



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

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

PAPEL DA VIA $S100\beta$ /RAGE/NF κ B NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE
INTESTINAL EXPERIMENTAL POR 5-FLUOROURACIL: DESREGULAÇÃO DE
CÉLULAS GLIAIS E DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS

FORTALEZA

2016

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

**PAPEL DA VIA S100 β /RAGE/NF κ B NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE
INTESTINAL EXPERIMENTAL POR 5-FLUOROURACIL: DESREGULAÇÃO DE
CÉLULAS GLIAIS E DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA
2016

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

C87p

Costa, Deiziane Viana da Silva.

Papel da via S100 β /RAGE/NFkB na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-fluorouracil : desregulação de células gliais e de neurônios entéricos / Deiziane Viana da Silva Costa. – 2016.

154 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2016.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

1. Sistema Nervoso Entérico. 2. Mucosite. 3. Fluoruracila. 4. Neuroglia. 5. Neurônios. I. Título.

CDD 616.8061

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

**PAPEL DA VIA S100 β /RAGE/NF κ B NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE
INTESTINAL EXPERIMENTAL POR 5-FLUOROURACIL: DESREGULAÇÃO DE
CÉLULAS GLIAIS E DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

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

A Deus,

Por ter me concedido o dom de aprender, do reconhecimento e do amor ao próximo e por sempre guiar meus caminhos na superação dos obstáculos e nas minhas escolhas.

Aos meus pais Onofre Maciel (1964-2013) e Maria José Viana,

Por terem me ensinado a atingir as minhas metas sempre com honestidade.

Às minhas irmãs Daniely Viana e Darlyane Viana,

Por me apoiarem em minhas escolhas de vida.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pela excelente orientação desde a ideia do trabalho à finalização do mesmo, por ter aberto a porta de seu laboratório e aceitado sem nenhum preconceito uma aluna que nunca havia conhecido uma pipeta. Por ter me criado, ensinando-me desde a leitura de artigos a busca de ideias. Posso dizer hoje que era como se eu fosse uma pedra bruta e que fui lapidada pela senhora. Agradeço ainda por ter sido agraciada com uma orientadora que é um exemplo de pesquisadora, de professora e de mãe. Agradecerei sempre e direi a quem perguntar que é a responsável pelo que sou hoje.

À Professora Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pelas contribuições valiosas para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre reservar parte de seu tempo para compartilhar seus valiosos conhecimentos. Além de sua amizade e seus conselhos e pelo exemplo de pesquisadora, professora e mãe.

Ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, por ter aberto as portas de seu laboratório (Laboratório de Morfogênese celular- LMC) para que eu pudesse conhecer outras formas de desenvolver pesquisa, pelo incentivo nessa caminhada e por ter aceitado a participar da banca de defesa dessa dissertação.

À minha amiga Doutoranda Conceição da Silva Martins (Josiane) por ter me ensinado, protegido e apoiado ao longo dessa caminhada. Além de sua contribuição com os experimentos e de sua amizade que foi fundamental.

À aluna de iniciação científica Angeline Maria Pascoal Holanda por ter me ajudado em todas as etapas deste trabalho. Agradeço ainda pelos sábados e domingos que dispôs para me ajudar quando foi necessário e pela paciência com o meu excesso de perfeccionismo.

À amiga Mestranda em Farmacologia Dainesy Santos Martins e aos alunos de iniciação científica Márcio Flávio Araújo Guanabara Júnior, Gutierrez Bernardo de Freitas, Lauro Inácio de Moura Neto, Stephanie Raissa, Juliana Ponte e Jardel Urcerzino pela amizade e ajuda nos experimentos.

À pós-doutoranda Juliana de Mattos Coelho Aguiar e à Doutoranda Ana Carina Bon Frauches Oliveira por terem me acompanhado e orientado no estágio que realizei durante o mestrado no LMC.

Às Professoras Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte e Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão pela amizade e contribuição quando foi necessário.

Ao laboratório LIO, LDI e LABICONTE, respectivamente coordenados pelo Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima e pelo Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá por conceder reagentes ou aparelhos que foram importantes para alguns dos parâmetros avaliados.

À central analítica, especialmente à Dra. Rosemayre Freire, pela aquisição das imagens de imunofluorescência no confocal.

À minha irmã Darlyane Viana da Silva Costa pelo desenvolvimento do desenho do modelo hipotético dos resultados deste estudo.

À minha irmã Daniely Viana da Silva Costa por participar ativamente da minha vida, pelo apoio constante nas minhas escolhas e por me incentivar a ir além. Agradeço ainda, pela ajuda nos experimentos quando foi necessário.

Ao Doutorando em Ciências Médicas Howard Lopes Ribeiro Junior por compartilhar seus conhecimentos de biologia molecular e pela amizade.

Aos amigos de pós-graduação Ludmila Tolstenko Nogueira, Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiro, Manuel Bonfim Braga Neto, Camila Naiane de Carvalho Lima, Francisco Advane de Paulo Rodrigues, Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, Rodolfo de Melo Nunes, Mariana Lima Feitosa, Cristhyane Costa de Aquino, Renan Oliveira Silva, Ana Paula Frago de Freitas, Gilberto Santos Cerqueira, Caren Nádia Soares de Sousa e Deysen Kerlla Fernandes Bezerra pela amizade ou pela disposição em ajudar quando foi necessário.

Às técnicas de laboratório Maria do Socorro França Monte e Flávia de Araújo Silva pela confecção das lâminas histológicas e apoio diário.

Às secretárias Laura Alves de Souza e Célia Araújo de Carvalho do programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela ajuda nas burocracias da dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza, Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior e à Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar por aceitarem a participar da minha banca de qualificação/defesa de mestrado e contribuírem para o aperfeiçoamento dessa dissertação.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), À Fundação cearense de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico (FUNCAP) e ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro necessário para o desenvolvimento deste estudo.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”

Augusto Cury

RESUMO

Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-fluorouracil: Desregulação de células gliais e de neurônios entéricos

O 5-Fluorouracil (5-FU) promove mucosite intestinal e alterações da motilidade. A mucosite atinge cerca de 40% dos pacientes em tratamento com 5-FU e há relatos de pacientes que a apresentam na primeira dose administrada. Em outras condições inflamatórias, a proteína S100 β está envolvida na ativação de RAGE com consequente translocação de NF κ B para o núcleo e transcrição de TNF- α e de iNOS. As células gliais entéricas por meio de S100 β , interagem com as células epiteliais intestinais e com os neurônios entéricos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo é investigar o efeito do 5-FU nas células gliais e nos neurônios entéricos, bem como estudar o papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal induzida por esse quimioterápico. Os camundongos Swiss machos receberam salina (0,9%, i.p.) ou 5-FU (450 mg/Kg, i.p. dose única). Após 24h da administração do quimioterápico, administrou-se pentamidina, inibidor de S100 β (P0,8 mg/Kg +5FU; P4 mg/Kg +5FU; ou somente P4mg/Kg, i.p.) durante dois dias e os animais foram eutanasiados no quarto dia do protocolo experimental. Os segmentos do intestino delgado e do cólon foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: perda ponderal; alterações histológicas; expressão de marcador de células gliais (GFAP e S100 β) e neuronal (HuC/D) por imunohistoquímica; imunofluorescência para iNOS e dupla marcação para GFAP e Iba-1, e para HuC/D e RAGE ou NF κ B NLS; expressão proteica de S100 β , NF κ B p65, iNOS e RAGE por Western Blotting; expressão gênica de GFAP, S100 β e iNOS por qPCR; e dosagem dos níveis de nitrito/nitrato, GSH, MDA, TNF- α e IL6. O 5-FU promoveu redução das vilosidades intestinais, perda da integridade das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias e hipertrofia do plexo mioentérico, bem como aumento da área imunomarcada para GFAP e S100 β e redução de HuC/D. Esse quimioterápico também foi capaz de elevar a imunomarcção para RAGE e NF κ B NLS nos neurônios entéricos e aumentou a imunomarcção para Iba-1, assim como elevou a expressão proteica de S100 β , RAGE, NF κ B p65 e iNOS, e a expressão gênica de S100 β , GFAP e iNOS. Além disso, aumentou os níveis de MDA, de nitrito/nitrato e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) no intestino delgado e no cólon. Ao passo que a inibição de S100 β foi capaz de reverter essas alterações promovidas por 5-FU. Conclui-se que 5-FU promove gliose reativa, resultando em redução dos neurônios entéricos pela ativação da via S100 β /RAGE/NF κ B. Adicionalmente, S100 β demonstrou ser um importante mediador envolvido na patogênese da mucosite intestinal.

Palavras-chave: Sistema nervoso entérico. Mucosite intestinal. 5-fluorouracil. Glia. S100 β . Neurônio.

ABSTRACT

Role of S100 β /RAGE/NF κ B pathway in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: dysregulation of enteric glia and neurons.

5-Fluorouracil (5-FU) promotes intestinal mucositis and motility alterations. The mucositis affect about 40% of patients receiving 5-FU and there are reports of patients presenting mucositis after the first dose. Under other inflammatory conditions, the S100 β protein is involved in the RAGE activation with subsequent NF κ B translocation to the nucleus and transcription of TNF- α and iNOS. The enteric glial cells through several mediators, such as S100 β , interact with the intestinal epithelial cells and enteric neurons. Therefore, the aim of this study was investigate the effect of 5-FU in the enteric glial cells and neurons, as well as study the role of the via S100 β /RAGE/NF κ B in the pathogenesis of the experimental intestinal mucositis. Swiss male mice received saline (control, 0.9%, i.p.) or 5-FU (450 mg/Kg, i.p., single dose). After 24h, mice were treated with pentamidine, a S100 β inhibitor (P0.8 mg/Kg +5FU; P4 mg/Kg +5FU; or only P4mg/Kg, i.p.) during two days and euthanized on the fourth day of the experimental protocol. The segments of the small intestine and colon were collected to analyze the following parameters: weight loss; histological alterations; expression of enteric glial cells (GFAP e S100 β) and neuronal (HuC/D) marker using immunohistochemistry; expression of iNOS and co-localization of GFAP and Iba-1, and HuC/D and RAGE or NF κ B NLS using immunofluorescence; protein expression of S100 β , NF κ B p65, iNOS and RAGE by Western Blotting; genic expression of GFAP, S100 β and iNOS using qPCR; The levels of nitrite/nitrate, GSH, MDA, TNF- α and IL6 by ELISA. The 5-FU promoted reduction of intestinal villus, loss of crypts integrity, intense inflammatory cell infiltrate and hypertrophy of the myenteric plexus, as well as increased the GFAP and S100 β immunostaining and diminished the HuC/D immunostaining. 5-FU was also able to elevate RAGE and NF κ B NLS immunostaining in the enteric neurons and Iba-1 in the intestine, as well as, augmented the protein expression of S100 β , RAGE, NF κ B p65 and iNOS, and the genic expression of S100 β , GFAP and iNOS. Furthermore, it enhanced the MDA, nitrite/nitrate and proinflammatory cytokines (TNF- α e IL-6) levels in the small intestine and colon. The S100 β inhibition was able to revert these changes promoted by 5-FU. We provide evidence that 5-FU promote reactive gliosis, leading reduction of the enteric neurons via S100 β /RAGE/NF κ B. Together, these results suggest that S100 β is a mediator important involved in the pathogenesis of the 5-FU-induced intestinal mucositis.

Keywords: Enteric nervous system. Intestinal mucositis. 5-fluorouracil. Glia. S100 β . Neuron.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	- Primers e sondas Taqman utilizadas no PCR em tempo real.....	66
Tabela 1	- Efeito do inibidor de S100 β no escore histopatológico de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Embriologia do sistema nervoso entérico.....	27
Figura 2	- Mecanismo do GDNF e da EDN3 na regulação da migração, da proliferação e da diferenciação das células entéricas derivadas da crista neural.....	28
Figura 3	- Distribuição dos plexos mucoso, submucoso e mioentérico no intestino.....	30
Figura 4	- Constituintes dos plexos do sistema nervoso entérico.....	30
Figura 5	- Classificação morfológica, neuroquímica e funcional dos neurônios entéricos.....	31
Figura 6	- Tipos de células gliais entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos.....	33
Figura 7	- Classificação da célula glial entérica de acordo com a sua localização no intestino.....	34
Figura 8	- Representação esquemática do " <i>motif</i> " " <i>EF-hand</i> ".....	37
Figura 9	- Estrutura do receptor RAGE.....	39
Figura 10	- Mecanismo de ativação e regulação de RAGE.....	40
Figura 11	- Efeito da ativação do receptor RAGE por S100 β em diferentes células....	42
Figura 12	- Metabolismo e mecanismo do 5-FU.....	46
Figura 13	- Desenvolvimento da mucosite intestinal.....	49
Figura 14	- Esquema de indução da mucosite intestinal por 5-FU e protocolo experimental.....	57
Figura 15	- Sistema de escores histológicos de Macpherson e Pfeiffer.....	59
Figura 16	- Fotomicrografias de amostras do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de camundongos Swiss submetidos à mucosite intestinal induzidas por 5-FU.....	71
Figura 17	- Imunomarcção de GFAP em amostras de intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	74
Figura 18	- 5-FU aumenta a área imunomarcada para GFAP no intestino delgado....	75
Figura 19	- Imunomarcção de S100 β em amostras de intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	76

Figura 20	- 5-FU aumenta a área imunomarcada para S100 β no intestino delgado.....	77
Figura 21	- Imunofluorescência representativa da dupla marcação de S100 β e GFAP no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	78
Figura 22	- 5-FU aumenta a expressão proteica de S100 β no jejuno, no íleo e no cólon de camundongos.....	80
Figura 23	- Imunomarcção de HuC/D em amostras do intestino delgado e do cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	82
Figura 24	- 5-FU reduz a área imunomarcada para HuC/D no intestino delgado e no cólon.....	83
Figura 25	- 5-FU aumenta a expressão proteica de NF κ B p65 no jejuno, no íleo e no cólon de camundongos.....	85
Figura 26	- Inibição de S100 β reduz parcialmente a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	87
Figura 27	- Efeito do inibidor de S100 β nas alterações histopatológicas do intestino delgado e do cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	90
Figura 28	- Inibição de S100 β aumenta o comprimento das vilosidades e da profundidade das criptas no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	92
Figura 29	- Inibição de S100 β reduz a imunomarcção de GFAP no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	95
Figura 30	- Inibição de S100 β reduz a porcentagem da área imunomarcada para GFAP no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	96
Figura 31	- Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de GFAP e Iba-1 no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	97
Figura 32	- Inibição de S100 β reduz a imunomarcção de S100 β no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	98

Figura 33	- Inibição de S100 β reduz a porcentagem da área imunomarcada para S100 β no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	99
Figura 34	- Inibição de S100 β reduz a expressão gênica de marcadores gliais (S100 β e GFAP) no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	101
Figura 35	- Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de S100 β no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	103
Figura 36	- Inibição de S100 β aumenta a imunomarcção de HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	105
Figura 37	- Inibição de S100 β aumenta a porcentagem da área imunomarcada para HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	106
Figura 38	- Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de GFAP e de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	108
Figura 39	- Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de HuC/D e de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	109
Figura 40	- Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	110
Figura 41	- Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de HuC/D e de NF κ B NLS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	112
Figura 42	- Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de NF κ B p65 no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	113
Figura 43	- Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcção de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	115
Figura 44	- Inibidor de S100 β reduz a expressão gênica de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	116
Figura 45	- Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	117

Figura 46	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de nitrito/nitrato no duodeno, no jejuno e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	119
Figura 47	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de TNF- α no intestino delgado e cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	121
Figura 48	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de IL-6 no duodeno e no jejuno de camundongos submetidos á mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	122
Figura 49	- Inibidor de S100 β aumenta os níveis de GSH no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	124
Figura 50	- Inibidor de S100 β diminui os níveis de MDA no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	125
Figura 51	- Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU (modelo hipotético).....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μmol	Micromol
15d-PGJ2	15-deoxi-Δ ^{12,14} -prostaglandina J2
15-HETE	15-hidroxi-eicosatetraenoico
5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	Serotonina
5-HT3	Receptor de serotonina do tipo 3
AChE	Acetilcolinesterase
ADAM10	Desintegrina e metaloproteinase 10
ADP-ribose	Ribose de adenosina difosfato
AKT	Serina-treonina quinase
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica -1
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CGEs	Células gliais entéricas

CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CH ₂ THF	5,10-metilenatetra-hidrofolato
Chat	Colina acetiltransferase
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
Conx43	Conexina 43
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAB	Diaminobenzidina
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DSS	Sulfato de sódio dextrano
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dATP	Trifosfato de deoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de deoxicitosina
dGTP	Trifosfato de deoxiguanosina
DHFU	Diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DPD	Desidrogenase diidropirimidina
dTMP	Monofosfato de deoxitimidina
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
dTTP	Trifosfato de deoxitimidina
dUMP	Monofosfato de deoxiuridina
dUTP	Trifosfato de deoxiuridina
EDN3	Endotelina-3
EDNRB	Receptor de endotelina B
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático

ENC	Encefalinas
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
FdUDP	Difosfato de fluorodeoxiuridina
FdUMP	Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodeoxiuridina
FUDP	Difosfato de fluorouridina
FUDR	Fluorodeoxiuridina
FUMP	Monofosfato de fluorouridina
FUR	Fluorouridina
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
GADD45 α	Gene 45 α indutor de dano ao DNA e interrupção do crescimento
GAP43	Proteína associada ao crescimento 43
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	Guanilato ciclase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GFR α 1	Receptor α 1 da família de GDNF
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H&E	Hematoxilina e eosina
HMGB1	Grupo de alta mobilidade Box 1
I κ B	Proteína inibitória kappa B
IA	Intestino anterior

Iba-1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
ICC	Células intersticiais de cajal
IEC-6	Células epiteliais intestinais-6
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina -1
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-1R α	Receptor de interleucina -1 α
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IM	Intestino médio
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IP	Intestino posterior
JNK	C-JUN kinase aminoterminal
kDa	KiloDalton
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LEICA	Sistema de aquisição de imagens
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mDia1	<i>Diaphanous-1</i>
mg	Miligrama

MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
Min	Minuto
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteinases
mTOR	Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamina-dicloridrato
NFκB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NK1	Neurocinina-1
NLS	Sequências conservadas de localização nuclear
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos de óxido nítrico
NP-40	Nonidet p-40
NPY	Neuropeptídeo Y
OPRT	Fosforibosiltransferase oratato
P	Página
PAF	Fator ativador plaquetário
PAFR	Receptor do fator ativador plaquetário
Panx1	Panexina-1
PAR-2	Receptor ativado por protease-2
PARP-1	Polimerase-1
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pg	Picograma
PGD2	Prostaglandina D2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKG	Proteína quinase G
PLP-1	Proteína proteolipídica-1
PMLC	Cadeia leve de miosina fosforilada
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama
proEGF	Pró-fator de crescimento epidérmico
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RET	Receptor de tirosina quinase
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RR	Ribonucleotídeo redutase
S100 β	Fração beta da proteína S100
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
SF	Soro fisiológico
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico

SOX10	SRY- <i>box</i> 10
sRAGE	Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular
sTNFR1	Receptor de TNF do tipo 1 solúvel
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBST	Tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TGI	Trato gastrintestinal
Th1	T helper do tipo 1
Th2	T helper do tipo 2
TK	Tirosina quinase
TK	Timidina quinase
TLCK	N-tosil-L-lisina clorometil cetona
TLRs	Receptores toll-like
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TP	Timidina fosforilase
TS	Timidilato sintetase
TUJ1	Classe de β -tubulina III específica de neurônios
UDG	Uracil-DNA-glicosilase
UK	Uridina quinase
UP	Uridina fosforilase
V	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
Zn ²⁺	Zinco
ZO-1	Zônulas de oclusão-1

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
γ	Gama
Δ	Delta
®	Marca registrada
+	Mais
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
&	E

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Sistema nervoso entérico.....	26
1.2	Neurônios entéricos.....	31
1.3	Célula glial entérica.....	32
1.4	Via S100 β /RAGE/NF κ B.....	36
1.5	Sistema nervoso entérico e doenças inflamatórias intestinais.....	43
1.6	5-Fluorouracil e alterações gastrointestinais.....	44
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	53
3	OBJETIVO.....	54
3.1	Objetivo geral.....	54
3.2	Objetivos específicos.....	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo.....	55
4.2	Aspectos éticos.....	55
4.3	Animais.....	55
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	55
4.5	Grupos experimentais.....	56
4.6	Parâmetros avaliados.....	57
4.6.1	Análise ponderal.....	57
4.6.2	Análise morfométrica e histopatológica.....	58
4.6.3	Imunohistoquímica.....	59
4.6.4	Imunofluorescência e microscopia confocal das alças intestinais.....	61
4.6.5	Expressão proteica de iNOS, S100 β , RAGE e NF κ Bp65.....	62
4.6.5.1	Extração de proteínas.....	62
4.6.5.2	Dosagem de proteína.....	62
4.6.5.3	Western Blotting.....	63
4.6.6	Expressão gênica de S100 β , GFAP e iNOS por qPCR.....	64
4.6.6.1	Preparação das amostras.....	64
4.6.6.2	Extração do RNA.....	64
4.6.6.3	Síntese do cDNA.....	65
4.6.6.4	PCR quantitativo em tempo real(qPCR).....	65

4.6.7	Dosagem de nitrito/nitrato.....	66
4.6.8	Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-6).....	67
4.6.9	Determinação de glutathiona reduzida (GSH).....	67
4.6.10	Dosagem de malondialdeido (MDA).....	68
4.7	Análise estatística.....	68
5	RESULTADOS.....	70
5.1	Avaliação das alterações histopatológicas do intestino induzidas pelo tratamento com 5-FU em camundongos Swiss.....	70
5.2	Efeito do 5-FU nas células gliais e neurônios entéricos do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de camundongos Swiss submetidos à mucosite intestinal.....	72
5.2.1	Avaliação de alterações da imunomarcção de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	72
5.2.2	Efeito do 5-FU na expressão proteica de S100 β no intestino delgado (jejuno e íleo) e no cólon.....	79
5.2.3	Avaliação de alterações da imunomarcção de HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	81
5.3	Efeito do 5-FU na expressão proteica de NF κ B p65 no intestino delgado (jejuno e íleo) e no cólon.....	84
5.4	Avaliação da participação da via S100 β /RAGE/NF κ B na mucosite intestinal e nas alterações das células gliais e dos neurônios entéricos induzidas por 5-FU.....	86
5.4.1	Efeito da inibição de S100 β na perda ponderal induzida por 5-FU.....	86
5.4.2	Efeito da inibição de S100 β nas alterações histológicas induzidas por 5-FU....	88
5.4.3	Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção de marcadores de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	93
5.4.4	Efeito do inibidor de S100 β na expressão gênica de marcadores gliais (GFAP e S100 β) no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	100
5.4.5	Efeito do inibidor de S100 β na expressão proteica de S100 β no jejuno de	

	animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	102
5.4.6	Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção de HuC/D no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	104
5.4.7	Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcção e na expressão proteica de RAGE no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	107
5.4.8	Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcção de NF κ B NLS e na expressão proteica de NF κ B p65 no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	111
5.4.9	Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção, da expressão gênica e proteica de iNOS no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	114
5.4.10	Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	118
5.4.11	Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de IL-6 e de TNF- α no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	120
5.4.12	Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de GSH e de MDA no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	123
6	DISCUSSÃO.....	126
7	CONCLUSÕES.....	139
	REFERÊNCIAS.....	140
	APÊNDICE.....	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema nervoso entérico

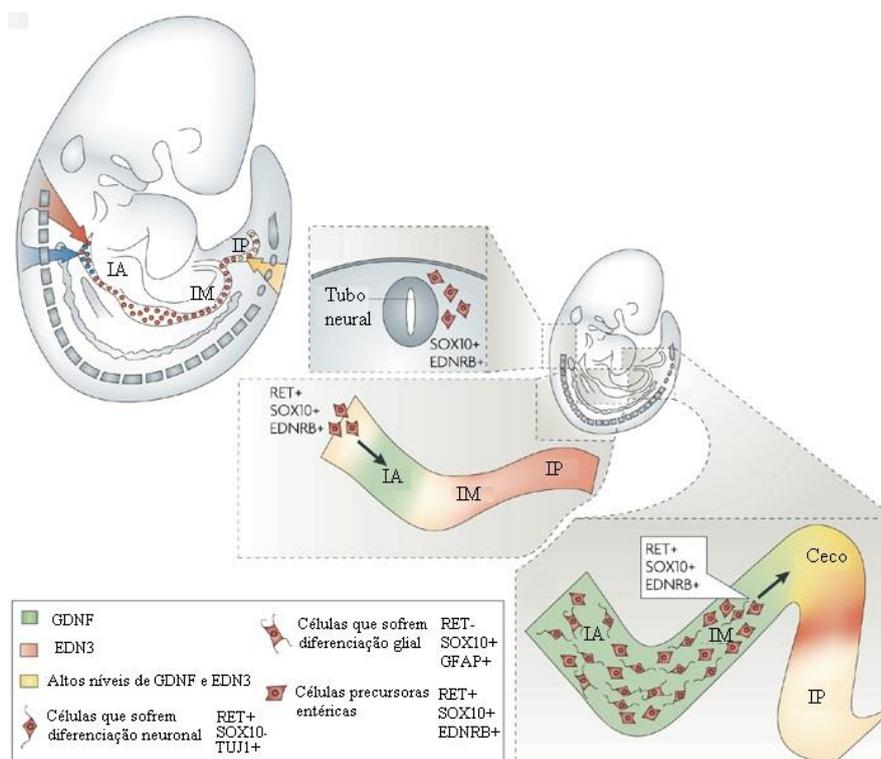
No século XIX, L. Auerbach e G. Meissner descobriram a existência de neurônios entéricos na parede intestinal e, no mesmo período, W. M. Bayliss e E. H. Starling, em 1899, descobriram a atividade funcional do sistema nervoso entérico (SNE). W. M. Bayliss e E. H. Starling isolaram alça intestinal de cachorro, elevaram a pressão no interior da alça e observaram contração muscular, que resultou em movimento propulsivo. Este evento foi nomeado como “a lei do intestino” que é conhecida atualmente como reflexo peristáltico. Na etapa seguinte, eles romperam os nervos que mediavam à comunicação do intestino com o sistema nervoso central (SNC) e observaram que o reflexo peristáltico não era alterado, dessa forma nomearam esse fenômeno como “mecanismo nervoso local”, o denominado SNE (HANSEN, 2003).

O SNE é originado, em sua maior parte, a partir da migração de células da crista neural vagal anterior para o intestino anterior. Uma fração pequena do SNE do intestino anterior também é derivada da migração de células tronco da crista neural da região vagal posterior (HEANUE; PACHNIS, 2007; LE DOUARIN *et al.*, 2004). Em humanos, a migração dessas células inicia-se na quarta semana do período embrionário e em camundongos na segunda semana (FARLIE *et al.*, 2004; SASSELLI; PACHNIS; BURNS, 2012). Ao entrarem no intestino, as células da crista neural passam a ser denominadas células entéricas derivadas da crista neural. Estas células migram do sentido rostral ao caudal, colonizando sequencialmente o intestino anterior (esôfago, estômago e duodeno), o intestino médio (porção distal do duodeno, jejuno, íleo, ceco, colo ascendente, colo transversal, e apêndice) e o intestino posterior (colo descendente, colo sigmoide e reto). No último estágio, células da crista neural sacral migram e contribuem para a formação de uma população restrita de neurônios e glia entérica do intestino médio e posterior (HEANUE; PACHNIS, 2007; KAPUR, 2000). A completa colonização do intestino pelas células entéricas derivadas da crista neural em humanos ocorre por volta da sétima semana do período embrionário e em camundongos no fim na segunda semana (DRUCKENBROD; EPSTEIN, 2005; FU *et al.*, 2003; SASSELLI; PACHNIS; BURNS, 2012) (figura 1).

No período embrionário já se pode diferenciar o tipo de célula precursora pela expressão de proteínas específicas. Células precursoras do sistema nervoso entérico não diferenciadas expressam SOX10 (*SRY-box 10*), RET (receptor de tirosina quinase) e receptor de endotelina B (EDNRB), enquanto as células precursoras gliais expressam SOX10 e

proteína glial fibrilar ácida (GFAP), mas não expressam RET. Por outro lado, as células precursoras neuronais apresentam RET e TUJ1 (Classe de β -tubulina III específica de neurônios), mas não expressam SOX10 (HEANUE; PACHNIS, 2007) (figura 1).

Figura 1 - Embriologia do sistema nervoso entérico.

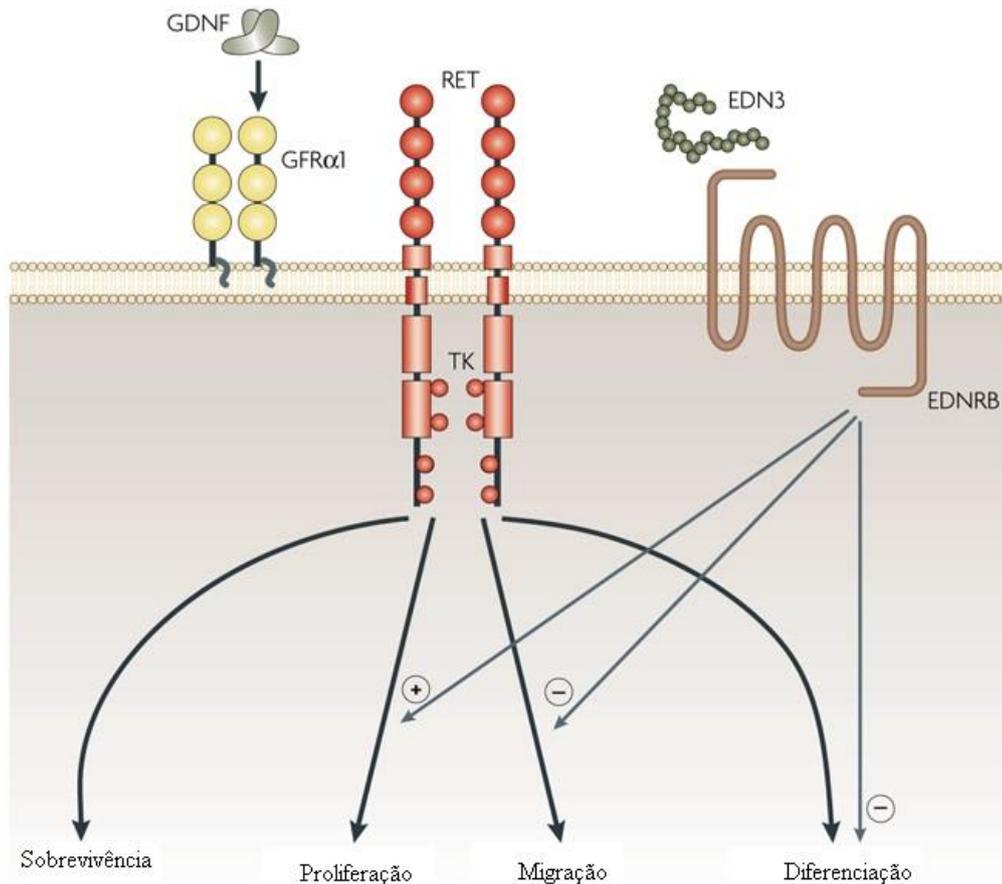


Fonte: Heanue e Pachnis (2007). Células da crista neural vagal anterior e posterior migram para o intestino anterior (IA). No intestino essas células passam a ser denominadas células precursoras entéricas que expressam RET, SOX10 e EDNRB. Essas células migram, proliferam e se diferenciam no sentido rostral-caudal. Células da crista neural sacral migram para o intestino posterior (IP) e intestino médio (IM) para contribuir na formação de neurônios e glias entéricos. Células que sofrem diferenciação neuronal expressam RET e TUJ1, enquanto células que se diferenciarão em glia apresentam SOX10 e GFAP. Fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) estimula a migração, sobrevivência e diferenciação. Endotelina-3 (EDN3) inibe a migração e diferenciação, porém estimula a proliferação dessas células precursoras entéricas.

No período embrionário, fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e endotelina-3 (EDN3) desempenham importante função na regulação da proliferação, da migração e da diferenciação das células entéricas derivadas da crista neural ao longo do trato gastrointestinal. O GDNF estimula a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação, enquanto que a EDN3 inibe a migração e diferenciação e estimula a proliferação dessas células (BONDURAND *et al.*, 2006; HEANUE; PACHNIS, 2007). O mecanismo pelo qual essas proteínas geram esses efeitos é distinto: GDNF liga-se ao receptor $\alpha 1$ da família de GDNF (GFR $\alpha 1$) que se dimeriza com o receptor RET, ativando uma cascata de sinalização

dependente de tirosina quinase (TK), enquanto que EDN3 liga-se ao receptor de endotelina B (EDNRB) (BARLOW; GRAAF; PACHNIS, 2003; HEANUE; PACHNIS, 2007; NATARAJAN *et al.*, 2002) (figura 2).

Figura 2 - Mecanismo do GDNF e da EDN3 na regulação da migração, da proliferação e da diferenciação das células entéricas derivadas da crista neural.



Fonte: Heanue e Pachnis (2007). GDNF: Fator neurotrófico derivado das células gliais; GFRα1: Receptor α1 da família de GDNF; EDN3: Endotelina-3; TK: Tirosina quinase; EDNRB: Receptor de endotelina B. A via GDNF-GFRα1-RET e EDN3-EDNRB regulam a proliferação, migração e diferenciação de células entéricas derivadas da crista neural do intestino anterior ao posterior.

Até recentemente, acreditava-se que os neurônios entéricos não se regeneravam no período pós-natal. Contudo, vários estudos tem identificado a presença de células tronco neurais entéricas no intestino de camundongos nesse período (BONDURAND *et al.*, 2003; SUAREZ-RODRIGUEZ; BELKIND-GERSON, 2004). Essas células, *in vitro*, tem demonstrado capacidade de contribuir para a neurogênese e a gliogênese sob condições específicas (JOSEPH *et al.*, 2011; LARANJEIRA *et al.*, 2011). Entretanto, seu exato papel no processo fisiológico ou patológico permanece desconhecido.

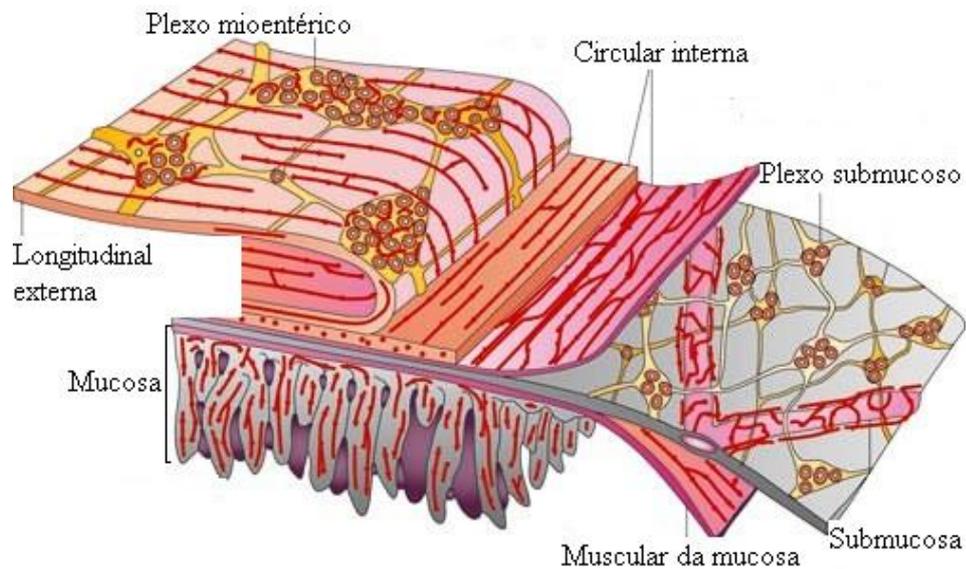
No sistema nervoso central (SNC), células-tronco neurais expressam nestina, filamento proteico intermediário que, durante o período embrionário, é responsável por regular a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação dessas células (CHOUAF-LAKHDAR *et al.*, 2003; WIESE *et al.*, 2004). Sob condições fisiológicas, no intestino delgado de camundongos, já foi evidenciada expressão de nestina dentro dos vilos, ao redor das criptas e nos plexos submucoso e mioentérico. Dentre as células que expressam essa proteína estão as células gliais entéricas que apresentam S100 β , células intersticiais de cajal (ICC), células endoteliais e pericitos (BELKIND-GERSON *et al.*, 2013; VANDERWINDER *et al.*, 2002). Porém não foi evidenciada em neurônios (BELKIND-GERSON *et al.*, 2013).

O sistema nervoso entérico (SNE) é chamado o cérebro do intestino por apresentar características independentes ao sistema nervoso central, como a funcionalidade, e apresenta repertório de neurotransmissores similar, elevado número de neurônios e sistema nervoso intrínseco extenso e diferenciado. Esse sistema se estende do esôfago ao esfíncter anal interno e inclui elementos localizados nas paredes da vesícula biliar, do ducto cístico e do ducto biliar comum, e no pâncreas (KRAMMER *et al.*, 2002; VON BOYEN *et al.*, 2002).

O SNE é constituído pelos plexos ganglionares e aganglionares. O plexo ganglionar é formado pelos plexos submucoso e mioentérico. O mioentérico está localizado entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa, enquanto o submucoso encontra-se entre a camada muscular circular interna e a submucosa. O plexo aganglionar está localizado na camada mucosa, precisamente na lâmina própria. (FURNESS, 2012) (figura 3).

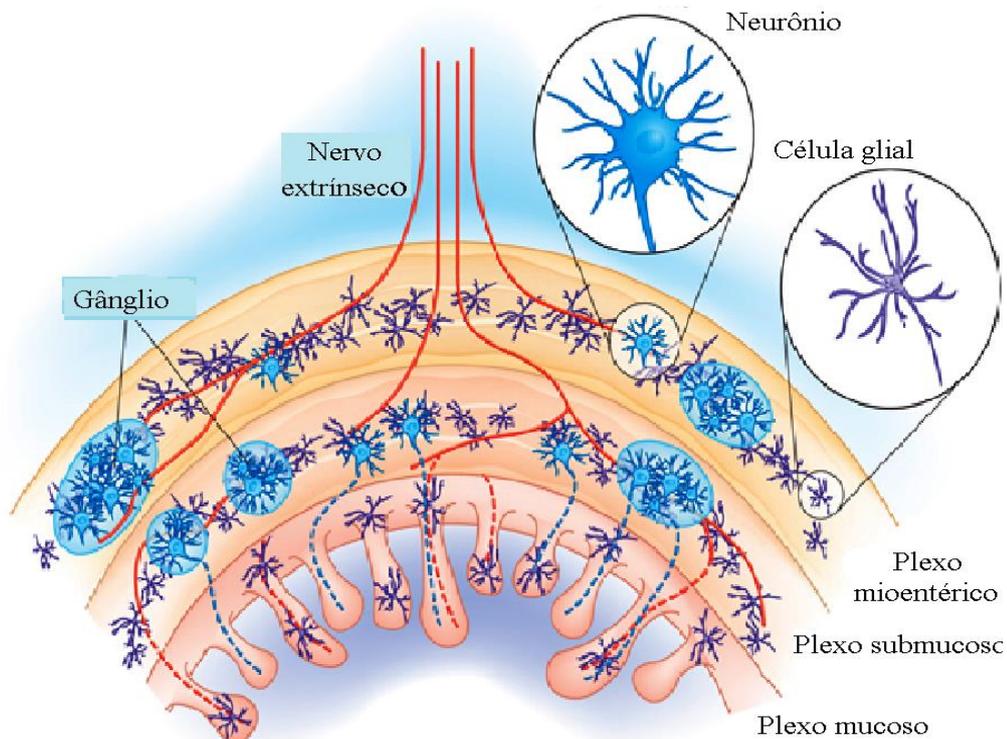
O plexo aganglionar é assim denominado devido à ausência de neurônios organizados em gânglios. Ele é formado por células gliais entéricas (CGEs) e por axônios dos plexos ganglionares. Os plexos ganglionares, submucoso e mioentérico, são constituídos por neurônios entéricos e por CGEs (RESCIGNO, 2008; VON BOYEN; STEINKAMP, 2011) (figura 4).

Figura 3 - Distribuição dos plexos mucoso, submucoso e mioentérico no intestino.



Fonte: Adaptado de Furness (2012). O sistema nervoso entérico é composto pelos plexos mucoso, submucoso e mioentérico. O plexo mucoso localiza-se na camada mucosa. O plexo submucoso na camada submucosa, próximo à camada muscular circular interna. Enquanto o plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa.

Figura 4 - Constituintes dos plexos do sistema nervoso entérico.



Fonte: Rescigno (2008). Os plexos que constituem o sistema nervoso entérico são inervados extrinsecamente por meio do nervo vago. O plexo submucoso e o plexo mioentérico são constituídos por neurônios e células gliais entéricas organizados em gânglios. Ao passo que o plexo mucoso é formado apenas por células gliais entéricas e terminações nervosas de neurônios.

O SNE regula diversas funções intestinais, incluindo motilidade, absorção, secreção, função sensorial, fluxo sanguíneo e secreção hormonal, bem como interage com as células do sistema imune (BISCHOFF *et al.*, 2009; KIBA, 2006). Além disso, também regula a barreira epitelial, participando no controle da proliferação e da diferenciação das células epiteliais (FURNESS, 2012).

1.2 Neurônios entéricos

Os neurônios entéricos podem ser classificados de acordo com as suas propriedades morfológicas, neuroquímicas ou funcionais, conforme apresentado na figura 5 (HANSEN, 2003).

A sua classificação morfológica é baseada na classificação de Dogiel que varia do tipo I ao VII, sendo a maioria dos neurônios do tipo I, II ou III. Enquanto a neuroquímica é fundamentada no principal neurotransmissor secretado, uma vez que os neurônios podem secretar mais de um neuromediador. Esses neurotransmissores podem ser constituídos de pequenas moléculas (por exemplo, noradrenalina e serotonina), grandes moléculas (peptídeos) ou gases (óxido nítrico, NO, e monóxido de carbono, CO). Essa variedade se deve a combinação de diferentes neurotransmissores, fenômeno denominado de código químico neuronal. Por último, a classificação funcional dos neurônios entéricos que é dividida em sensoriais, interneurônios, motores e secretomotores (FURNESS, 2012).

Figura 5 - Classificação morfológica, neuroquímica e funcional dos neurônios entéricos.

Classificação dos neurônios entéricos		
Morfológica (Dogiel)	Neuroquímica	Funcional
I-VII	Calbidina, Chat, Calretinina, Substância P VIP, NOS, CGRP Somatostatina, 5-HT NPY, ENC	- Sensoriais - Interneurônios - Motores - Secretomotores

Fonte: Elaborado pela autora. Chat: Colina acetiltransferase, CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo, NOS: óxido nítrico sintase, 5-HT: serotonina, NPY: neuropeptídeo Y, ENC: encefalinas.

No intestino, HuC/D tem sido utilizado amplamente como marcador pan-neuronal de neurônios entéricos (BROWN *et al.*, 2015; GULBRANSEN *et al.*, 2012; LIN; SANDGREN; EKBLAD, 2003). Funcionalmente, as proteínas Hu ligam-se ao RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), da acetilcolinesterase (AChE), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da proteína associada ao crescimento 43 (GAP43) por meio do reconhecimento de *motifs* que interagem com elementos ricos em uridina adenina na extremidade 3' não codificada (ALLEN *et al.*, 2013; ANDERSON *et al.*, 2001). De forma geral, as proteínas Hu ao se ligar ao RNAm desses mediadores regulam a estabilidade de seu RNAm, modulando e controlando a expressão temporal dessas proteínas (PERRONE-BIZZOZERO; BIRD, 2013). Além disso, as proteínas Hu também regulam a localização desses RNAm e a supressão mediada por microRNA (HINMAN; LOU, 2008).

Devido ao seu papel na estabilização do RNAm, HuC/D normalmente é encontrado no citoplasma, porém também pode estar presente no núcleo, já que proteínas transportadoras específicas o transloca para o núcleo (SAITO *et al.*, 2004). Em condições de privação de oxigênio molecular, de inibição da cadeia respiratória mitocondrial e de danos teciduais, HuC/D encontra-se predominantemente localizado no núcleo, podendo também ser um marcador de dano neuronal (DESMET; CIRILLO; VANDEN BERGHE, 2014).

1.3 Célula glial entérica

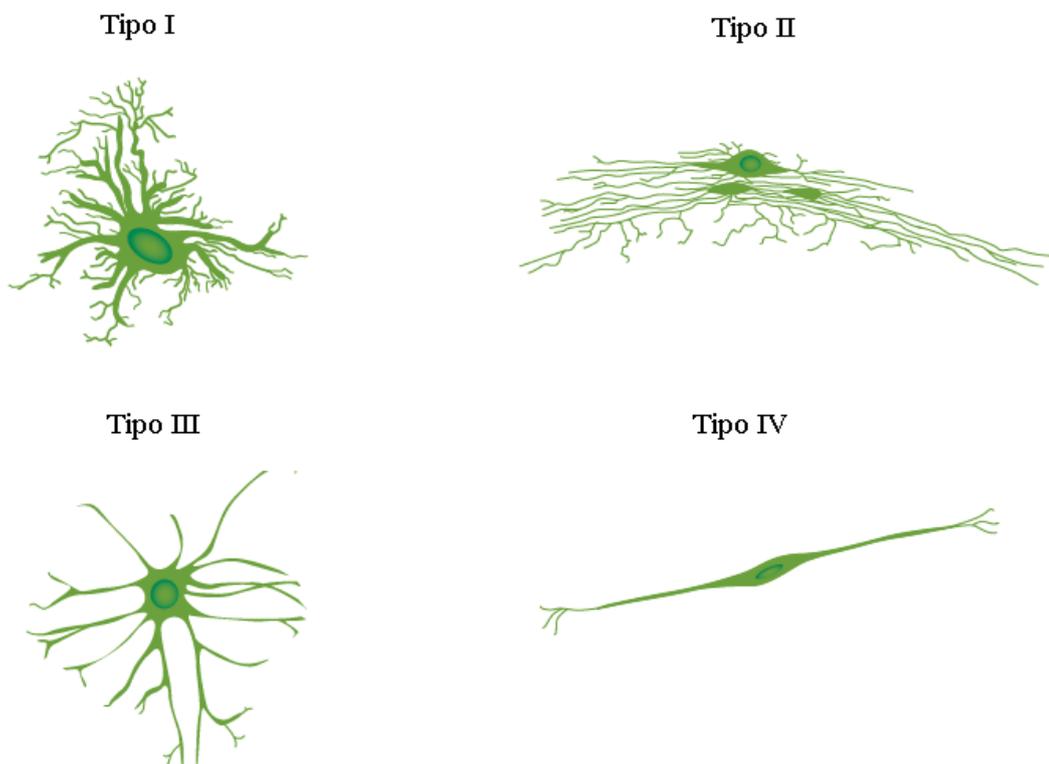
As células gliais foram observadas dentro do gânglio entérico pela primeira vez em 1899 por Dogiel e, a partir de então, passou ser definida como célula de Schwann. Em 1970, após a análise morfológica por Gabela, as células gliais passaram a ser reconhecidas como uma classe única de glia periférica com características distintas (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Atualmente, as células gliais no intestino são denominadas como células gliais entéricas (CGEs).

As CGEs podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (tipo I, II, III ou IV) ou com a sua localização nas camadas do trato gastrointestinal, que é a mais utilizada, (mucosa, intragangliônica ou intramuscular).

A classificação morfológica das CGEs foi estabelecida por Hanani. Ele notou a semelhança estrutural das células gliais entéricas com os astrócitos do SNC e descreveu cada tipo da seguinte forma: Tipo I são as CGEs que apresentam processos curtos, ramificados e irregulares, assemelhando-se aos astrócitos protoplasmáticos do SNC; Tipo II, caracteriza-se

por células com aspecto alongado encontrada dentro de feixes de fibras interganglionares, similar aos astrócitos fibrosos do SNC; Tipo III ou mucosa engloba as CGEs que apresentam vários processos longos ramificados e tipo IV ou intramuscular caracteriza CGEs alongadas que se alinham às fibras nervosas (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012) (figura 6).

Figura 6 - Tipos de células glias entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos.

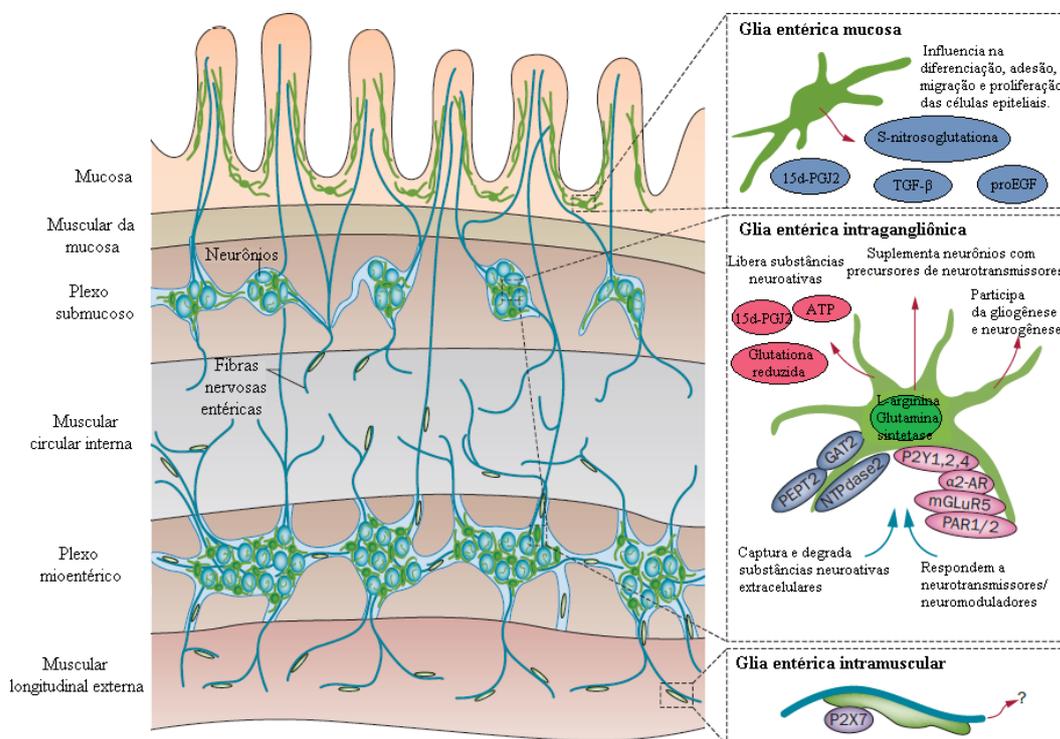


Fonte: Gulbransen e Sharkey (2012).

A classificação das CGEs de acordo com a sua localização nas camadas do trato gastrointestinal (mucosa, intragangliônica ou intramuscular) pode também ser correlacionada com a função dessas células. A glia entérica mucosa interage com as células epiteliais intestinais, contribuindo na diferenciação, na adesão, na migração e na proliferação por meio da liberação de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15d-PGJ2), do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), da S-nitrosoglutationa (GSNO) e do pró-fator de crescimento epidérmico (proEGF) (BACH-NGOHOU *et al.*, 2010; NEUNLIST *et al.*, 2007; SAVIDGE *et al.*, 2007; VAN LANDEGHEM *et al.*, 2011). A intragangliônica é capaz de liberar

substâncias neuroativas (15d-PGJ2), trifosfato de adenosina (ATP), glutatona reduzida e precursores de neurotransmissores (L-arginina e glutamina sintetase), bem como de capturar e degradar substâncias neuroativas extracelulares e de responder a neurotransmissores (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Enquanto que a glia intramuscular ou extraganglionar expressa o receptor P2X7, porém a sua função específica no trato gastrointestinal ainda é desconhecida (VANDERWINDER; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003) (figura 7).

Figura 7 - Classificação da célula glial entérica de acordo com a sua localização no intestino.



Fonte: Gulbransen e Sharkey (2012). As células gliais entéricas são classificadas em glia entérica da mucosa, glia entérica intragangliônica e glia entérica intramuscular. A glia entérica mucosa secreta S-nitrosoglutatona, fator de crescimento transformador- β (TGF- β), pró-fator de crescimento epidérmico (proEGF) e 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15-d-PGJ2). A glia entérica intragangliônica libera trifosfato de adenosina (ATP), 15d-PGJ2 e glutatona reduzida, além de ser capaz de capturar e degradar substâncias neuroativas, secretar L-arginina e glutamina sintetase para formar neurotransmissores e expressar receptores para neurotransmissores e neuromoduladores. A glia entérica intramuscular expressa o receptor P2X7, porém sua função é desconhecida.

As células gliais desempenham importantes funções no trato gastrointestinal e interagem de forma direta com as células epiteliais intestinais por meio de GDNF, TGF- β , GSNO, 15d-PGJ2 e 15-hidroxiciclopentanoico (15-HETE) (POCHARD *et al.*, 2016; YAN-BO; YAN-QING, 2014).

No intestino, o GDNF atua como fator antiapoptótico nas células epiteliais intestinais (SAVIDGE *et al.*, 2007; STEINKAMP *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual

GDNF inibe a apoptose de células epiteliais é mediado pela ativação das vias de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/AKT) (STEINKAMP *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010). De forma autócrina, GDNF inibe a apoptose de células gliais entéricas por meio da ativação dos receptores GFR α 1-3 e o co-receptor RET (STEINKAMP *et al.*, 2012).

O TGF- β , sintetizado pelas células gliais entéricas da mucosa, inibe a proliferação e estimula a migração de células epiteliais intestinais (BULUT *et al.*, 2004; GATZA *et al.*, 2011; YAN-BO; YAN-QING, 2014). Os efeitos anti-proliferativos desse mediador são por meio da infrarregulação de quinases dependentes de ciclina e suprarregulação de inibidores de quinase dependente de ciclina, resultando, dessa forma, no bloqueio do ciclo celular (ALI; MOLLOY, 2011; WANG *et al.*, 2004).

No intestino, a CGE é a principal fonte de GSNO que é um potente doador de óxido nítrico (JAFFREY *et al.*, 2001; SAVIDGE *et al.*, 2007). O GSNO regula a permeabilidade intestinal por estimular a suprarregulação de proteínas da “tight junctions” como ocludinas e zônulas de oclusão-1 (ZO-1) e inibe o aumento de cadeia leve de miosina fosforilada (PMLC), bem como melhora a localização dessas proteínas (CHEADLE *et al.*, 2013; CONSTATINI *et al.*, 2010).

Diferente do GSNO, 15d-PGJ2 liberado pelas CGEs não afeta a permeabilidade paracelular. Assim como o TGF- β , o 15d-PGJ2 inibe a proliferação e estimula a diferenciação de células epiteliais intestinais por meio da ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR- γ) (BACH-NGOHOU *et al.*, 2010).

O 15-HETE controla a permeabilidade da barreira epitelial intestinal por inibir a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e regular a expressão de ZO-1, influenciando na permeabilidade paracelular da mesma forma que o GSNO, porém apresentando mecanismo distinto (POCHARD *et al.*, 2016).

As CGEs também podem atuar como células do sistema imune inato devido a sua capacidade de reconhecer patógenos por meio de receptores toll-like (TLRs) e liberar fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Vale ressaltar que as células gliais do intestino expressam TLRs 1-5, 7 e 9 (TURCO *et al.*, 2014).

Além de interagirem diretamente com as células epiteliais intestinais e com os patógenos, as CGEs também se conectam de forma dinâmica com os neurônios entéricos. A comunicação entre as CGEs e os neurônios entéricos ocorre de forma bidirecional. Os neurônios entéricos podem estimular as células gliais entéricas por meio da acetilcolina, da

serotonina (5-HT) e do ATP (BOESMANS *et al.*, 2013). Enquanto que o ATP liberado por células gliais entéricas pode ativar o receptor P2X7 em neurônios, estimulando a morte dessas células principalmente sob condições inflamatórias (BROWN *et al.*, 2015).

Em condições basais, isto é, fisiológicas, as células gliais liberam L-arginina que contribui para a síntese de óxido nítrico em neurônios nitrérgicos. Além do mais, as células gliais representam a única fonte de L-arginina nos gânglios entéricos (NAGAHAMA *et al.*, 2001).

As CGEs do plexo mucoso, do submucoso e do mioentérico expressam e secretam a proteína S100 β (BOESMAN *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2015). No intestino, a CGE representa a única fonte de S100 β . Diferente dos outros mediadores, essa proteína tem se destacado por ser largamente distribuída na parede intestinal (RAO *et al.*, 2015).

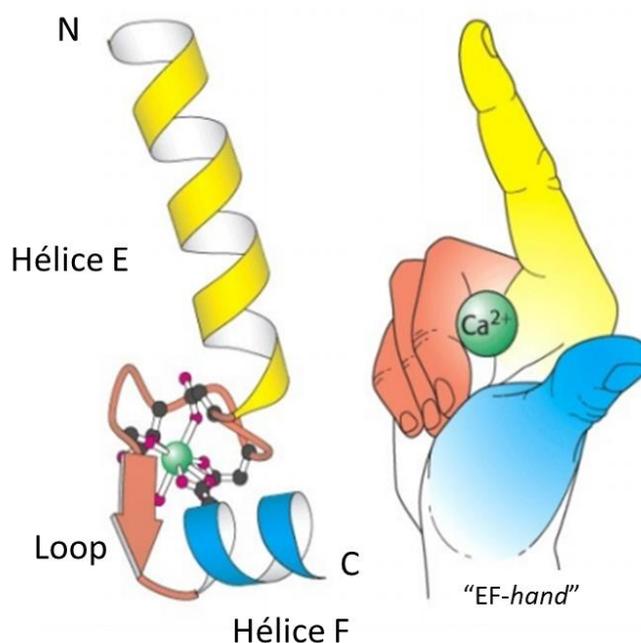
O S100 β pode ter papel dual sobre os neurônios entéricos. Em baixos níveis (nanomolar) estimula a sobrevivência neuronal, enquanto em altas concentrações (micromolar) promove a morte de neurônios do SNC (VILLARREAL *et al.*, 2011). Além disso, S100 β tem mostrado inibir a proliferação de células epiteliais intestinais em estudo *in vitro* (TURCO *et al.*, 2012).

Tanto a morte neuronal quanto o efeito anti-proliferativo sobre as células epiteliais intestinais promovidos por S100 β parecem ser mediados pela ativação da via do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE)/ fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B) (TURCO *et al.*, 2012; VILLARREAL *et al.*, 2011).

1.4 Via S100 β /RAGE/NF κ B

A família das proteínas S100 são constituídas por 21 membros. As proteínas S100 são pequenas proteínas (9-13 kDa) ligantes de cálcio do tipo EF-*hand* (HEIZMANN; FRITZ; SCHAFER, 2002). Este termo foi criado por R. H Kretsinger mediante um estudo realizado em parvalbumina, uma pequena proteína ligante de cálcio isolada do músculo de carpa. A denominação EF-*hand* designa um *motif* do tipo hélice-*loop*-hélice que apresenta alta afinidade pelo cálcio, sendo que as letras E e F referem-se as hélices E e F da parvalbumina. O clássico *motif* EF-*hand* é geralmente formado por um *loop* de 10 a 12 aminoácidos, ladeados por duas hélices apontadas para direções opostas e perpendiculares entre si (KRETSINGER; NOCKOLDS, 1973; STRYER; BERG; TYMOCZKO, 2008) (figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática do *motif* EF-hand.



Fonte: Stryer, Berg e Tymoczko (2008). EF-hand designa um *motif* do tipo hélice-loop-hélice que apresenta alta afinidade pelo cálcio (Ca^{2+}). O *motif* EF-hand é formado por um *loop* de 10 a 12 aminoácidos, ladeados por duas hélices, Hélice E e Hélice F, apontadas para direções opostas e perpendiculares entre si.

Dentre os membros da família S100, o S100 β vem se destacando devido aos seus efeitos na neuroinflamação e nas doenças inflamatórias intestinais (CIRILLO *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2012; VILLARREAL *et al.*, 2011).

O S100 β pode ser expresso por oligodendrócitos imaturos, células epiteliais de túbulos renais, pituícitos, condrócitos, adipócitos, melanócitos, células de Langerhans e astrócitos (DONATO *et al.*, 2009). No intestino, essa proteína é expressa exclusivamente por CGEs (RAO *et al.*, 2015).

No SNC, S100 β é uma proteína solúvel secretada por astrócitos que apresenta efeitos pró-apoptóticos ou pró-sobrevivência em neurônios dependendo da concentração presente no meio extracelular. Além disso, caracteriza-se como proteína de ligação ao cálcio que é abundante no citoplasma de astrócitos cerebrais. No citoplasma, S100 β é encontrado na sua forma solúvel associado à porção interna da membrana plasmática, aos centrossomos, aos microtúbulos ou aos filamentos intermediários do tipo III (DONATO, 2003).

Essa proteína apresenta várias ações intracelulares, incluindo a regulação da homeostase do cálcio (XIONG *et al.*, 2000), o controle da estabilidade de microtúbulos (SORCI; AGNELETTI; DONATO, 2000) e a modulação da mitose (DONATO, 2003).

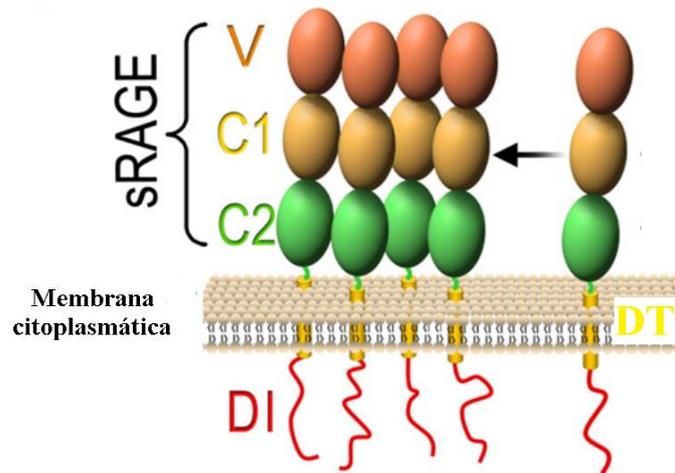
Em adição as suas ações intracelulares, o S100 β também exibe atividade extracelular que é mediada por sua interação com o receptor RAGE (DONATO *et al.*, 2009).

No SNC, a liberação de S100 β por astrócitos é aumentada quando essas células são estimuladas com 5-HT, por meio da ativação do receptor 5-HT_{1A}, ácido lipofosfatídico, glutamato e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e submetidas ao estresse metabólico (CICCARELLI *et al.*, 1999; DONATO *et al.*, 2009; EDWARDS; ROBINSON, 2006; PINTO *et al.*, 2000).

De forma semelhante, as células gliais entéricas quando expostas às citocinas pró-inflamatórias, *in vitro*, também liberam S100 β e produzem óxido nítrico (CIRILLO *et al.*, 2011). Quando S100 β é liberado em grandes concentrações para o meio extracelular, ele funciona como padrão molecular associado ao dano (DAMP) devido a sua capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de RAGE (SAVIDGE *et al.*, 2007).

O RAGE é um receptor de superfície celular ao qual pertence a uma família de proteínas de receptores de imunoglobulinas que compartilha homologia estrutural com outros receptores de imunoglobulinas (BARCLAY, 2003; LECLERC *et al.*, 2009). Em relação à sua estrutura, RAGE é constituído por um domínio extracelular, um transmembranar e uma extremidade citosólica (domínio intracelular). Vale enfatizar que o domínio extracelular de RAGE é denominado como região do RAGE de ligação para o ligante extracelular (sRAGE). O sRAGE é composto por um domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V e por dois domínios de Ig C-terminal (C1 e C2) (HSIEH *et al.*, 2004; KOCH *et al.*, 2010; LECLERC *et al.*, 2009). (figura 9).

Figura 9 - Estrutura do receptor RAGE.



Fonte: Leclerc *et al.* (2009). sRAGE= região do RAGE de ligação para o ligante extracelular; V= domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V; C1= domínio de Ig C-terminal 1; C2= domínio de Ig C-terminal 2; DT= Domínio transmembranar e DI= Domínio intracelular.

O S100 β ativa o receptor RAGE por ligar-se ao domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V. A sua interação com esse receptor tem demonstrado ser dependente dos níveis de cálcio, uma vez que esse íon promove a formação de proteínas S100 β tetraméricas, as quais apresentam alta afinidade pelo receptor RAGE (OSTENDORP *et al.*, 2007).

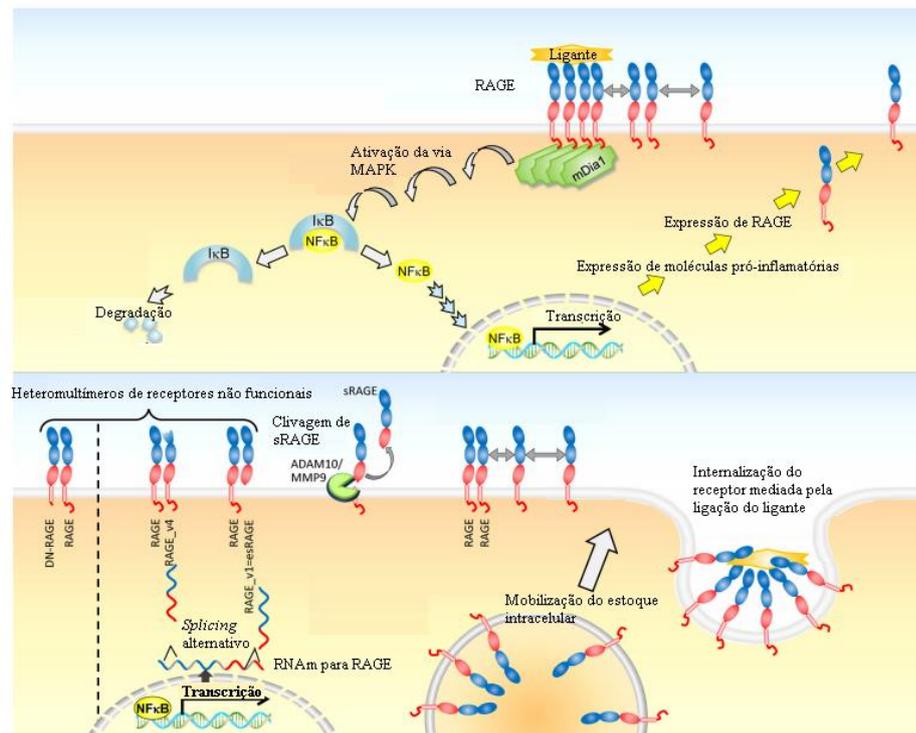
Além de S100 β , há outros ligantes para o receptor RAGE que incluem anfoterina (grupo de alta mobilidade Box 1, HMGB1), peptídeo β amiloide e outros membros da família S100 como S100A6 (LECLERC *et al.*, 2009). No entanto, cada um desses ligantes se torna relevante dependendo do processo patológico. Por exemplo, na doença de Alzheimer foi evidenciado aumento da expressão de receptores RAGE no SNC ao qual foi associado com aumento de peptídeo β amiloide, que por sua vez estimulou via RAGE o estresse oxidativo em neurônios e a produção de citocinas pró-inflamatórias em micróglia (YAN *et al.*, 2003).

O RAGE pode ser encontrado em neurônios, células musculares lisas, células mensangiais, células gliais entéricas, endotélio vascular, células epiteliais intestinais, macrófagos e linfócitos (CIRILLO *et al.*, 2011; LECLERC *et al.*, 2009; TURCO *et al.*, 2009). Pelo fato desse receptor ser expresso por diferentes células, não há um esquema geral para a resposta celular após ativação de RAGE. Essa resposta celular depende da identidade do ligante, do tipo de célula a ser estimulada, da concentração do ligante, da presença de outros ligantes, da concentração de RAGE na membrana celular e das moléculas adaptadoras que medeiam à sinalização (KIERDORF; FRITZ, 2013).

Na maioria dos casos, a interação do ligante ao receptor RAGE promove o recrutamento de *diaphanous-1*(mDia1) que ativa a via da MAPK, resultando na fosforilação da proteína inibitória kappa B (IkB) e na liberação de NFκB, ao qual se transloca para o núcleo, estimulando a expressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF-α, interleucina-1β (IL-1β) e IL-6, de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e de ciclooxygenase-2 (COX-2) (DONATO *et al.*, 2009; KIERDORF; FRITZ, 2013; LECLERC *et al.*, 2009).

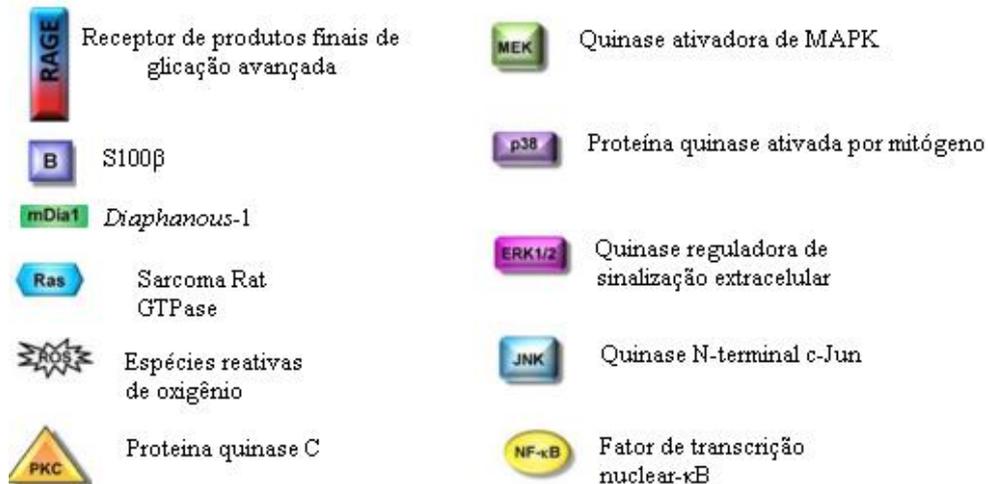
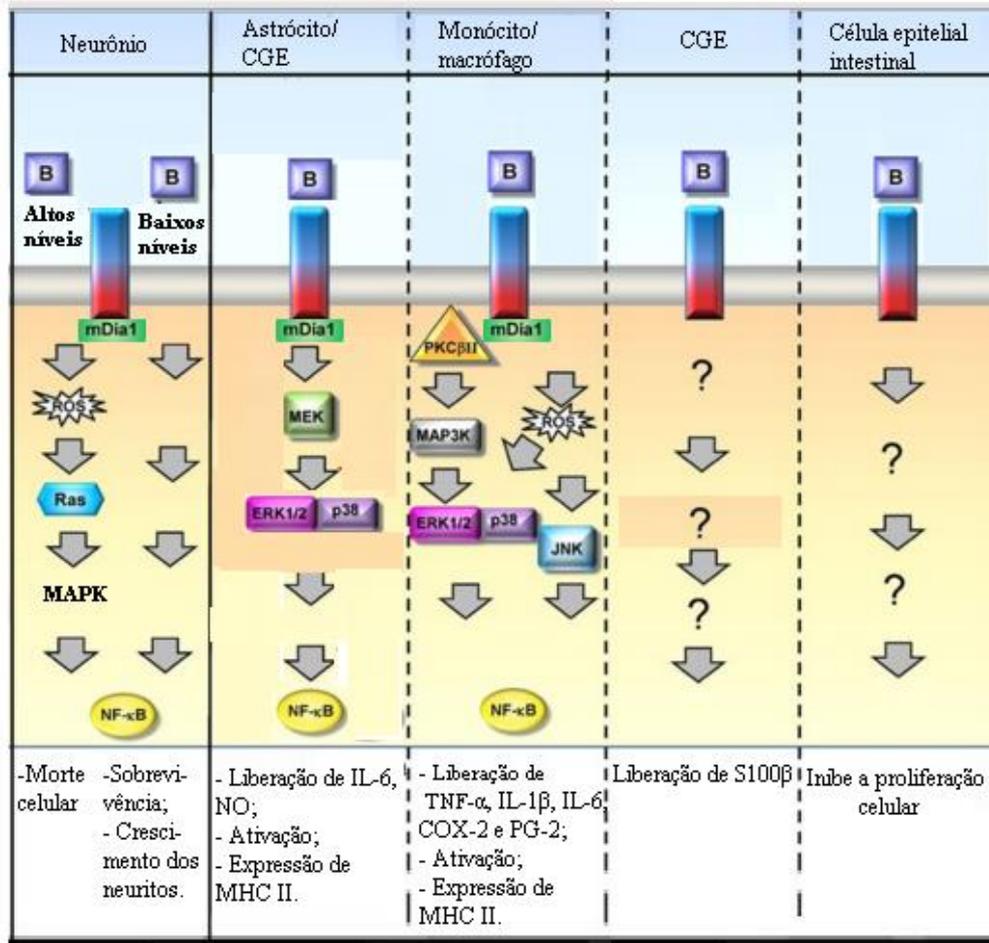
A ativação do receptor RAGE por seus ligantes promove uma retroalimentação positiva na ativação dessa via por aumentar a expressão desse receptor na membrana citoplasmática. Este evento pode ser promovido de duas formas: pelo aumento da expressão gênica de RAGE e pela reciclagem do receptor. Nesta última forma, os ligantes promovem a internalização do receptor por endocitose e as vesículas contendo os receptores se fundem a membrana plasmática (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 10).

Figura 10 - Mecanismo de ativação e regulação de RAGE.



Fonte: Kierdorf e Fritz (2013). mDia1= *Diaphanous-1*; RNAm= RNA mensageiro; sRAGE= Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular. O esquema acima (figura acima) mostra que o ligante interage com o RAGE por meio do seu domínio sRAGE, recrutando mDia1, que por sua vez ativa a via MAPK que promove a fosforilação de IkB com conseqüente ativação de NFκB e translocação desse fator de transcrição para o núcleo que promove aumento da transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias e RAGE, contribuindo para a reciclagem do receptor RAGE. O segundo esquema (figura abaixo) representa outra forma de reciclagem de RAGE, onde a interação do ligante a esse receptor promove a sua endocitose, culminando com o armazenamento do receptor no meio intracelular em endossomos que quando estimulados se fundem à membrana plasmática, levando a expressão desse receptor na membrana. Na membrana plasmática pode haver heterodímeros de RAGE não funcionais que são clivados por desintegrina e metaloproteinases 10 (ADAM10)/ MMP9 com conseqüente liberação de sRAGE para o meio extracelular.

Os efeitos celulares de S100 β por meio de RAGE são variáveis e depende, conforme já mencionado anteriormente, da concentração de S100 β no meio extracelular e do tipo de célula a ser estimulada. Em neurônios, altos níveis de S100 β promove a formação de espécies reativas de oxigênio que culmina com a ativação de NF κ B e resulta na morte de neurônios, enquanto baixos níveis desse ligante também promove a ativação de NF κ B, que por sua vez estimula a transcrição de fatores antiapoptóticos como Bcl-2, resultando na sobrevivência neuronal e no desenvolvimento de neuritos. Em astrócitos ou células gliais entéricas a ativação da via S100 β /RAGE/NF κ B promove a liberação de óxido nítrico e de IL-6, a ativação de células gliais e a expressão de MHC classe II. Em macrófagos também ocorre ativação de NF κ B que resulta na liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e prostaglandina D2 (PGD2), na ativação de macrófagos e na expressão de MHC classe II. A via de sinalização envolvida na liberação de S100 β por via autócrina é desconhecida, assim como a via envolvida na inibição da proliferação de células epiteliais intestinais por S100 β /RAGE (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 11).

Figura 11 - Efeito da ativação do receptor RAGE por S100 β em diferentes células.

Fonte: Adaptado de Kierdorf e Fritz (2013). S100 β ao se ligar ao receptor RAGE, localizado em neurônios, astrócitos, células glias entéricas, monócito/macrófago e células epiteliais intestinais, ativa-o e recruta a molécula *diaphanous-1* (mDia1) que culmina, na maioria das células, na ativação de NF κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e na ativação de macrófagos/monócitos e células glias entéricas. Os mecanismos pelos quais a ativação de RAGE por S100 β inibe a proliferação em células epiteliais intestinais e estimula por via autócrina a liberação de S100 β por CGE ainda é desconhecido.

Inibidores de S100 β , como os anticorpos neutralizantes e a pentamidina, vem sendo utilizados em modelos experimentais de doença de Alzheimer e de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) para investigar o papel desse sinalizador na patogênese dessas doenças (CIRILLO *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2012). Nesses modelos, a pentamidina é utilizada devido a sua capacidade de se ligar ao S100 β , impedindo a sua interação com o receptor RAGE (CIRILLO *et al.*, 2015).

O isotiocianato de pentamidina foi descoberto em 1938, como um fármaco antiprotozoário, e aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de *Pneumocystis carinii* e de doenças causadas por protozoários, como a Leishmaniose e a tripanossomíase (DRAKE *et al.*, 1985; RYBNIKER *et al.*, 2010). O seu efeito antiprotozoário é, em parte, devido à inibição da topoisomerase II e à sua ligação a regiões do DNA rica em adenina-timina (CHOUDHURY; LEIBOWITZ, 2003; JUNG *et al.*, 2011; SINGH; DEY, 2007).

Em doses de 6 a 10 mg/Kg tem mostrado potente efeito antitumoral por inibir a enzima endo-exonuclease, que é suprarregulada em vários tipos de câncer e está envolvida no reparo do DNA, e a topoisomerase II, promovendo a morte de células cancerígenas por impedir a separação da dupla fita de DNA durante a mitose (IMREH *et al.*, 2011). Novas formulações de pentamidina, como a lipossômica, têm sido desenvolvidas para melhorar a sua biodisponibilidade e o seu efeito antitumoral (MÉRIAN *et al.*, 2015).

A pentamidina inibe S100 β por interagir com resíduos aromáticos na hélice 4 e na alça C-terminal de S100 β (MARKOWITZ *et al.*, 2004). O mecanismo de inibição de S100 β por pentamidina ocorre devido à ligação de duas moléculas desse fármaco ao S100 β . Uma molécula de pentamidina se liga ao sítio de ligação do peptídeo p53 (denominado sítio 1) e a segunda molécula a um sítio independente (denominado sítio 2), que é adjacente ao bem caracterizado sítio de ligação do Zn²⁺, formando um complexo pentamidina-Ca²⁺-S100 β ou Pentamidina-Zn²⁺,Ca²⁺-S100 β (CHARPENTIER *et al.*, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2004; WILDER *et al.*, 2005). Dessa forma, impedindo a interação de S100 β com o receptor RAGE.

1.5 Sistema nervoso entérico e doenças inflamatórias intestinais

A inflamação crônica no intestino pode ocasionar importantes alterações no sistema nervoso entérico, conforme demonstrado por vários estudos que foram realizados em pacientes com doença inflamatória intestinal, sendo a colite ulcerativa e a doença de Crohn as mais investigadas (BERNARDINI *et al.*, 2012; VON BOYEN *et al.*, 2011). Ambas, a colite ulcerativa e a doença de Crohn são caracterizadas por uma inflamação no intestino, que é

acompanhada por uma ampla liberação de citocinas pró-inflamatórias e seguem com dismotilidade intestinal (BASSOTI *et al.*, 2014; SCHREIBER *et al.*, 1999).

Em amostras de biópsias de pacientes com colite ulcerativa já foram relatadas alterações nos neurônios entéricos, nas células gliais e nas células intersticiais de Cajal. Onde houve redução de aproximadamente 61% dos neurônios entéricos e de 38% das células gliais. (BERNARDINI *et al.*, 2012). Esses dados mostraram que há uma perda maior de neurônios do que de células gliais na colite ulcerativa.

Pacientes apresentando colite ulcerativa, doença de Crohn ou colite infecciosa (por *Clostridium difficile*) exibiram aumento da expressão proteica e da imunomarcagem de GDNF e GFAP na mucosa colônica inflamada (VON BOYEN *et al.*, 2011).

Recentemente, foi evidenciado o papel regulatório da CGE na barreira epitelial funcional e na inflamação através da liberação de GSNO, encontrando-se este reduzido em doenças inflamatórias, como a doença de Crohn (SAVIDGE *et al.*, 2007).

Ainda nesse contexto da colite ulcerativa, Cirillo *et al.* (2009) demonstrou que a produção aumentada de óxido nítrico na mucosa de pacientes com colite ulcerativa é decorrente, em parte, de expressão aumentada de S100 β por CGE.

Em chineses com colite ulcerativa e doença de Crohn foram identificados importantes polimorfismos no receptor RAGE (WANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014). Alterações genéticas nesse receptor são consideradas relevantes, uma vez que no intestino esse receptor é expresso por macrófagos, células epiteliais intestinais, células gliais entéricas e neurônios (CIRILLO *et al.*, 2011; DONATO *et al.*, 2009; TURCO *et al.*, 2012).

1.6 5-Fluorouracil e Alterações gastrintestinais

O 5-FU foi desenvolvido em 1957 e pertence à classe das fluoropirimidinas (HEIDELBERGER *et al.*, 1957). Esse fármaco antimetabólico foi gerado com a finalidade de tratar pacientes com câncer por meio da inibição de processos essenciais para as células como a síntese proteica e o metabolismo celular (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

O 5-FU é um análogo da uracila que contem um átomo de fluorina na posição C-5 em vez de hidrogênio (figura 12A). Ele entra nas células por meio de transporte facilitado, mecanismo semelhante ao da uracila. No meio intracelular, 5-FU é convertido em vários metabólitos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). Esses metabólitos ativos interrompem a síntese de RNA e inibem a enzima timidilato sintetase (TS). A enzima

desidrogenase diidropirimidina (DPD), que é expressa abundantemente por hepatócitos, converte 5-FU a diidrofluorouracil (DHFU), sendo essa a etapa limitante no catabolismo desse quimioterápico. Vale enfatizar que cerca de 80% do 5-FU administrado é primeiramente catabolizado no fígado (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

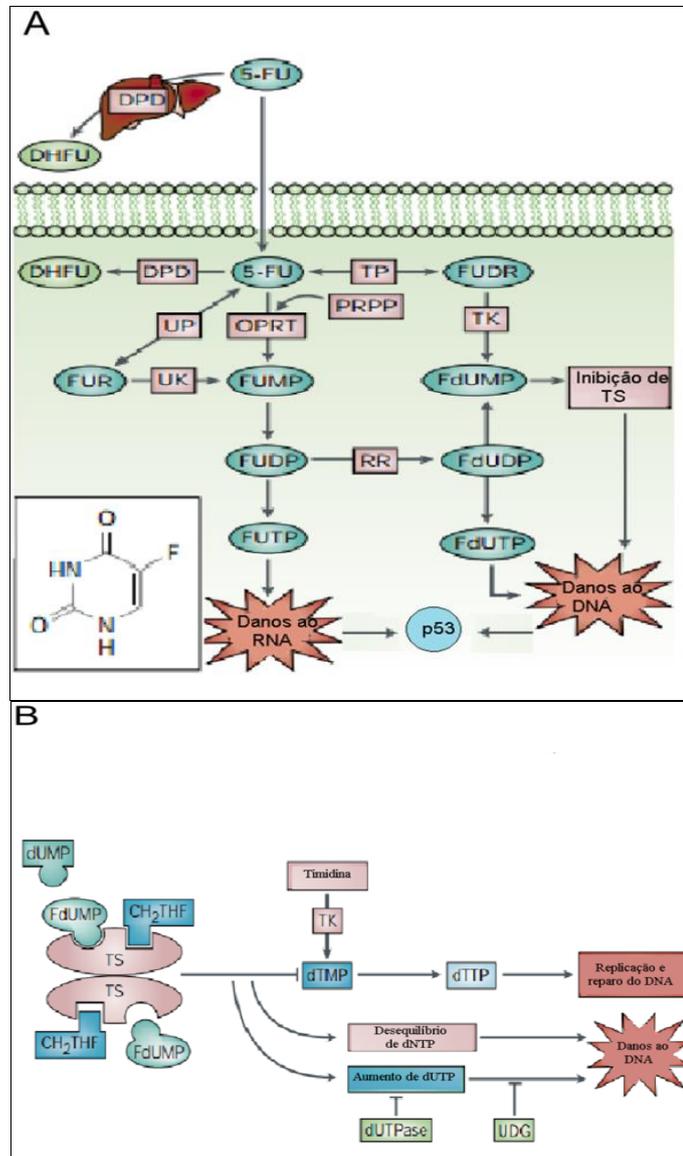
O metabolismo do 5-FU varia de indivíduo para indivíduo devido à variação genética e à degradação da enzima DPD que é provavelmente a base genética mais importante para a variação da farmacocinética entre indivíduos (SOVERI *et al.*, 2014).

A enzima TS catalisa a metilação redutiva da monofosfato de deoxiuridina (dUMP) para formar monofosfato de deoxitimidina (dTMP) com a utilização de 5,10-metilenatetra-hidrofolato (CH_2THF) como doador do grupo metila. Essa reação é a única fonte fornecedora de timidilato, que é necessária para replicação e reparo do DNA. A proteína TS apresenta 36 kDa e é constituída por duas subunidades, as quais contem sítios de ligação para nucleotídeo e outro para CH_2THF . FdUMP, que é um metabólito ativo do 5-FU, liga-se ao sítio de ligação para os nucleotídeos da TS, formando um complexo terciário estável com a enzima TS e CH_2THF , culminando com o bloqueio da ligação do substrato fisiológico dUMP e inibindo a síntese de dTMP. A depleção de dTMP resulta em subsequente redução de trifosfato de deoxitimidina (dTTP) que induz desequilíbrio nos níveis de outros deoxinucleotídeos (dATP, dGTP e dCTP) por meio de mecanismos de *feedback*. Esse desequilíbrio de deoxinucleotídeos resulta na interrupção da síntese e reparo do DNA, culminando em danos letais nesse ácido nucleico (figura 12 B). Em adição, a inibição de TS resulta em acúmulo de dUMP, que pode subsequentemente levar ao aumento dos níveis de trifosfato de deoxiuridina (dUTP). dUTP e FdUTP podem ser incorporados dentro do DNA de forma incorreta. O reparo do DNA contendo essas moléculas pela enzima uracil-DNA-glicosilase (UDG) não é eficaz devido aos altos níveis da dUTP/dTTP e resulta na incorporação de mais falsos nucleotídeos. Esses ciclos inadequados de incorporação, deleção e reparo promovem a desintegração do DNA e morte celular. Enquanto que a função do RNA é afetada pela incorporação de FUTP (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 TS. Os danos ao DNA e ao RNA levam a ativação de p53 (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003) (figura 12 B). O supressor tumoral p53 mantém a integridade do DNA por estimular a transcrição de genes como inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A) e gene 45 α indutor de dano ao DNA e interrupção do crescimento (GADD45 α), os quais induzem cessamento do ciclo celular. Dependendo do tipo celular e da natureza do

dano ao DNA, p53 pode promover apoptose por meio da indução de genes pró-apoptóticos como FAS e BAX, ou inibi-la por meio da suprarregulação de genes antiapoptóticos como BCL2 (PETAK; TILLMAN; HOUGHTON, 2000).

Figura 12 - Metabolismo e mecanismo de ação do 5-FU.



Fonte: adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003). O 5-FU é um análogo da uracila e contém um átomo de fluorina na posição C5 (à esquerda de A). **A:** O 5-FU entra nas células por meio de transporte facilitado. No meio intracelular, é convertido em três metabólitos ativos principais: (monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). A conversão de 5-FU em monofosfato de fluorouridina (FUMP) pode ser direta (por meio da enzima fosforibosiltransferase oratato-OPRT- e o co-fator 5-fosforibosil-1-pirofosfato-PRPP) ou indireta (por meio da via fluorouridina-FUR- pela ação sequencial da uridina fosforilase-UP- e uridina quinase-UK). FUMP é convertido sequencialmente em difosfato fluorouridina (FUDP) e no metabólito ativo FUTP ou, por ação da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), em difosfato fluorodeoxiuridina (FdUDP). Este último é convertido em FdUTP ou FdUMP. A conversão de 5-FU em FdUMP ocorre de forma indireta por meio da fluorodeoxiuridina (FUDR) pela ação sequencial de timidina fosforilase (TP) e timidina quinase (TK). FUTP se incorpora ao RNA, FdUTP ao DNA e FdUMP inibe a enzima timidilato sintetase (TS), levando respectivamente a danos ao RNA e ao DNA, que por sua vez estimulam a ativação de p53. **B:** FdUMP se liga a enzima TS, competindo pelo sítio de ligação da monofosfato de deoxiuridina (dUMP), formando um complexo FdUMP-5,10-metilenatetra-hidrofolato (CH₂THF)-TS que impede a ação dessa enzima, resultando em danos ao DNA e inibição da replicação e do reparo.

O 5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o colorretal, sendo de maior impacto nesse último. No tratamento do câncer colorretal, o 5-FU geralmente é associado ao irinotecano, um inibidor da topoisomerase II, e ao leucovorin, um biomodulador que aumenta a ligação do 5-FU à timidilato sintetase. A combinação desses três fármacos tem aumentado a sobrevivência de pacientes com esse tipo de câncer (SALTZ *et al.*, 2001).

Os efeitos colaterais do 5-FU variam consideravelmente de acordo com o tratamento, a dose utilizada e a via de administração e são mais evidentes em células com grande índice de mitose, como tecidos de rápida proliferação. Seus efeitos colaterais incluem mielossupressão, mucosite oral e intestinal, dermatite e diarreia (VANHOECKE *et al.*, 2015). Cerca de 40% dos pacientes em uso de doses padrões de quimioterápicos, como o 5-FU, apresentam mucosite e há relatos de pacientes que a apresentam na primeira dose administrada (GIBSON *et al.*, 2013).

Estudo realizado com 880 pacientes da França e 153 da Finlândia com câncer colorretal e em uso de 5-FU evidenciou que a mucosite, a diarreia e as náuseas atingiram respectivamente 42%, 53% e 54% desses pacientes (SOVERI *et al.*, 2014). Esses dados revelam que a mucosite é um das complicações mais prevalentes com o uso do 5-FU.

A mucosite oral caracteriza-se por apresentar cinco fases fisiopatológicas: (1) fase de iniciação, (2) resposta primária ao dano, (3) amplificação, (4) ulceração e (5) cicatrização (SONIS, 2004).

Na fase de iniciação, o DNA das células basais é lesado e, simultaneamente, há formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são mediadores cruciais nos eventos biológicos subsequentes. Nessa fase não há alteração visível na camada mucosa, porém há o início de uma cascata de eventos na camada submucosa (SONIS, 2004).

Na fase seguinte, a qual é denominada resposta primária ao dano, o DNA lesado e as ROS iniciam uma cascata de eventos complexos que ainda não é bem compreendido. Porém, já é bem estabelecido que o dano ao DNA resulta na estimulação de várias vias de transdução que ativam fatores de transcrição como p53 e NFκB. Este pode ser estimulado em resposta às ROS (SONIS, 2002). A degradação dos lipídios da membrana celular pelas ROS geram produtos que suprarregulam genes de resposta imediata, como os codificados por C-JUN e C-JUN kinase aminoterminal (JNK) (CRISWELL *et al.*, 2003; DAVIS, 2000). Nessa fase ocorrem mudanças em grande parte das células da mucosa, não se limitando às células epiteliais intestinais. Dentre os fatores transcripcionais que são ativados pelas ROS, NFκB

tem sido considerado um dos mais importantes devido a sua relação com a toxicidade e resistência a terapia antitumoral (SONIS, 2002).

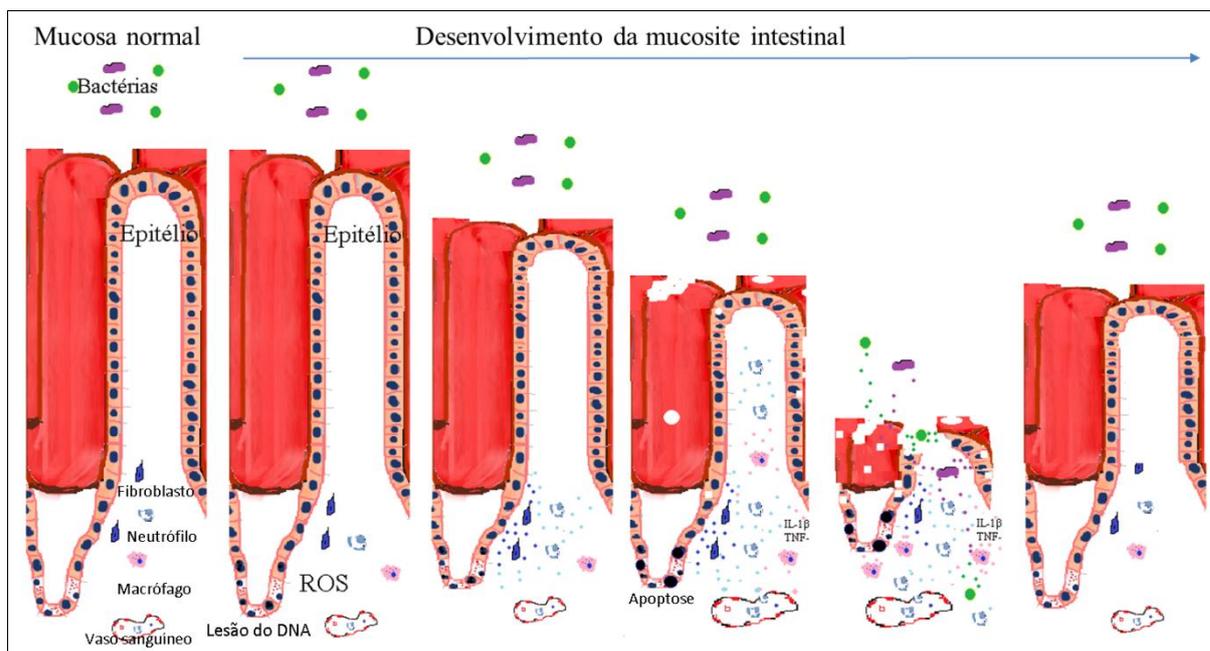
Além disso, a ativação de NF κ B pode resultar na suprarregulação de mais de 200 genes, muitos dos quais apresentam potencial efeito tóxico sobre a mucosa. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 encontram-se elevadas na mucosite induzida por 5-FU e são suprarreguladas por NF κ B. Geralmente, os níveis elevados dessas citocinas são correlacionados a dano precoce ao tecido conjuntivo e ao endotélio, resultando na redução da oxigenação epitelial e morte das células epiteliais basais. Concomitantemente, fibroblastos, via ativação de AP-1, são estimulados a secretar metaloproteinases (MMP) que promovem a destruição de colágeno da matriz subepitelial e da membrana basal respectivamente por MMP-1 e MMP-3 (BAMBA *et al.*, 2003).

A fase de amplificação ocorre como consequência da suprarregulação gênica que é influenciada pela ativação inicial de fatores de transcrição. Uma larga quantidade de moléculas biologicamente ativas se acumulam e atingem o tecido da submucosa. Algumas dessas, como a citocina pró-inflamatória TNF- α , ativam NF κ B, gerando uma retroalimentação positiva. Em adição, agindo por meio de membros da família do receptor TNF- α , ela inicia a sinalização de MAPK levando a ativação de JNK, que por sua vez regula a ativação transcripcional de AP-1, resultando na ativação de caspase-3 e morte celular (DAVIS, 2000). Além disso, TNF- α e IL-1 β induzem a ativação de MMP-1 e MMP-3 (BAMBA *et al.*, 2003; SESAKI *et al.*, 2000). Esses eventos em conjunto contribuem para as alterações na camada submucosa e no epitélio oral.

A fase de ulceração da mucosite é considerada a mais significativa em pacientes e modelos murinos. A perda da integridade da mucosa propicia a invasão de produtos da parede celular de bactérias que colonizam o intestino, os quais estimulam células mononucleares a liberarem e produzirem citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez promovem indiretamente a transcrição de genes pró-apoptóticos e potencializam os danos teciduais (ALIKHANI *et al.*, 2003; ENGELS-DEUTSH *et al.*, 2003). Nessa fase, há intensa migração de células inflamatórias para a base da lesão mediada por fatores quimiotáticos. Por fim, na fase de cicatrização ocorre a resolução da lesão induzida pelo quimioterápico (SONIS, 2004).

Diferente da mucosite oral, a mucosite intestinal não apresenta fases bem definidas (figura 13). No entanto, mediadores como CXCL4, IL-4, IL-1 β , CXCL9, TGF- β , PAF, substância P e serotonina demonstraram participar da sua patogênese (GAO *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2011, 2013; WU *et al.*, 2011a, 2011b).

Figura 13 – Desenvolvimento da mucosite intestinal.



Fonte: Elaborada pela autora. Em condições normais (mucosa normal), há a presença de macrófagos em estado inativo e poucos neutrófilos. Inicialmente, ocorre lesão do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Neutrófilos são estimulados a liberar mieloperoxidase e elastases que estimulam a apoptose das células epiteliais intestinais e diversas vias de sinalização são ativadas, levando a liberação extensa de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , culminando com a perda da integridade do epitélio intestinal que propicia a invasão de bactérias e intensifica a inflamação, levando ao recrutamento de neutrófilos para a lesão. Após a cessação do quimioterápico, ocorre a resolução da lesão.

A apoptose induzida por 5-FU nas células da cripta intestinal demonstrou ter importante participação de CXCL4 e CXCR3. Ambos encontram-se aumentados na mucosite intestinal induzida por 5-FU e em cultura de IEC-6, linhagem de células epiteliais de ratos, expostas a esse quimioterápico. A inibição de CXCL4 com um anticorpo neutralizante foi capaz de reduzir o escore de diarreia, aumentou a sobrevivência e o comprimento das vilosidades e reduziu a apoptose das células da cripta intestinal. Além disso, foi demonstrado que CXCL4, liberado por células epiteliais das vilosidades, por meio de sua ligação ao receptor CXCR3 ativa de forma direta e indireta a via MAPK, culminando na expressão de p53 e BAX, que por sua vez estimulam a apoptose de células epiteliais (GAO *et al.*, 2014). Sabe-se que p53 induz apoptose por múltiplos mecanismos, incluindo suprarregulação de genes pró-apoptóticos da via extrínseca e intrínseca, como o Apaf-1, Bax e Fas, que por sua vez promovem a liberação direta do citocromo C da mitocôndria e a relocação de Fas para a membrana celular (PIETSCH *et al.*, 2008).

A citocina imunomoduladora IL-4 e pró-inflamatória IL-1 β também demonstraram importante função na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Animais nocautes para IL-4 apresentaram aumento do comprimento das vilosidades, redução de mieloperoxidase e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-8), apresentando dessa forma importante papel no recrutamento de neutrófilos (SOARES *et al.*, 2013). IL-4 promove migração de leucócitos, incluindo neutrófilos, por aumentar a expressão de CCL2 ou por elevar a expressão do receptor de TNF do tipo 1 solúvel (sTNFR1) (RATTHE *et al.*, 2009).

As citocinas da família IL-1 e o seu receptor IL-1R α são produzidos na mucosa intestinal (DAIG *et al.*, 2000). Após 24h de administração de 5-FU há elevada expressão gênica de IL-1 β na mucosa intestinal de ratos. Antagonista do receptor de IL-1 β foi capaz de diminuir apoptose e transcrição gênica de fatores pró-apoptóticos como BAX e caspase-3 e aumentar os fatores anti-apoptóticos como BCL-2, elevar a viabilidade de células epiteliais intestinais expostas ao 5-FU, bem como potencializar o efeito antitumoral do 5-FU (WU *et al.*, 2011a). Além disso, o uso desse antagonista também reduziu a perda de peso, aumentou a sobrevivência, diminuiu a severidade da diarreia e melhorou os parâmetros microscópicos, elevando o comprimento dos vilos (WU *et al.*, 2011b).

Na mucosite intestinal induzida por 5-FU também foi evidenciado aumento de CXCL9, CXCR3 e TGF- β que foram implicados na redução da proliferação de células epiteliais ocorrente nesse processo. A quimiocina CXCL9 foi revelada como importante molécula sinalizadora desse processo via mTOR/p70S6K, estimulando a secreção de TGF- β que é um potente inibidor do crescimento da maioria das células epiteliais (LU *et al.*, 2015).

Soares *et al.* (2011) demonstrou, por meio da utilização de animais nocautes para o receptor do fator ativador plaquetário (PAFR) e antagonista farmacológico desse receptor, que o fator ativador plaquetário (PAF) tem importante função nas alterações microscópicas e na suprarregulação de IL-8 induzida por 5-FU em modelo de mucosite intestinal. Em condições inflamatórias, PAF é sintetizado no intestino por células epiteliais e é um potente mediador de diversos processos inflamatórios, incluindo a síntese de eicosanoides, a indução da apoptose e a ativação de NF κ B (LU *et al.*, 2008; VENKATESHA *et al.*, 2004).

Na mucosite intestinal induzida por 5-FU foi evidenciado aumento da expressão gênica dos receptores NK1 e 5-HT₃, bem como de seus ligantes substância P e serotonina (5-HT), e grande parte desses receptores foram identificados em macrófagos e mastócitos (MATSUMOTO *et al.*, 2013). Células intersticiais de Cajal, neurônios entéricos, fibras aferentes vagais e células musculares lisas também expressam esses receptores (HOLZER; HOLZER-PETSCHKE, 2001; GLATZLE *et al.*, 2002). A interação da substância P com seu receptor NK1 no trato gastrointestinal culmina com a liberação de citocinas, quimiocinas, e

neuropeptídeos que modulam a inflamação, a motilidade e a diarreia que estão associadas com a patogênese da maioria dos distúrbios intestinais (KOON; POTHOUKAKIS, 2006). Em cultura de mastócitos, a substância P demonstrou exercer potente efeito pró-inflamatório por meio de TNF- α , de IL-1 β , de IL-4 e de IL-6 via ativação de NF κ B (AZZOLINA; BONGIOVANNI; LAMPISI, 2005).

Em relação à diarreia, Sakai *et al.* (2013) demonstraram em camundongos que 5-FU diminui a expressão das aquaporinas 1, 4, 8 e 11 no cólon. Essas aquaporinas, que são responsáveis pelo transporte de fluidos transepitelial, apresentaram importante envolvimento no mecanismo da diarreia promovida por esse quimioterápico, uma vez que ambas a diarreia e a redução desses canais promovidas por 5-FU não foram revertidas com a utilização do inibidor de TNF- α , o etanercepte. Em outro estudo, a redução das aquaporinas por 5-FU demonstrou ser mediada por neutrófilos, uma vez que o inibidor da elastase liberada por essas células, o sivelestat, e o antagonista de CXCR2, o SB225002, revertem o seu efeito sobre a expressão das aquaporinas concomitante com a redução da diarreia (SAKAI *et al.*, 2014).

Diversas terapêuticas vêm sendo utilizadas em modelos de mucosite intestinal induzida por 5-FU com a finalidade de desvendar uma terapia capaz de reduzir eficazmente as dismotilidades intestinais, como a diarreia, e a perda de peso promovidas pelo uso desse quimioterápico.

A minociclina, derivado semissintético da tetraciclina, demonstrou ser capaz de reduzir a perda de peso e a severidade da diarreia induzidas por 5-FU, bem como aumentar o comprimento das vilosidades do jejuno e do íleo, diminuir a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α , reduzir a apoptose e suprimir a ativação de (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) (HUANG *et al.*, 2009).

Fator de crescimento semelhante à insulina -1(IGF-1), que foi implantado por via subcutânea na região supraescapular de ratos submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU, melhorou apenas o comprimento das vilosidades e os parâmetros microscópicos (COOL *et al.*, 2005).

De forma semelhante, a administração do inibidor da uridina fosforilase-1 também foi eficaz nesses dois parâmetros (RENCK *et al.*, 2014). A enzima uridina fosforilase é responsável por controlar a homeostase da uridina a nível plasmático e tecidual. A utilização do inibidor dessa enzima aumenta os níveis de uridina, que por sua vez contribui para o aumento da taxa de formação de uridina trifosfato que compete com o FUTP pela incorporação ao RNA (AL SAFARJALANI *et al.*, 2006). Dessa forma, esse composto age reduzindo os danos ao RNA.

O probiótico *Lactobacillus acidophilus* apresentou papel regulatório na inflamação e na dismotilidade gastrintestinal induzida por 5-FU, onde aumentou as vilosidades intestinais, reduziu o recrutamento de neutrófilos, aumentou os níveis de glutatona reduzida (GSH), diminuiu os níveis de nitrito e nitrato e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), além de reduzir o esvaziamento gástrico e trânsito na porção proximal e distal do intestino delgado (JUSTINO *et al.*, 2015).

Similarmente, *Saccharomyces boulardii*, outro probiótico utilizado no tratamento da mucosite intestinal induzida por esse quimioterápico, apresentou o mesmo resultado, porém reduziu as alterações na permeabilidade induzida por 5-FU e a apoptose das criptas intestinais (JUSTINO *et al.*, 2014).

O peptídeo mimético COG 133 da apolipoproteína E, em cultura de células epiteliais (IEC-6) expostas ao 5-FU, foi capaz de aumentar a proliferação e a migração dessas células, bem como reduzir a sua apoptose. Os efeitos benéficos desse peptídeo quando administrado por via intraperitoneal em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU incluem aumento da altura das vilosidades e do índice mitótico em células da cripta intestinal, redução de mieloperoxidase, IL-1 β , TNF- α e apoptose, elevação dos níveis de IL-10 e diminuição da transcrição gênica de iNOS e TNF- α (AZEVEDO *et al.*, 2012).

Na fase de cicatrização, as alterações epiteliais induzidas por 5-FU são totalmente revertidas conforme relatado anteriormente. Apesar de nessa fase não haver inflamação na mucosa intestinal, pacientes que utilizaram 5-FU podem apresentar dismotilidade intestinal. Soares *et al* (2008) demonstrou, em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, redução do esvaziamento gástrico e aumento da contratilidade intestinal na fase de cicatrização.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal é um dos efeitos colaterais mais prevalentes nos pacientes em uso de quimioterápicos, como o 5-FU. Caracteriza-se por intensa inflamação na mucosa intestinal que, geralmente, é acompanhada por diarreia. Na fase de cicatrização, as alterações epiteliais induzidas por 5-FU são totalmente revertidas. No entanto, Soares *et al* (2008) demonstrou, em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, redução do esvaziamento gástrico e aumento da contratilidade intestinal na fase de cicatrização, isto é, apesar de haver resolução do quadro inflamatório intestinal, os animais seguem com dismotilidade, assim como observado na clínica.

Nesse aspecto, é importante ressaltar que o SNE regula as secreções e a motilidade no intestino. Observa-se na literatura que alterações na motilidade intestinal associadas à inflamação podem ocorrer por distúrbios da liberação de neurotransmissores do plexo mioentérico e por hipertrofia e hiperplasia muscular (MOREELS *et al.*, 2001). Vale ressaltar que um dos constituintes do SNE são as CGEs que interagem tanto com neurônios quanto com células epiteliais, liberando diversos sinalizadores como o S100 β . Nesse contexto, tanto a mucosite intestinal quanto a persistência da dismotilidade podem ter alguma correlação positiva com modificações no SNE. No entanto, na literatura vigente, não há pesquisas clínicas ou experimentais relacionadas ao 5-FU que associem esses achados com alterações nesse sistema e nem acerca do papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Vale destacar que o surgimento da mucosite intestinal durante o ciclo de quimioterapia requer redução da dose dos antineoplásicos, mudanças no esquema nutricional e adição de terapia antimicrobiana para os pacientes que desenvolvem infecção. De fato, todos esses fatores contribuem para o aumento significativo de investimentos por pacientes, afetando os custos hospitalares totais (BOWEN; GIBSON; KEEFE, 2011).

Diante da importância das células gliais para a atividade neuronal, assim como para a função do epitélio intestinal, este estudo se propõe a estudar as alterações nas CGEs e nos neurônios entéricos, bem como investigar o papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese na mucosite intestinal induzida por 5-FU o que poderá contribuir para melhorar o manejo dos efeitos colaterais do tratamento antineoplásico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as alterações da glia e neurônios entéricos e estudar o papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as alterações histológicas do SNE na mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar as alterações da imunomarcção, da expressão proteica e gênica de populações de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) e da imunomarcção de neurônios entéricos (HuC/D) na mucosite intestinal induzida por 5-FU, bem como estudar o efeito do inibidor de S100 β , a pentamidina, nessas alterações;
- Verificar o efeito do inibidor de S100 β na ativação de macrófagos na mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar a expressão de NF κ B NLS e de RAGE em neurônios entéricos e Iba-1 em células gliais entéricas (GFAP) na mucosite intestinal por 5-FU, bem como estudar o efeito do inibidor de S100 β nessas alterações por imunofluorescência;
- Verificar o efeito do inibidor de S100 β na expressão proteica de RAGE e de NF κ B p65 na mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Estudar o efeito do inibidor de S100 β na perda de peso, nas alterações histológicas, na inflamação (mensurando a síntese de TNF- α , de IL-6 e de nitrito/nitrato e a expressão proteica e gênica de iNOS) e no estresse oxidativo (mensurando os níveis de GSH e de MDA) induzidos por 5-FU na mucosite intestinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo

Os fármacos, os reagentes, os materiais e as soluções que foram utilizados neste estudo encontram-se detalhados no apêndice.

4.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

4.3 Animais

No protocolo experimental foram utilizados camundongos Swiss, machos, com massa corpórea entre 25g a 30g, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará- UFC.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, trocadas duas vezes por semana. Os animais permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos (temperatura: $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$; com exaustão de ar e ciclo de 12h claro/12h escuro) e com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*.

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

O modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU foi realizado conforme descrito por Soares *et al.* (2008). O 5-FU (450 mg/Kg, dose única) foi administrado por via intraperitoneal, no primeiro dia do protocolo experimental, e os camundongos foram eutanasiados com cetamina (Syntec, 100 mg/Kg) e xilazina (Agener União, 10 mg/Kg) por via intramuscular três dias após a administração do quimioterápico. Este período, de acordo com o modelo proposto, é capaz de mimetizar os efeitos inflamatórios e funcionais que ocorrem no intestino de humanos ocasionado pelo uso desse quimioterápico.

4.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo cada um composto por seis animais:

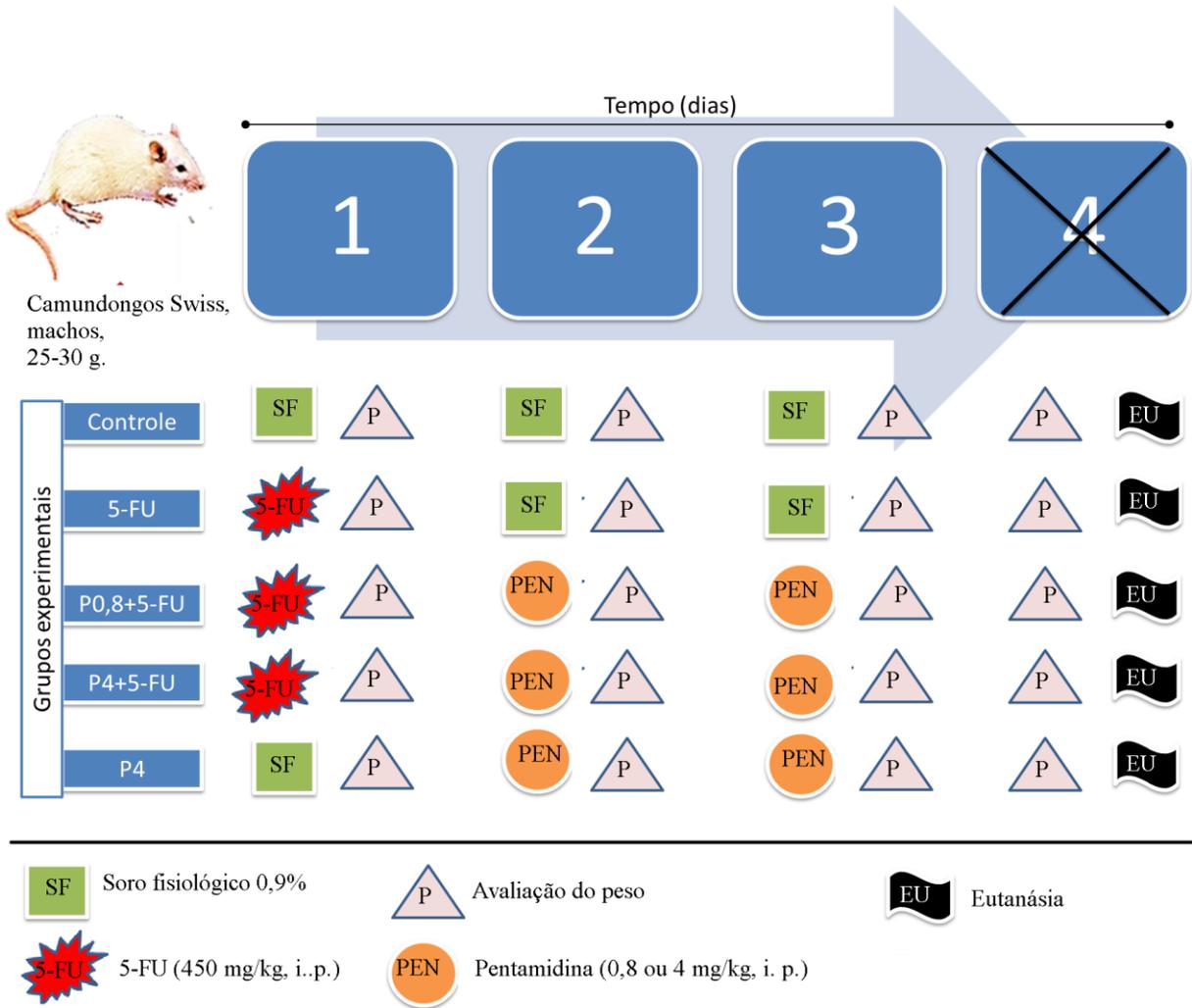
- **Grupo controle:** Os animais foram tratados com SF estéril 0,9% por via intraperitoneal.

- **Grupo 5-FU:** Os animais receberam dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal, no primeiro dia, e soro fisiológico (SF) 0,9% nos dois dias seguintes do protocolo experimental.
- **Grupo Pentamidina (0,8 mg/Kg de peso do animal) com mucosite induzida por 5-FU (P0,8+5-FU):** Os animais receberam 5-FU (450mg/Kg de peso do animal, dose única, intraperitoneal) no primeiro dia do protocolo experimental. Após 24h da administração do quimioterápico, os animais receberam isotiocianato de pentamidina (Sigma-Aldrich, EUA), inibidor de S100 β (0,8 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal), no segundo e no terceiro dia do protocolo experimental.
- **Grupo Pentamidina (4 mg/Kg de peso do animal) com mucosite induzida por 5-FU (P4+5-FU):** Os animais receberam 5-FU (450mg/Kg de peso do animal, dose única, intraperitoneal) no primeiro dia do protocolo experimental. Após 24h da administração do quimioterápico, os animais receberam isotiocianato de pentamidina, inibidor de S100 β (4 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal), no segundo e no terceiro dia do protocolo experimental.
- **Grupo Pentamidina (4 mg/Kg de peso do animal) (P4):** Este grupo foi utilizado para avaliar o efeito isolado do isotiocianato de pentamidina. Dessa forma os animais receberam apenas pentamidina (4 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal) no segundo e no terceiro dia do protocolo experimental.

As doses de pentamidina utilizadas nesse estudo foram estabelecidas conforme descrito por Esposito *et al.* (2012) e modificadas de acordo com o modelo experimental do presente estudo.

O protocolo experimental encontra-se ilustrado na figura 14.

Figura 14 - Esquema de indução da mucosite intestinal por 5-FU e protocolo experimental.



Fonte: Elaborado pela autora. i. p. = intraperitoneal.

4.6 Parâmetros avaliados

4.6.1 Análise ponderal

Os animais foram pesados uma vez ao dia durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em variável de peso, em relação ao peso inicial. Essa análise forneceu dados para confirmar o modelo experimental utilizado neste estudo, além de verificar o efeito do inibidor de S100 β (isotiocianato de pentamidina) nessa variável.

4.6.2 Análise morfométrica e histopatológica

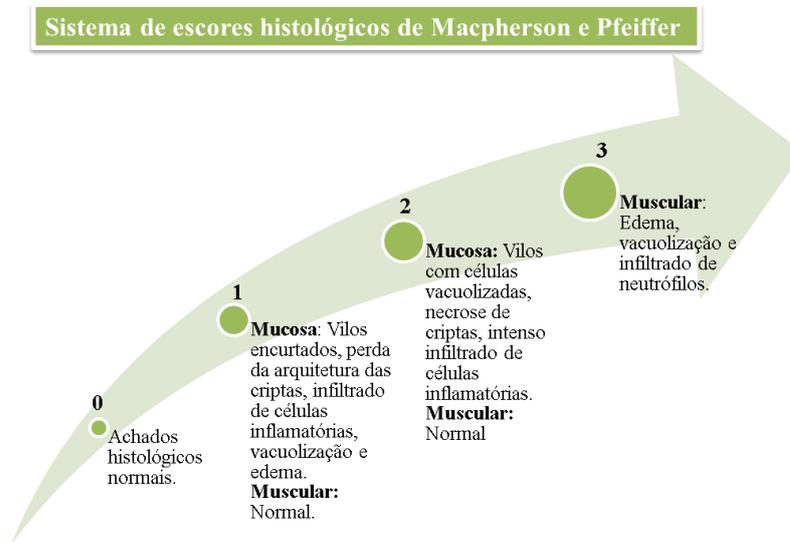
Os segmentos obtidos do duodeno, jejuno, íleo e cólon foram fixados em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os segmentos intestinais foram retirados do formol e inseridos em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Na etapa seguinte, os segmentos intestinais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo para obter cortes histológicos de 5 μm de espessura, as lâminas contendo os cortes dos segmentos intestinais foram adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilosidades e a profundidade de 10 criptas de cada lâmina. A altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais foram obtidas em μm .

Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da mucosite intestinal induzida por 5-FU por meio do sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer para os segmentos do intestino delgado. Ressalta-se que para o cólon esse sistema de escores foi adaptado.

O sistema de escore de Macpherson e Pfeiffer avalia alterações na camada mucosa e muscular e seus escores variam de 0 a 3: 0= achados histológicos normais; 1= vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 2= vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 3= vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose de criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos (figura 15).

Figura 15 - Sistema de escores histológicos de Macpherson e Pfeiffer.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar as alterações histológicas do cólon foi utilizado o sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer adaptado: 0= achados histológicos normais; 1= perda da arquitetura das criptas, baixo grau de infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 2= necrose das criptas, moderado infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa, edema na camada submucosa e camada muscular normal; 3= Redução de células caliciformes, Células vacuolizadas, necrose de criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e submucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos.

4.6.3 Imunohistoquímica

Para avaliar a localização de marcadores de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) e neuronal (HuC/D) no intestino delgado e no cólon foi realizado imunohistoquímica para esses imunomarcadores.

Primeiramente foram removidas as alças intestinais, onde as mesmas foram isoladas, separadas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 μ m que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol por cinco minutos cada. Em seguida, os cortes intestinais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho Maria (95°C). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Abcam) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para anti-GFAP (DAKO Flex), anti-S100β (DAKO Flex) ou HuC/D (Invitrogen, 1:100) por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar a área imunomarcada para GFAP, S100β ou HuC/D, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ da área imunomarcada} = \frac{\text{Área imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

4.6.4 Imunofluorescência e microscopia confocal das alças intestinais

A imunofluorescência foi realizada com a finalidade de obter dados quantitativos da marcação dupla de GFAP e de S100 β no cólon, e qualitativos de GFAP, Iba-1, iNOS, HuC/D, RAGE e NF κ B NLS no jejuno.

Após a remoção da alça intestinal, a mesma foi isolada, separada e fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após o emblocamento, estes blocos de parafina foram cortados no micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 μ m que foram recolhidos e aderidos em lâminas de vidro histológicas silanizadas. As lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização e incubadas por uma hora em estufa a 60°C. Decorrido este tempo, submeteu-se as lâminas a dois banhos em xilol e dois banhos em etanol absoluto por 10 min cada, e um banho no etanol a 90%, um banho em etanol a 70% e um banho em etanol a 50%, sendo cinco minutos cada banho. Para finalizar esse processo de hidratação do tecido, realizou-se um banho com água destilada por 10 minutos, seguido por dois banhos em PBS por três minutos cada. Em seguida, procedeu-se a recuperação antigênica, com a finalidade de expor os epítomos, onde as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato (pH= 6,0) por 20 min no banho Maria à 99°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes, três minutos cada, com PBS 1%. Na etapa seguinte, as lâminas foram mergulhadas em 0,1 % de *Sudan black* (diluído em 70% de etanol) por 20 min para reduzir a autofluorescência da parafina. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem, e em seguida foi realizada a permeabilização por 10 min com PBS/0,2% triton-X-100. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio dos cortes para reduzir as marcações inespecíficas com solução de bloqueio (780 μ L de PBS/1% triton-X-100, 20 μ L de soro de cavalo e 200 μ L BSA 5%). Após o bloqueio, incubou-se os cortes intestinais com os anticorpos primários anti-GFAP (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-6170, 1:100), anti-S100 β (Santa Cruz *Biotechnolog*, SC-7851, 1:100), anti-RAGE (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-5563, 1:200), anti-iNOS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8310, 1:100), anti-Iba-1 (Abcam, ab107159, 1:50), anti-HuC/D (Invitrogen, A21271, 1:400) ou anti-NF κ B NLS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-114, 1:200), diluídos em BSA 1%, *overnight* a 4°C em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Na etapa seguinte, efetuou-se a lavagem dos cortes com PBS por cinco minutos e incubou-se com os anticorpos secundários Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen, A21206, 1:500), Alexa fluor 594 donkey anti-mouse (Invitrogen, A21203, 1:400) e Alexa fluor 594 donkey anti-goat (Invitrogen). Após a remoção do anticorpo secundário e lavagem com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada, aplicou-se, por 7 min, DAPI

(4, 6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen) para a marcação nuclear. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS por 3 vezes durante 5 min cada, secadas e aplicado o Fluoromaut (DAKO) para inserir a lamínula.

As imagens foram adquiridas por meio de um microscópio de confocal (LM 710, Zeiss, Alemanha) usando uma objetiva de 40x/NA 1,4 para análise qualitativa. A intensidade de imunofluorescência de GFAP e de S100 β no cólon foi mensurada por meio do ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

4.6.5 Expressão protéica de iNOS, S100 β , RAGE e NF κ Bp65

Para avaliar a expressão protéica de iNOS, S100 β , RAGE e NF κ Bp65 nos segmentos intestinais avaliados, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.6.5.1 Extração de proteínas

Os segmentos intestinais (em torno de 30 mg) foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 μ l de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

4.6.5.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*Thermo Scientific*, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu²⁺) para a cuprosa (Cu¹⁺). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 μ l de proteína: 20 μ l de RIPA) e preparado 75 μ L de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 μ l de cada amostra diluída e 200 μ l da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30

min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

4.6.5.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (S100β, NFκB p65, RAGE e β-actina) ou 8% (iNOS e β-actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-S100β (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-7851, 1:100), anti-RAGE (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-5563, 1:100), anti-iNOS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8310, 1:100), anti-NFκB p65 (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-372, 1:200) ou anti-β-actina (Millipore, EP1123Y, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico.

A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.6.6 Expressão Gênica de S100 β , GFAP e iNOS por qPCR.

4.6.6.1 Preparação das amostras

Os fragmentos de jejuno dos animais foram retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados foram adicionados em microtubo com 175 μ L de tampão de lise (Promega, EUA). Em seguida, foram armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

4.6.6.2 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com tampão de lise foram misturadas cinco vezes por inversão. Adicionou-se às amostras 350 μ L de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo. Adicionou-se 200 μ L de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionou-se 600 μ L de solução de lavagem e em seguida os tubos foram centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 μ L de DNase *stop solution* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, inseriu-se tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Adicionou-se 250 μ L de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 μ L de H₂O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA extraído foi armazenado no freezer -70°C.

Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1 μ L de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Concomitante a dosagem em ng/ μ L, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

4.6.6.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High capacity cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA). O volume final de cada amostra foi de 20 μ L: 2 μ L do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 μ L de oligonucleotídeos; 2 μ L de primer; 1 μ L da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em μ L foi dependente da concentração inicial extraída; H₂O de nucleases para completar 20 μ L. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR.

4.6.6.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica de GFAP, S100 β e iNOS foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (CFX96 real time system/c1000touch thermal cycler, BioRAD), utilizando kit de TaqMan PCR master mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as sondas utilizadas e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

Os valores de *Threshold cycle* (C_q ou C_t), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Quadro 1 - Primers e sondas Taqman utilizadas no PCR em tempo real.

GFAP (Proteína glial fibrilar ácida)	
ID assay	Mm01253033_m1
Taqman probe	AGAAAACCGCATCACCATTCTGTA
Amplicon length:	75
S100 β (Fração beta da proteína S100)	
ID assay	Mm00485897_m1
Taqman probe	CTTCCTGGAGGAAATCAAGGAGGAGCAG
Amplicon length:	69
iNOS (Óxido nítrico sintase induzida)	
ID assay	Mm00440502_m1
Taqman probe	GCCTTGTGTCAGCCCTCAGAGTACA
Amplicon length:	66
GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	
ID assay	Mm99999915_g1
Taqman probe	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG
Amplicon length:	109

Fonte: Elaborado pela autora.

4.6.7 Dosagem de nitrito/nitrato

A dosagem de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) foi obtida como um indicador indireto da produção de NO nos segmentos intestinais avaliados (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e foi determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess. Inicialmente, preparou-se um homogenato a 10%, adicionando solução gelada de KCl a 1,15% aos segmentos intestinais previamente pesados. O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. Primeiramente, o NO_3^- dos homogenatos (40 μL) foi convertido em NO_2^- pela incubação, *overnight* em temperatura ambiente, em uma solução (40 μL) contendo nitrato redutase (1U/50 μL , Sigma-Aldrich, EUA), NADPH (5mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA), tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e água ultrapura, respectivamente na seguinte proporção: 1:10:20:19.

Após essa etapa, uma série de diluições da curva-padrão de referência de NO_2^- (200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,12 μM , 1,56 μM , 0,78 μM , 0,39 μM e 0,19 μM) foi preparada. Na etapa seguinte, adicionou-se 80 μL da solução de Griess (constituída por uma parte de 2% de sulfanilamida em H_3PO_4 5%, duas partes de H_3PO_4 5%, uma parte de 0,2% de NEED em água ultrapura e uma parte de água ultrapura) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os níveis teciduais de nitrito/nitrato foram expressos em NO_x ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido).

4.6.8 Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-6)

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 no intestino foram quantificados por ELISA. Os segmentos intestinais coletados foram homogeneizados em PBS. A detecção das citocinas IL-6 e TNF- α foi realizada por meio do *Kit DuoSet* (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-6 ou TNF- α por 18h em temperatura ambiente com 100 μL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200 μL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100 μL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-6 ou TNF- α em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e incubadas com 100 μL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 μL solução de parada (H_2SO_4). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.6.9 Determinação de Glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de GSH nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e colon) foi avaliada utilizando o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As amostras obtidas dos segmentos intestinais

(100mg/mL) foram homogeneizadas em 0,02 M EDTA. Alíquotas de 100 μ L do homogenato foram misturadas com 80 μ L de H₂O destilada e 20 μ L de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa, centrifugou-se o material por 15 min em rotação de 3000 rpm à uma temperatura de 4°C. Em seguida, novas alíquotas de 100 μ L do sobrenadante foram misturadas com 200 μ L de tampão TRIS (0,4 M, pH 8,9) e com 5 μ L de de solução de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA) e agitadas por 3 min. A absorvância foi então determinada a 412 nm contra um reagente branco (sem o homogenato). A concentração de GSH foi expressa em μ g de GSH/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.6.10 Dosagem de malondialdeído (MDA)

O Malondialdeído (MDA) constitui um indicador de peroxidação lipídica, e sua dosagem permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico- TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo. Inicialmente foi preparado um homogenato a 10% do tecido macerado em cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 μ L foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375 μ L de ácido fosfórico (1%) e 125 μ L de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Em seguida, as amostras foram imersas em banho maria por 45 min a 100°C. Decorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 500 μ L de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 μ L da fase superior foi inserida em placa de 96 poços e a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 535nm.

4.7 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste t de Student para comparar dois grupos; o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; para os escores histológicos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn; e para a

variável perda ponderal, optou-se pelo teste two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

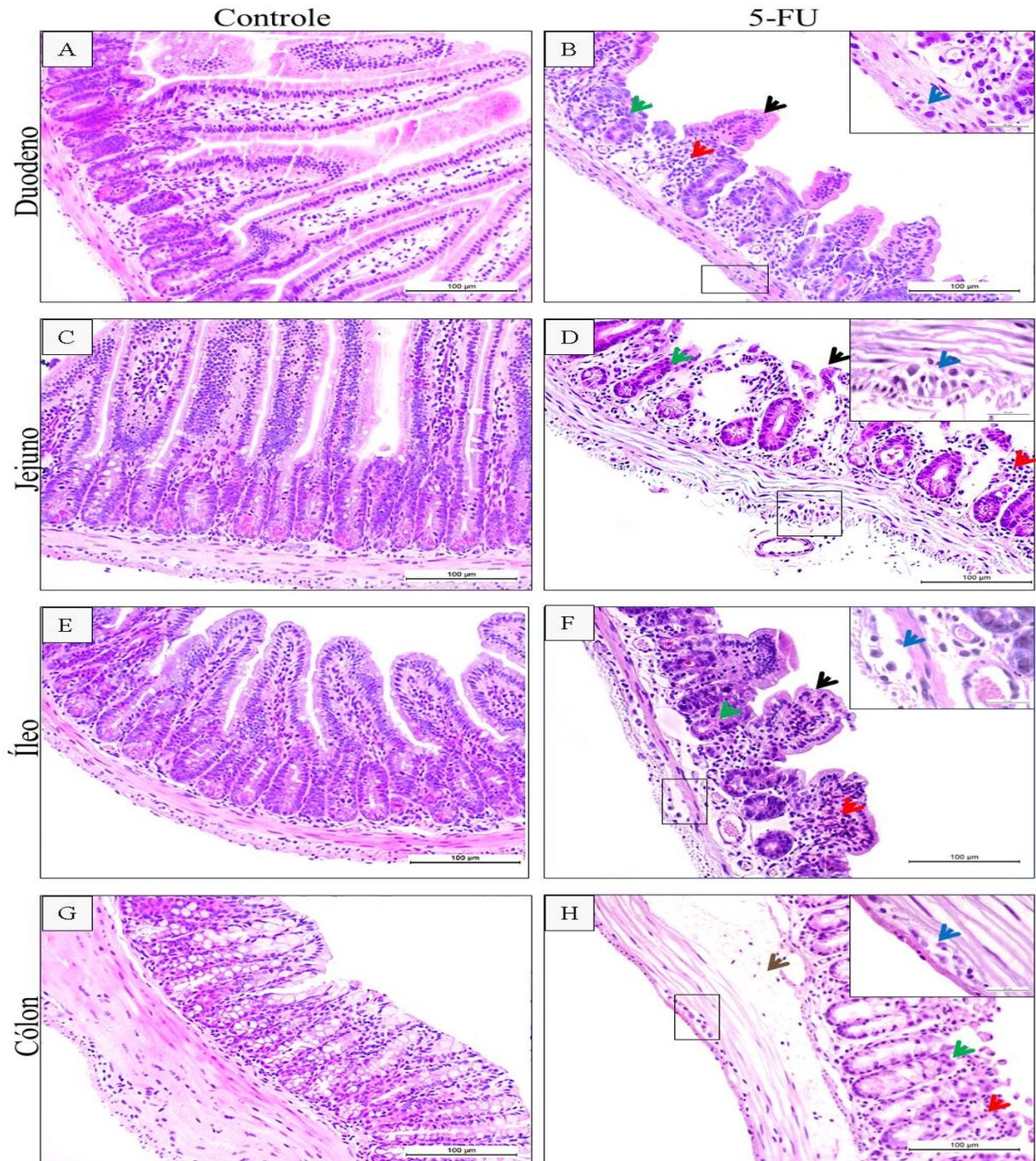
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação das alterações histopatológicas do intestino induzidas pelo tratamento com 5-FU em camundongos Swiss.

A coloração de segmentos intestinais com hematoxilina e eosina propiciou visualizar microscopicamente a arquitetura tecidual e analisar as alterações morfológicas induzidas por 5-FU no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e no cólon.

Em condições normais, conforme demonstrado neste estudo pelo grupo controle, as criptas intestinais e o plexo mioentérico (organizado em gânglios, contendo neurônios e células gliais, localizado entre a camada muscular circular interna e longitudinal externa) do intestino delgado (duodeno, figura 16A; jejuno, figura 16C; íleo, figura 16E) e do cólon (figura 16G) encontram-se preservados, isto é, sem alterações morfológicas. Além disso, os vilos intestinais do intestino delgado, os quais são maiores no duodeno (figura 16A), seguido em comprimento pelo jejuno (figura 16C) e íleo (figura 16C) apresentaram estruturas morfológicas preservadas. Enquanto que a administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciadas pela redução da altura das vilosidades do intestino delgado e do comprimento das criptas intestinais, vacuolização de células da mucosa intestinal e da camada muscular, bem como intenso infiltrado de células inflamatórias. Observou-se ainda hipertrofia do plexo mioentérico com redução do número células neuronais ao longo de todos os segmentos intestinais avaliados (duodeno, figura 16B; jejuno, figura 16D; íleo, figura 16F; cólon, figura 16H). No cólon, além dessas alterações, notou-se a presença de importante edema na camada submucosa (figura 16H).

Figura 16 - Fotomicrografias de amostras do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de camundongos Swiss submetidos à mucosite intestinal induzidas por 5-FU.



Camundongos Swiss ($n=6/\text{grupo}$) receberam salina (Grupo controle, 0,9%, i.p, dose única) ou 5-FU (Grupo 5-FU, 450 mg/Kg, i.p, dose única) e três dias após a administração do quimioterápico os animais foram eutanasiados. Segmentos do duodeno, do jejuno, do íleo e do cólon foram removidos e corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica. Os segmentos intestinais do grupo controle apresentam integridade das criptas, da camada muscular e do plexo mioentérico (painéis A, C, E e G), além de preservação dos vilos no intestino delgado (painéis A, C e E). Enquanto que a administração de 5-FU induz redução da altura das vilosidades (seta preta) e do comprimento das criptas (seta verde), intenso infiltrado de células inflamatórias (seta vermelha) e hipertrofia do gânglio mioentérico (seta azul) (painéis B, D, F e H). No cólon (painel H), 5-FU induz importante edema na camada submucosa (seta marrom). Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μm , exceto as imagens ampliadas (escala de 20 μm) que se encontram a direita dos painéis B, D, F e H.

5.2 Efeito do 5-FU nas células gliais e nos neurônios entéricos do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de camundongos Swiss submetidos à mucosite intestinal.

5.2.1 Avaliação de alterações da imunomarcção de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Com o objetivo de localizar e de avaliar as alterações da expressão de GFAP e de S100 β , realizou-se a técnica de imunohistoquímica nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo).

Em condições normais, conforme se observou no grupo controle (figura 17A, C e E), há pouca expressão de GFAP ao longo do intestino delgado. Comparado a esse grupo, 5-FU aumentou a imunomarcção dessa proteína (figura 17B, D e F).

Ao mensurar a porcentagem da área imunomarcada para GFAP, observou-se que 5-FU induz o aumento significativo da porcentagem da área imunomarcada para GFAP (área GFAP+) no intestino delgado (duodeno: $4,35 \pm 0,38$, figura 18A; jejuno: $4,38 \pm 0,41$, figura 18B; Íleo: $4,05 \pm 0,93$, figura 18C) em comparação com o grupo controle (duodeno: $2,93 \pm 0,25$, figura 18B; jejuno: $3,03 \pm 0,25$, figura 18B; Íleo: $1,92 \pm 0,24$, figura 18C), confirmando, dessa forma, os dados apresentados anteriormente.

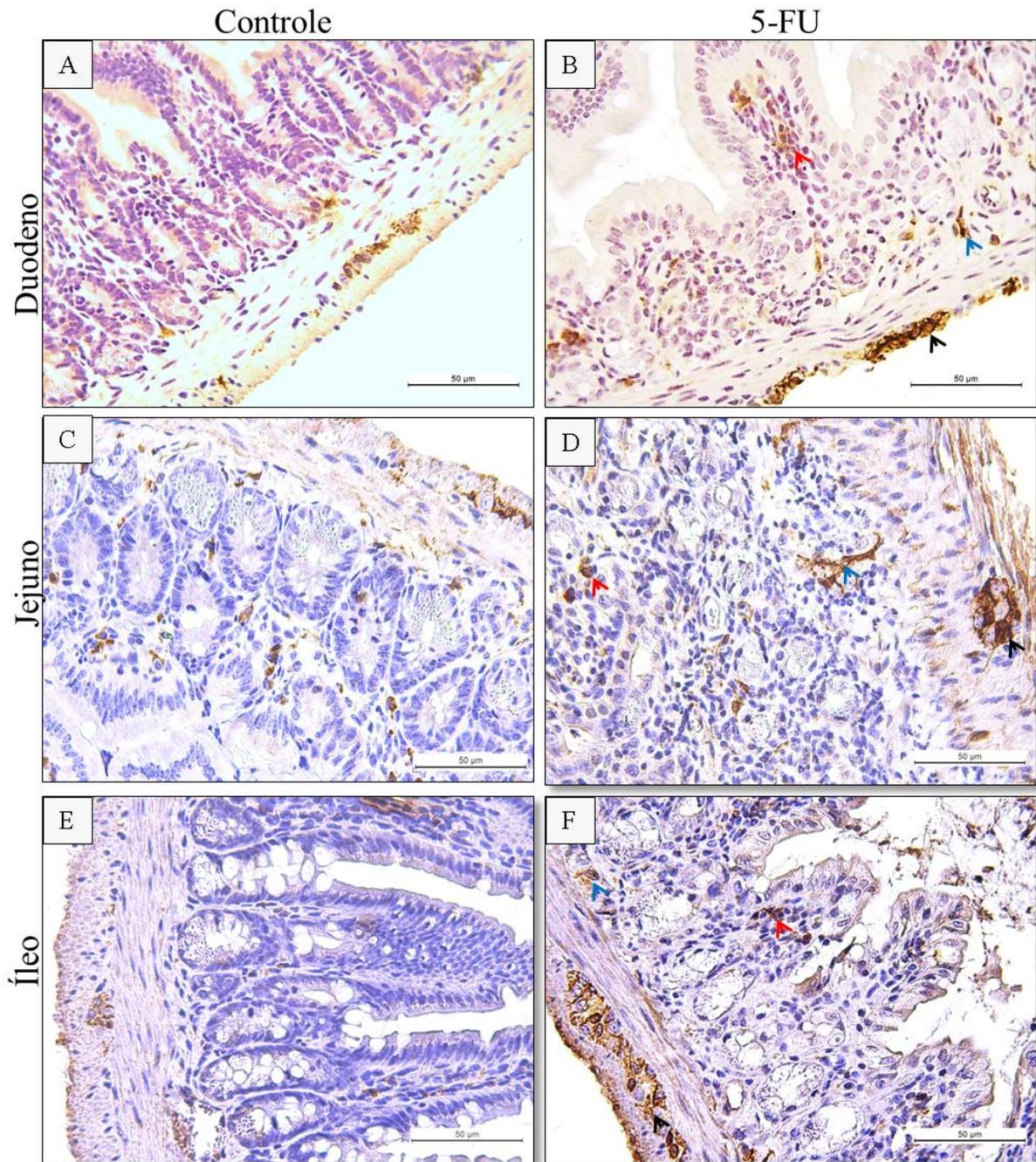
A proteína S100 β , que é considerada um marcador pan-gliial, é expressa em baixa quantidade em condições normais no plexo mucoso, submucoso e mioentérico pela CGE, conforme foi evidenciado no duodeno (figura 19A), no jejuno (figura 19C) e no íleo (figura 19E) do grupo controle. Em relação a este grupo, 5-FU aumentou a imunomarcção dessa proteína no intestino delgado (figura 19: B, D e F).

Para confirmar esses dados, realizou-se a medida da porcentagem da área imunomarcada para S100 β (Área S100 β +). Observou-se que 5-FU (duodeno: $4,15 \pm 0,24$, figura 20A; jejuno: $3,08 \pm 0,34$, figura 20 B; íleo: $3,50 \pm 0,47$, figura 20 C) elevou ($p < 0,05$) a área S100 β + ao longo do intestino delgado quando comparado ao grupo controle (duodeno: $2,62 \pm 0,21$, figura 20 A; jejuno: $0,68 \pm 0,06$, figura 20 B; íleo: $1,73 \pm 0,33$, figura 20C).

Na imunofluorescência de segmentos do cólon, observou-se que ambas S100 β e GFAP encontram-se aumentadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU quando comparado ao grupo controle. A sobreposição das duas marcações demonstrou que as áreas marcadas para GFAP são positivas também para S100 β . Além disso, essa dupla marcação encontra-se aumentada no grupo 5-FU quando comparado ao grupo controle (figura 21).

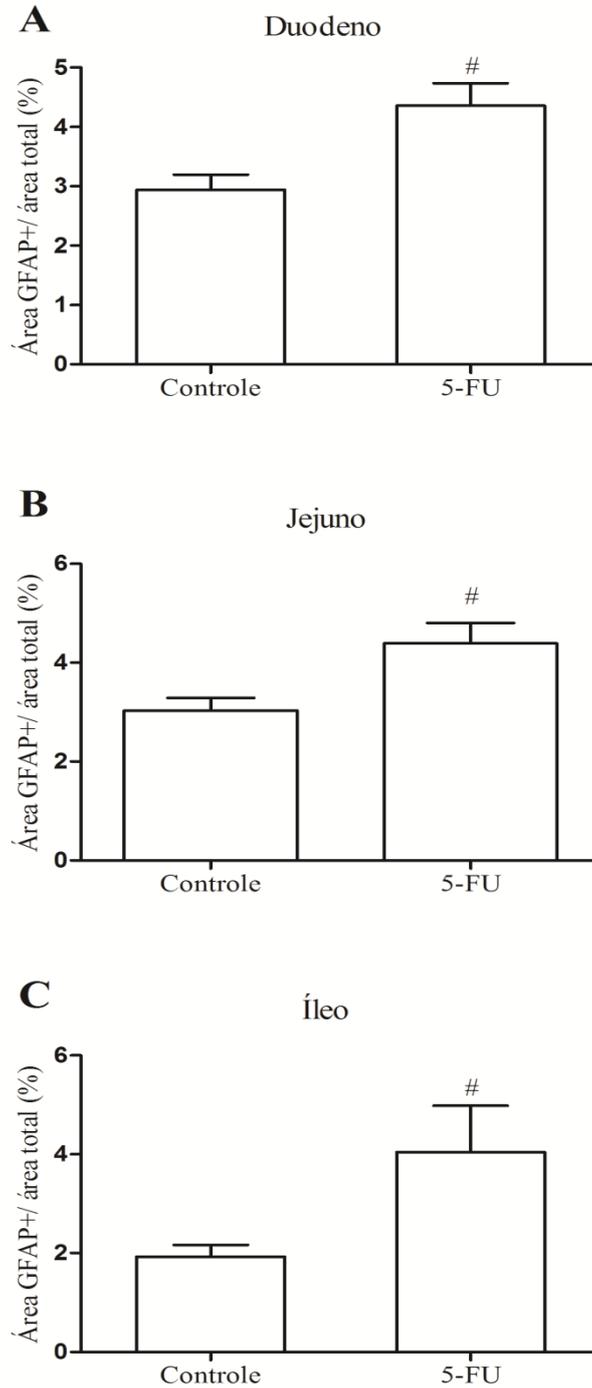
Esses dados demonstraram que 5-FU promove gliose reativa no intestino evidenciado por elevação da imunomarcção de S100 β e GFAP no intestino delgado e no c3lon.

Figura 17 - Imunomarcação de GFAP em amostras de intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



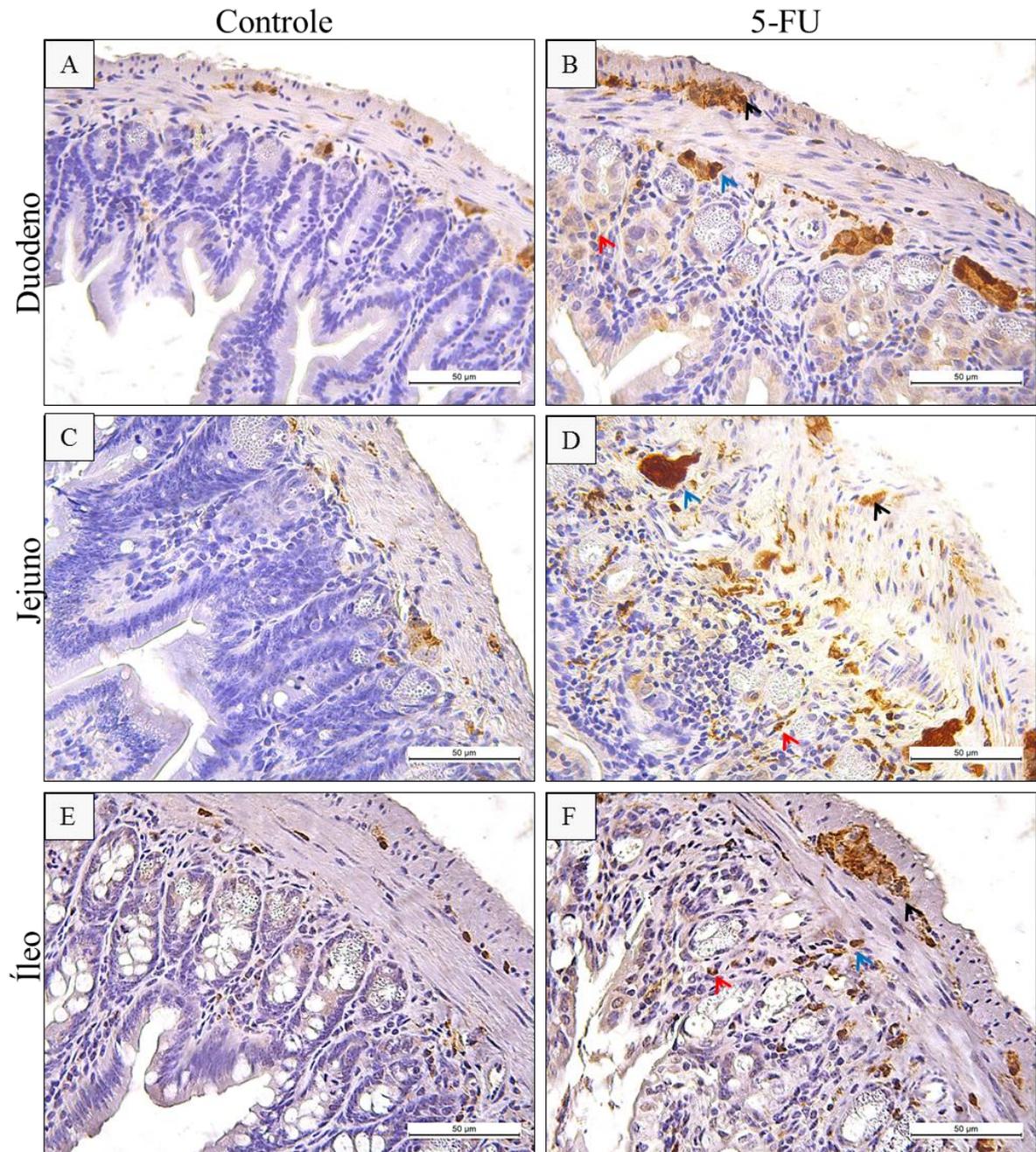
Segmentos do duodeno (painéis A e B), do jejuno (painéis C e D) e do íleo (E e F) foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para GFAP, que é um marcador de células gliais ativadas. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se nos plexos mucoso (seta vermelha), submucoso (seta azul) e no mioentérico (seta preta). Nota-se ainda aumento da imunomarcação para GFAP nos segmentos do intestino delgado de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis B, D e F) quando comparado aos controles (painéis A, C e E). Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm.

Figura 18 - 5-FU aumenta a área imunomarcada para GFAP no intestino delgado.

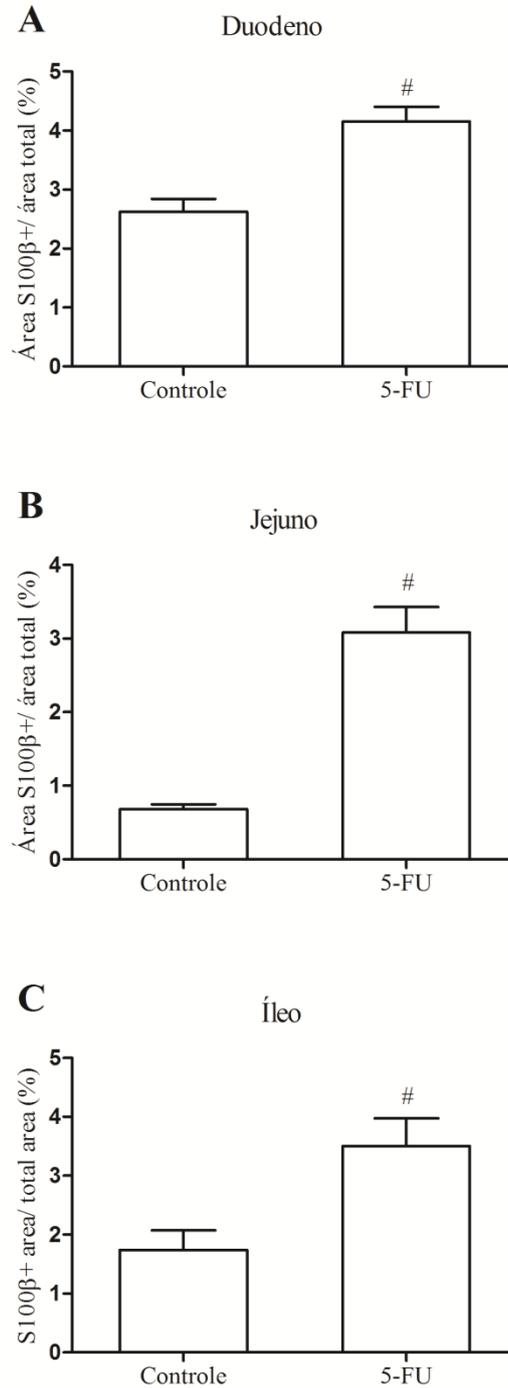


Segmentos do duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para GFAP. Foram fotografados de 7 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU aumenta a porcentagem da área imunomarcada para GFAP no duodeno (A), no jejuno (B) e no íleo (C) quando comparado ao controle. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para GFAP. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle.

Figura 19 - Imunomarcação de S100  em amostras de intestino delgado de camundongos submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU.

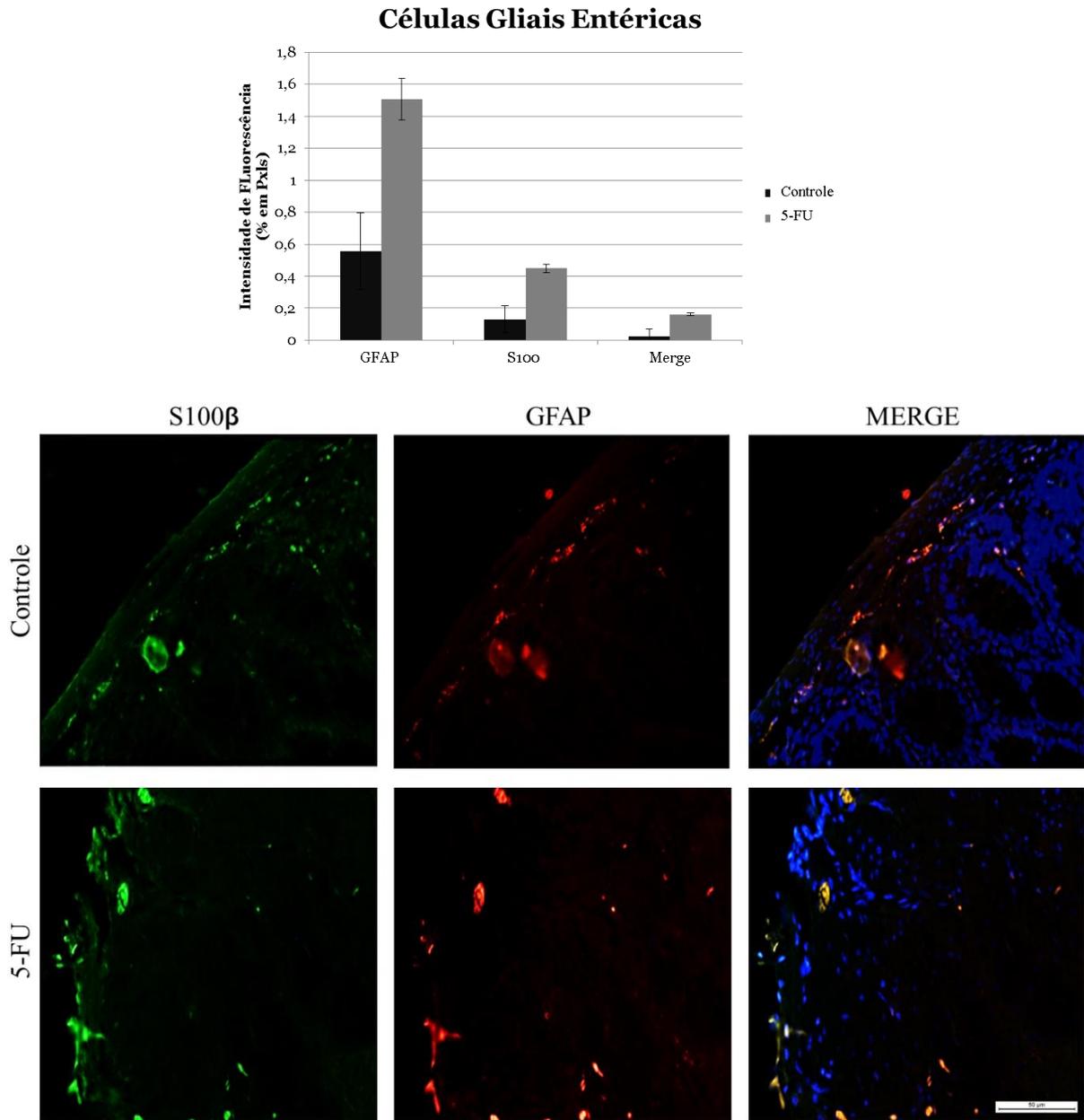


Segmentos do duodeno (painéis A e B), do jejuno (painéis C e D) e do  leo (E e F) foram coletados e processados para a realiza o de imunohistoquímica para S100 , que   um marcador pan-gliial. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se nos plexos mucoso (seta vermelha), submucoso (seta azul) e mioentérico (seta preta). Nota-se ainda aumento da imunomarca o para S100  nos segmentos do intestino delgado de animais submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis B, D e F) quando comparado ao grupo controle (painéis A, C e E). Todos os painéis foram obtidos na escala de 50  m.

Figura 20 - 5-FU aumenta a área imunomarcada para S100 β no intestino delgado.

Segmentos do duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para S100 β . Foram fotografados de 7 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU aumenta a porcentagem da área imunomarcada para S100 β no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para S100 β . Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle.

Figura 21 - Imunofluorescência representativa da dupla marcação de S100 β e GFAP no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



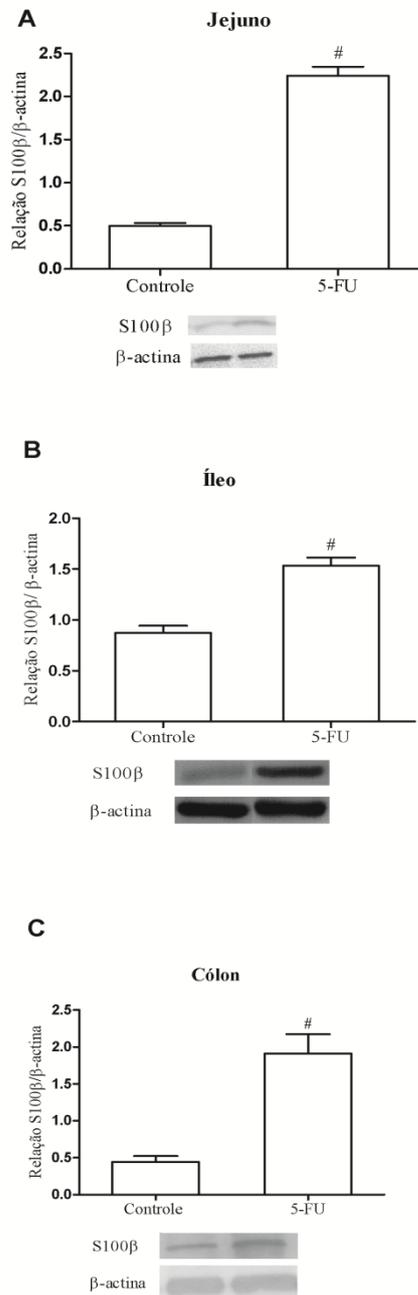
Segmentos do cólon foram coletados e processados para a realização de imunofluorescência para S100 β (verde), marcador pan-glial, e GFAP (vermelho), marcador de CGE ativada. Observa-se que há aumento da imunomarcção de S100 β e de GFAP, bem como da sobreposição dessas proteínas (MERGE, amarelo) em animais tratados com 5-FU quando comparado ao controle. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

5.2.2 Efeito do 5-FU na expressão proteica de S100 β no intestino delgado (jejuno e íleo) e no cólon.

A expressão proteica de S100 β foi mensurada por Western Blotting. No intestino, essa proteína é secretada exclusivamente pelas CGEs.

De acordo com a figura 22, sob condições normais (grupo controle) há pouca expressão proteica de S100 β no jejuno, no íleo e no cólon de camundongos (jejuno, $0,49 \pm 0,035$; íleo, $0,87 \pm 0,071$; cólon, $0,44 \pm 0,08$). Comparado a este grupo, 5-FU eleva a expressão proteica ($p < 0,05$) de S100 β em todos os segmentos intestinais avaliados (jejuno, $2,24 \pm 0,10$; íleo, $1,53 \pm 0,07$; cólon, $1,91 \pm 0,26$).

Figura 22 - 5-FU aumenta a expressão proteica de S100 β no jejuno, no íleo e no cólon de camundongos.



Segmentos do jejuno (A), do íleo (B) e do cólon (C) foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar a expressão proteica de S100 β . Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de S100 β em todos os segmentos intestinais avaliados quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de S100 β que resultou da relação da densidade de S100 β e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle.

5.2.3 Avaliação de alterações da imunomarcção de HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

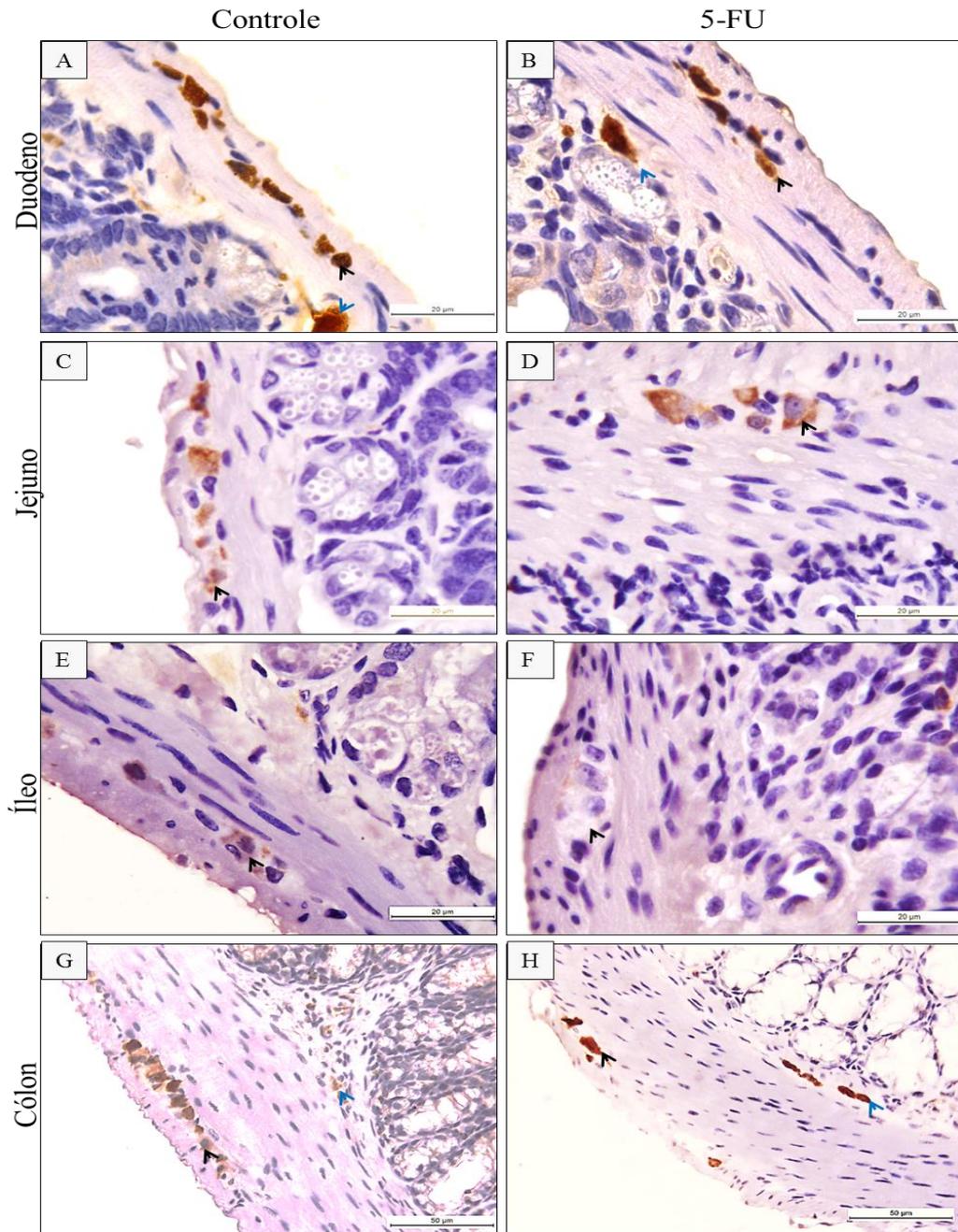
O marcador pan-neuronal HuC/D é utilizado para identificar neurônios do sistema nervoso entérico. Essa proteína neuronal pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo dessas células.

Conforme observado na figura 23, em condições basais (grupo controle), os neurônios entéricos encontram-se organizados em gânglios localizados no plexo submucoso e mioentérico do intestino delgado (figura 23A, C e E) e do cólon (figura 23G). Comparado ao grupo controle, 5-FU reduziu a imunomarcção de HuC/D no intestino delgado (figura 23B, D e F) e no cólon (figura 23H). Ao observar a localização da proteína HuC/D nos neurônios entéricos, visualizou-se que na maioria dos neurônios do grupo controle a localização da proteína HuC/D foi predominantemente citoplasmática, ao passo que nos neurônios entéricos de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU, diferente do que foi observado no grupo controle, foi prevalentemente nuclear.

Em conformidade com esses dados qualitativos, 5-FU diminuiu a porcentagem da área imunomarcada para HuC/D em todos os segmentos intestinais avaliados neste estudo (duodeno: $3,26 \pm 0,17$, figura 24A; jejuno: $1,05 \pm 0,11$, figura 24B; íleo: $0,42 \pm 0,11$ figura 24C; cólon, $0,78 \pm 0,09$ figura 24D) em relação ao grupo controle (duodeno: $4,71 \pm 0,56$, figura 24A; jejuno: $1,76 \pm 0,27$, figura 24B; íleo: $1,33 \pm 0,14$, figura 24C; cólon, $1,26 \pm 0,13$, figura 24D).

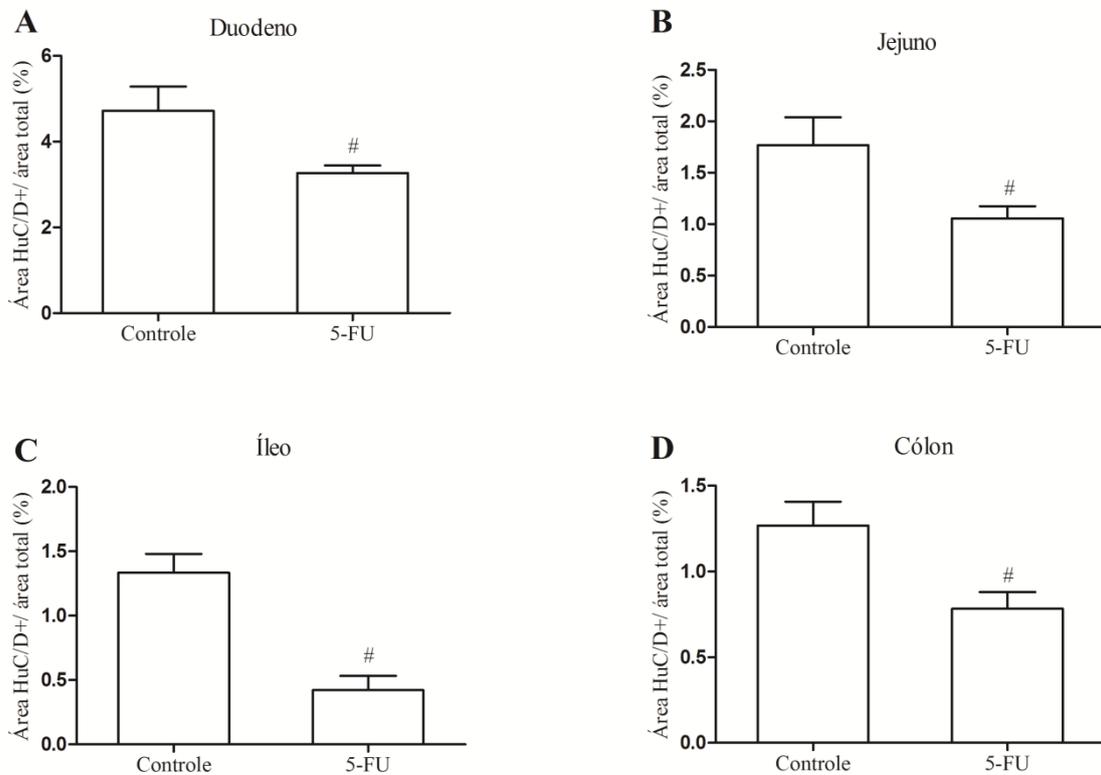
Esses dados sugerem que 5-FU reduz o número de neurônios do intestino delgado e do cólon.

Figura 23 - Imunomarcção de HuC/D em amostras de intestino delgado e do cólon camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (painéis A e B), do jejuno (painéis C e D), do íleo (painéis E e F) e do cólon (painéis G e H) foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para HuC/D, que é um marcador pan-neuronal. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se nos plexos submucoso (seta azul) e no mioentérico (seta preta). Nota-se ainda redução da imunomarcção para HuC/D nos segmentos do intestino de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis B, D, F e H) quando comparado aos controles (painéis A, C, E e G). Todos os painéis foram obtidos na escala de 20 µm, exceto os referentes ao cólon (escala de 50 µm).

Figura 24 - 5-FU reduz a área imunomarcada para HuC/D no intestino delgado e no cólon.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para HuC/D. Foram fotografados de 5 a 6 campos/corte histológico (intestino delgado: escala de 20 μ m; cólon: escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU diminui a porcentagem da área imunomarcada para HuC/D no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para HuC/D. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle.

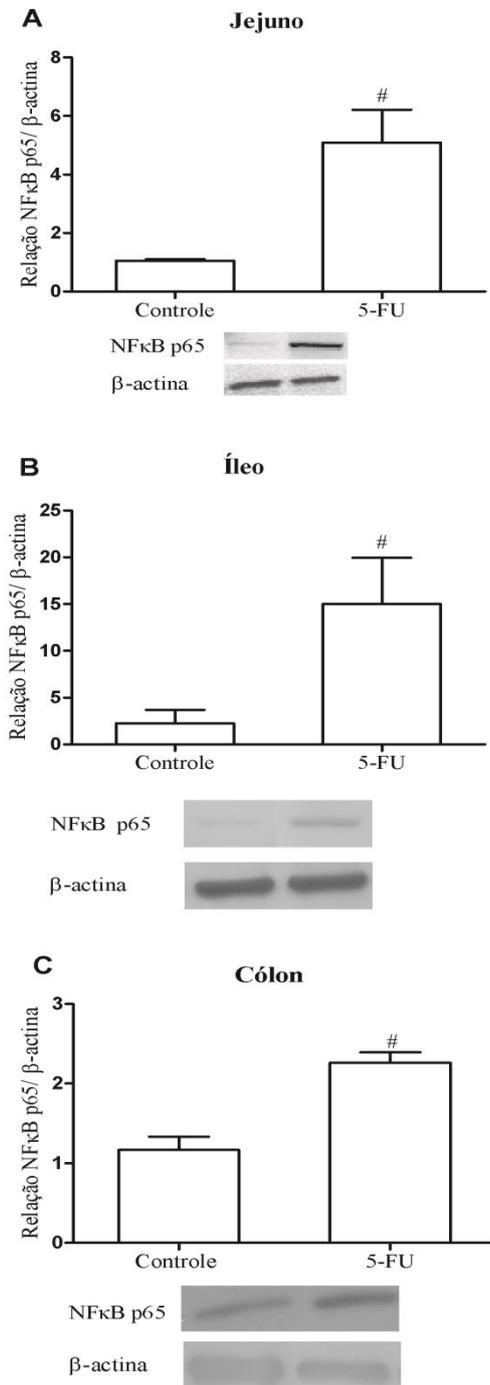
5.3 Efeito do 5-FU na expressão proteica de NFκB p65 no intestino delgado (jejuno e íleo) e no cólon.

No SNC é bem estabelecido que a proteína S100β liga-se ao receptor RAGE e promove a ativação de NFκB com consequente translocação desse fator de transcrição para o núcleo. NFκB p65 é uma das frações responsáveis no núcleo pela transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, de quimiocinas e de moléculas de adesão. Dessa forma, foi avaliada a expressão proteica de NFκB p65 por Western Blotting no intestino delgado (jejuno e íleo) e no cólon.

Em condições normais, NFκB p65 é pouco expresso no intestino conforme observado no grupo controle (jejuno: $1,05 \pm 0,04$; íleo: $2,25 \pm 1,44$; cólon, $1,16 \pm 0,09$). Enquanto que 5-FU aumentou a expressão proteica de NFκB p65 em todos os segmentos intestinais avaliados (jejuno: $5,09 \pm 1,12$; íleo: $15 \pm 4,95$; cólon, $2,26 \pm 0,07$) (figura 25).

Portanto, na mucosite intestinal induzida por 5-FU há aumento da expressão proteica de NFκB p65.

Figura 25 - 5-FU aumenta a expressão proteica de NFκB p65 no jejuno, no íleo e no cólon de camundongos.



Segmentos do jejuno (A) do íleo (B) e do cólon (C) foram coletados e processados para realizar Western Blotting para mensurar a expressão proteica de NFκB p65. Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de NFκB p65 de todos os segmentos intestinais avaliados quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média ± EPM da expressão proteica de NFκB p65 que resultou da relação da densidade de NFκB p65 e de β-actina. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle.

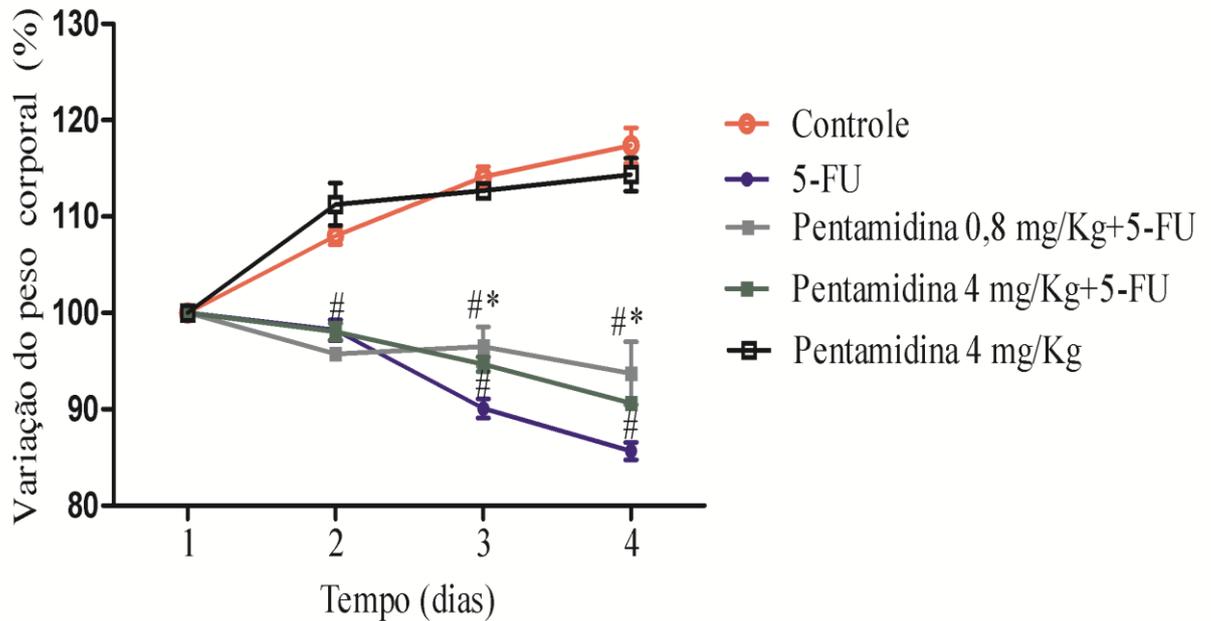
5.4 Avaliação da participação da via S100 β /RAGE/NF κ B na mucosite intestinal e as alterações das células gliais e dos neurônios entéricos induzidas por 5-FU.

5.4.1 Efeito da inibição de S100 β na perda ponderal induzida por 5-FU.

Na clínica, pacientes em uso de 5-FU apresentam perda de peso. Desse modo, a perda de peso é um dos parâmetros avaliados para confirmar o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Dessa forma, conforme observado na figura 26, 5-FU promoveu uma significativa perda ponderal a partir do segundo dia após a administração desse quimioterápico em relação ao grupo controle. Enquanto que a inibição de S100 β com pentamidina, apenas na dose de 0,8 mg/Kg, reduziu ($p < 0,05$) parcialmente a perda ponderal de animais submetidos a mucosite intestinal. O grupo tratado apenas com o inibidor de S100 β não apresentou diferença estatística com o grupo controle.

Figura 26 - Inibição de S100 β reduz parcialmente a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Camundongos Swiss (n=6) receberam salina (Grupo controle, 0,9%, i.p.) ou 5-FU (Grupo 5-FU, 450 mg/Kg, i.p. dose única). Após 24h da administração do quimioterápico, administrou-se pentamidina, inibidor de S100 β (Grupo P0,8+5FU, 0,8mg/Kg; Grupo P4+5FU, 4 mg/Kg; Grupo P4, 4mg/Kg, i.p.) durante dois dias e os animais foram eutanasiados no quarto dia do protocolo experimental. Os animais foram pesados diariamente até o quarto dia do protocolo experimental. A indução da mucosite intestinal por 5-FU induziu perda de peso em todos os grupos tratados com o quimioterápico quando comparado ao grupo controle. Enquanto que a inibição de S100 β com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg reduziu parcialmente essa perda de peso induzida por 5-FU. Os pontos representam a média \pm EPM do percentual de variação do peso inicial. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.2 Efeito da inibição de S100 β nas alterações histopatológicas induzidas por 5-FU.

Sob condições fisiológicas, o intestino delgado e o cólon se caracterizam por apresentar escasso infiltrado de células inflamatórias e integridade do seu epitélio de revestimento, do plexo mioentérico e das criptas. Estas características foram representadas pelo grupo controle deste estudo (figura 27A, B, C e D). Ao passo que 5-FU induziu redução da altura das vilosidades, perda da integridade da barreira epitelial intestinal caracterizada por descontinuidade desse tecido, bem como promoveu vacuolização de células epiteliais e intenso infiltrado de células inflamatórias que se estendeu da camada mucosa a serosa (figura 27E, F, G e H). Por outro lado, a inibição de S100 β com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (figura 27I, J, K e L) e na de 4 mg/Kg (figura 27M, N, O e P) em animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU diminuiu essas alterações histopatológicas. Os aspectos histológicos do grupo que recebeu apenas o inibidor de S100 β (figura 27Q, R, S e T) foram semelhantes ao do grupo controle.

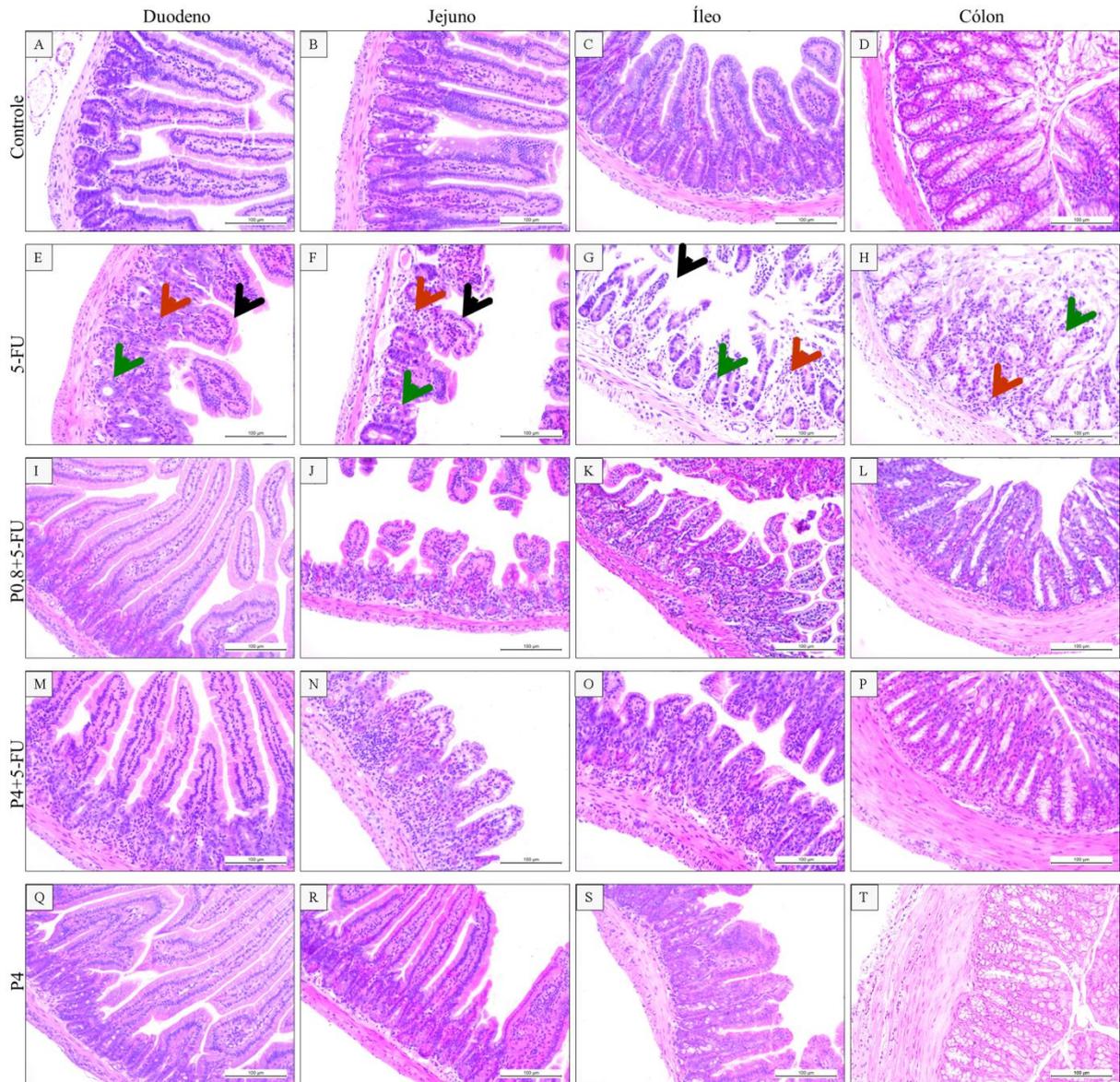
Os escores histopatológicos, apresentados na tabela 1, demonstraram que 5-FU aumentou ($p < 0,05$) esses escores no intestino delgado e no cólon, atingindo o grau máximo apenas no jejuno e no cólon em relação ao controle. Entretanto, a inibição de S100 β , em animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU, reduziu ($p < 0,05$) os escores histopatológicos no duodeno (nas duas doses de pentamidina) e no jejuno (apenas na dose de 4 mg/Kg). Enquanto que o grupo o qual recebeu apenas pentamidina não apresentou diferença estatística com o grupo controle.

Ao mensurar a altura das vilosidades e o comprimento das criptas no intestino delgado, observou-se que 5-FU promoveu redução estatisticamente significativa da altura das vilosidades e da profundidade das criptas quando comparado ao grupo controle. Ao passo que a inibição de S100 β na mucosite intestinal induzida por 5-FU aumentou ($p < 0,05$) a altura das vilosidades no duodeno, quando utilizado pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg, e em todos os segmentos do intestino delgado na dose de 4 mg/Kg quando comparado ao grupo que recebeu apenas 5-FU. Em relação à profundidade das criptas, a inibição de S100 β com pentamidina elevou apenas no duodeno (na dose de 0,8 mg/Kg) e no íleo (na dose de 4 mg/Kg). Porém a administração apenas do inibidor de S100 β não apresentou diferença estatística com o grupo controle, exceto na profundidade das criptas do jejuno que houve aumento quando comparado com o grupo controle (figura 28).

Dessa forma, esses dados em conjunto com os achados da perda de peso confirmam a indução da mucosite intestinal por 5-FU e demonstram que o grupo que recebeu

pentamidina, administrada de forma isolada, comportou-se de forma semelhante ao grupo controle, sendo a mesma omitida dos demais parâmetros que foram avaliados nas etapas subsequentes. Adicionalmente, evidenciou-se que S100 β tem importante participação nas alterações histopatológicas induzidas por 5-FU.

Figura 27 - Efeito do inibidor de S100 β nas alterações histopatológicas do intestino delgado e do cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



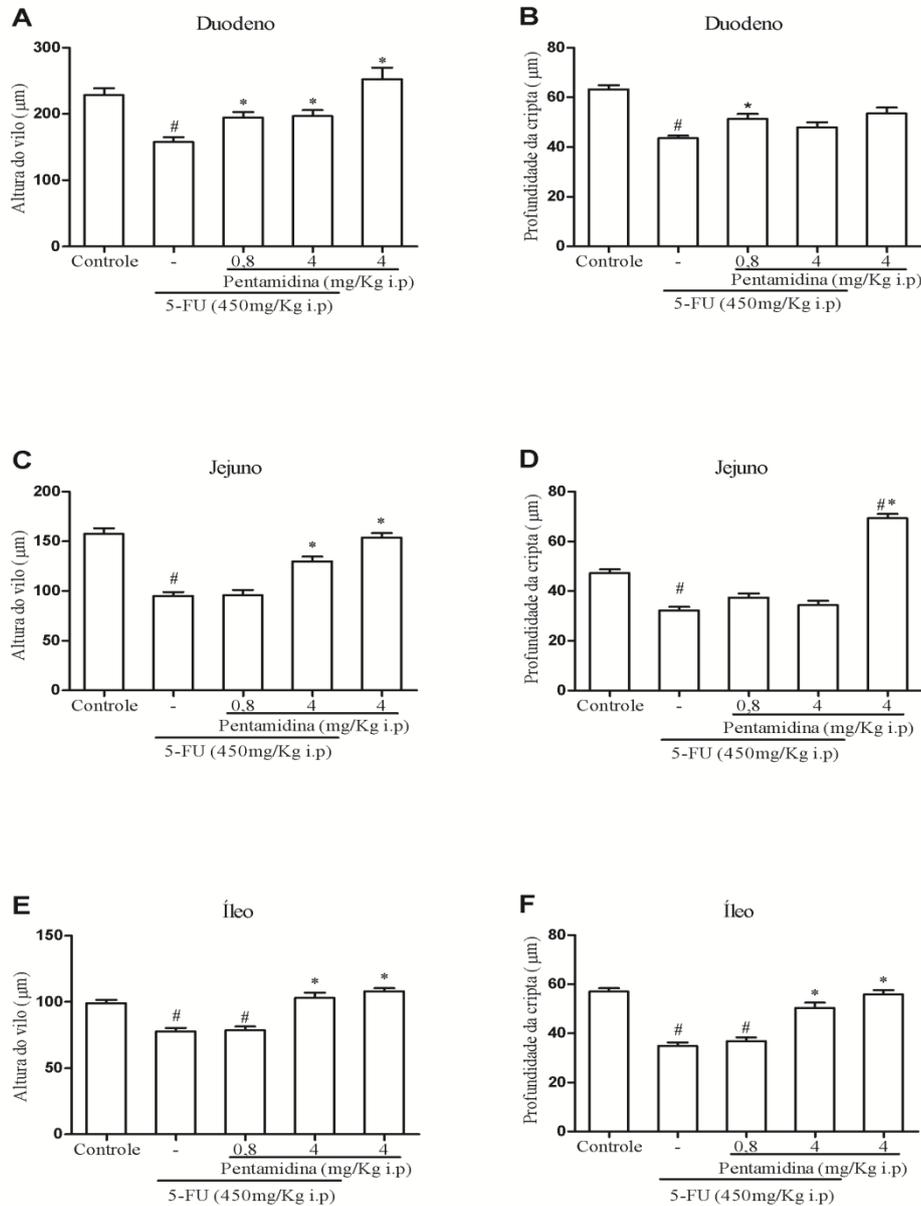
Segmentos do duodeno, do jejuno, do íleo e do cólon foram removidos e corados pelo método de H&E para análise histopatológica. O duodeno (painel A), o jejuno (painel B), o íleo (painel C) e o cólon (painel D) do grupo controle apresenta integridade das vilosidades, das criptas e do plexo mioentérico. Enquanto que a administração de 5-FU promove redução das vilosidades (seta preta) e das criptas (seta verde) e induz intenso infiltrado de células inflamatórias (seta vermelha) (painéis E, F, G, e H). A inibição de S100 β em camundongos tratados com 5-FU reduziu parcialmente essas alterações nas doses de 0,8 mg/Kg (painéis I, J, K e L) e 4 mg/Kg (painéis M, N, O e P). Os aspectos histológicos do grupo que recebeu apenas o inibidor de S100 β são equivalentes ao grupo controle (painéis Q, R, S e T). Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μ m.

Tabela 1 - Efeito do inibidor de S100 β no escore histopatológico de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Segmentos do intestino	Grupos experimentais				
	Controle	5-FU	5-FU+P0,8	5-FU+P4	P4
Duodeno	0 (0-0)	2 (2-2)#	0 (0-1)#*	0 (0-1)*	0 (0-0)*
Jejuno	0 (0-0)	3 (3-3)#	2 (0-2)#	1 (0-2)*	1 (0-1)*
Íleo	0 (0-0)	2,5 (2-3)#	1 (1-2)	1,5 (1-2)	0 (0-1)*
Cólon	0 (0-0)	3 (3-3)#	2 (0-2)	1 (1-2)	0 (0-1)*

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU (n=6/grupo).

Figura 28 - Inibição de S100 β aumenta o comprimento das vilosidades e da profundidade das criptas no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno, do jejuno, do íleo e do cólon foram removidos e corados com H&E para mensurar o comprimento das vilosidades e da profundidade das criptas. Cerca de 10 vilosidades e de 10 criptas intestinais foram analisadas de cada corte histológico. Em relação ao controle, observa-se que 5-FU reduziu o comprimento dos vilos (A, C e E) e profundidade das criptas (B, D e F) do intestino delgado. Quando comparado ao grupo 5-FU, a inibição de S100 β com pentamidina na dose de 4 mg/Kg foi capaz de reverter os efeitos do 5-FU nas vilosidades do intestino delgado (A, C e E), porém nas criptas foi apenas no íleo. Em relação ao controle, o grupo tratado apenas com o inibidor de S100 β não apresentou nenhum efeito isolado nas vilosidades intestinais, porém nas criptas do jejuno exibiu aumento de sua profundidade. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da altura das vilosidades (A) ou do comprimento das criptas intestinais (B) em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.3 Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção de marcadores de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Uma das características da gliose reativa são o aumento da expressão de GFAP e de S100 β .

Em condições fisiológicas, conforme representado pelo grupo controle (figura 29A, B, C e D), há células que expressam GFAP no plexo mucoso, submucoso e mioentérico do intestino delgado e do cólon. Comparado ao grupo controle, observou-se que 5-FU acentuou a imunomarcção de GFAP, principalmente no plexo mioentérico do intestino delgado e do cólon (figura 29E, F, G e H). Ao passo que a inibição de S100 β com pentamidina reduziu essa imunomarcção nas doses de 0,8 mg/Kg (figura 29I, J, K e L) e 4 mg/Kg (figura 29M, N, O e P).

Em conformidade com esses dados qualitativos, a determinação da porcentagem da área imunomarcada para GFAP (Área GFAP+), conforme observado na figura 30, demonstrou que 5-FU (duodeno: $4,31 \pm 0,37$; jejuno: $4,78 \pm 0,25$; íleo: $4,87 \pm 0,99$) foi capaz de elevar ($p < 0,05$) a área GFAP+ ($p < 0,05$) ao longo do intestino delgado quando comparado ao grupo controle (duodeno: $2,93 \pm 0,25$; jejuno: $3,03 \pm 0,25$; íleo: $1,92 \pm 0,24$). Por outro lado, a inibição de S100 β com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (duodeno: $3,55 \pm 0,23$; jejuno: $2,75 \pm 1,06$; íleo: $3,47 \pm 0,2$) e 4 mg/Kg (duodeno: $3,17 \pm 0,19$; jejuno: $2,4 \pm 0,35$; íleo: $1,85 \pm 0,17$) diminuiu significativamente a porcentagem da área imunomarcada para GFAP no intestino delgado.

Para verificar se macrófagos marcados com Iba-1 (Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1), que é um marcador de macrófagos ativados, estavam localizados próximos as células gliais marcadas para GFAP, realizou-se a imunofluorescência com dupla marcação para essas duas proteínas. 5-FU aumentou a imunomarcção de ambas em comparação com o grupo controle no jejuno. Porém, a inibição de S100 β reduziu a imunomarcção tecidual de Iba-1 e de GFAP no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU (figura 31). Conforme evidenciado pela figura 31, os macrófagos ativados no jejuno, na mucosite induzida por 5-FU, estão localizados próximos às células gliais entéricas ativadas, isto é, marcadas para GFAP.

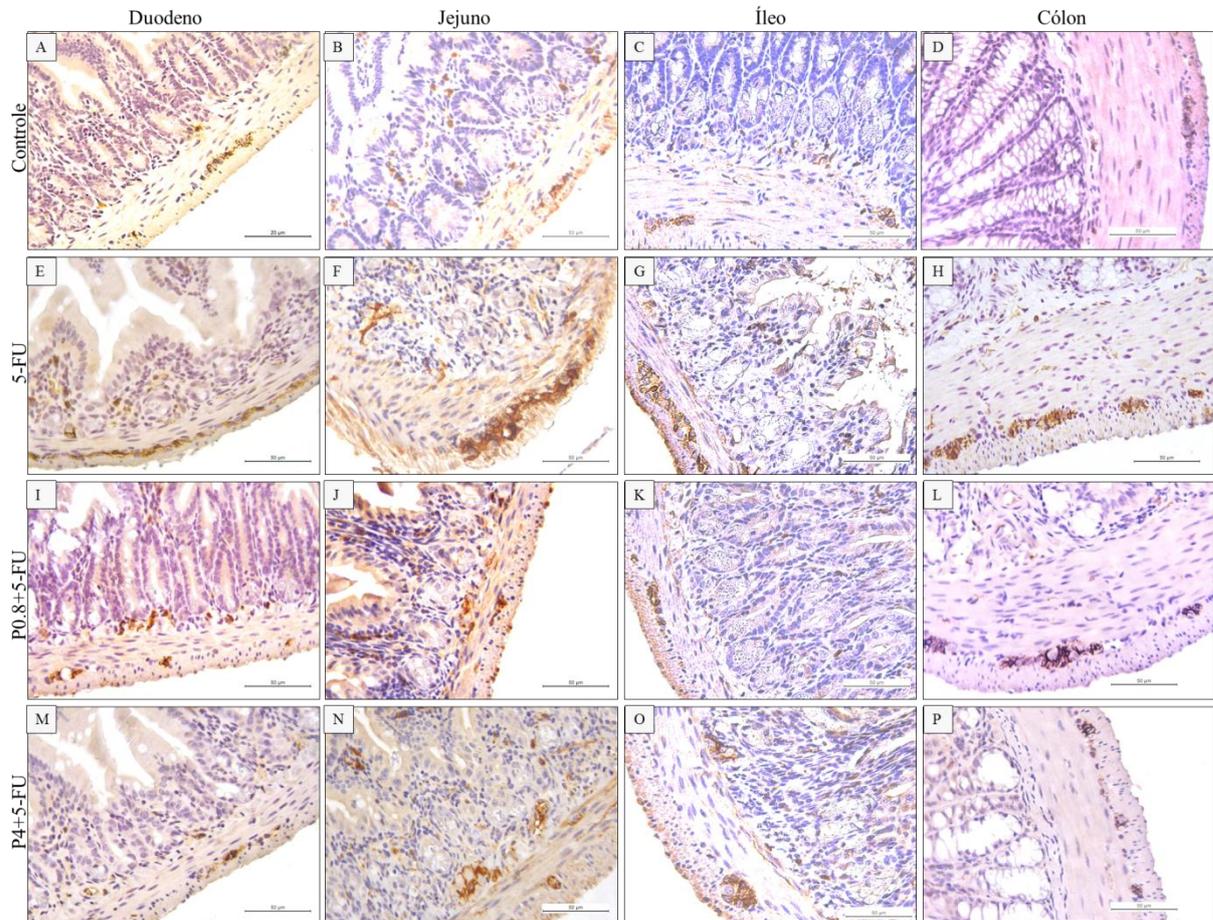
Outro marcador de CGE é a proteína S100 β , a qual apresenta localização citoplasmática. Conforme observado na figura 32, a localização dessa proteína no intestino delgado assemelha-se ao que foi observado na imunomarcção de GFAP (figura 30). De

forma similar ao que foi observado em GFAP, 5-FU (figura 32E-H) aumentou a imunomarcção de S100 β no intestino delgado quando comparada ao grupo controle (figura 32A-D). O aumento da imunomarcção de S100 β induzida por 5-FU foi evidenciado no plexo mucoso, submucoso e mioentérico. Entretanto, a inibição de S100 β nos animais tratados com 5-FU reduziu a imunomarcção de S100 β no intestino delgado e no cólon (figura 32I-P).

A determinação da porcentagem da área marcada para S100 β (Área S100 β +), conforme observado na figura 33, demonstrou que 5-FU (duodeno: $4,9 \pm 0,3$; jejuno: $3,32 \pm 0,34$; íleo: $3,5 \pm 0,47$) foi capaz de elevar a área S100 β + ($p < 0,05$) ao longo do intestino delgado quando comparado ao grupo controle (duodeno: $2,5 \pm 0,18$; jejuno: $0,68 \pm 0,06$; íleo: $1,73 \pm 0,33$). Ao passo que a inibição de S100 β com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (duodeno: $3,75 \pm 0,22$; jejuno: $1,99 \pm 0,21$; íleo: $1,05 \pm 0,12$) e 4 mg/Kg (duodeno: $3,44 \pm 0,39$; jejuno: $1,72 \pm 0,14$; íleo: $1,08 \pm 0,12$) diminuiu significativamente a porcentagem da área imunomarcada para S100 β no intestino delgado.

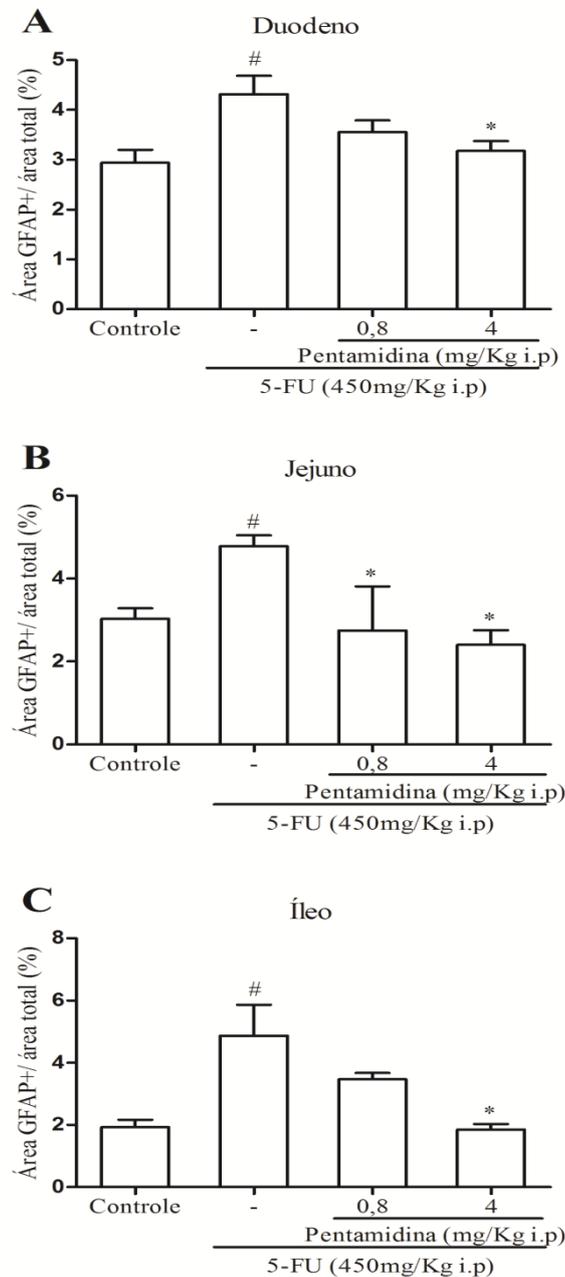
Esses dados sugerem que a inibição de S100 β reduz a gliose reativa em CGEs na mucosite intestinal induzida por 5-FU evidenciada pela redução da imunomarcção de S100 β e de GFAP.

Figura 29 - Inibição de S100 β reduz a imunomarcação de GFAP no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU.



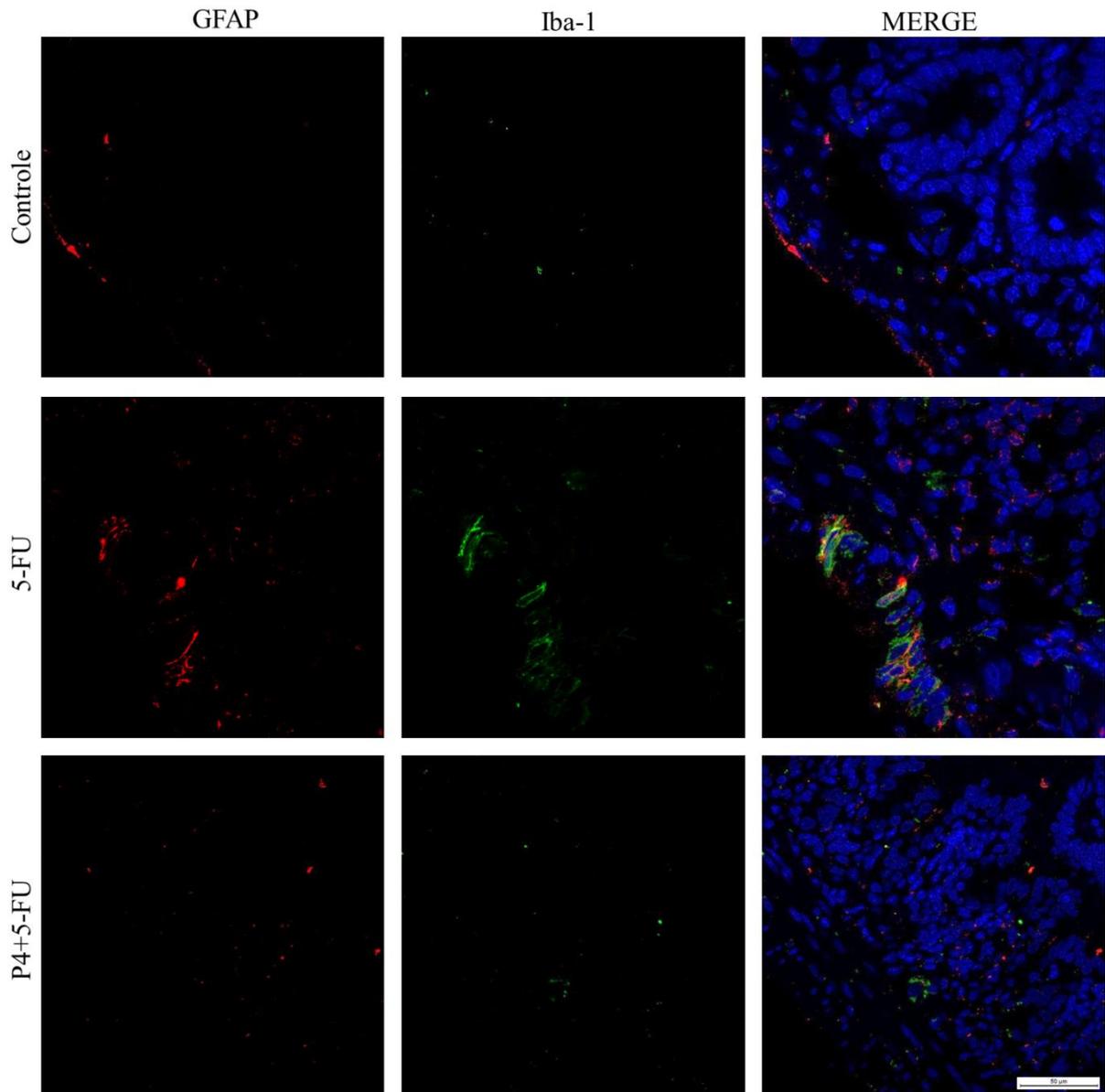
Segmentos do duodeno, do jejuno, do óleo e do cólon foram removidos e processados para a realiza o de imunohistoquímica para GFAP, que   um marcador de gliose reativa. Nota-se aumento da imunomarca o para GFAP nos segmentos do intestino delgado e do cólon de animais submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis E, F, G e H) quando comparado aos controles (painéis A, B, C e D). Enquanto que a inibi o de S100 β em animais submetidos   mucosite intestinal por 5-FU com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (painéis I, J, K e L) e de 4 mg/Kg (painéis M, N, O e P) reduziu a imunomarca o dessa proteína quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 30 - Inibição de S100 β reduz a porcentagem da área imunomarcada para GFAP no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



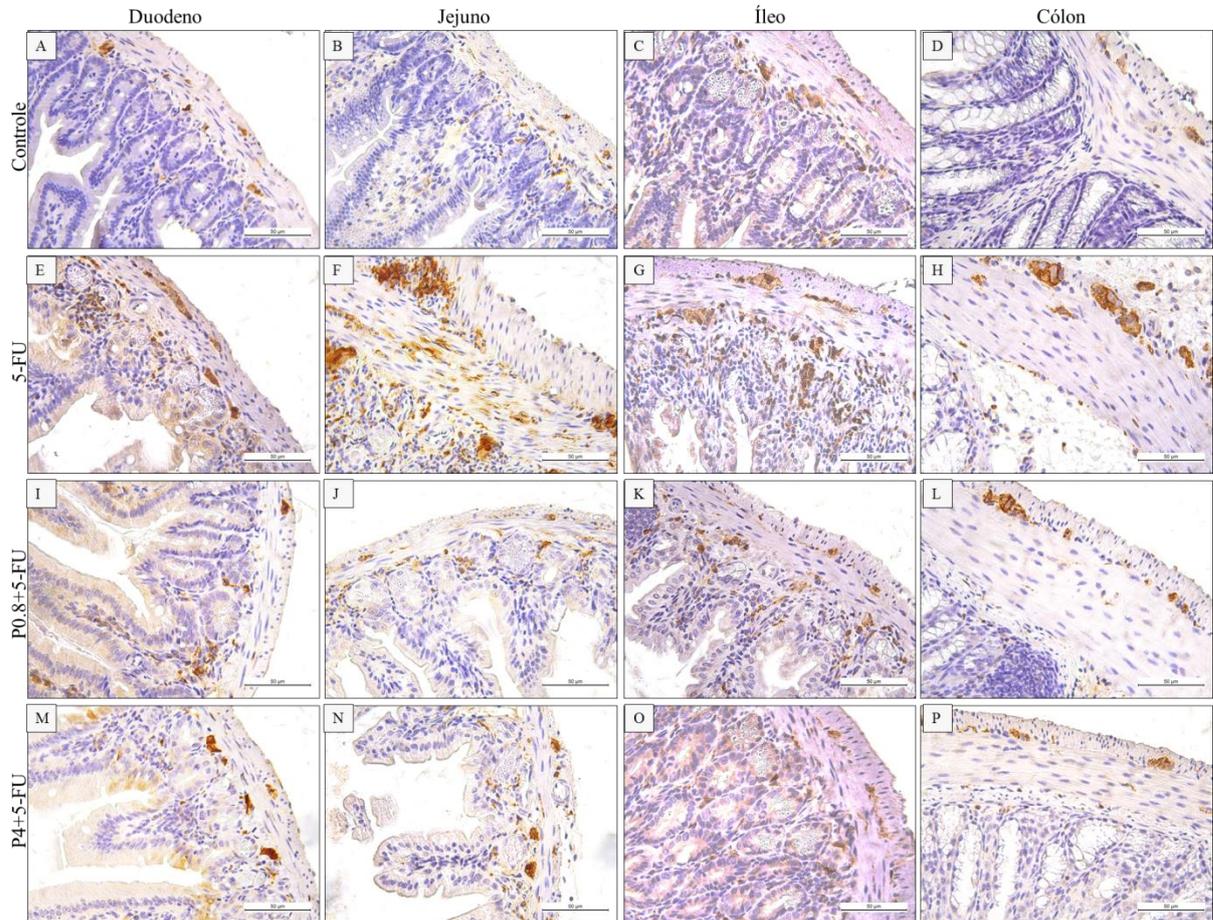
Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B) e do íleo (C) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para GFAP. Foram fotografados de 7 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU aumenta a porcentagem da área imunomarcada para GFAP no duodeno (A), no jejuno (B) e no íleo (C) quando comparado ao controle. A inibição de S100 β nesses animais reduz essa imunomarcção no duodeno (A), no jejuno (B) e no íleo (C). Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para GFAP. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 31 - Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de GFAP e Iba-1 no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



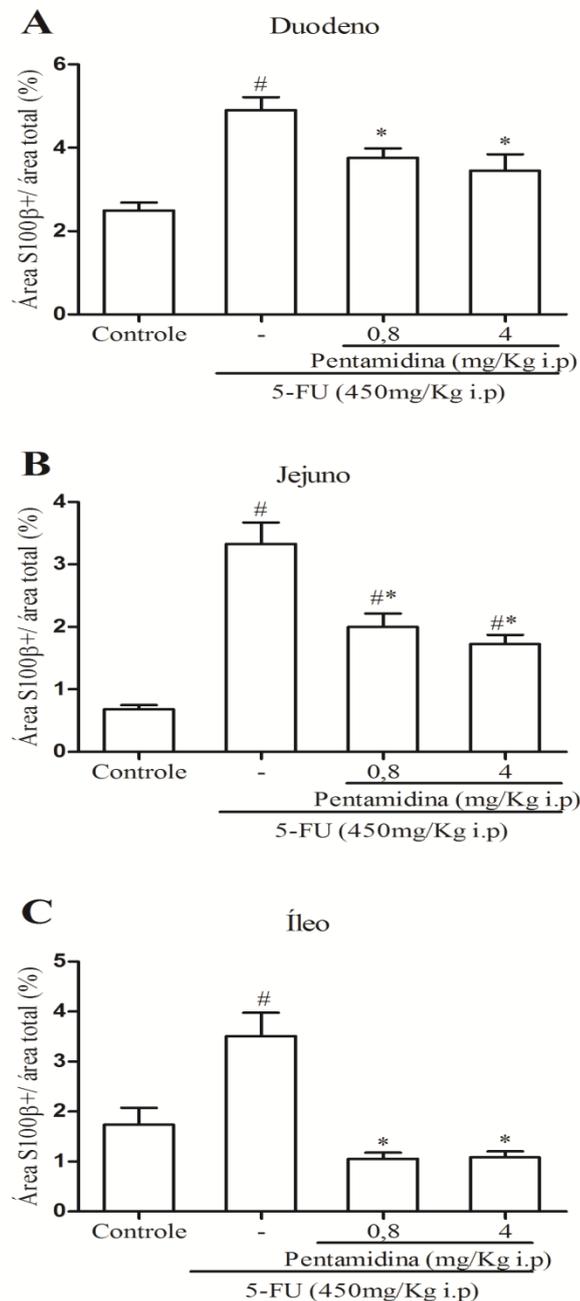
Segmentos do jejuno foram coletados e processados para realização de imunofluorescência para GFAP (vermelho), marcador de células gliais entéricas ativadas, e Iba-1 (verde), marcador de macrófagos ativados. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Comparado ao grupo controle, observa-se que há aumento da imunomarcação de GFAP e Iba-1 na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Comparado a este grupo, a inibição de S100 β (P4+5FU) reduziu essa imunomarcação. A sobreposição (MERGE) das duas marcações demonstra que macrófagos estão localizados próximo as células gliais marcadas para GFAP. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 32 - Inibição de S100 β reduz a imunomarcação de S100 β no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno, do jejuno, do íleo e do cólon foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para S100 β , que é um marcador pan-glial. Nota-se aumento da imunomarcação para S100 β nos segmentos do intestino delgado e do cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis E, F, G e H) quando comparado aos controles (painéis A, B, C e D). Enquanto que a inibição de S100 β em animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (painéis I, J, K e L) e 4 mg/Kg (painéis M, N, O e P) reduziu a imunomarcação dessa proteína quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 33 - Inibição de S100 β reduz a porcentagem da área imunomarcada para S100 β no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B) e do íleo (C) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para S100 β . Foram fotografados de 7 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU aumenta a porcentagem da área imunomarcada para S100 β no duodeno (A), no jejuno (B) e no íleo (C) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais reduz essa imunomarcção no duodeno (A), no jejuno (B) e no íleo (C). Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para S100 β . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

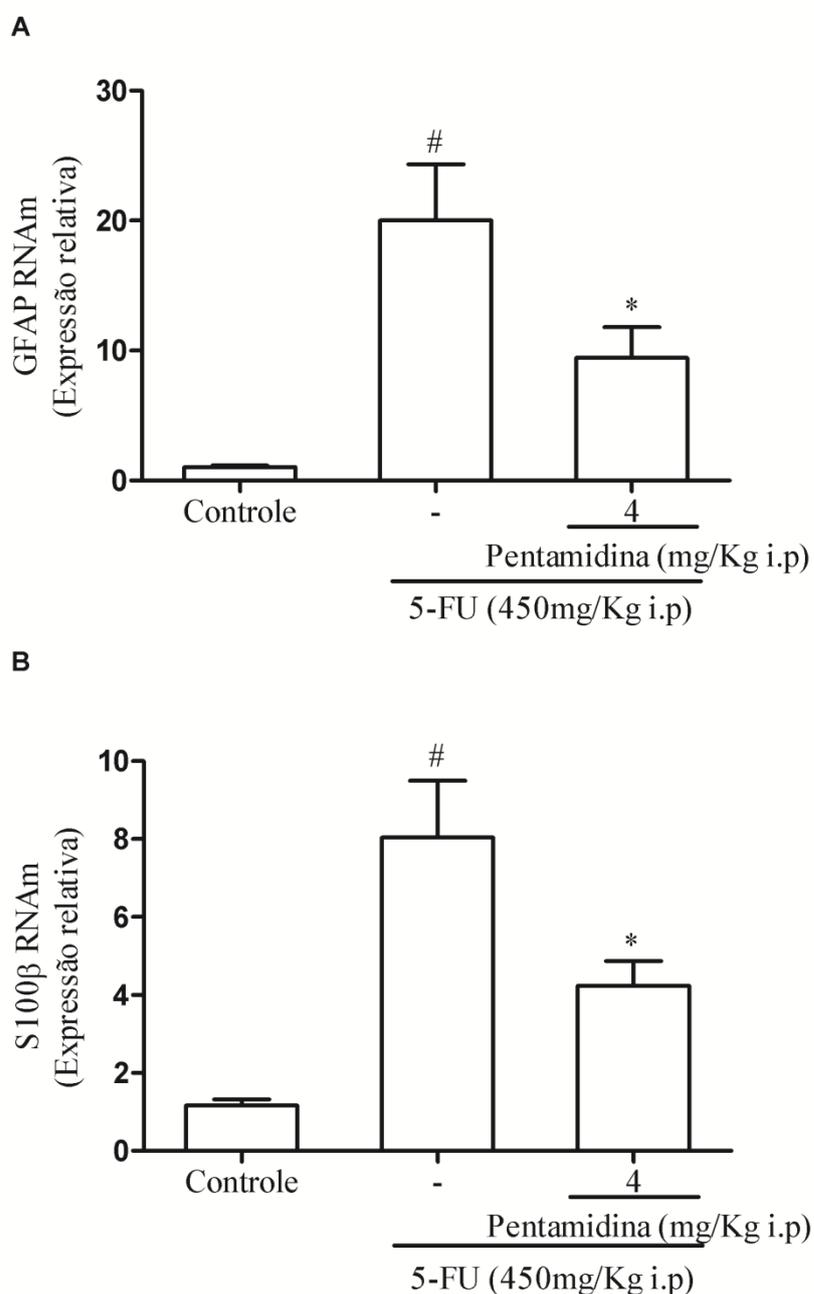
5.4.4 Efeito do inibidor de S100 β na expressão gênica de marcadores gliais (GFAP e S100 β) no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Com o propósito de investigar a participação de S100 β na expressão gênica de GFAP e na sua própria expressão por via autócrina, uma vez que S100 β no intestino é secretado exclusivamente por células gliais entéricas, avaliou-se a expressão gênica por qPCR desses dois marcadores de gliose reativa.

Segundo os dados apresentados na figura 34, em condições fisiológicas (grupo controle), GFAP ($1,04 \pm 0,12$) e S100 β ($1,16 \pm 0,15$) são expressos em baixos níveis. No entanto, comparado ao grupo controle, 5-FU aumenta ($p < 0,05$) a expressão gênica de ambas o GFAP ($20,0 \pm 4,3$) e o S100 β ($8,03 \pm 1,45$), sendo que o aumento foi cerca de 6 e de 20 vezes respectivamente. Enquanto que a inibição de S100 β foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa a expressão gênica desses marcadores (GFAP: $9,44 \pm 2,3$; S100 β : $4,23 \pm 0,63$) na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Esses achados demonstraram que 5-FU induz aumento da expressão gênica de S100 β e de GFAP, e S100 β demonstrou ser um importante mediador na promoção desse efeito.

Figura 34 - Inibição de S100 β reduz a expressão gênica de marcadores gliais (S100 β e GFAP) no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão gênica de GFAP (A) e de S100 β (B) por qPCR (sonda taqman). Observa-se que 5-FU eleva a expressão gênica de GFAP e de S100 β comparado com o grupo controle, enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão desses genes. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de GFAP e de S100 β . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

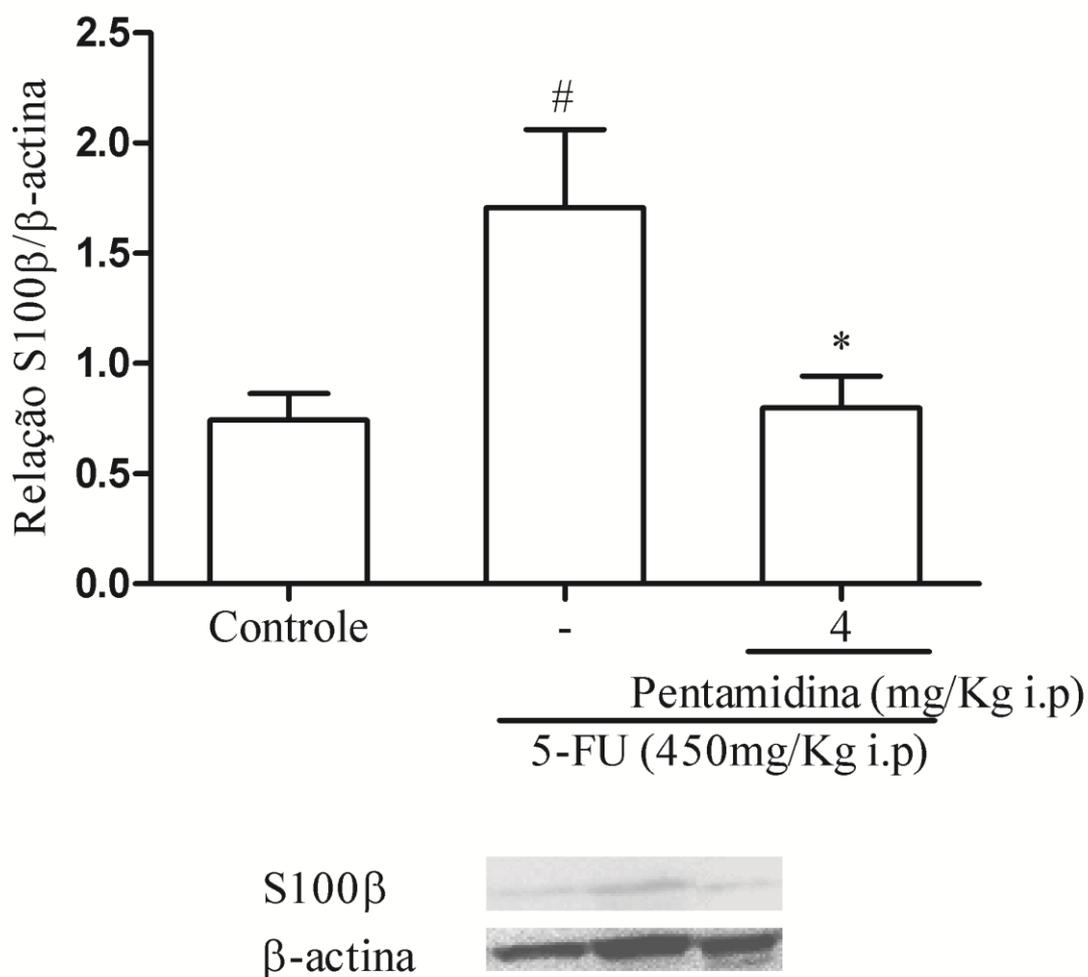
5.4.5 Efeito do inibidor de S100 β na expressão proteica de S100 β no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Sabendo-se que nem todo RNAm se acoplará ao ribossomo para promover a síntese de uma determinada proteína, investigamos, então, se a elevada e reduzida expressão gênica de S100 β promovida respectivamente por 5-FU e pelo inibidor de S100 β (pentamidina) coincidia com o aumento ou redução da sua expressão proteica. Dessa forma, realizou-se Western Blotting para avaliar a expressão proteica de S100 β .

Conforme observado na figura 35, 5-FU ($1,70 \pm 0,35$) elevou ($p < 0,05$) a expressão proteica de S100 β no jejuno quando comparado ao grupo controle ($0,74 \pm 0,12$). Por outro lado, o inibidor de S100 β reduziu ($p < 0,05$) os níveis dessa proteína no jejuno de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU ($0,79 \pm 0,14$).

Portanto, esses achados em conjunto com os dados do qPCR e imunohistoquímica demonstram que 5-FU promove aumento de S100 β no intestino. Além disso, o inibidor de S100 β foi capaz de reduzir a expressão gênica e proteica de S100 β , evidenciando que S100 β contribui para a sua própria suprarregulação na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Figura 35 - Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de S100 β no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão proteica de S100 β por Western Blotting. Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de S100 β comparado ao grupo controle, enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão dessa proteína. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de S100 β que resultou da relação da densidade de S100 β e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.6 Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção de HuC/D no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

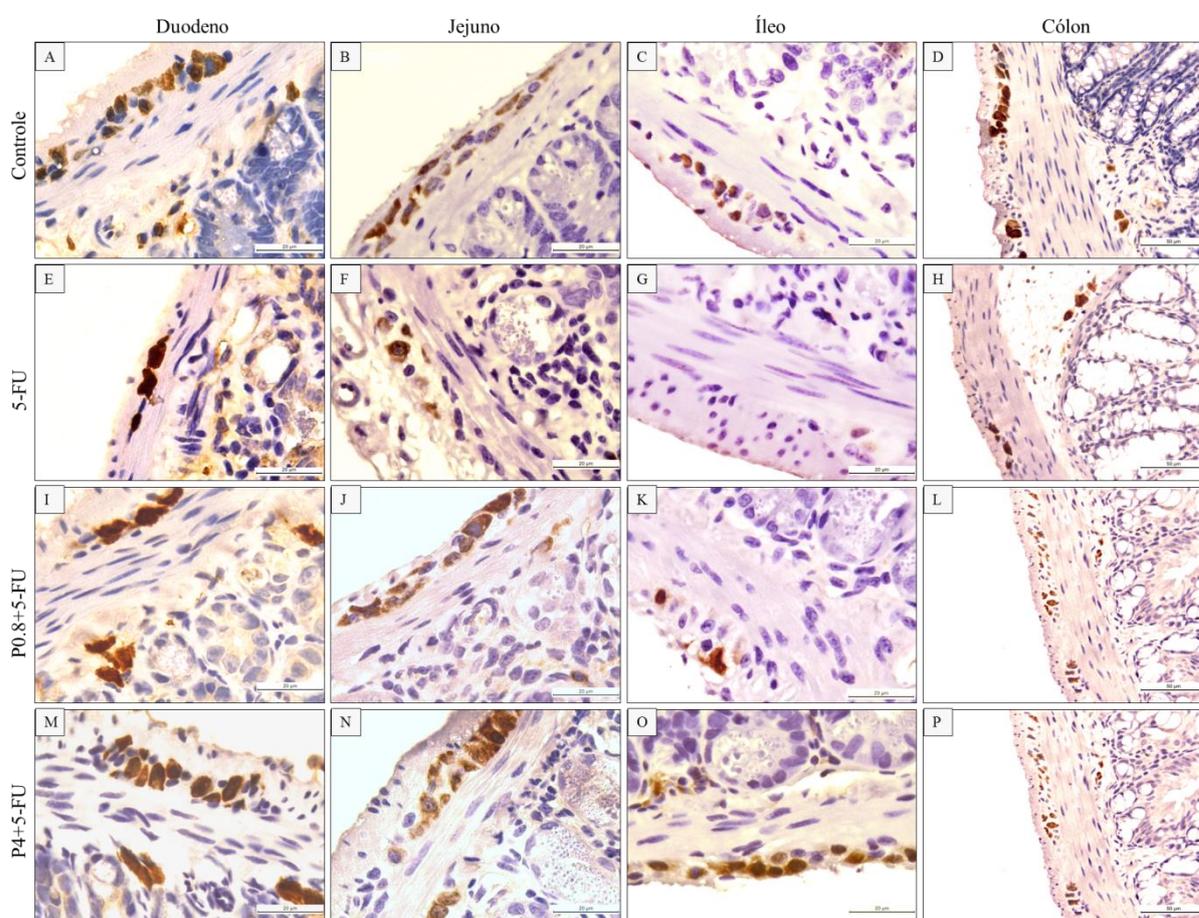
Para verificar o papel do S100 β , liberado por células gliais entéricas, na redução de neurônios induzida por 5-FU, realizou-se imunohistoquímica para HuC/D, que é um marcador pan-neuronal.

De acordo com a figura 36, comparado ao grupo controle (figura 36A-D), 5-FU reduziu a imunomarcção de HuC/D no intestino delgado (figura 36E-G) e no cólon (figura 36H). Ao passo que a inibição de S100 β (figura 36I-P) foi capaz de aumentar a imunomarcção desse marcador neuronal no intestino delgado e no cólon em animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU quando comparado aos animais que receberam apenas 5-FU.

Em consonância com esses dados da imunohistoquímica, conforme apresentado na figura 37, a quantificação da área marcada para HuC/D mostrou que 5-FU (duodeno: $3,25 \pm 0,16$; jejuno: $1,12 \pm 0,10$; íleo: $0,23 \pm 0,03$; cólon: $0,61 \pm 0,05$) reduziu de forma estatisticamente significante a área marcada para HuC/D no intestino delgado e no cólon quando comparado ao grupo controle (duodeno: $4,71 \pm 0,56$; jejuno: $2,16 \pm 0,31$; íleo: $1,41 \pm 0,15$; cólon: $1,37 \pm 0,14$). Por outro lado, a inibição de S100 β com pentamidina promoveu o aumento ($p < 0,05$) da área imunomarcada para HuC/D nas doses de 0,8 mg/Kg (duodeno: $4,34 \pm 0,42$; jejuno: $2,24 \pm 0,30$; íleo: $1,31 \pm 0,22$; cólon: $1,36 \pm 0,12$) e de 4 mg/Kg (duodeno: $5,69 \pm 0,62$; jejuno: $3,21 \pm 0,30$; íleo: $0,76 \pm 0,16$; cólon: $1,08 \pm 0,09$). No entanto, observou-se também que no duodeno e no jejuno a inibição de S100 β promoveu, de certa forma, maior proteção de neurônios entéricos na dose de 4 mg/Kg, enquanto que no íleo e no cólon essa proteção foi melhor na dose de 0,8 mg/Kg.

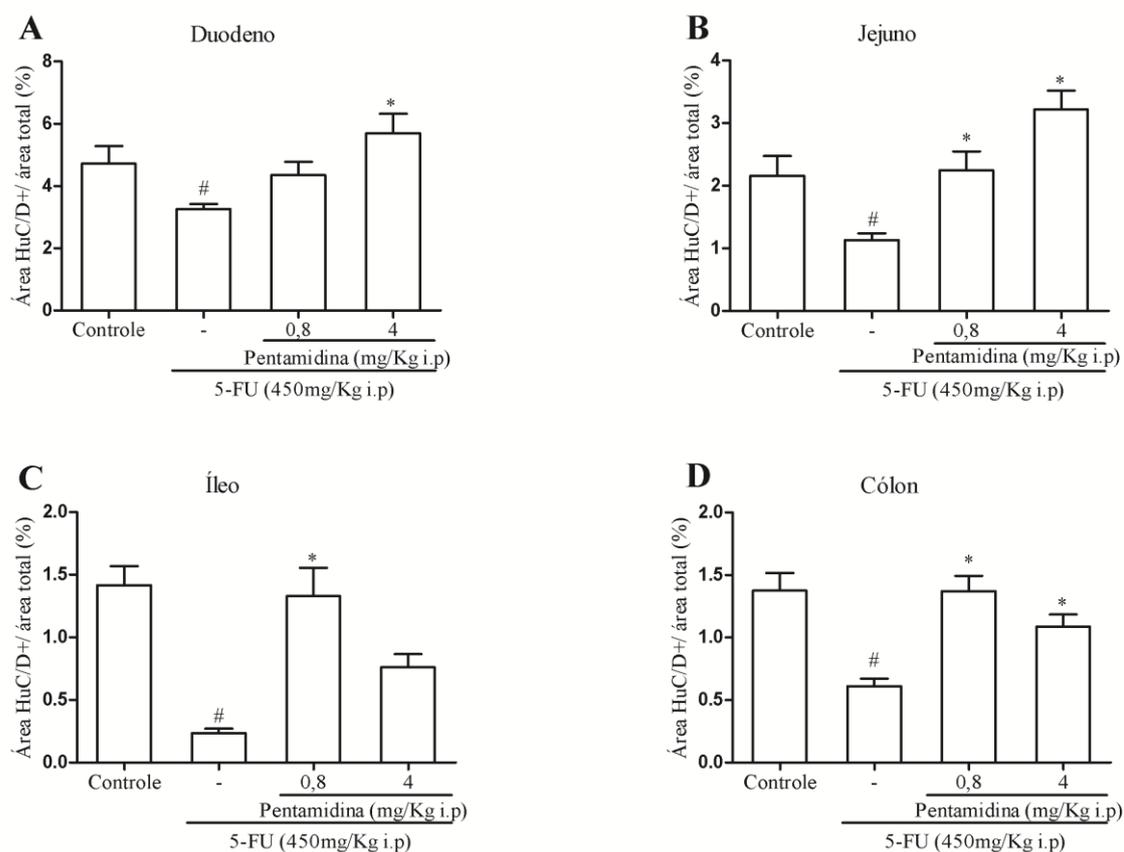
Esses dados em conjunto sugerem que S100 β é um mediador que está envolvido na redução de neurônios induzida por 5-FU na mucosite intestinal.

Figura 36 - Inibição de S100 β aumenta a imunomarcação de HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno, do jejuno, do óleo e do cólon foram removidos e processados para a realiza o de imunohistoquímica para HuC/D, que   um marcador pan-neuronal. Nota-se diminui o da imunomarca o para HuC/D nos segmentos do intestino delgado e do cólon de animais submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU (painéis E, F, G e H) quando comparado aos controles (painéis A, B, C e D). Enquanto que a inibi o de S100 β em animais submetidos   mucosite intestinal por 5-FU com pentamidina na dose de 0,8 mg/Kg (painéis I, J, K e L) e de 4 mg/Kg (painéis M, N, O e P) aumentou a imunomarca o dessa proteína quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 20  m, exceto os referentes ao cólon (escala de 50  m).

Figura 37 - Inibição de S100 β aumenta a porcentagem da área imunomarcada para HuC/D no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados e processados para realizar imunohistoquímica para HuC/D. Foram fotografados de 5 a 6 campos/corte histológico (intestino delgado: escala de 20 μ m; cólon: escala de 50 μ m). A área imunomarcada foi quantificada por meio do software Adobe Photoshop. Observa-se que 5-FU diminui a porcentagem da área imunomarcada para HuC/D no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais aumentou essa imunomarcção no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D). Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para HuC/D. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.7 Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcação e na expressão proteica de RAGE no jejuno de animais submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Devido   elevada expressão proteica de S100 β no intestino de animais submetidos   mucosite intestinal por 5-FU e   sua correla o positiva com a perda de neurônios entéricos induzida por esse quimioterápico, investigou-se, então, se o 5-FU seria capaz de aumentar a expressão de RAGE no jejuno. Vale enfatizar que, segundo a literatura vigente, a maior parte dos efeitos de S100 β   mediada pela ativa o de RAGE.

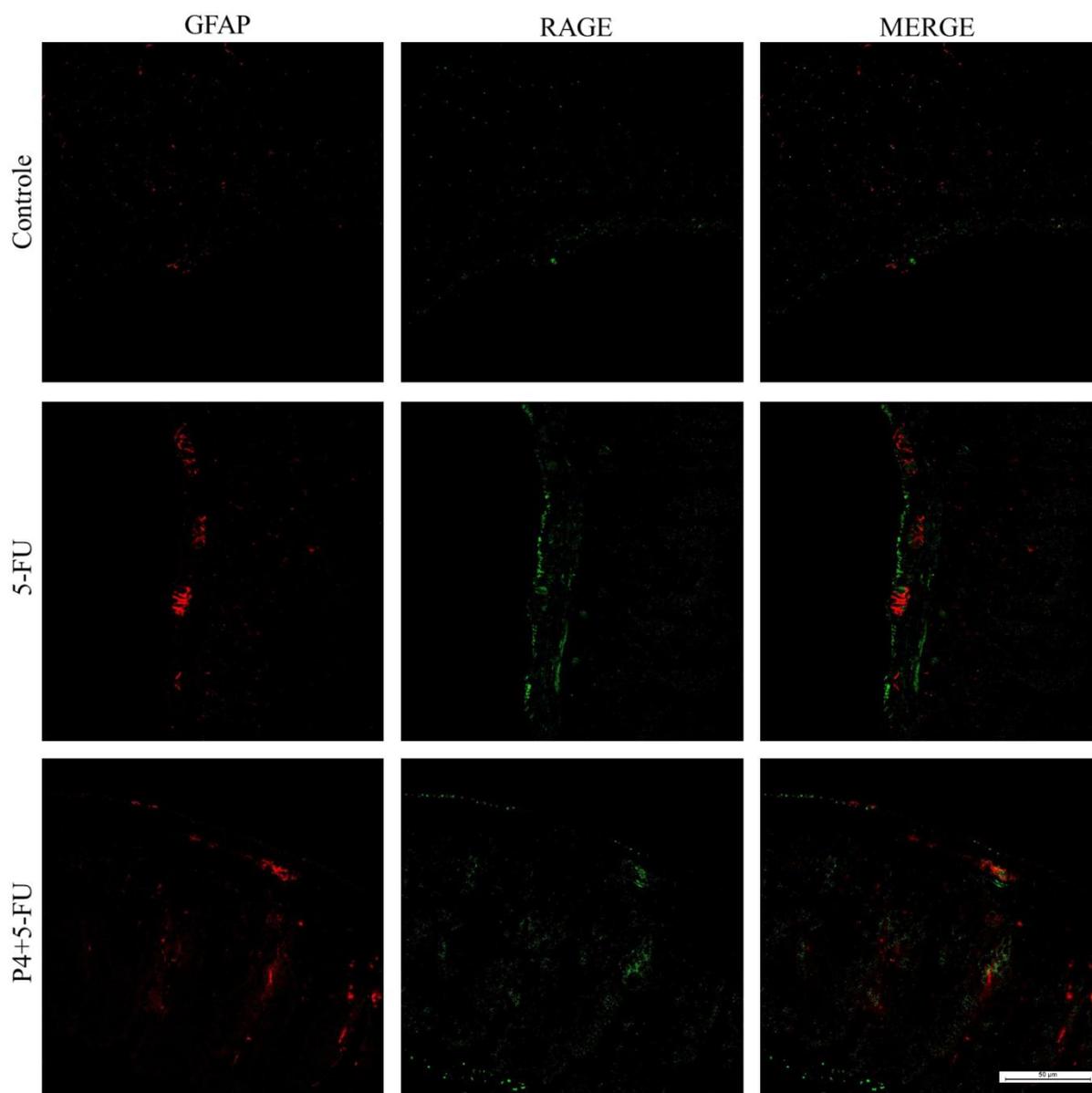
Conforme apresentado na figura 38, em condi es fisiológicas (grupo controle), RAGE e GFAP são pouco expressos no jejuno de camundongos. Enquanto que 5-FU aumentou a imunomarca o de RAGE e GFAP no jejuno comparado ao grupo controle. A inibi o de S100 β reduziu ambos o RAGE e o GFAP. A sobreposi o das duas imagens demonstrou que células gliais entéricas positivas para GFAP não expressam RAGE na mucosite intestinal e nem no grupo controle.

De forma semelhante, a figura 39 mostra que 5-FU aumentou a imunomarca o de RAGE e reduziu a de HuC/D quando comparada ao grupo controle. Na mucosite induzida por 5-FU, RAGE exibiu aumento em células epileliais das vilosidades e criptas intestinais e em células do plexo mioentérico. Por outro lado, a inibi o de S100 β promoveu a redu o da imunomarca o de RAGE e aumentou a de HuC/D na mucosite intestinal induzida por 5-FU. A sobreposi o da marca o de RAGE e HuC/D demonstrou que os neurônios entéricos expressam RAGE, e a dupla marca o dessas proteínas encontra-se aumentada na mucosite induzida por 5-FU.

Conforme observado na figura 40, demonstrou-se que 5-FU ($0,96 \pm 0,04$) aumenta de forma estatisticamente significativa a expressão proteica de RAGE no jejuno quando comparado ao grupo controle ($0,71 \pm 0,08$). Comparado ao grupo tratado apenas com 5-FU, a inibi o de S100 β diminuiu ($p < 0,05$) a expressão dessa proteína em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU ($0,72 \pm 0,05$).

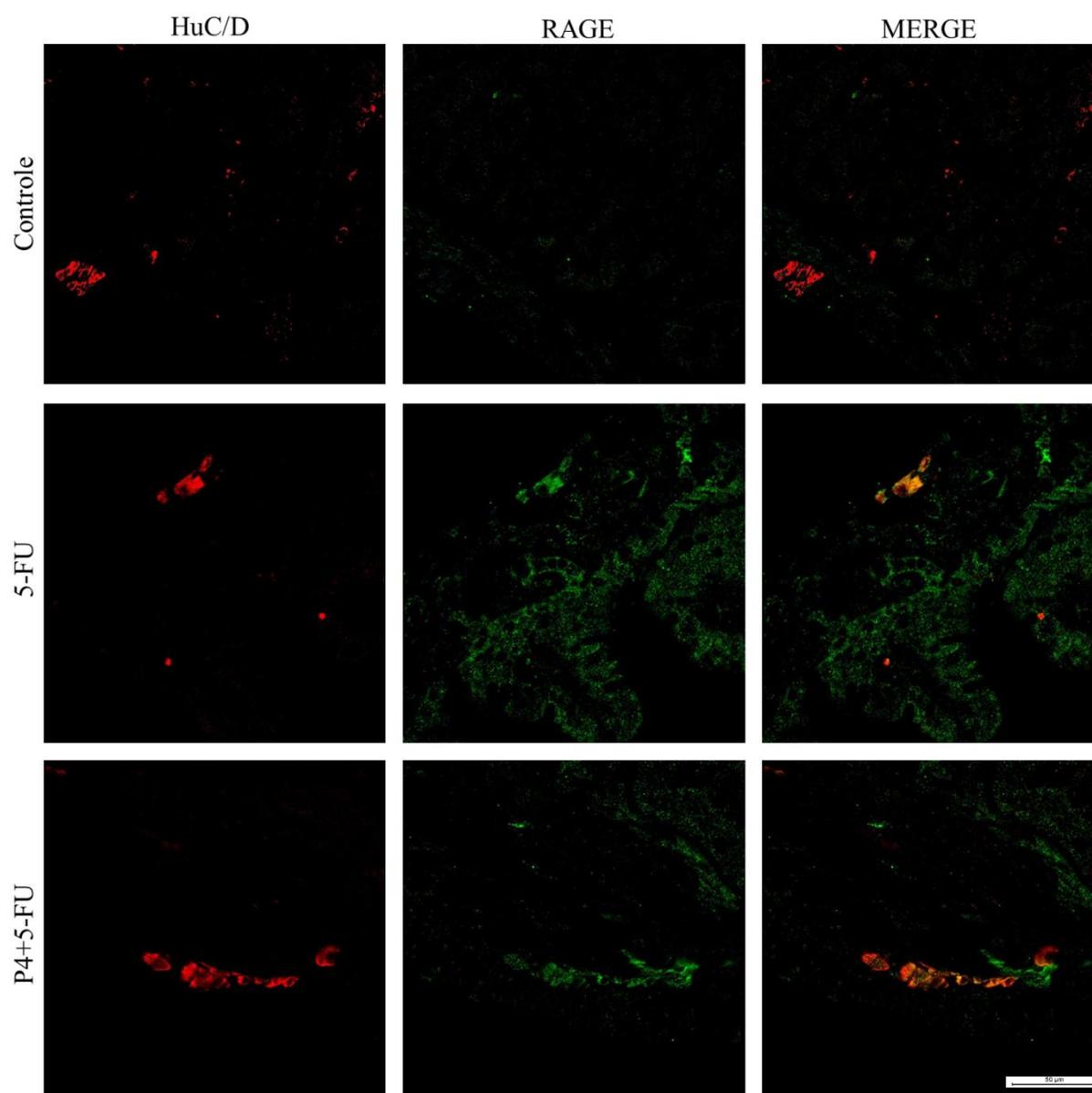
Desse modo, esses dados mostram claramente que 5-FU aumenta a expressão proteica de RAGE no jejuno de animais submetidos   mucosite intestinal. Apesar de haver vários ligantes para RAGE, S100 β demonstrou ser o mais importante na mucosite intestinal, uma vez que a inibi o de S100 β reduziu a sua expressão, que pode ser um indicador indireto da redu o da ativa o desse receptor.

Figura 38 - Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de GFAP e de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



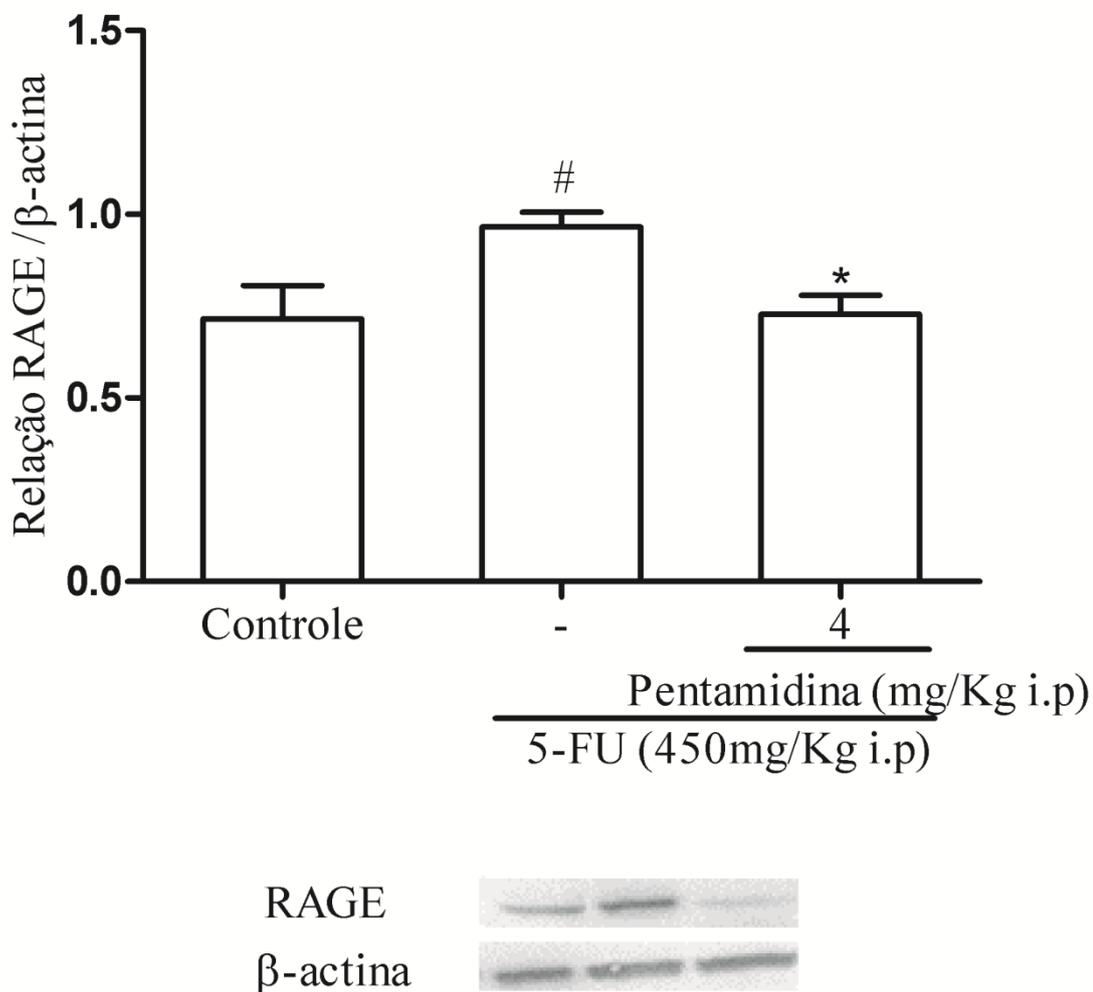
Segmentos do jejuno foram coletados e processados para realização de imunofluorescência para GFAP (vermelho), marcador de células gliais entéricas ativadas, e RAGE (verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Comparado ao grupo controle, observa-se que há aumento da imunomarcção de GFAP e RAGE na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Comparado a este grupo, a inibição de S100 β (P4+5FU) reduziu essa imunomarcção. A sobreposição (MERGE) das duas marcações demonstra que subpopulações de células gliais positivas para GFAP não expressam RAGE. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 39 - Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de HuC/D e de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados e processados para realização de imunofluorescência para HuC/D (vermelho), marcador pan-neuronal entérico, e RAGE (verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Comparado ao grupo controle, observa-se que há redução da imunomarcagem de HuC/D e aumento de RAGE na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Comparado a este grupo, a inibição de S100 β (P4+5FU) aumentou a imunomarcagem para HuC/D e reduziu a imunomarcagem de RAGE. A sobreposição (MERGE) das duas marcações demonstra que subpopulações de neurônios entéricos expressam RAGE. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 40 - Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de RAGE no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão proteica de RAGE por Western Blotting. Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de RAGE comparado ao grupo controle, enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão dessa proteína. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de RAGE que resultou da relação da densidade de RAGE e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.8 Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcaço de NF κ B NLS e na expresso proteica de NF κ B p65 no jejuno de animais submetidos  mucosite intestinal induzida por 5-FU.

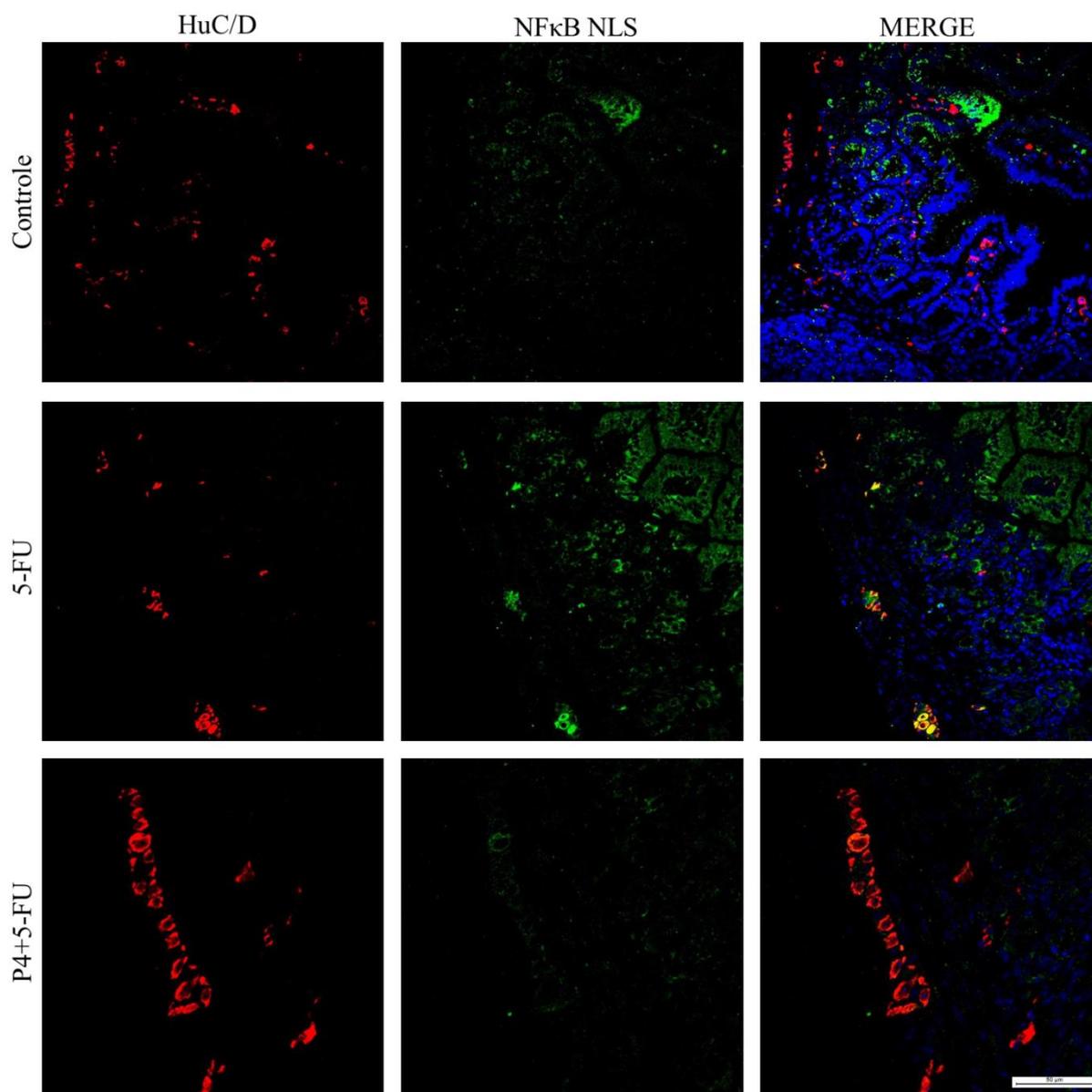
A interao de S100 β com RAGE resulta na ativao de NF κ B. NF κ B NLS  um marcador de ativao, isto , de desligamento de NF κ B de I κ B, levando  exposio de sequncias conservadas de localizao nuclear (NLS). Enquanto que NF κ B p65 apresenta elevada expresso gnica sob condioes inflamatrias. Por conta desses fatores, NF κ B NLS foi avaliado por imunohistoqumica e NF κ B p65 por Western Blotting.

Observou-se que 5-FU induziu aumento da imunomarcao de NF κ B NLS e reduo de HuC/D no jejuno de camundongos comparado ao grupo controle. Ao passo que a inibio de S100 β diminuiu a imunomarcao de NF κ B NLS e elevou a de HuC/D. A sobreposio de NF κ B NLS e de HuC/D demonstrou que 5-FU promoveu aumento da expresso de NF κ B NLS por neurnios entricos. No entanto, a inibio de S100 β reduziu a dupla marcao dessas protenas (figura 41). Notou-se que 5-FU elevou a imunomarcao de NF κ B NLS nos vilos e nas criptas intestinais.

Em relao  expresso proteica de NF κ B p65, 5-FU ($6,17 \pm 0,44$) promoveu aumento da expresso dessa protena no jejuno de camundongos submetidos  mucosite intestinal quando comparado ao grupo controle ($1,22 \pm 0,17$). Enquanto que a inibio de S100 β ($1,22 \pm 0,36$) foi capaz de diminuir a expresso proteica de NF κ B p65 quando comparado aos animais que receberam apenas 5-FU (figura 42).

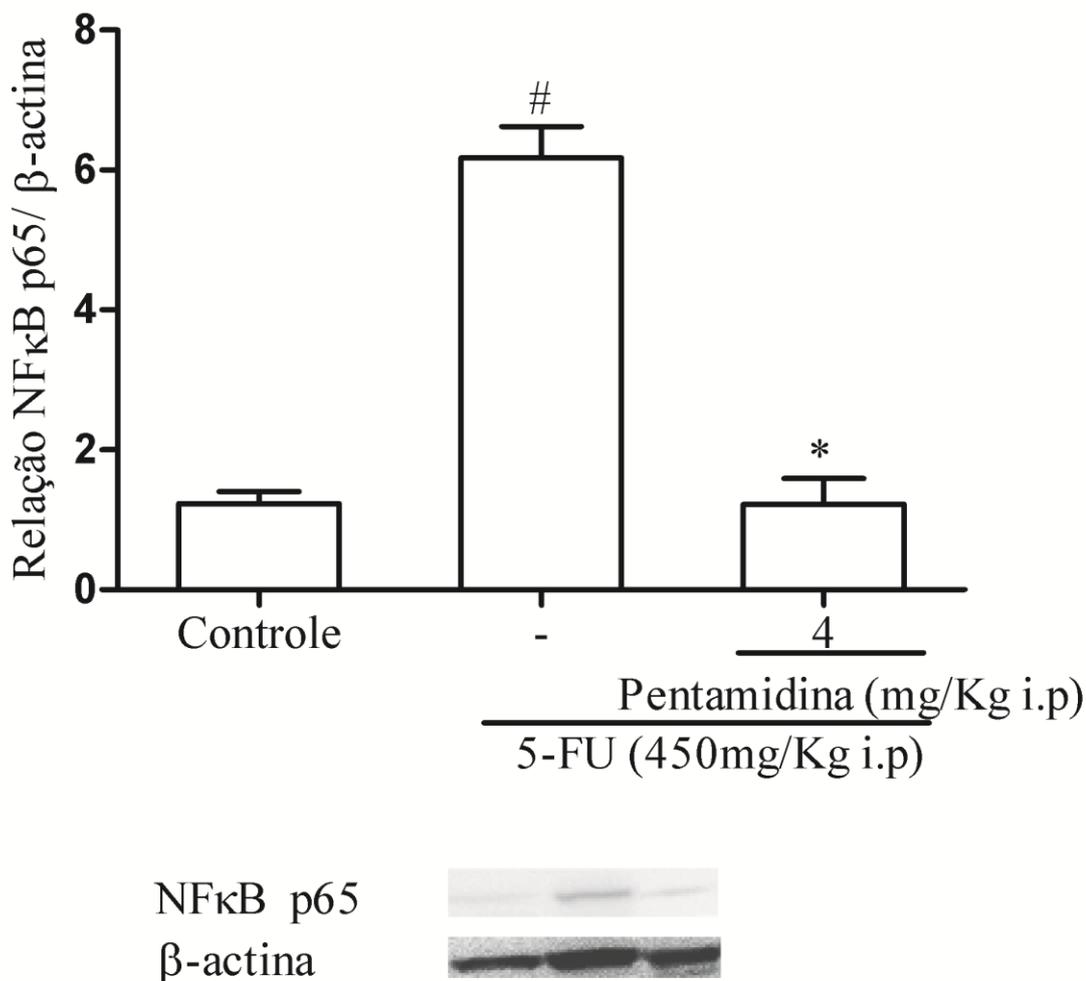
Em conjunto, esses dados evidenciaram que 5-FU aumenta a ativao de NF κ B em neurnios entricos, e a inibio de S100 β reduz essa ativao.

Figura 41 - Efeito do inibidor de S100 β na marcação dupla de HuC/D e de NF κ B NLS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados e processados para a realização de imunofluorescência para HuC/D (vermelho), marcador pan-neuronal entérico, e NF κ B NLS (verde), marcador de ativação de NF κ B. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Comparado ao grupo controle, observa-se que há redução da imunomarcação de HuC/D e aumento de NF κ B NLS na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Comparado a este grupo, a inibição de S100 β (P4+5FU) aumentou a imunomarcação para HuC/D e reduziu a imunomarcação de NF κ B NLS. A sobreposição (MERGE) das duas marcações demonstra que há aumento da expressão de NF κ B NLS nos neurônios do plexo mioentérico de animais submetidos   mucosite intestinal. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 42 - Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de NF κ B p65 no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão proteica de NF κ B p65 por Western Blotting. Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de NF κ B p65 no jejuno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão dessa proteína quando comparado ao grupo que recebeu apenas 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de NF κ B p65 que resultou da relação da densidade de NF κ B p65 e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.9 Efeito do inibidor de S100 β nas alterações da imunomarcção, da expressão gênica e proteica de iNOS no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) catalisa a reação entre L-arginina e oxigênio molecular que resulta na síntese de óxido nítrico.

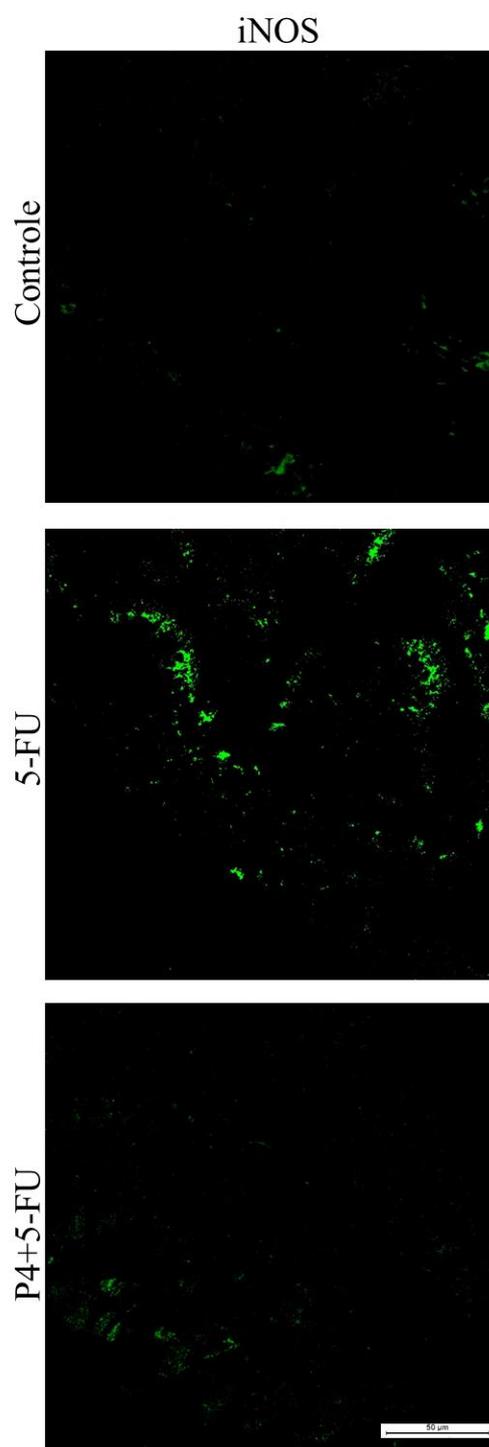
Em condições fisiológicas, essa proteína é pouco expressa no intestino, conforme se observou no grupo controle utilizado no presente estudo. Comparado a este grupo, 5-FU aumentou a imunomarcção de iNOS no intestino. Ao passo que a inibição de S100 β reduziu a imunomarcção de iNOS na mucosite intestinal induzida por 5-FU (figura 43).

Conforme apresentado na figura 44, 5-FU ($3,27 \pm 0,30$) elevou de forma estatisticamente significativa a expressão gênica de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal quando comparado ao grupo controle ($0,88 \pm 0,34$). Ao passo que a inibição de S100 β reduziu ($p < 0,05$) a expressão desse gene na mucosite induzida por 5-FU ($0,44 \pm 0,10$).

Ao avaliar a expressão proteica de iNOS por Western Blotting, observou-se que no grupo controle ($2,92 \pm 1,17$) há baixa expressão dessa proteína no jejuno. Comparado a este grupo, 5-FU ($9,88 \pm 1,68$) aumentou ($p < 0,05$), cerca de sete vezes, a expressão proteica de iNOS. Por outro lado, a inibição de S100 β nos camundongos tratados com 5-FU ($2,86 \pm 0,95$) diminuiu de forma estatisticamente significativa a expressão dessa proteína (figura 45).

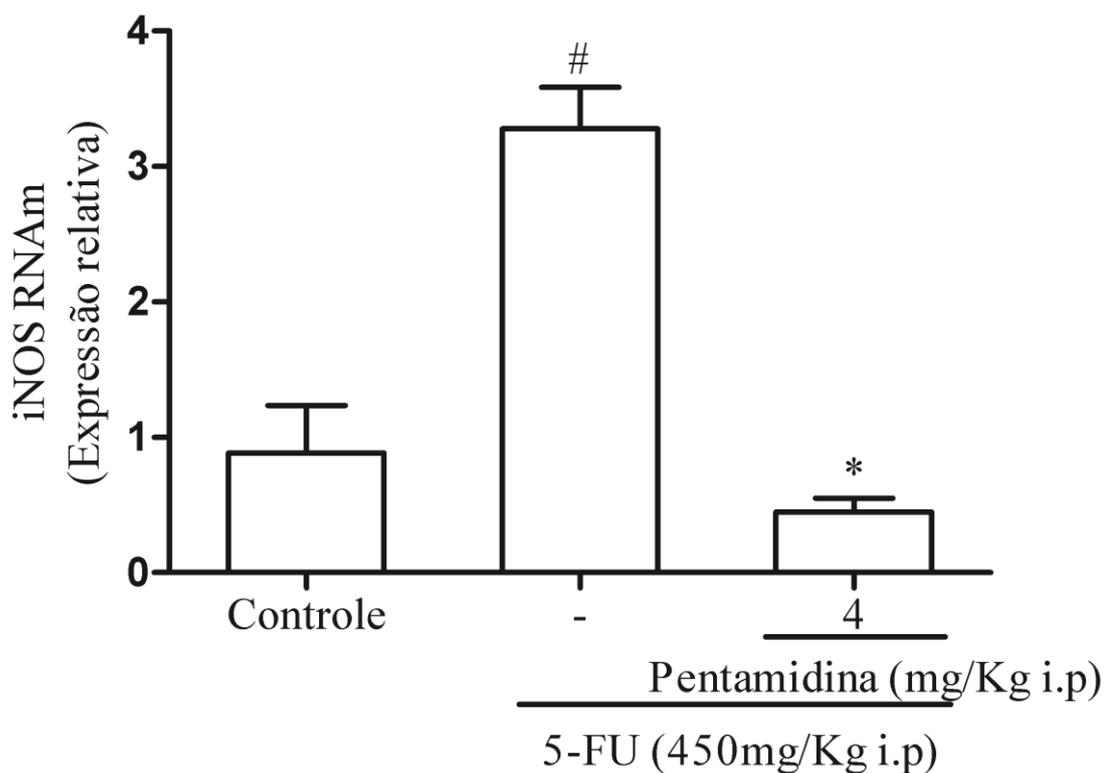
De fato, esses dados comprovam que 5-FU aumenta a expressão gênica e proteica de iNOS, e o inibidor de S100 β é capaz de reverter os efeitos desse quimioterápico na expressão dessa enzima.

Figura 43 - Efeito do inibidor de S100 β na imunomarcação de iNOS no jejuno de camundongos submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU.



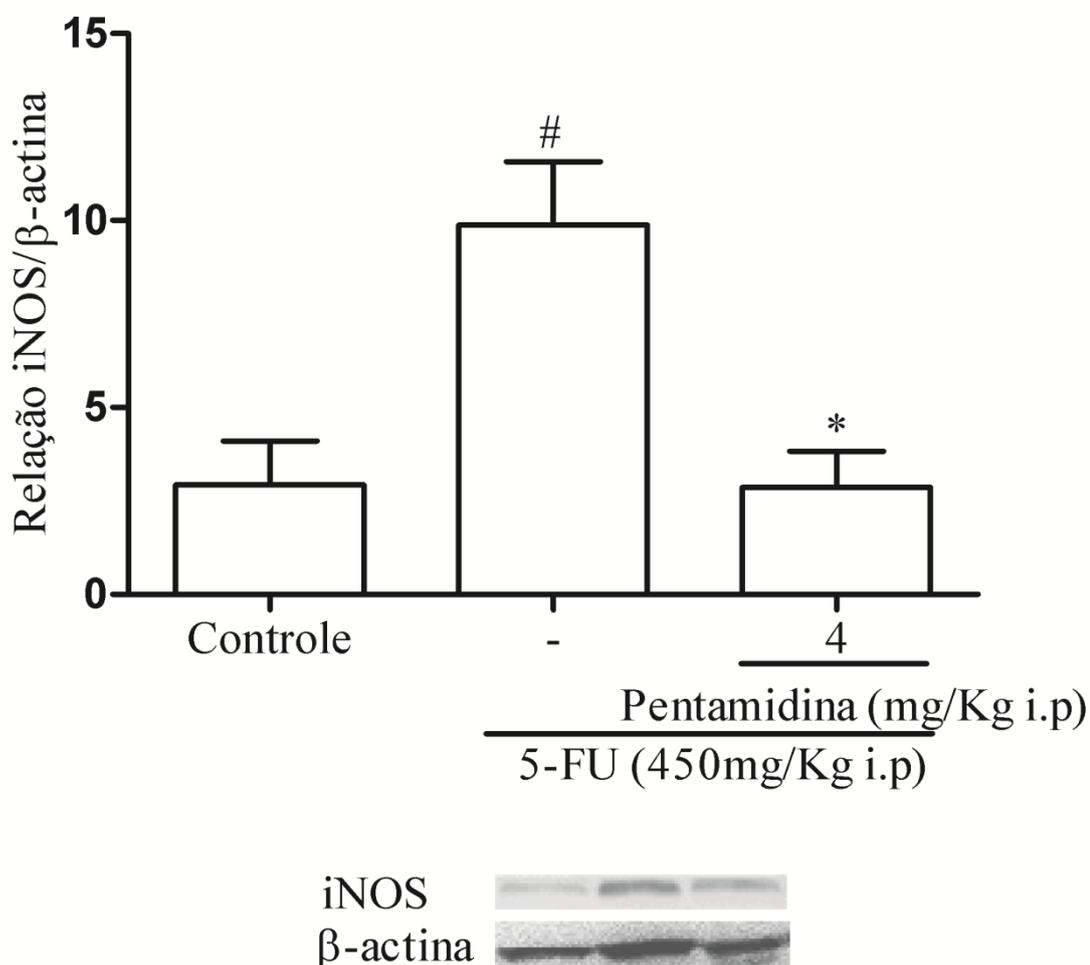
Segmentos do jejuno foram coletados e processados para realização de imunofluorescência para iNOS (verde). Comparado ao grupo controle, observa-se que há elevada imunomarcação de iNOS na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Comparado a este grupo, a inibição de S100 β (P4+5FU) diminuiu a imunomarcação para iNOS. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 44 - Inibidor de S100 β reduz a expressão gênica de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão gênica de iNOS por qPCR (sonda taqman). Observa-se que 5-FU eleva a expressão gênica de iNOS comparado com o grupo controle, enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão desse gene. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de iNOS. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 45 - Inibidor de S100 β reduz a expressão proteica de iNOS no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



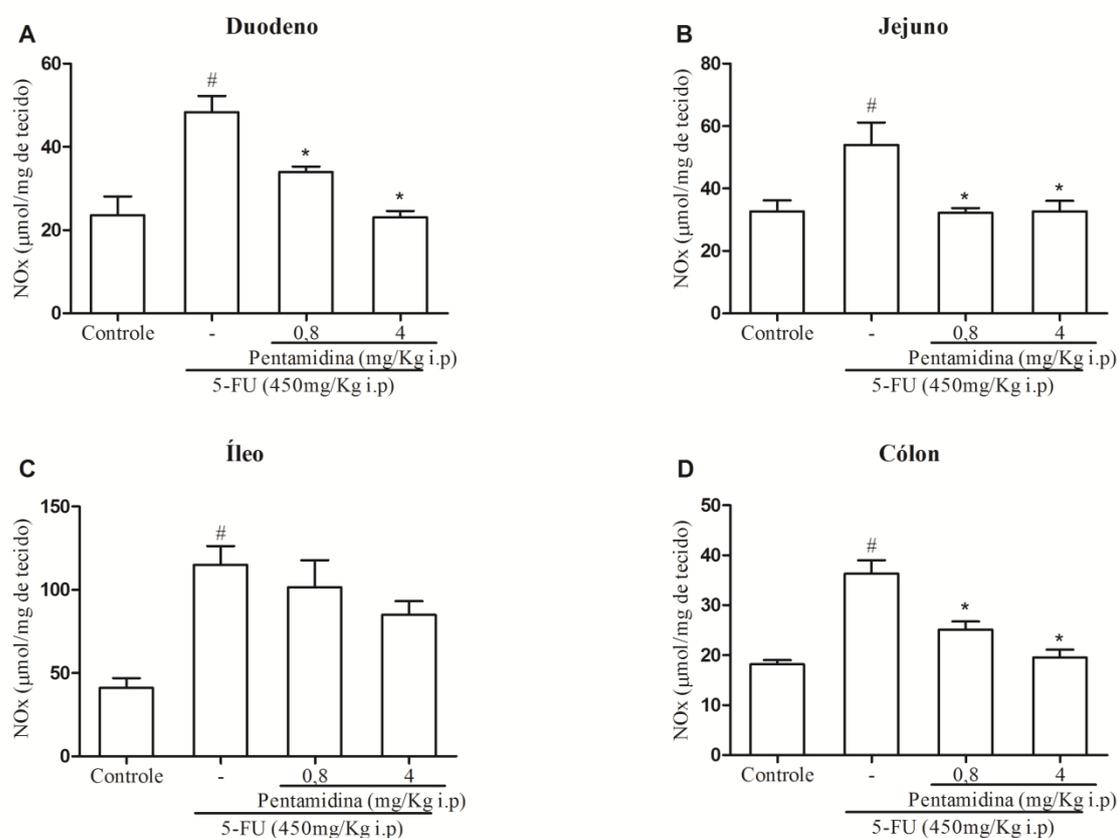
Segmentos do jejuno foram coletados para avaliar a expressão proteica de iNOS por Western Blotting. Observa-se que 5-FU eleva a expressão proteica de iNOS comparado ao grupo controle, enquanto que o inibidor de S100 β reduz a expressão dessa proteína. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de iNOS que resultou da relação da densidade de iNOS e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.4.10 Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Os níveis de óxido nítrico no intestino geralmente são mensurados indiretamente pela dosagem dos seus metabólitos nitrito/nitrato.

No grupo controle, baixos níveis de nitrito/nitrato foram detectados no intestino delgado (duodeno: $23,57 \pm 4,50$; jejuno: $32,68 \pm 3,50$; íleo: $41,03 \pm 5,90$) e no cólon ($18,18 \pm 0,82$). Comparado a este grupo, 5-FU (duodeno: $48,37 \pm 3,85$; jejuno: $54,00 \pm 7,18$; íleo: $115,0 \pm 11,38$; cólon: $36,33 \pm 2,67$) aumentou ($p < 0,05$) os níveis de nitrito/nitrato no intestino. Ao passo que a inibição de S100 β , em camundongos submetidos à mucosite intestinal, foi capaz de diminuir ($p < 0,05$) os níveis desses metabólitos do óxido nítrico no duodeno (P0,8: $33,98 \pm 1,29$; P4: $23,06 \pm 1,57$), no jejuno (P0,8: $32,21 \pm 1,57$; P4: $32,72 \pm 3,31$) e no cólon (P0,8: $25,13 \pm 1,61$; P4: $19,53 \pm 1,56$) (figura 46).

Figura 46 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de NOx no duodeno, no jejuno e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados para mensurar os níveis de NOx. Observa-se que 5-FU aumenta os níveis de nitrito e nitrato no intestino delgado e no cólon quando comparado ao grupo controle. O inibidor de S100 β reduz os níveis de NOx no duodeno, no jejuno e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de nitrito/nitrato expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

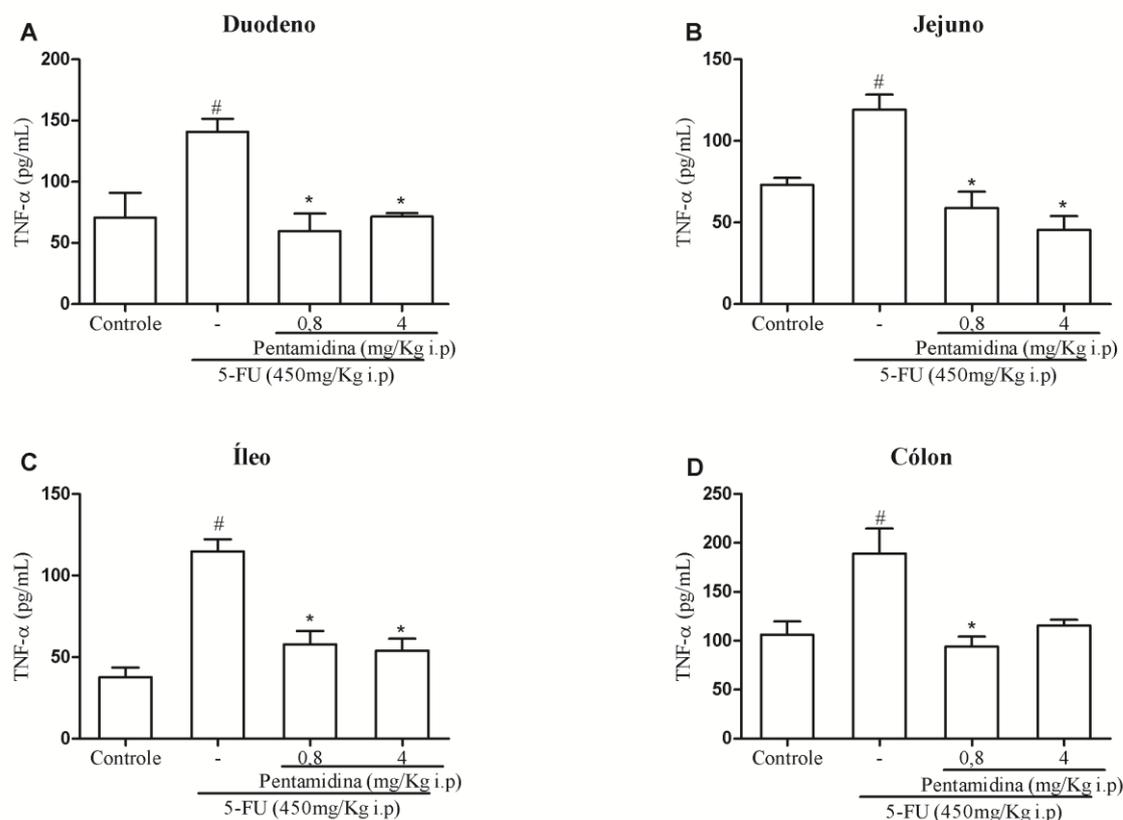
5.4.11 Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de TNF- α e de IL-6 no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 podem ser sintetizadas por macrófagos e células gliais entéricas.

Conforme observado na figura 47, 5-FU aumentou ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α no intestino delgado (duodeno: $140,80 \pm 10,54$; jejuno: $119,10 \pm 9,27$; íleo: $114,80 \pm 7,51$) e no cólon ($189,10 \pm 25,57$) quando comparado ao grupo controle (duodeno: $70,80 \pm 20,18$; jejuno: $73,10 \pm 4,20$; íleo: $37,70 \pm 6,02$; cólon: $106,10 \pm 13,57$). Por outro lado, o inibidor de S100 β diminuiu de forma estatisticamente significativa os níveis dessa citocina pró-inflamatória na mucosite induzida por 5-FU em ambas as doses de 0,8 mg/Kg (duodeno: $59,80 \pm 14,11$; jejuno: $58,90 \pm 9,92$; íleo: $57,80 \pm 8,29$; cólon: $94,30 \pm 10,01$) e de 4 mg/Kg (duodeno: $74,55 \pm 2,78$; jejuno: $45,50 \pm 8,42$; íleo: $53,90 \pm 7,42$; cólon: $115,6 \pm 5,78$).

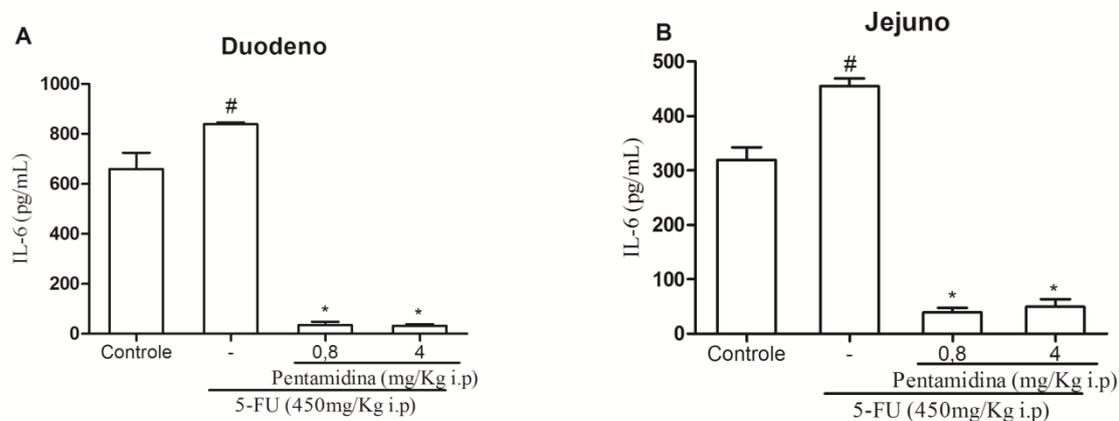
De forma semelhante aos achados de TNF- α , comparado ao grupo controle, 5-FU aumentou de forma estatisticamente significativa os níveis de IL-6 no duodeno e no jejuno. Enquanto que a inibição de S100 β foi capaz de reverter ($p < 0,05$) os efeitos de 5-FU na síntese de IL-6 na mucosite intestinal (figura 48).

Figura 47 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de TNF- α no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados para mensurar os níveis de TNF- α , citocina pró-inflamatória, por ELISA. Observa-se que 5-FU aumenta os níveis de TNF- α no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais reduz os níveis dessa citocina pró-inflamatória nos segmentos intestinais avaliados. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de TNF- α expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 48 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de IL-6 no duodeno e no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A) e do jejuno (B) foram coletados para mensurar os níveis de IL-6, citocina pró-inflamatória, por ELISA. Observa-se que 5-FU aumenta os níveis de IL-6 no duodeno (A) e no jejuno (B) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais reduz os níveis dessa citocina pró-inflamatória nos segmentos intestinais avaliados. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de IL-6 expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

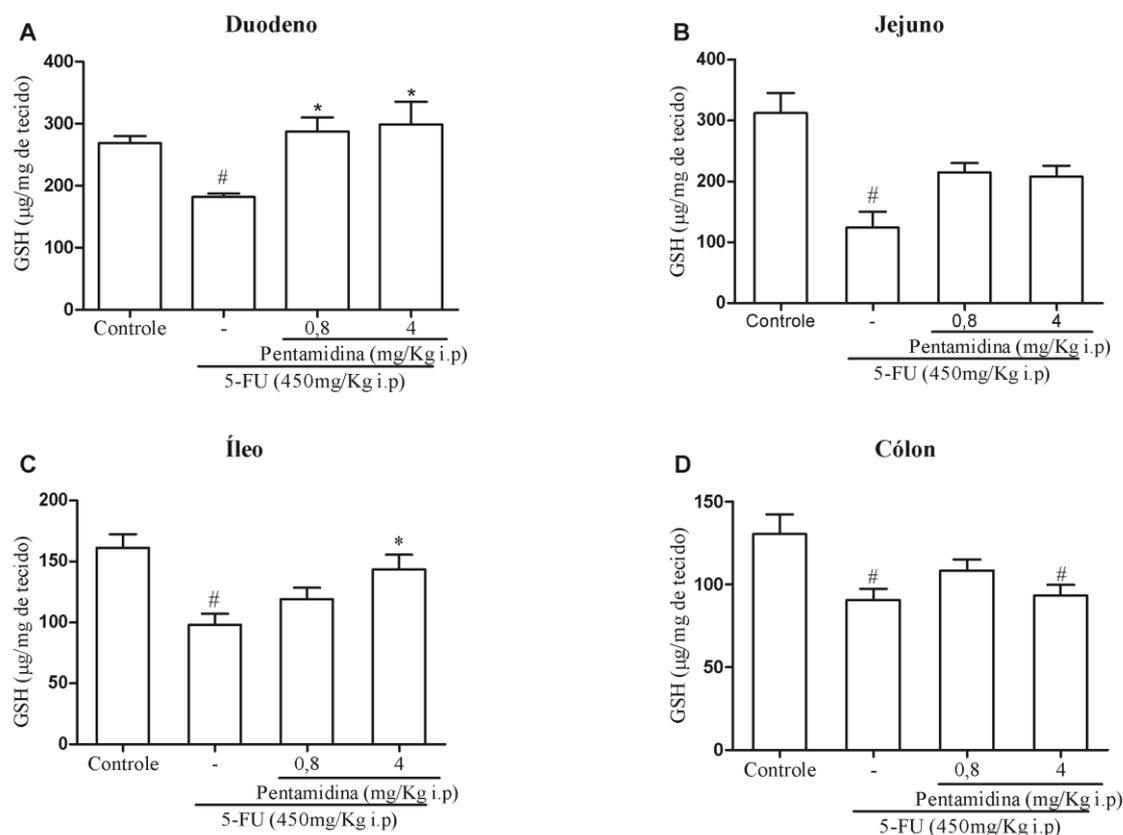
5.4.12 Efeito do inibidor de S100 β nos níveis teciduais de GSH e de MDA no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O GSH e o MDA são marcadores de estresse oxidativo. GSH é um antioxidante fisiológico e MDA é um produto da peroxidação lipídica e estão respectivamente, sob condições fisiológicas, em altos e em baixos níveis.

Em relação aos níveis de GSH, 5-FU reduziu ($p < 0,05$) os níveis desse antioxidante fisiológico no intestino delgado (duodeno: $181,60 \pm 5,35$; jejuno: $124,20 \pm 25,94$; íleo: $98,01 \pm 9,27$) e no cólon ($90,60 \pm 6,89$) em comparação ao grupo controle (duodeno: $268,40 \pm 11,32$; jejuno: $312,10 \pm 33,19$; íleo: $161,30 \pm 11,15$; cólon: $130,50 \pm 11,92$). Ao passo que a inibição de S100 β aumentou ($p < 0,05$) os níveis de GSH no duodeno (P0,8: $287,10 \pm 22,95$; P4: $298,60 \pm 36,84$) e no íleo (P0,8: $119,30 \pm 9,30$; P4: $143,50 \pm 12,06$) de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU (figura 49).

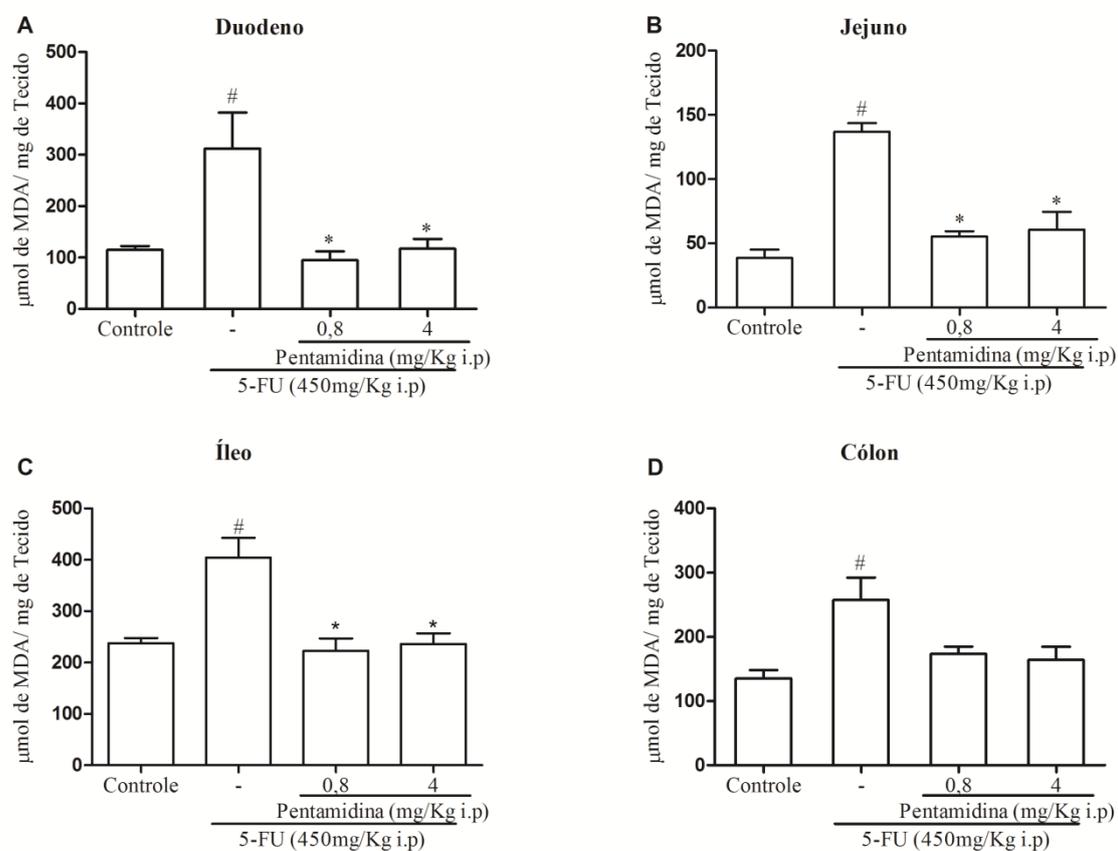
Quanto aos níveis de MDA, comparado ao grupo controle, 5-FU elevou de forma estatisticamente significativa os níveis desse marcador de peroxidação lipídica no intestino delgado (duodeno: $312,40 \pm 69,96$; jejuno: $137,0 \pm 6,63$; íleo: $404,30 \pm 38,87$) e no cólon ($257,40 \pm 35,08$). Por outro lado, a inibição de S100 β reduziu os níveis de MDA no intestino delgado de animais submetidos à mucosite intestinal (P0,8- duodeno: $94,95 \pm 17,64$; jejuno: $55,31 \pm 4,09$; íleo: $223,10 \pm 23,61$; P4- duodeno: $117,4 \pm 19,18$; jejuno: $60,58 \pm 13,92$; íleo: $236,40 \pm 20,35$) (figura 50).

Figura 49 - Inibidor de S100 β aumenta os níveis de GSH no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejunum (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados para mensurar os níveis de GSH, antioxidante fisiológico. Observa-se que 5-FU diminui os níveis de GSH no duodeno (A), no jejunum (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais aumenta os níveis desse antioxidante fisiológico no duodeno e no íleo. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de GSH expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 50 - Inibidor de S100 β diminui os níveis de MDA no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados para mensurar os níveis de MDA, um produto da peroxidação lipídica. Observa-se que 5-FU aumenta os níveis de MDA no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. A inibição de S100 β nesses animais reduz os níveis de MDA no duodeno, no jejuno e no íleo. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de MDA expressos em μmol de MDA/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que na mucosite intestinal induzida por 5-FU há aumento de imunomarcadores de células gliais entéricas (GFAP e S100 β) e redução de marcador neuronal (HuC/D) que sugerem respectivamente gliose reativa e morte neuronal. Estes achados foram acompanhados por elevação da expressão proteica de NF κ B p65 e S100 β . Além disso, evidenciou-se que S100 β participa na patogênese da mucosite intestinal induzida por esse quimioterápico via S100 β /RAGE/NF κ B.

Adicionalmente, a inibição de S100 β reduziu a expressão gênica de iNOS, bem como diminuiu os níveis de nitrito/nitrato, das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e da expressão gênica de marcadores de células gliais (GFAP e S100 β), assim como atenuou a perda de neurônios, as alterações histológicas e o estresse oxidativo induzidos por 5-FU no intestino.

Nesse estudo, utilizou-se o modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU amplamente descrito na literatura e modificado pelo nosso grupo de pesquisa. Para induzir a mucosite intestinal, utilizou-se a dose de 450 mg/Kg de 5-FU, a qual foi estabelecida em camundongos Swiss por Soares *et al.* (2008). Essa dose vem sendo amplamente utilizada em estudos experimentais devido a sua capacidade de reproduzir os sinais clínicos apresentados por pacientes em uso desse quimioterápico, como diarreia, perda de peso e inflamação da mucosa intestinal com perda de vilosidades (AZEVEDO *et al.*, 2012; JUSTINO *et al.*, 2014, 2015; SOARES *et al.*, 2008, 2013). O protocolo experimental e a dose utilizada do 5-FU para induzir mucosite intestinal dependem do animal e da linhagem a ser utilizada. Em ratos a dose utilizada foi de 50 mg/Kg (RENCK *et al.*, 2014), enquanto que, em camundongos BALB/c, utilizam-se doses de 200 mg/Kg (HAN *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011), 250 mg/Kg (GAO *et al.*, 2014) ou 450 mg/Kg (LU *et al.*, 2015).

Inicialmente, demonstrou-se, no presente estudo, que 5-FU ocasiona redução das vilosidades com intenso infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal e promove vacuolização de células epiteliais e musculares, conforme já observado por estudos anteriores (GAO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2008, 2013; STEIN; VOIGT; JORDAN, 2010; WU *et al.*, 2011). Além desses achados histopatológicos, observou-se nos animais tratados com 5-FU uma importante hipertrofia do plexo mioentérico com aparente redução de neurônios entéricos. Ressalta-se que essa alteração histopatológica no plexo mioentérico em modelo de mucosite induzida por 5-FU foi relatada pela primeira vez nesse estudo. No entanto, essa alteração já foi evidenciada na mucosite induzida por irinotecano, um

quimioterápico inibidor da topoisomerase I (COELHO-AGUIAR *et al.*, 2015; NOGUEIRA, 2015).

Sabe-se que a fase inflamatória da mucosite intestinal induzida por 5-FU é caracterizada por redução das vilosidades intestinais com ruptura do seu epitélio de revestimento e intensa inflamação na mucosa intestinal. Além disso, o 5-FU ocasiona alterações na motilidade do intestino, mesmo na ausência de inflamação intestinal, isto é, na fase de cicatrização (SOARES *et al.*, 2008). Essas alterações na mucosa e na motilidade intestinal contribuem para a diarreia presente tanto em modelos animais de mucosite intestinal quanto em pacientes que estão em tratamento com esse quimioterápico (MAGNE *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2008, 2013). O mecanismo envolvido nas alterações da motilidade intestinal e da diarreia pode estar associado com modificações morfológicas e funcionais do sistema nervoso entérico (SNE).

A motilidade do intestino é regulada principalmente pelo plexo mioentérico, enquanto as secreções intestinais pelo plexo submucoso. Ambos os plexos, o submucoso e o mioentérico, são constituídos por neurônios e células gliais entéricas (CGEs) (FURNESS, 2012).

Dessa forma, levantou-se a hipótese de que o 5-FU poderia ocasionar importantes alterações nas células gliais e nos neurônios do intestino. Logo, as alterações histopatológicas e moleculares no SNE do intestino delgado e do cólon foram investigadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Conforme observado neste estudo, em cortes intestinais corados com hematoxilina e eosina (H&E), visualizam-se facilmente os gânglios mioentéricos, o que não ocorre com os gânglios do plexo submucoso. Portanto, prosseguimos o estudo utilizando imunomarcadores de CGEs (S100 β e GFAP) e de neurônios (HuC/D) para melhor caracterizar as alterações dessas células no intestino delgado e no cólon.

Os resultados deste estudo demonstraram que o 5-FU induz aumento da imunomarcagem de GFAP, marcador de célula glial entérica, no intestino delgado e no cólon. De forma semelhante, o aumento da expressão dessa proteína foi evidenciado na mucosa inflamada de pacientes com colite ulcerativa (VON BOYEN *et al.*, 2011) e no plexo mucoso, submucoso e mioentérico de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (NOGUEIRA, 2015). Em contraste, foi observada redução de GFAP na enterocolite necrotizante e na mucosa não inflamada de pacientes com doença de Crohn (SAVIDGE; SOFRONIEW; NEUNLIST, 2007).

No sistema nervoso central (SNC), GFAP é o principal filamento intermediário proteico de astrócitos maduros e está envolvido no controle da forma e do movimento dessas

células (BRAHMACHARI; FUNG; PAHAN, 2006). Entretanto, no sistema nervoso entérico, células neuroprogenitoras tem demonstrado expressar essa proteína glial, principalmente em condições inflamatórias (IPPOLITO *et al.*, 2015; JOSEPH *et al.*, 2011).

Em cultura primária de astrócitos cerebrais de camundongos, foi demonstrado que a expressão de GFAP é induzida pela ativação da via guanilato ciclase (GC)/monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)/proteína quinase G (PKG) por óxido nítrico (BRAHMACHARI; FUNG; PAHAN, 2006). No presente estudo, evidenciou-se que o 5-FU eleva a expressão gênica e proteica de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que foram acompanhadas por aumento dos níveis de óxido nítrico (NO), evidenciado indiretamente por elevada concentração de nitrito/nitrato no intestino.

A enzima iNOS é expressa em condições inflamatórias e utiliza L-arginina e oxigênio molecular para sintetizar NO (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Além do NO, a acetilcolina, o ATP e a serotonina (5-HT), liberados por neurônios, também podem estimular a expressão de GFAP por CGEs (BOESMANS *et al.*, 2013).

No presente estudo, o aumento da imunomarcção de GFAP em CGEs pode estar implicado em alterações da contratilidade intestinal presente tanto em modelos experimentais quanto em pacientes em tratamento com quimioterápicos, conforme evidenciado por outros estudos (JUSTINO *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2008; STEIN; VOIGT; JORDAN, 2010). De fato, as células gliais entéricas (CGEs) têm sido implicadas nas alterações da motilidade intestinal. A ablação de células gliais positivas para GFAP por uma gliotoxina resultou em diminuição da motilidade e trânsito do intestino delgado, mostrando dessa forma que as CGEs estão envolvidas na modulação de neurônios entéricos responsáveis pelo controle da atividade motora intestinal (BASSOTTI *et al.*, 2007; NASSER *et al.*, 2006).

Sob condições normais, uma pequena população de células gliais expressam GFAP e a maioria coexpressam S100 β , proteína proteolipídica-1 (PLP-1) e SOX-10 que são considerados marcadores pan-glial no SNE (RAO *et al.*, 2015). Desse modo, investigaram-se as alterações na imunomarcção e na expressão proteica de S100 β .

O aumento da imunomarcção de GFAP foi acompanhado por elevada imunomarcção e expressão proteica de S100 β ao longo do intestino delgado e do cólon. No SNC, a elevada expressão de fatores derivados da glia como GFAP e S100 β caracterizam a denominada “gliose reativa” (PEKNEY; PEKNA, 2014). De forma semelhante, porém no intestino, esse fenômeno foi observado neste estudo, sendo um achado inédito em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Nesse estudo, S100 β foi expresso por células gliais localizadas no plexo mucoso, submucoso e mioentérico do intestino, assim como observado por estudos prévios (SAVIDGE; SOFRONIEW; NEUNLIST, 2007; RAO *et al.*, 2015). No SNC, essa proteína é secretada especificamente por astrócitos. Além disso, S100 β é caracterizada como proteína de ligação ao cálcio, abundante no citoplasma, e apresenta várias ações intracelulares, incluindo regulação da homeostase do cálcio (XIONG *et al.*, 2000), controle da estabilidade de microtúbulos (SORCI; AGNELETTI; DONATO, 2000) e modulação da mitose (DONATO, 2003).

Para avaliar se o 5-FU promoveria alterações nos neurônios entéricos na mucosite intestinal, utilizou-se o marcador HuC/D para identificá-los. De forma semelhante, diversos estudos tem utilizado HuC/D como marcador pan-neuronal de neurônios entéricos (BROWN *et al.*, 2015; GULBRANSEN *et al.*, 2012; LIN; SANDGREN; EKBLAD, 2003).

Dessa forma, evidenciou-se que o 5-FU reduz a imunomarcagem de HuC/D no intestino delgado e no cólon. Esses dados sugerem que o 5-FU ocasiona redução do número de neurônios. De forma semelhante, o irinotecano também apresentou o mesmo efeito nos neurônios entéricos (NOGUEIRA, 2015), assim como a oxaliplatina (WAFAI *et al.*, 2013).

Essa redução de neurônios pode ser um dos fatores que podem contribuir para as dismotilidades do trato gastrointestinal presente na ausência de inflamação. Em outras doenças inflamatórias intestinais como doença de Crohn, colite ulcerativa e enterocolite necrotizante também foram evidenciados morte de neurônios entéricos (SAVIDGE; SOFRONIEW; NEUNLIST, 2007).

Funcionalmente, as proteínas Hu ligam-se ao RNAm de VEGF, AChE, BDNF e GAP43 (ALLEN *et al.*, 2013; ANDERSON *et al.*, 2001). De forma geral, as proteínas Hu ao se ligar ao RNAm desses mediadores regulam a estabilidade de seu RNAm, modulando e controlando a expressão temporal dessas proteínas (PERRONE-BIZZOZERO; BIRD, 2013). Devido ao seu papel na estabilização do RNAm, HuC/D normalmente é encontrado no citoplasma, porém também pode estar presente no núcleo (SAITO *et al.*, 2004).

No presente estudo, notou-se nos neurônios entéricos remanescentes de animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU que a localização de HuC/D foi predominantemente nuclear, diferente do grupo controle que foi citoplasmática. Em condições de privação de oxigênio molecular, de inibição da cadeia respiratória mitocondrial e de danos teciduais, HuC/D encontra-se predominantemente localizado no núcleo, representando um marcador de dano neuronal (DESMET; CIRILLO; VANDEN BERGHE, 2014). Assim, os dados evidenciados neste estudo quanto ao efeito de 5-FU na localização de

HuC/D mostraram que esse quimioterápico causa dano neuronal nos neurônios remanescentes, o que mostra a necessidade de mais investigações.

Em relação à redução de neurônios observada neste estudo, sabe-se que diferentes mecanismos de morte neuronal vêm sendo estudados no contexto das doenças inflamatórias intestinais.

Em cultura de neurônios do plexo mioentérico, os mastócitos, por meio dos mediadores IL-6 e PGD₂, foram capazes de induzir morte neuronal. Além desses mediadores, triptase apresentou o mesmo efeito nos neurônios via ativação do receptor ativado por protease-2 (PAR-2), receptor de membrana expresso por neurônios entéricos (SAND; THEMNER-PERSSON; EKBLAD, 2009).

Em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), altos níveis de ATP presentes no meio extracelular demonstrou ser capaz de promover, preferencialmente, a perda de neurônios nitrérgicos por ativar o receptor P2X₇ (P2X₇R), a panexina-1 (panx1) e as caspases. Enquanto que a inibição de panx1 por probenecida reduziu a perda neuronal tanto em modelo de colite induzida por DSS quanto em modelo experimental de colite recorrente (GULBRANSEN *et al.*, 2012).

Em outro estudo, a ativação de células gliais entéricas demonstrou ser suficiente para causar a morte de neurônios entéricos associada aos altos níveis de ATP liberados no meio extracelular por meio de mecanismo dependente da ativação de hemicanais de conexina-43 (Conx43), ao qual foi potencializado por elevada produção de NO catalisada por iNOS. O mecanismo estabelecido nesse estudo foi de que a liberação de purinas mediadas por panx1-P2X₇R ou fatores estressores durante a inflamação medeiam à ativação glial, levando a liberação de ATP dependente de Conx43 por células gliais e a morte neuronal por ativação de P2X₇R em neurônios (BROWN *et al.*, 2015). De forma semelhante, evidenciou-se, no presente estudo, uma importante correlação da redução de neurônios entéricos por 5-FU com o aumento da ativação de células gliais entéricas, da expressão gênica e proteica de iNOS e dos níveis de óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por esse quimioterápico.

Em cultura de neurônios do córtex cerebral, S100 β em concentração micromolar promoveu a morte desses neurônios, alterou a extensão dos dendritos e elevou a expressão nuclear de NF κ B p65 por meio da sinalização mediada por RAGE. Em adição, a inibição de RAGE por um anticorpo neutralizante preveniu a morte neuronal induzida por esses altos níveis de S100 β (VILLARREAL *et al.*, 2011).

Em modelo de doença de Alzheimer, ao qual caracteriza-se por intensa morte neuronal, foi observado aumento da expressão de RAGE em neurônios e em astrócitos do

córtex e do hipocampo de camundongos (CHOI *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo, foi mostrado que 5-FU induz aumento da imunomarcção de RAGE em neurônios entéricos do plexo submucoso e do plexo mioentérico do jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal, porém células gliais entéricas que expressam GFAP não apresentaram esse receptor.

De acordo com a concentração presente no meio extracelular, S100 β pode apresentar efeitos pró-apoptóticos ou pró-sobrevivência em neurônios. Em condições fisiológicas, S100 β é liberado em concentrações nanomolar, favorece a sobrevivência de neurônios e estimula o crescimento dos neuritos, ao passo que em concentrações micromolar ele promove inflamação tecidual e apoptose em células neuronais (VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003). Após liberado, o S100 β ativa o receptor RAGE levando a fosforilação MAPK e a ativação de NF κ B, que por sua vez promove, então, a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias e de iNOS (CIRILLO *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2001).

Vale destacar que S100 β tem sido considerada como uma citocina pró-inflamatória devido à sua capacidade de promover inflamação, aumentando a expressão gênica de iNOS, de IL-6 e de TNF- α via S100 β -RAGE-NF κ B (VILLARREAL *et al.*, 2011). Em consonância com esses dados, no presente estudo, observou-se que 5-FU elevou a expressão proteica de NF κ B p65 no intestino delgado e no cólon de animais submetidos à mucosite intestinal.

Dessa forma, os dados deste estudo demonstraram que na mucosite intestinal induzida por 5-FU há aumento de imunomarcadores de CGEs (S100 β e GFAP) e redução de imunomarcador neuronal (HuC/D), acompanhado por aumento da expressão proteica de S100 β e de NF κ B p65 no intestino delgado e no cólon.

Dentre esses achados, os altos níveis de S100 β se destacaram devido a sua relação com a ativação de NF κ B e a perda de neurônios, ambos já evidenciados no SNC. Dessa maneira, levantou-se a hipótese de que esse mediador inflamatório poderia contribuir, assim como observado no SNC, na perda neuronal observada nesse modelo. Portanto, na etapa seguinte, utilizou-se o inibidor de S100 β , a pentamidina, para avaliar a participação de S100 β /RAGE/NF κ B na gliose reativa, na morte neuronal e nos parâmetros inflamatórios associados à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O isotiocianato de pentamidina foi descoberto em 1938, como um fármaco antiprotozoário, e aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de *Pneumocystis carinii* e

de outras doenças causadas por protozoários como Leishmaniose (DRAKE *et al.*, 1985; RYBNIKER *et al.*, 2010). Nas pesquisas experimentais, vem sendo utilizado como ferramenta farmacológica para estudar o papel de S100 β em doenças que acometem o SNC, como a doença de Alzheimer (CIRILLO *et al.*, 2015). No intestino, foi utilizado pela primeira vez em modelo de colite experimental induzida por DSS (ESPOSITO *et al.*, 2012). Nesses modelos, a pentamidina é utilizada devido a sua capacidade de se ligar ao S100 β , impedindo a sua interação com o receptor RAGE (CIRILLO *et al.*, 2015).

Primeiramente, o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU foi confirmado pela avaliação da perda ponderal e análise histopatológica. Os dados deste estudo mostraram que o 5-FU induziu a perda de peso a partir do segundo dia do protocolo experimental quando comparado ao grupo controle, bem como diminuiu o comprimento das vilosidades intestinais, levou a uma sutil perda da arquitetura das criptas e promoveu intenso infiltrado de células inflamatórias intestinais, conforme evidenciado por estudos anteriores (GAO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2009; JUSTINO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013). Enquanto que a inibição de S100 β por pentamidina reduziu parcialmente a perda de peso induzida por 5-FU, assim como diminuiu o infiltrado de células inflamatórias ao longo de todo o intestino e aumentou o comprimento das vilosidades no intestino delgado.

O efeito do inibidor de S100 β na redução da perda de peso induzida por 5-FU foi associado ao aumento das vilosidades intestinais no intestino delgado. De fato, o aumento do comprimento das vilosidades promove maior contato dos nutrientes com a área absorptiva. Nesse contexto, sabe-se que em pacientes em uso de 5-FU, a perda de peso é decorrente da redução da absorção de nutrientes, bem como da diarreia e de alterações da motilidade intestinal. Em modelo experimental de mucosite intestinal foi demonstrado que o 5-FU é capaz de alterar a permeabilidade intestinal e reduzir a área absorptiva (JUSTINO *et al.*, 2014).

Nesse contexto, é importante ressaltar que o epitélio intestinal se renova a cada cinco a sete dias, e sua restauração é dependente da proliferação e da diferenciação das células tronco intestinais (BARKER, 2014). Como essas células apresentam alta atividade mitótica, o 5-FU reduz a sua proliferação e diferenciação por inibir a enzima timidilato sintetase, além de promover a sua apoptose por gerar danos ao RNA e ao DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O S100 β também pode inibir a proliferação de células epiteliais por meio da ativação do receptor RAGE expresso por células epiteliais (TURCO *et al.*, 2012; ZEN *et al.*, 2007). Conforme esses achados, no presente estudo observou-se que o 5-FU aumentou a expressão de RAGE em células epiteliais. Dessa forma esses dados sugerem que o S100 β

pode potencializar o efeito tóxico do 5-FU sobre as células epiteliais intestinais por inibir a sua proliferação. Portanto esses achados sugerem que o S100 β pode estar envolvido na redução do comprimento das vilosidades intestinais promovidas por 5-FU, devido a sua atividade antiproliferativa em células epiteliais intestinais.

Em relação à gliose reativa, S100 β demonstrou modular, por via autócrina, a expressão gênica e proteica de GFAP e de S100 β na mucosite intestinal induzida por 5-FU, uma vez que o inibidor de S100 β foi capaz de reduzir a expressão de ambas. De fato, conforme evidenciado neste estudo, o S100 β liberado por células gliais entéricas pode por via autócrina estimular a sua própria secreção. Em estudo *in vitro*, astrócitos cerebrais expostos ao S100 β passaram a expressá-lo de forma proporcional ao aumento da exposição a essa proteína (PONATH *et al.*, 2007). No entanto, evidenciou-se, no presente estudo, que a expressão de GFAP mediada por S100 β não foi diretamente pela ativação de RAGE, uma vez que as células positivas para GFAP não expressavam RAGE em sua superfície.

Além do efeito direto do S100 β na sua expressão, outras substâncias como o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e a interferon- γ (INF- γ) mostram elevar a proliferação de células gliais entéricas e a expressão gênica e proteica de S100 β , bem como aumentar a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II) e da proteína c-fos nessas células (CIRILLO *et al.*, 2011).

A partir da redução da expressão de GFAP pelo inibidor de S100 β , levantou-se a hipótese de que macrófagos poderiam estar relacionados com a ativação de células gliais e expressão de GFAP. Evidenciou-se, no presente estudo, uma relação direta na localização de GFAP e Iba-1 que são respectivamente marcadores de células gliais entéricas ativadas e de macrófagos ativados. Esse achado demonstra que macrófagos podem estar envolvidos indiretamente na expressão aumentada de GFAP por células gliais entéricas.

No SNC, Iba1 é um marcador de ativação microglial (ITO *et al.*, 2001). Iba1 é uma proteína do tipo EF-hand, altamente e especificamente expressa por células da linhagem monocítica (IMAI *et al.*, 1996). Essa proteína está envolvida nas vias de sinalização do cálcio e de Rac-1, além de ser responsável pela migração e atividade fagocítica de macrófagos/micróglia (OHSAWA *et al.*, 2000). Vale destacar que a micróglia tem efeito dual no SNC (MOORE; THANOS, 1996). A liberação de neurotrofinas e a fagocitose de microorganismos/debris deletérios compõem o seu efeito neuroprotetor, enquanto que a liberação de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias por micróglia medeiam seu efeito neurotóxico (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; LI *et al.*,

2007). Assim como a micróglia do SNC, os macrófagos intestinais também podem exercer função similar.

Conforme evidenciado no presente estudo, 5-FU induz aumento de macrófagos ativados no plexo mioentérico e S100 β participa desse processo, pois o inibidor de S100 β reduziu os macrófagos ativados no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal. Da mesma forma, o aumento de macrófagos na mucosite intestinal induzida por 5-FU já foi evidenciado anteriormente, porém utilizaram o CD11b para identificar essas células (KOON; POTHOUKAKIS, 2006).

Dois tipos de macrófagos com fenótipos distintos vêm sendo identificados em condições de homeostase e de inflamação. Macrófagos ativados por via clássica, denominados macrófagos M1, caracterizados pelo envolvimento de citocinas da resposta T helper do tipo 1 (Th1), como INF- γ , que promovem a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e contribuem para a exacerbação do processo inflamatório. Em contraste, macrófagos ativados por citocinas oriundas da resposta Th2 desenvolvem características de célula anti-inflamatória e são denominados macrófagos M2 (LUO; CHEN, 2012).

No presente estudo não diferenciamos os fenótipos de macrófagos intestinais, porém observamos aumento de células marcadas para Iba-1 na mucosa intestinal e no plexo mioentérico de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Enquanto que a inibição de S100 β reduziu a imunomarcagem de Iba-1, isto é, reduziu os macrófagos entéricos. Esses dados sugerem que a interação de S100 β com o receptor RAGE localizado nos macrófagos entéricos podem contribuir para a ativação dessas células, uma vez que Iba-1 é marcador da ativação de macrófagos. Em consonância a esses dados, porém utilizando outro marcador de macrófagos, MAC387, o mesmo inibidor de S100 β utilizado neste estudo diminuiu a infiltração de macrófagos na colite induzida por DSS (ESPOSITO *et al.*, 2012).

Os efeitos de S100 β não se restringem às CGEs, uma vez que macrófagos também expressam o receptor RAGE em sua superfície. Em cultura primária de macrófagos isolados da cavidade peritoneal, S100 β de forma dose dependente estimulou a expressão gênica de iNOS, a produção de óxido nítrico e a expressão proteica de TNF- α (ESPOSITO *et al.*, 2006).

No presente estudo, observou-se também que a redução de neurônios induzida por 5-FU foi via S100 β RAGE/NF κ B. Este dado foi evidenciado pela correlação positiva entre o aumento de neurônios e a redução da expressão de RAGE e da ativação de NF κ B em neurônios ao utilizar o inibidor de S100 β na mucosite intestinal. Assim como demonstrado

nesse estudo, porém em modelo de doença de Alzheimer, a utilização de pentamidina (inibidor de S100 β) foi capaz de reduzir a perda neuronal (CIRILLO *et al.*, 2015).

Indiretamente, identificamos neste estudo que o inibidor de S100 β reduz, de fato, a ativação de NF κ B evidenciada pela diminuição da expressão gênica de iNOS no jejuno e dos níveis proteicos de IL-6 e de TNF- α no intestino delgado e no cólon na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Conforme demonstrado por estudos anteriores, 5-FU eleva os níveis desses mediadores inflamatórios (AZEVEDO *et al.*, 2012; JUSTINO *et al.*, 2015; SAKAI *et al.*, 2013). De forma semelhante, a inibição de S100 β ou RAGE por um anticorpo neutralizante em células gliais entéricas expostas ao LPS e ao INF- γ foi capaz de inibir a expressão gênica de iNOS e reduzir os níveis de nitrito nessas células (CIRILLO *et al.*, 2011).

Conforme já mencionado anteriormente, a ligação de S100 β ao receptor RAGE, localizado em glias, macrófagos e neurônios entéricos, ativa NF κ B e culmina com a transcrição de genes que codificam o RNAm de iNOS, TNF- α e IL-6 (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009).

No presente estudo evidenciamos que RAGE encontra-se amplamente expresso por neurônios entéricos e células epiteliais intestinais na mucosite intestinal induzida por 5-FU, porém não realizamos experimentos para identificar a expressão desse receptor em células gliais entéricas positivas para S100 β e em macrófagos positivos para Iba-1. Porém, outros estudos mostraram que células gliais entéricas e macrófagos entéricos expressam RAGE (CIRILO *et al.*, 2009; ESPOSITO *et al.*, 2006).

Em consonância com os dados evidenciados neste estudo, tem sido demonstrado que IL-6 e TNF- α são mediadores importantes na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU, pois a redução desses mediadores vem sendo acompanhada por melhora das alterações histológicas induzidas por esse quimioterápico (AZEVEDO *et al.*, 2012; JUSTINO *et al.*, 2014, 2015). Entretanto, no presente estudo a redução de TNF- α e IL-6 teve importante correlação com a diminuição da ativação da via S100 β /RAGE/NF κ B com a utilização do inibidor de S100 β na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Comprovadamente, em cultura de células gliais do intestino, o estímulo pró-inflamatório intensifica a resposta inflamatória de S100 β , o qual estimula a expressão dessas citocinas, assim como pode ter sua expressão aumentada pelas mesmas (CIRILLO *et al.*, 2009).

Além disso, a redução de TNF- α e de IL-6 também ocorreu de forma concomitante com a diminuição de CGEs e de macrófagos promovidos pela inibição de S100 β na mucosite intestinal. Logo, esses dados sugerem que as CGEs e os macrófagos são

importantes fontes desses mediadores na mucosite intestinal induzida por 5-FU. De acordo com estudos anteriores, macrófagos são considerados uma importante fonte de TNF- α . De forma semelhante, as CGEs podem sintetizar TNF- α e IL-6 (RUHL *et al.*, 2001). Em cultura de células gliais entéricas, TNF- α estimulou, com a mesma intensidade de IL-1 β , a expressão de GFAP por células gliais entéricas (VON BOYEN *et al.*, 2004).

A citocina pró-inflamatória IL-6 tem demonstrado excitar neurônios mioentéricos e estimular a contratilidade intestinal (BUCKLEY *et al.*, 2014). Embora não tenhamos mostrado no presente estudo as alterações da contratilidade na mucosite intestinal induzida por 5-FU, estudo realizado por Soares *et al.* (2008) demonstrou que esse quimioterápico altera a motilidade intestinal. Estudo em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU tem demonstrado importante correlação entre os níveis de IL-6 e as alterações na motilidade (JUSTINO *et al.*, 2014, 2015).

Como S100 β tem importante relação com a produção de óxido nítrico, investigamos se o inibidor de S100 β reduziria a expressão gênica e proteica de iNOS, assim como os níveis de nitrito na mucosite intestinal induzida por 5-FU. De forma interessante, o inibidor de S100 β reduziu os níveis de nitrito, isto é, óxido nítrico, na mucosite intestinal por diminuir a expressão proteica e gênica de iNOS. Logo, evidenciamos que a via S100 β /RAGE/NF κ B tem função chave nos elevados níveis de óxido nítrico presentes no intestino de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O aumento da expressão gênica de iNOS já foi demonstrada por estudos anteriores nesse mesmo modelo experimental (AZEVEDO *et al.*, 2012). De forma semelhante, porém em modelo de colite ulcerativa induzida por DSS e em modelo de doença de Alzheimer, foi observado que pentamidina é capaz de reduzir a expressão proteica de iNOS e os níveis de óxido nítrico (CIRILLO *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2012).

Assim como neste estudo, na doença celíaca foi demonstrado que S100 β foi capaz de estimular a produção de óxido nítrico por CGEs (ESPOSITO *et al.*, 2006). Da mesma forma, foi observado que na colite ulcerativa, S100 β influenciou parcialmente (CIRILLO *et al.*, 2009).

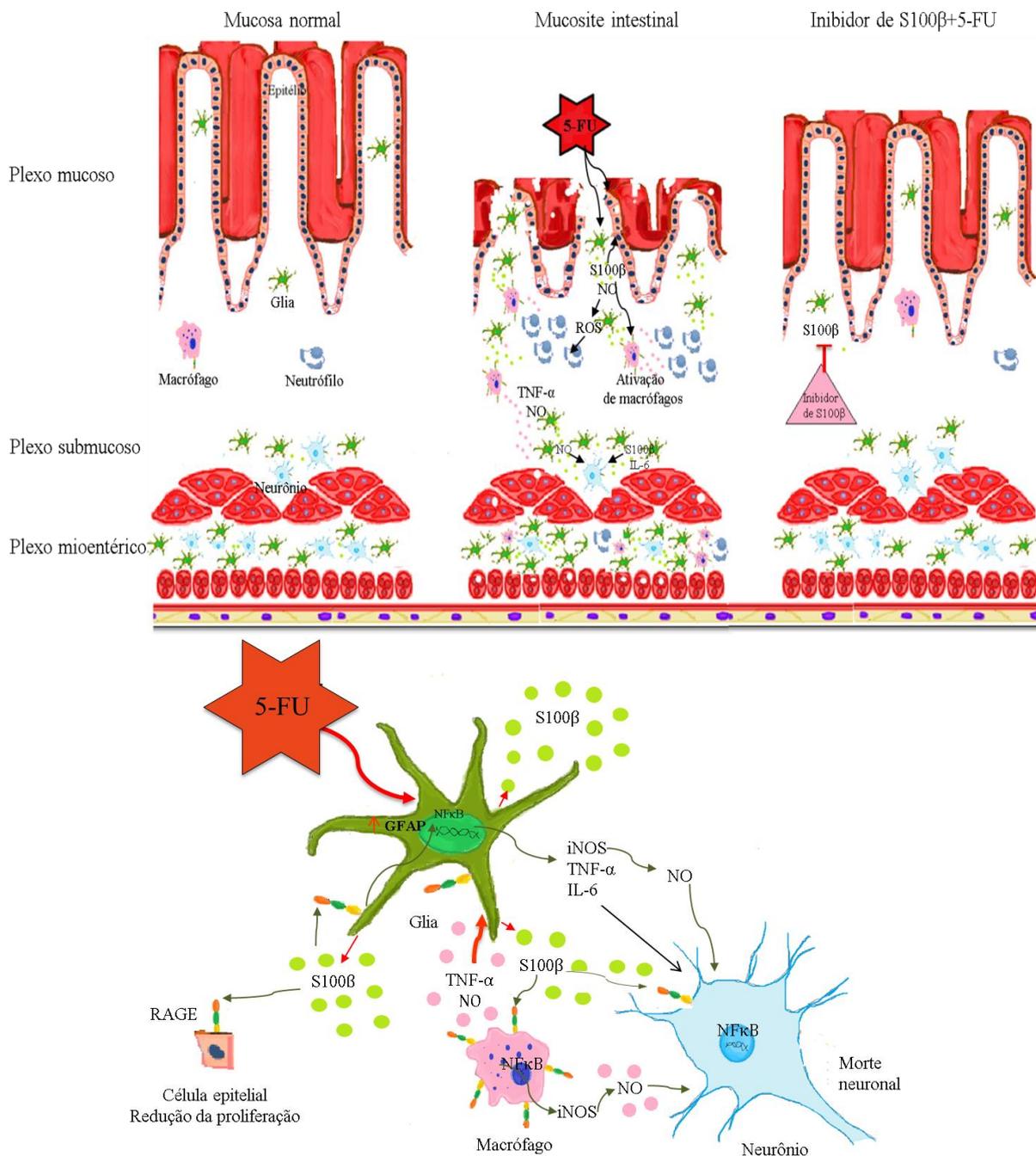
Na etapa seguinte, investigou-se se o inibidor de S100 β seria capaz de atenuar o estresse oxidativo, por reduzir a expressão gênica de iNOS, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e a expressão proteica de RAGE na mucosite intestinal induzida por 5-FU. De fato, evidenciou-se neste estudo que o inibidor de S100 β aumentou os níveis de GSH e reduziu a formação de MDA no intestino de animais submetidos à mucosite intestinal.

Conforme demonstrado em modelo de colite ulcerativa, pentamidina é capaz de reduzir os níveis de MDA (CIRILLO *et al.*, 2015).

Ao reduzir os níveis de óxido nítrico produzidos por via iNOS, S100 β diminuiu a formação de ROS e os danos no intestino, promovendo a redução da utilização de GSH que é um antioxidante fisiológico e formação de MDA, que é um produto da peroxidação lipídica. Sabe-se que o estresse oxidativo demonstrou atenuar a morte de neurônios induzidos pela ativação de células gliais entéricas (BROWN *et al.*, 2015).

Em suma, este estudo evidenciou que o 5-FU induz gliose reativa, isto é, o aumento da expressão de GFAP e de S100 β por CGEs no intestino. O S100 β liberado para o meio extracelular interage via S100 β /RAGE/NF κ B com os neurônios entéricos, promovendo a sua morte, com os macrófagos, estimulando a sua ativação e consequente liberação de TNF- α e de NO. Esses mediadores juntamente com a IL-6, contribuem para o aumento do estresse oxidativo por intensificar a resposta inflamatória, reduzindo os níveis de GSH e aumentando os de MDA. Enquanto que o inibidor de S100 β por reduzir a ativação da via S100 β /RAGE/NF κ B foi capaz de reverter esses efeitos promovidos pelo 5-FU no intestino (figura 51).

Figura 51 - Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU (modelo hipotético).



Fonte: Elaborada pela autora. Em condições fisiológicas (mucosa normal), as células gliais entéricas interagem de forma homeostática com os neurônios e as células epiteliais, contribuindo para a integridade da parede intestinal. Ao expor a mucosa intestinal ao 5-FU (mucosite intestinal), a barreira epitelial intestinal é rompida, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa com ativação de células gliais entéricas do plexo mucoso, submucoso e mioentérico. Nessas condições, as células gliais passam a liberar grandes quantidades de S100 β , que por sua vez se ligará ao receptor RAGE localizado nas células epiteliais intestinais, macrófagos e neurônios e promoverá respectivamente a redução da proliferação, a ativação de macrófagos e a morte neuronal. Além de por via autócrina, suprarregular a liberação de S100 β e a expressão de RAGE, culminando com a ativação de NF κ B, resultando na transcrição de IL-6, TNF- α , iNOS e RAGE. Por outro lado, o inibidor de S100 β é capaz de reduzir esses efeitos do 5-FU no intestino (inibidor de S100 β com 5-FU).

7 CONCLUSÕES

Com base nos achados deste estudo, conclui-se que 5-FU promove gliose reativa, morte neural, bem como aumenta a expressão proteica de RAGE e de NF κ B em neurônios entéricos e células epiteliais intestinais e estimula a ativação de macrófagos. Além disso, os dados mostrados neste estudo também evidenciaram que S100 β é um importante mediador da patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU, uma vez que a sua inibição é capaz de reduzir a expressão proteica de S100 β , RAGE, NF κ B p65 e iNOS, bem como diminuir a ativação de macrófagos e células gliais entéricas e proteger os neurônios. Além disso, a inibição de S100 β também atenua a perda de peso e as alterações histológicas induzidas por 5-FU, assim como diminui os mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e NO) e de estresse oxidativo (aumenta GSH e diminui MDA).

Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de mais estudos que permitam de fato desvendar se a morte de neurônios mediada por S100 β na mucosite intestinal induzida por 5-FU é dependente de RAGE e se esse efeito protetor neuronal da inibição de S100 β é capaz de melhorar as alterações da motilidade intestinal na fase inflamatória e na fase de cicatrização da mucosite.

Portanto, neste estudo, S100 β demonstra ser uma importante molécula alvo para o desenvolvimento de terapêuticas futuras para atenuar os danos do 5-FU sobre a mucosa intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIKHANI, M. *et al.* LPS indirectly stimulates apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 52901–52908, 2003.
- ALI, N. A.; MOLLOY, M. P. Quantitative phosphoproteomics of transforming growth factor- β signaling in colon cancer cells. **Proteomics**, v. 11, p. 3390-3401, 2011.
- ALLEN, M. *et al.* HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA. **Plos ONE**, v. 8, p. 55718e, 2013.
- AL SAFARJALANI, O. N. *et al.* Modulation of 5-fluorouracil host-toxicity and chemotherapeutic efficacy against human colon tumors by 5-(Phenylthio) acyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 58, p. 692–698, 2006.
- ANDERSON, K. D. *et al.* Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells in vitro. **Exp. Neurol.**, v. 168, p. 250-258, 2001.
- AZZOLINA, A.; BONGIOVANNI, A.; LAMPIASI, N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.**, v.1643, p. 75–8, 2003.
- AZEVEDO, O. G. R. *et al.* Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Gastroenterology**, v.1 2, n. 35, p. 1-18, 2012.
- BACH-NGOHOU, K. *et al.* Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12, 14-prostaglandin J2. **J. Physiol.**, v. 588, p. 2533–2544, 2010.
- BAMBA, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. **J. Gastroenterol.**, v. 38, p. 548–554, 2003.
- BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains –a master superfamily of interaction molecules. **Semin. Immunol.**, v. 15, p. 215-223, 2003.
- BARKER, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 19-33, 2014.
- BARLOW, A.; DE GRAAFF, E.; PACHNIS, V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. **Neuron.**, v. 40, p. 905–916, 2003.
- BASSOTTI, G. *et al.* Gastrointestinal motility disorders in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 37-44, 2014.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara (2008). 1059p.

- BERNARDINI, N. *et al.* Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 318–327, 2012.
- BELKIND-GERSON, J. *et al.* Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 25, n. 1, p. 61-67, 2013.
- BISCHOFF, S. C. *et al.* Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 296, p. 685-695, 2009.
- BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 57-69, 2007.
- BOESMANS, W. *et al.* Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 35, p. 151-160e, 2013.
- BONDURAND, N. *et al.* Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. **Development.**, v. 133, p. 2075–2086, 2006.
- BONDURAND, N. *et al.* Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. **Development.**, v. 130, p. 6387–400, 2003.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Animal models of mucositis: implications for therapy. **J. Support Oncol.**, v. 9, p. 161-168, 2011.
- BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006.
- BROWN, I. A. M. *et al.* Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 2015 (article in press).
- BUCKLEY, M. M. *et al.* Modulation of enteric neurons by interleukin-6 and corticotropin-releasing factor contributes to visceral hypersensitivity and altered colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome. **The Journal of Physiology**, v. 23, n. 592, p. 5235-5250, 2014.
- BULUT, K. *et al.* Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro-evidence for a TGF-beta- mediated effect. **Regul. Pept.**, v. 121, p. 137-143, 2004.
- CHANG, C. T. *et al.* 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

CHARPENTIER, T. H. *et al.* Divalent metal ion complexes of S100 β in the absence and presence of pentamidine. **J. Mol. Biol.**, v. 382, p. 56-73, 2008.

CHEADLE, G. A. *et al.* Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

CHOI, B. *et al.* Increased expression of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 46, p. 1-10, 2014.

CHOUAF-LAKHDAR, L. *et al.* Proliferative activity and nestin expression in periventricular cells of the adult rat brain. **NeuroReport.**, v. 14, p. 633-6, 2003.

CHOUDHURY, K.; LEIBOWITZ, M. J. Pentamidine-induced alteration in restriction endonuclease cleavage of plasmid DNA. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 21, n. 1, p. 127-134, 2003.

CICCARELLI, R. *et al.* Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S100 β protein from cultured astrocytes. **Glia**, v. 27, p. 275-281, 1999.

CIRILLO, C. *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209-1218, 2009.

CIRILLO, C. *et al.* S100 β inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

CIRILLO, C. *et al.* Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n. 9, p. 372-382, 2011.

COELHO-AGUIAR, J. M. *et al.* The enteric glia identity and functions. **Glia**, v. 63, n. 6, p. 921-935, 2015.

COSTANTINI, T. W. *et al.* Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 299, p. 1308-1318G, 2010.

COOL, J. C. *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm IGF-56.**, v. 15, p. 72-82, 2004.

CRISWELL, T. *et al.* Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. **Oncogene**, v. 22, p. 5813-5827, 2003.

DAIG, R. *et al.* Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 and interleukin-6. **Gut.**, v. 46, p. 350-358, 2000.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell.**, v. 103, p. 239–252, 2000.

DESMET, A. S.; CIRILLO, C.; VANDEN BERGHE, P. Distinct subcellular localization of the neuronal marker HuC/D reveals hypoxia-induced damage in enteric neurons. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, p. 1131-1143, 2014.

DONATO, R. *et al.* S100 β 's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 1008-1022, 2009.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60, p. 540-551, 2003.

DRAKE, S. *et al.* Pentamidine isethionate in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clinical Pharmacy**, v. 4, n. 5, p. 507-516, 1985.

DRUCKENBROD, N. R.; EPSTEIN, M. L. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. **Dev. Biol.**, v. 287, p. 125–133, 2005.

EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF- α affects the expression of GFAP and S100 β : implications for Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm.**, v. 113, p. 1709-1715, 2006.

ENGELS-DEUTSCH, M. A. *et al.* Insertional inactivation of *pac* and *rmKB* genes reduces the release of tumor necrosis factor α , interleukin-6, and interleukin-8 by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp and periodontal ligament cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5169–5177, 2003.

ESPOSITO, G. *et al.* The antiprotozoal drug pentamidine ameliorates experimentally induced acute colitis in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 277, p. 1-12, 2012.

ESPOSITO, G. *et al.* The astroglial-derived S100 β protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophages through p38 MAP kinase activation. **Life Sciences**, v. 78, p. 2707-2715, 2006.

FARLIE, P. G.; MCKEOWN, S. J.; NEWGREEN, D. F. The neural crest: basic biology and clinical relationships in the craniofacial and enteric nervous systems. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 72, p. 173–189, 2004.

FU, M., *et al.* HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. **Dev. Dyn.**, v. 228, p. 1–10, 2003.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2012.

GAO, J. *et al.* Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 axis contributes to p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil. **Cancer Biology & therapy**, v. 15, n. 8, p. 982-991, 2014.

GATZA, C. E. *et al.* Type III TGF- β receptor enhances colon cancer cell migration and anchorage-independent growth. **Neoplasia**, v. 13, p. 758-770, 2011.

GIBSON, R. J. *et al.* Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 1, p. 313-326, 2013.

GLATZLE, J. *et al.* Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 123, p. 217–226, 2002.

GULBRANSEN, B. D. *et al.* Activation of neuronal P2X₇ receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 600-605, 2012.

HAN, X. *et al.* CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 547-554, 2011.

HANSEN, M. B. The enteric nervous system I: organization and classification. **Pharmacology & toxicology**, v. 92, p. 105-113, 2003.

HEANUE, T. A.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nature Review Neuroscience**, v. 8, p. 466-479, 2007.

HEIDELBERGER, C. *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, v. 179, p. 663–666, 1957.

HEIZMANN, C. W.; FRITZ, G.; SCHAFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Front. Biosci.**, v. 7, p. 1356-1368d, 2002.

HINMAN, M. N.; LOU, H. Diverse molecular functions of Hu proteins. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 65, p. 3168-3181, 2008.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCHKE, U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 1, p. 583–590, 2001.

HSIEH, H. *et al.* S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 949-959, 2004.

HUANG, T. Y. *et al.* Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, p. 634–639, 2009.

IMAI, Y. *et al.* A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, p. 855–862, 1996.

IMREH, G. *et al.* Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger gammaH2AX-ATM-p53- mediated apoptosis. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 2951-2963, 2011.

IPPOLITO, C. *et al.* An integrated assessment of histopathological changes of the enteric neuromuscular compartment in experimental colitis. **J. Cell. Mol.**, v. 19, n. 2, p. 485-500, 2015.

ITO, D. *et al.* Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**, v. 32, p. 1208-1215, 2001.

JUNG, H. J. *et al.* Pentamidine reduces expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in DU145 and MDA-MB-231 cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 303, n. 1, p. 39-46, 2011.

JUSTINO, P. F. C. *et al.* Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Br. J. Nutr.**, v. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.

JUSTINO, P. F. C. *et al.* Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 75, p. 559-567, 2015.

KAPUR, R. P. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. **Dev. Biol.**, v. 227, p. 146-155, 2000.

KIBA, T. Relationships between the autonomic nervous system, humoral factors and immune functions in the intestine. **Digestion**, v. 4, p. 215-27, 2006.

KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, p. 55-68, 2013.

KOCH, M. *et al.* Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. **Structure**, v. 18, n. 10, p. 1342-1352, 2010.

KOON, H. W., POTHOUKAKIS, C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1088, p. 23-40, 2006.

KRETSINGER, R. H.; NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. structure determination and general description. **J. Biol. Chem.** v. 248, n. 9, p. 3313-3326, 1973.

JAFFREY, S. R. *et al.* Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nat. Cell. Biol.**, v. 3, p. 193-197, 2001.

JOSEPH, N. M. *et al.* Enteric glial cells are multipotent in culture but primarily from glia in the adult rodent gut. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 3398-3411, 2011.

LECLERC, E. *et al.* Binding of S100 proteins to RAGE: an update. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 993-1007, 2009.

LARANJEIRA, C. *et al.* Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 3412-3424, 2011.

LE DOUARIN, N. M. *et al.* Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, p. 4637-4650.

LI, L. *et al.* The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. **Brain Research**, v. 1159, p. 8-17, 2007.

LIN, Z.; SANDGREN, K.; EKBLAD, E. Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 107, p. 9-19, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LU, J. *et al.* Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 294, p. 1181–1190, 2008.

LU, H. *et al.* The chemokine CXCL9 exacerbates chemotherapy-induced acute intestinal damage through inhibition of mucosal restitution. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 141, p. 983-992, 2015.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 157-167, 2008.

LUO, X.; CHEN, S. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. **Translational Neurodegeneration**, p. 1-9, 2012.

MAGNE, N. *et al.* Concomitant twice-a-day radiotherapy and chemotherapy in unresectable head and neck cancer patients: a long-term quality of life analysis. **Head Neck**, v. 23, p. 678-682, 2001.

MARKOWITZ, J. *et al.* Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium –dependent S100 β -p53 tumor suppressor interaction. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 5085-5093, 2004.

MATSUMOTO, K. *et al.* Increased expression of 5-HT-3 and NK1 receptors in 5-fluorouracil-induced mucositis in mouse jejunum. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 12, p. 3440-3451, 2013.

MÉRIAN, J. *et al.* Development of a liposome formulation for improved biodistribution and tumor accumulation of pentamidine for oncology applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 488, p. 154-164, 2015.

MOORE, S.; THANOS, S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. **Prog. Neurobiol.**, v. 48, p.441–460, 1996.

MOREELS, T. G. *et al.* Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 280, p. 1030–1042, 2001.

NAGAHAMA, M. *et al.* L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. **Biological signals and receptors**, v. 10, n. 5, p. 336-340, 2001.

NASSER, Y. *et al.* The role of enteric glia in intestinal physiology: the effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. **Am. J. Physiol.**, v. 291, p. 827-912, 2006.

NATARAJAN, D. *et al.* Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. **Development**, v. 129, p. 5151–5160, 2002.

NEUNLIST, M. *et al.* Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 292, p. 231–241, 2007.

NOGUEIRA, L. T. **Alterações do sistema nervoso entérico e sua relação com mastócitos na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano.** Tese (doutorado em ciências morfológicas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Fortaleza, 2015.

OHSAWA, K. *et al.* Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **J. Cell Sci.**, v. 113, p.3073–3084, 2000.

OSTENDORP, T. *et al.* Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100 β . **The EMBO Journal**, v. 26, n. 16, p. 3868-3878, 2007.

PINTO, S. S. *et al.* Immunocontent and secretion of S100 β in astrocytes cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS Lett.**, v. 486, p. 203-207, 2000.

RESCIGNO, M. Don't forget to have a second brain. **Mucosal Immunology**, v.1, p. 328-329, 2008.

PEKNY, M.; PEKNA, M. "Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: cost and benefits". **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1077-1098, 2014.

PERRONE-BIZZOZERO, N.; BIRD, C. W. Role of HuD in nervous system function and pathology. **Front. Biosci.**, v. 5, p. 554-563, 2013.

PETAK, I.; TILLMAN, D. M.; HOUGHTON, J. A. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 4432–4441, 2000.

PIETSCH, E. C. *et al.* The p53 family and programmed cell death. **Oncogene**, v. 27, p. 6507-6521, 2008.

- POCHARD, C. *et al.* Defects in 15-HETE production and control of epithelial permeability by human enteric glial cells from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 150, p. 168-170, 2016.
- PONATH, G. *et al.* Autocrine S100 β effects on astrocytes are mediated via RAGE. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, p. 214-222, 2007.
- RAO, M. *et al.* Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. **Glia**, v. 63, p. 2040-2057, 2015.
- RATTHE, C. *et al.* Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. **Mediators Inflamm.**, v. 2009, 2009.
- RENCK, D. *et al.* Human uridine phosphorylase-1 inhibitors: a new approach to ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Invest. New Drugs**, v. 32, p. 1301-1307, 2014.
- RYBNIKER, J. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 522-525e, 2010.
- RUHL, A. *et al.* Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 280, n. 6, p. 1163-1171G, 2001.
- RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization. **Cancer research**, v. 14, n. 2, p. 119–123, 1954.
- SAITO, K. *et al.* TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 321, p. 291-297, 2004.
- SAKAI, H. *et al.* 5-fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. **Plos one**, v. 8, n. 1, 2013.
- SAKAI, H. *et al.* Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 71-79, 2014.
- SALTZ, L. B. *et al.* Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **The Oncologist**, v. 6, p. 81-91, 2001.
- SAND, E.; THEMME-PERSSON, A.; EKBLAD, E. Mast cell reduce survival of myenteric neurons in culture. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 2, p. 522-530, 2009.
- SASSELLI, V.; PACHNIS, V.; BURNS, A. J. The enteric nervous system. **Developmental Biology**, v. 366, p. 64-73, 2012.
- SAVIDGE, T. C. *et al.* Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1344–1358, 2007.

SAVIDGE, T. C.; SOFRONIEW, M. V.; NEUNLIST, M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 731-736, 2007.

SCHMIDT, A. M. *et al.* The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 18, n. 7, p. 949-955, 2001.

SCHREIBER, S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. **Lancet**, v. 353, p. 459-461, 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SESAKI, M. *et al.* Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 β and TNF- α . **Mediators Inflamm.**, v. 9, p. 155-160, 2000.

SINGH, G.; DEY, C. S. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. **Acta Trop.**, v. 103, n. 3, p. 172-185, 2007.

SOARES, P. M. G. *et al.* Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.

SOARES, P. M. G. *et al.* Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.**, p. 68, v. 713-720, 2011.

SOARES, P. M. G. *et al.* Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, p. 46-49, 2013.

SONIS, S. T. The biologic role of nuclear factor- κ B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, p. 300-309, 2002.

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

SORCI, G; AGNELETTI, A. L.; DONATO, R. Effects of S100A1 and S100 β on microtubule stability: an *in vitro* study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. **Neuroscience**, v. 99, p. 773-783, 2000.

SOVERI, L. M. *et al.* Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: is efficacy an impact of toxicity? **European Journal of Cancer**, v. 50, p. 2966-2974, 2014.

STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Ther. Adv. Med. Oncol.**, v. 2, n. 1, p. 51-63, 2010.

STEINKAMP, M. *et al.* Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 4, p. 117–22, 2012.

STEINKAMP, M. *et al.* Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1748-1757, 2003.

STEINKAMP, M. *et al.* GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. **BMC Gastroenterology**, v. 12, n. 6, p. 1-7, 2012.

SUAREZ-RODRIGUEZ, R.; BELKIND-GERSON, J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle. **Stem Cells**, v. 22, p. 1373–85, 2004.

TURCO, F. *et al.* Enteroglia-derived S100 β protein integrates bacteria-induced toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. **Gut**, v. 63, p. 105-115, 2014.

TURCO, F. *et al.* Enteroglia-derived S100 β protein modulates differentiation and proliferation of human intestinal epithelial cells in a RAGE-dependent manner. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 837, 2012.

VANDERWINDEN, J. M. *et al.* Distribution of the intermediate filament nestin in the muscularis propria of the human gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**, v. 309, p. 261–8, 2002.

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Res.**, v. 312, p. 149–154, 2003.

VAN ELDIK, L. J.; WAINWRIGHT, M. S. The janus face of glial-driven S100 β : beneficial and detrimental functions in the brain. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 21, n. 3-4, p. 97-108, 2003.

VANHOECKE, B. *et al.* Dark agouti rat model of chemotherapy-induced mucositis: establishment and current state of the art. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, p. 725-741, 2015.

VAN LANDEGHEM, L. *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 300, p. 976–987, 2011.

VENKATESHA, R. T. *et al.* Platelet-activating factor induced chemokine gene expression requires NF-kappaB activation and Ca2p/calcineurin signaling pathways. Inhibition by receptor phosphorylation and betaarrestin recruitment. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 44606–44612, 2004.

VILLARREAL, A. *et al.* S100 β alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- κ B signaling. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, p. 321-332, 2011.

- VON BOYEN, G. B. *et al.* Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. **Scand J. Gastroenterol.**, v. 37, p. 621–25, 2002.
- VON BOYEN, G. B. T. *et al.* Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 3, p. 1-8, 2011.
- VON BOYEN, G. B. T. *et al.* Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 222-228, 2004.
- VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron Glia Biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2011.
- WAFAI, L. *et al.* Effects of oxaliplatin on mouse myenteric neurons and colonic motility. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 1-8, 2013.
- WANG, J. *et al.* Autocrine and exogenous transforming growth factor beta control cell cycle inhibition through pathways with different sensitivity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40237-40244, 2004.
- WANG, J. *et al.* Genetic polymorphisms of RAGE and risk of ulcerative colitis in a chinese population. **Immunol. Lett.**, v. 15, p. 30027-30034, 2015.
- WANG, Z. *et al.* RAGE gene three polymorphism with Crohn's disease susceptibility in chinese an population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 9, p. 2397-2402, 2014.
- WIESE, C., *et al.* Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell Mol. Life Sci.**, v. 20, p. 2510–22, 2004.
- WILDER, P. T. *et al.* Solution structure of zinc- and calcium –bound rat S100 β as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 44, p. 5690-5702, 2005.
- WU, Z. Q. *et al.* Interleukin receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 87-96, 2011.
- WU, Z. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 339-344, 2011b.
- XIONG, S. *et al.* Neuronal hypertrophy in acute appendicitis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, n. 10, p. 1429-1433, 2000.
- YAN-BO, Y.; YAN-QING, L. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 32, p. 11273-11280, 2014.
- YAN, S. S. *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. **Nat. Med.**, v. 9, p. 287-293, 2003.

ZEN, K. *et al.* Receptor for advanced glycation endproducts mediates neutrophil migration across intestinal epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 2483-2490, 2007.

ZHANG, D. K. *et al.* Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. **J. Pathol.**, v. 222, p. 213-222, 2010.

APÊNDICE A

Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
5-FU	Eurofarma	214508-00
Isotiocianato de pentamidina	Sigma-Aldrich	P0547
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin [®])	Syntec	-
Xilazina 2% (Calmin [®])	Agener União	-

Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
2-Mercaptoetanol	Biorad	1610710
30% de Bis-acrilamida	Biorad	1610154
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
<i>Clarity Western ECL Substrate</i>	Biorad	1705060
DAB	Dako	K3468
Dako Pen	Dako	52002
Diluyente do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130-5
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako	S3023
Glicina	Biorad	1610718
High Capacity cDNA (Kit de transcriptase reversa)	Applied biosystems	4368814
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
Kit de citocinas para TNF- α	R&D Systems	DY410
Kit de citocinas para IL-6	R&D Systems	DY406
Kit de dosagem de proteína	Thermo Scientific	23227
Kit de extração do RNA	Promega	Z3105
Membrana de PVDF	Biorad	1620177
NADPH	Sigma-Aldrich	N5130
NEED	Sigma-Aldrich	222488
Nitrato redutase	Sigma-Aldrich	N7265
Papel filtro (Western Blotting)	Biorad	1703932
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
Persulfato de amônia	Biorad	1610700
<i>Precision Plus Protein Kaleidoscope</i> (Western Blotting)	Biorad	1610375
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluyente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
SDS	Biorad	1610301
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Soro de cavalo	Sigma-Aldrich	H0146-10

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Tampão da amostra (Western Blotting)	Biorad	1610737
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
Taq Man <i>Gene Expression Master Mix</i>	Applied biosystems	4369016
TEMED	Biorad	1610801
Tris Base	Promega	H5135
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TWEEN 20	Biorad	1706531

Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Tampão citrato (concentrado 10x)	29,4g de Citrato de sódio 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 6,0 Completar para 1000 mL.
Tampão citrato (concentrado 1x)	20 mL de tampão citrato 10x 180 mL de água destilada
PBS/0,2% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 50µL de triton-X-100
PBS/1% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 250µL de triton-X-100
Solução de DTNB	13,2 mg de DTNB 3,33 mL de metanol Observação: Proteger a solução da luz.
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9