.; VAN DEVENTER, S.; BOECKXSTAENS, G. Postoperative ileum is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. **Gastroenterology.**, v.125: p. 1137 – 1147, 2003.

DE KONING, B. A. E.; VAN DIEREN, J. M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J.; VAN DER SLUIS, M.; MATSUMOTO, T.; YAMAGUCHI, K.; EINERHAND, A. W.; SAMSOM, J. N.; PIETERS, R.; NIEUWENHUIS, E. E. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate- induced mucositis. **Int. Immunol.**, 18(6):941–9, 2006.

DE WINTER, B.Y.; BREDENOORD, A.J.; DE MAN, J.G.; MOREELS, T.G.; HERMAN, A.G.; PELCKMANS, P.A. Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase and guanylyl cyclase on endotoxin-induced delay in gastric emptying and intestinal transit in mice. **Shock.**, v. 18: p. 125 – 131, 2002.

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.**, v. 18: p. 1102 – 1111, 2006.

DENIZOT Y, CHAUSSADE S, NATHAN N, COLOMBEL JF, BOSSANT MJ, CHEROUKI N, BENVENISTE J, COUTURIER D. PAF-acether and acetylhydrolase in stool of patients with Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, p. 432–437, 1992.

DENIZOT, Y.; CHAUSSADE, S.; BENVENISTE, J.; COUTURIER, D. Presence of PAF-acether in stools of patients suffering from inflammatory bowel disease. **C. R. Acad. Sci. III.**, v. 312, p. 329–33, 1991.

DEPOORTERE, I.; ASSCHE, G. V.; THIJS, T.; GEBOES, K.; PEETERS, T. L. Differential changes in ACh, motilin, substance P, and K<sup>+</sup>-induced contractility in rabbit colitis. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G61-G68, 1999.

DESHPANDE, Y.; LONGO, W. E.; CHANDEL, B.; NIEHOFF, M.; ROBINSON, S.; POLITIES, G.; VERNAVA, A. M.; KAMINSKI, D. L. Effect of platelet-activating factor and its antagonist on colonic dysmotility and tissue levels of colonic neuropeptides. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 256, p. R1–3, 1994.

DONALDSON, S. S.; LENON, R. A. Alterations of nutritional status: Impact of chemotherapy and radiation therapy. **Cancer.**, v. 43, p. 2036-2052, 1979.

DU, X.X.; DOERSCHUK, C.M.; ORAZI, A.; WILLIAMS, D.A. A bone marrow stromal-derived growth factor, interleukin-11, stimulates recovery of small intestinal mucosal cells after cytoablative therapy. **Blood.**, v. 83: p. 33 – 37, 1994.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 853-874, 2003.

ECKMANN, L.; JUNG, H. C.; SCHURER-MALY, C.; PANJA, A.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M. F. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. **Gastroenterology.**, v. 105, p. 1689–1697, 1993a.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F.; FIERER, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4569–4574, 1993b.

EDENS, H. A.; LEVI, B. P.; JAYE, D. L.; WALSH, S.; REAVES, T. A.; TURNER, J. R.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: Evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. **J. Immunol.**, v. 169, p. 476–486, 2002.

FARRELL, C.L.; BREADY, J.V.; REX, K.L.; CHEN, J.N.; DIPALMA, C.R.; WHITCOMB, K.L.; YIN, S.; HILL, D.C.; WIEMANN, B.; STARNES, C.O.; HAVILL, A.M.; LU, Z.N.; AUKERMAN, S.L.; PIERCE, G.F.; THOMASON, A.; POTTEN, C.S.; ULICH, T.R.; LACEY, D.L. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. **Cancer. Res.**, v. 58: p. 933 – 939, 1998.

FERRARIS, L.; KARMELI, F.; ELIAKIM, R.; KLEIN, J.; FIOCCHI, C.; RACHMILEWITZ, D. Intestinal epithelial cells contribute to the enhanced generation of platelet activating factor in ulcerative colitis. **Gut.**, v. 34, p. 665–668, 1993.

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S. C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K. B.; SCHOPF, L.; URBAN, J. F. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 139-155, 2004.

FORT, M.; LESLEY, R.; DAVIDSON, N.; MENON, S.; BROMBACHER, F.; LEACH, M.; RENNICK, D. IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2793–2800, 2001.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L., Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN.**, v. 12 (4), p. 325-331, 1988.

GARCIA-RODRIGUEZ, L. A.; RUIGOMEZ, A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. **Br. Med. J.**, v. 318, p. 565-566, 1999.

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

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

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

GRACIE, J. A.; FORSEY, R. J.; CHAN, W. L.; GILMOUR, A.; LEUNG, B. P.; GREER, M. R.; KENNEDY, K.; CARTER, R.; WEI, X. Q.; XU, D.; FIELD, M.; FOULIS, A.; LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 1393–1401, 1999.

GROSSI, L.; MCHUGH, K.; COLLINS, S. M. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. **Gastroenterology.**, v. 104, p. 1049-1056, 1993.

HABA, T.; SARNA, S.K. Regulation of gastroduodenal emptying of solids by gastropyloroduodenal contractions. **Am. J. Physiol.**, v. 264: p. G261 – G271, 1993.

HAWKER, P. C.; MCKAY, J. S.; TURNBERG, L. A. Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.**, v. 79, p. 508-511, 1980.

HENDEL, J.; AHNFELT-RØNNE, I.; NIELSEN, O. H. Expression of 5-lipoxygenase mRNA is unchanged in the colon of patients with active inflammatory bowel disease. **Inflamm. Res.**, v. 51(8), p. 423-426, 2002.

HICKOK, J. T.; ROSCOE, J. A.; MORROW, G. R.; KING, D. K.; ATKINS, J. N.; FITCH, T. R. Nausea and emesis remain significant problems of chemotherapy despite prophylaxis with 5-hydroxytryptamine-3 antiemetics. **Cancer.**, v. 97, p. 2880-2886, 2003.

HOFFMAN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6406–6416, 2000.

HOSSEINE, J. M.; GOLDHILL, J. M.; BOSSONE, C.; PINEIRO-CARRERO, V.; SHEA-DONOHUE, T. Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats. **Neurogastroenterol. Mot.**, v. 11, p. 347-356, 1999.

HSUEH, W.; CAPLAN, M. S.; QU, X. W.; TAN, X. D.; DE PLAEN, I. G.; GONZALEZ-CRUSSI, F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. **Pediatr. Dev. Pathol.**, v. 6, p. 6–23, 2003.

HSUEH, W.; GONZALEZ-CRUSSI, F.; ARROYAVE, J. L. Platelet-activating factor: an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. **FASEB J.**, v. 1, p. 403–405, 1987.

ISGAR, B.; HARMAN, M.; KAYE, M.D.; WHORWELL, P.J. Symptoms of irritable bowel syndrome in ulcerative colitis in remission. **Gut.**, v. 24: p. 190 – 192, 1983.

IZZO, R. S.; WITKON, K.; CHEN, A. I.; HADJIYANE, C.; WEINSTEIN, M. I.; PELLECCIA, C. Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 87, p. 1447–1452, 1992.

JACOBSON, K.; MCHUGH, K.; COLLINS, S. M. The mechanism of altered neural function in a rat model of acute colitis. **Gastroenterology.**, v. 112, p. 156-162, 1997.

JEANNETON, O.; DELVAUX, M.; BOTELLA, A.; FREXINOS, J.; BUENO, L. Platelet-activating factor (PAF) induces a contraction of isolated smooth muscle cells from guinea pig ileum: intracellular pathway involved. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 31–37, 1993.

KAMPEN, C. V.; GAULDIE, J.; COLLINS, S. M. Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 288, p. G111–G117, 2005.

KANAI, T.; WATANABE, M.; OKAZAWA, A.; SATO, T.; HIBI, T. Interleukin-18 and Crohn's disease. **Digestion.**, v. 63 (Suppl 1), p. 37–42, 2001.

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

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

KEEFE, D. M.; CUMMINS, A. G.; DALE, B. M.; KOTASEK, D.; ROBB, T. A.; SAGE, R. E. Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. **Clin. Sci.**, v. 92 (4), p. 385-389, 1997.

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

KHAN, W. I.; VALLANCE, B. A.; BLENNERHASSETT, P. A.; DENG, Y.; VERDU, E. F.; MATTHAEI, K. I.; COLLINS, S. M. Critical role for signal transducer and activator of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in trichinella spiralis-infected mice. **Infect. Immun.**, v. 69 (2), p. 838–844, 2001.

KOYAMA, S.; RENNARD, S. I.; LEIKAUF, G. D.; SHOJI, S.; VON ESSEN, S.; CLAASEN, L.; ROBBINS, R. A. Endotoxin stimulates bronchial epithelial cells to release chemotactic factors for neutrophils: a potential mechanism for neutrophil recruitment, cytotoxicity, and inhibition of proliferation in bronchial inflammation. **J. Immunol.**, v. 147, p. 4293-4301, 1991.

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

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59 (5), p.603-612, 2007.

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

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3(5), p. 330-338, 2003.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell.**, v. 94, p. 481–490, 1998.

MADARA, J. L.; PATAPOFF, T. W.; GILLECE-CASTRO, B.; COLGAN, S. P.; PARKOS, C. A.; DELP, C.; MRSNY, R. J. 5'-AMP is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 epithelial monolayers. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2320-2325, 1993.

MAGRATH, I. T.; JANUS, C.; EDWARDS, B. K.; SPIEGEL, R.; JAFFE, E. S.; BERARD, C. W.; MILIAUSKAS, J.; MORRIS, K.; BARNWELL, R. An effective therapy for both undifferentiated (including Burkitt's) lymphomas and lymphoblastic lymphomas in children and young adults. **Blood.**, v. 63(5), p. 1102-1111, 1984.

MARTINOLLE, J.P.; GARCIA-VILLAR, R.; MORE, J.; BUENO, L. Evidence for mast cell, leukotriene and nitric oxide involvement in the regulation of the adrenoreceptor number of inflamed small intestine in guinea pigs. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 3: p. 187 – 195, 1995.

MAZZUCHELLI, L.; HAUSER, C.; ZGRAGGEN, K.; WAGNER, H.; HESS, M.; LAISSUE, J. A.; MUELLER, C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. **Am. J. Pathol.**, v. 144, p. 997–1007, 1994.

MCCORMICK, B. A.; COLGAN, S. P.; DELP-ARCHER, C.; MILLER, S. I.; MADARA, J. L. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signaling to subepithelial neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v. 123, p. 895–907, 1993.

MCCORMICK, B. A.; HOFMAN, P. M.; KIM, J.; CARNES, D. K.; MILLER, S. I.; MADARA, J. L. Surface attachment of Salmonella typhimurium to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v. 131, p. 1599–1608, 1995.

MEENAN, J.; GROOL, T. A.; HOMMES, D. W.; DIJKHUIZEN, S.; TEN KATE, F. J.; WOOD, M.; WHITTAKER, M.; TYTGAT, G. N.; VAN DEVENTER, S. J. Lexipafant (BB-882), a platelet activating factor receptor antagonist, ameliorates mucosal inflammation in an animal model of colitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, p. 569–573, 1996.

MELO, M.; BRITO, G.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer. Chemoth. Pharm.**, doi:10.1007/s00280-007-0534-4.

MILKS, L. C.; BRONTOLI, M. J.; CRAMER, E. B. Epithelial permeability and the transepithelial migration of human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v. 96, p. 1241-1247, 1983.

MILLER, M. S.; GALLIGAN, J. J.; BURKS, T. F. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. **J. Pharmacol. Methods.**, v. 6(3), p. 211-217, 1981.

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

MOREELS, T. G.; DE MAN, J. G.; BOGERS, J.; DE WINTER, B. Y.; VROLIX, G.; HERMAN, A. G.; VAN MARCK, E. A.; PELCKMANS, P. A. Effect Shistosoma mansoni-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. G1030-G1042, 2001.

NAGATA, S. Fas ligand-induced apoptosis. **Annu. Rev. Genet.**, v. 33, p. 29–55, 1999.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 423–474, 2001.

NARUSHIMA, S.; DIMEO, D.; TIAN, J.; ZHANG, J.; LIU, D.; BERG, D. J. 5-Lipoxygenase-derived Lipid Mediators Are Not Required for the Development of NSAID-induced Inflammatory Bowel Disease in IL10<sup>-/-</sup> Mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 2007 Nov 29 [Epub ahead of print]

NASH, S.; STAFFORD, J.; MADARA, J. L. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **J. Clin. Invest.**, v. 80, p. 1104-1113, 1987.

NELSON, K.; WALSH, D.; SHEEHAN, F. Cancer and chemotherapy-related upper gastrointestinal symptoms: the role of abnormal gastric motor function and its evaluation in cancer patients. **Support. Care. Cancer.**, v. 10: p. 455 – 461, 2002.

NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; LIANG, T. W.; CARNES, D. K.; MADARA, J. L. Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. **Gastroenterology.**, v. 113, p.1489-1500, 1997

OKUDA, Y.; TAKAHASHI, I.; KIM, J.; OHTA, N.; IWATANI, K.; IJIMA, H.; KAI, Y.; TAMAGAWA, H.; HIROI, T.; KWEON, M.; KAWANO, S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SASAKI, Y.; HORI, M.; KIYONO H. Development of colitis in signal transducers and activators of transcription 6-deficient T-cell receptor  $\alpha$ -deficient mice. **Am. J. Pathol.**, v. 162 (1), p. 263-271, 2003.

ORAZI, A.; DU, X.; YANG, Z.; KASHAI, M.; WILLIAMS, D.A. Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. **Lab. Invest.**, v. 75: p. 33 – 42, 1996.

PAPADAKIS, K. A.; ZHU, D.; PREHN, J. L.; LANDERS, C.; AVANESYAN, A.; LAFKAS, G.; TARGAN, S. R. Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9<sup>+</sup> T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4985–4990, 2005.

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

PARSONS, P. E.; SUGAHARA, K.; COTT, G. R.; MASON, R. J.; HENSON, P. M. The effect of neutrophil migration and prolonged neutrophil contact on epithelial permeability. **Am. J. Pathol.**, v. 129, p. 302-312, 1987.

PAUL, W. E. IL-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. **Blood.**, v. 77, p. 1859–1870, 1991.

PETSCHOW, B.W.; CARTER, D.L.; HUTTON, G.D. Influence of orally administered epidermal growth factor on normal and damaged intestinal mucosa in rats. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 17: 49 – 58, 1993.

PICO, J-L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **Oncologist.**, v. 3, p. 446-451, 1998.

PIZARRO, T. T.; MICHIE, M. H.; BENTZ, M.; WORARATANADHARM, J.; SMITH, M. F.; FOLEY, E.; MOSKALUK, C. A.; BICKSTON, S. J.; COMINELLI, F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is upregulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6829–6835, 1999.

PLEDGER, J. V.; PEARSON, A. D.; CRAFT, A. W.; EASTHAM, E. J. Intestinal permeability during chemotherapy for childhood tumours. **Eur. J. Pediatr.**, v. 147 (2), p. 123-127, 1988.

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

PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; GU, Y.; SU, M. S.; DINARELLO, C. A. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1-beta via TNF-alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 711–721, 1998.

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

RASK-MADSEN, J.; BUKHAVE, K.; LAURSEN, L. S.; LAURITSEN, K. 5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. **Agents. Actions.**, C37-46, 1992.

REAVES, T.A.; CHIN, A.C.; PARKOS, C.A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 100 (suppl. I): p. 191-198, 2005.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. **Gastroenterology.**, v. 122, p. 1070-1087, 2002.

REUTER, B. K.; PIZARRO, T. T. The role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 2347–2355, 2004.

RIEZZO, G.; CHILOIRO, M.; RUSSO, F.; CLEMENTE, C.; DI MATTEO, G.; GUERRA, V.; DI LEO, A. Gastric electrical activity and gastrointestinal hormones in dyspeptic patients. **Digestion.**, v. 63(1), p. 20-29, 2001.

RIEZZO, G.; CLEMENTE, C.; LEO, S.; RUSSO, F. The role of electrogastrography and gastrointestinal hormones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. **J. Gastroenterol.**, v. 40, p. 1107–1115, 2005.

ROTH, B. J.; SLEDGE, G. W. JR; WILLIAMS, S. D.; MEYER, S. C.; ANSARI, R.; FISHER, W. B. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic breast cancer. A phase II trial of the Hoosier Oncology Group. **Cancer.**, v. 68 (2), p. 248-252, 1991.

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L.S.; FOX, P.C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S.T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer.**, v. 100 (suppl 9): p. 2026-2046, 2004.

RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. The catabolism of uracil in vivo and in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 210(1), p. 321-329, 1954.

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

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

SCHINDLER, C.; DARNELL, J. J. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, p. 621–651, 1995.

SCHWARZ, N. T.; KALFF, J. C.; TÜRLER, A.; SPEIDEL, N.; GRANDIS, J. R.; BILLIAR, T. R.; BAUER, A. J. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. **Gastroenterology**, v. 126, p. 159–169, 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 1192–1205, 1968.

SHOU, J.; LIEBERMAN, M. D.; HOFMANN, K.; LEON, P.; REDMOND, H. P.; DAVIES, H.; DALY, J. M. Dietary manipulation of methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN.**, v. 15 (3), p. 307-312, 1991.

SIMRÉN, M.; VOS, R.; JANSSENS, J. ; TACK, J. Unsuppressed postprandial phasic contractility in the proximal stomach in functional dyspepsia: relevance to symptoms. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 98(10): p. 2169 – 2175, 2003.

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

SMITH, F. P.; KISNER, D. L.; WIDERLITE, L.; SCHEIN, P. S. Chemotherapeutic alteration of small intestinal morphology and function: a progress report. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 1 (3), p. 203-207, 1979.

SONIS, S. Oral complications. In: HOLLAND, J. F.; FREI, E.; BAST, R. C. **Cancer Medicine**, 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 3255-3264, 1997.

SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral. Oncol.**, v. 34, p. 39-43, 1998.

SONIS, S. T. Oral complications of cancer therapy. In: DE VITA, V. T. JR.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer** – principles & practice of oncology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, p. 2385-2393, 1993.

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

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MASON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES, G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L. L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral. Oncol.**, v. 36(4), p. 373–81, 2000.

SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; HAUTAMAKI, R. D.; MENDENHALL, W. H.; BOVA, F. C.; HOWARD, R. J.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. **J. Surg. Res.**, v. 48 (1), p. 1-5, 1990.

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

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

SPILLER, R.C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18: p. 641 – 661, 2004.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Caspases: controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1477, p. 299–306, 2000.

STRATER, J.; WELLISCH, I.; RIEDL, S.; WALCZAK, H.; KORETZ, K.; TANDARA, A.; KRAMMER, P. H.; MOLLER, P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 113, p. 160, 1997.

STROHMEIER, G. R.; LENCER, W. I.; PATAPOFF, T. W.; THOMPSON, L. F.; CARLSON, S. L.; MOE, S. J.; CARNES, D.; MRSNY, R. J.; MADARA, J. L. Surface expression, polarization and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2588-2601, 1997.

STROHMEIER, G. R.; REPERT, S. M.; LENCER, W. I.; MADARA, J. L. The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 2387-2394, 1995.

SUN, X. M.; HSUEH, W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 1328– 1331, 1988.

TACK, J.; DEMEDTS, I.; DEHONDT, G. Clinical and pathophysiological characteristics of acute-onset functional dyspepsia. **Gastroenterology**, v. 122: p. 1738 – 1747, 2002.

TACK, J.; PIESSEVAUX, H.; COULIE, B.; CAENEPEEL, P.; JANSSENS, J. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. **Gastroenterology**, v. 115(6): p. 1346 – 1352, 1998.

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

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

TRIER, J. S. Morphologic alterations induced by methotrexate in the mucosa of human proximal intestine. Serial observations by light microscopy. **Gastroenterology**, v. 42, p. 295-305, 1962.

VALLANCE, B. A.; RADOJEVIC, N.; HOGABOAM, C. M.; DENG, Y.; GAULDIE, J.; COLLINS, S. M. IL-4 gene transfer to the small bowel serosa leads to intestinal inflammation and smooth muscle hyperresponsiveness. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 292, p. G385–G394, 2007.

VERMILLION, D.L.; COLLINS, S.M. Increased responsiveness of jejunal longitudinal muscle in *Trichinella*-infected rats. **Am. J. Physiol.**, v. 264: p. G124 – G129, 1988.

WEHNER, S.; SCHWARZ, N. T.; HUNSDOERFER, R.; HIERHOLZER, C.; TWEARDY, D. J.; BILLIAR, T. R.; BAUER, A. J.; KALFF, J. C. Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. **Surgery.**, v. 137, p. 436–446, 2005.

WEILAND, J. E.; DAVIS, W. B.; HOLTER, J. F.; MOHAMMED, J. R.; DORINSKY, P. M.; GADEK, J. E. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p. 218-225, 1986.

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

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

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

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

YAN, S. R.; JOSEPH, R. R.; WANG, J.; STADNYK, A. W. Differential Pattern of Inflammatory Molecule Regulation in Intestinal Epithelial Cells Stimulated with IL-1. **J. Immunol.**, v. 177, p. 5604–5611, 2006.

YOUNGMAN, K. R.; SIMON, P. L.; WEST, G. A.; COMINELLI, F.; RACHMILEWITZ, D. J.; KLEIN, S.; FIOCCHI, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology.**, v. 104, p. 749–758, 1993.

ZAMUNER, S. R.; WARRIER, N.; BURET, A. G.; MACNAUGHTON, W. K.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. **Gut.**, v. 52, p. 1714-1720, 2003.

ZHAO, A.; MCDERMOTT, J.; URBAN, J. F.; GAUSE, W.; MADDEN, K. B.; YEUNG, K. A.; MORRIS, S. C.; FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **J. Immunol.**, v. 171, p. 948 –954, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)