



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

VIVIANE CARVALHO DA SILVA

MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM *HAMSTERS*
PERSISTE APÓS O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA VIA DOS
LEUCOTRIENOS

FORTALEZA

2017

VIVIANE CARVALHO DA SILVA

MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM *HAMSTERS*
PERSISTE APÓS O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA VIA DOS
LEUCOTRIENOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- S584m Silva, Viviane Carvalho da.
Mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters persiste após o bloqueio farmacológico da via dos leucotrienos / Viviane Carvalho da Silva. – 2017.
116 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas.
1. Leucotrienos. 2. Araquidonato. 3. 5-lipoxigenase. 4. Estomatite. 5. Fluorouracil.
I. Título.

CDD 617

VIVIANE CARVALHO DA SILVA

MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM *HAMSTERS*
PERSISTE APÓS O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA VIA DOS
LEUCOTRIENOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em cirurgia.

Aprovada em: 28 / 07 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Rabelo de Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleonice Hitomi Watashi Hirata
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Prof.^a Dra. Karoline Saboia Aragão
Centro Universitário Estácio do Ceará (Estácio-FIC)

A Deus.

Aos meus pais amados, sempre me guiando com seus exemplos e a minha família querida sempre presente.

Ao Alexandro meu amado companheiro e sua família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos Rabelo de Freitas, meu orientador e que ousou chamar de amigo, por ajudar neste caminho não somente orientando, mas acreditando em mim e incentivando desde o início da minha especialização em otorrinolaringologia e que foi o meu elo inicial para a otorrinolaringologia pediátrica e para o mestrado. Muito obrigada!

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, que tive a honra e privilégio de ter como coorientador no início deste projeto e que sempre será um dos maiores exemplos de conhecimento e amor a ciência e amor à vida. Embora sem sua presença física seus ensinamentos continuam reverberando em todos nós.

Ao saudoso professor Luc Louis Maurice Weckx que instigou meu interesse para as doenças da mucosa oral e tanto ensinou e agigantou a otorrinolaringologia em todo o Brasil.

Ao meu grande mestre professor Sebastião Diógenes Pinheiro, primeira inspiração na otorrinolaringologia e exemplo de conhecimento, ética, integridade e amor ao ensino e à medicina. Sempre terei orgulho de ser sua aluna, residente e colega de trabalho. O senhor será sempre um modelo a ser seguido.

A professora Renata Ferreira de Carvalho Leitão que com sua generosidade e conhecimento ajudou no meu primeiro contato com o modelo de mucosite, e durante toda esta pesquisa com suas sugestões e orientações inestimáveis, sempre solícita, e ajudando a indicar o melhor caminho a seguir.

A professora Gerly Anne de Castro Brito que permitiu e apoiou a confecção das lâminas e execução das análises histológicas e imunoistoquímicas no NEMPI, bem como toda a equipe deste laboratório, especialmente os técnicos, Júnior, Flávia e Socorro; os pós-graduandos Deiziane, Gildenio e Conceição da Silva Martins (Josy), cujos auxílios foram fundamentais.

A professora Karoline Saboia Aragão que contribuiu desde o estágio mais embrionário deste projeto até este momento.

Ao professor Gilberto Cerqueira Santos que tão prontamente aceitou a ajudar-me nos momentos finais deste doutorado e tanto contribuiu.

Aos alunos da graduação que me ajudaram nos experimentos iniciais, Mateus, Eduardo, Gabriel, Camila e Gabriel Carvalho.

A toda a equipe do LAFICA que me apoiou e permitiu esta pesquisa; em especial a técnica Vandinha, ao Carlos Wagner Wanderley, ao professor Roberto Lima que tanto me ajudaram e ensinaram.

Aos colegas do serviço de otorrinolaringologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo e da Clínica Otorrhinos e todos meus amigos que compreenderam minhas eventuais ausências e colaboraram para eu conseguir realizar esta pós-graduação.

Ao programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFC e as secretárias Magda e Luciene sempre tão solícitas e dando todo o suporte necessário para termos êxito nesta jornada.

A todos os membros da banca de avaliação desta tese pelo tempo dispensado e valiosas colaborações que certamente engrandecerão este trabalho.

A todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

A mucosite oral (MO) é um importante efeito adverso em pacientes submetidos ao tratamento do câncer. Sua fisiopatologia ainda não está totalmente esclarecida e causa desconforto e interrupções do tratamento contribuindo para um pior prognóstico. A relação da via da cicloxigenase-2 (COX-2) com a MO por quimioterápicos é conhecida, mas o papel dos leucotrienos (outro metabólito do ácido araquidônico e um dos atores nos processos inflamatórios da mucosa gastrointestinal) não está determinado. Foi realizado estudo experimental de MO induzida por 5-fluorouracil (5-FU), em *hamsters*, para investigar a participação, dos cisteinil leucotrienos (cys-LT) na sua fisiopatologia. O estudo teve duas partes: 1º experimento: quatro grupos controles 1) 5-FU: animais submetidos à mucosite oral; 2) SAL: animais não submetidos à mucosite oral ou controle normal; 3) TM: animais submetidos apenas trauma mecânico (escoriações nas mucosas jugais) e 4) CLX (grupo tratamento padrão): animais com MO que receberam celecoxibe (7,5 mg/kg/dia; intra peritoneal) 1 hora antes das administrações de 5-FU e, diariamente até o décimo dia do experimento) e três grupos tratamento: animais submetidos a MO e bloqueio dos cys-LT por montelucaste (MTK) (10 ou 20 ou 40 mg/Kg/dia/10 dias; via oral por gavagem). 2º experimento: os grupos controles utilizados foram os mesmos do 1º experimento, com exceção do grupo CLX e grupo tratamento com bloqueio da cascata de síntese de leucotrienos por MK886 (inibidor da síntese da 5-lipoxigenase) (3mg/kg/dia; intraperitoneal) por 4 dias, administrado 1 hora antes das administrações de 5-fluorouracil e, diariamente, até o 4º dia experimental. Em ambos experimentos os animais foram eutanasiados no 10º dia e realizadas análises macroscópicas das mucosas jugais, além de avaliação histopatológica para hematoxilina-eosina, avaliação imunoistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 para todos os grupos experimentais e dosagem de mieloperoxidase para os animais do 2º experimento. Montelucaste apresentou uma proteção parcial na dose de 40mg/kg/dia na avaliação macroscópica, mas nas demais doses administradas não houve proteção. O MK886 não protegeu macroscopicamente a evolução da MO por 5-fluorouracil. A atividade da mieloperoxidase não foi reduzida pelo uso de MK886 por quatro dias. Montelucaste ou MK886 foram incapazes de proteger os animais da MO na avaliação histopatológica por hematoxilina-eosina, e incapaz de reduzir a expressão de iNOS2, COX-2 e IL1- β . Mas montelucaste e MK886 diminuíram a expressão de TNF- α em todas as doses utilizadas. Montelucaste promoveu a diminuição da expressão de IL10 na dose 40mg/kg/dia. O bloqueio da COX-2 reduziu a expressão de iNOS2, COX-2, IL1- β e TNF- α , mas foi incapaz de promover diminuição da expressão de IL10. Diferindo da via da COX-2, a via dos leucotrienos não é relevante na fisiopatologia no modelo de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil. Entretanto, o seu efeito sobre o TNF- α sugere uma ação moduladora especificamente sobre esta citocina.

Palavras-chaves: Leucotrienos. Araquidonato. 5-lipoxigenase. Estomatite. Fluorouracil.

ABSTRACT

Oral mucositis (OM) is an important adverse effect in patients undergoing cancer treatment. Its pathophysiology is still not fully understood and causes discomfort and treatment interruptions, contributing to a worse prognosis. The relationship of the cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway with the MO to chemotherapeutic agents is known, but the role of leukotrienes (another arachidonic acid metabolite and one of the actors in inflammatory processes of the gastrointestinal mucosa) is not determined. An experimental study of 5-fluorouracil induced OM in *hamsters* was conducted to investigate the participation of cysteinyl leukotrienes (cys-LT) in their pathophysiology. The study had two parts: 1st experiment: four control groups 1) 5-FU: animals submitted to oral mucositis; 2) SAL: animals not submitted to oral mucositis or normal control; 4) CLX (standard treatment group): animals with OM who received celecoxib (7.5 mg/kg/day, intraperitoneal) 1 hour before the administration of 5-fluorouracil, and daily until the tenth day) and three treatment groups: animals with OM and montelukast (MTK) cys-LT blockade (10 or 20 or 40 mg/kg/day/10 days; orally by gavage). The controls groups used were the same as those of the 1st experiment, except for the CLX group and the treatment group had blocked the leukotriene synthesis cascade by MK886 (inhibitor of 5-lipoxygenase synthesis) (3mg/kg/day; intraperitoneal) for 4 days, given 1 hour before 5-fluorouracil administrations and daily until the 4th experimental day. In both experiments the animals were euthanized on the 10th day and macroscopic analysis of the jugal mucosa was performed, as well as histopathological evaluation for hematoxylin-eosin, immunohistochemical evaluation for iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α and IL10 for all experimental groups and dosage of myeloperoxidase for the animals of the 2nd experiment. Montelukast presented partial protection at a dose of 40mg/kg/day in the macroscopic evaluation, but in the other doses administered there was no protection. MK886 did not macroscopically protect the progression of OM by 5-fluorouracil. Myeloperoxidase activity was not reduced by the use of MK886 for four days. Montelukast or MK886 were unable to protect the animals from OM in the histopathological evaluation by hematoxylin-eosin, and unable to reduce the expression of iNOS2, COX-2 and IL1- β . But montelukast and MK886 decreased TNF- α expression at all doses used. Montelukast promotes a decrease in IL-10 expression at a dose of 40mg/kg/day. COX-2 blockade reduced the expression of iNOS2, COX-2, IL-1 β and TNF- α , but was unable to induce decreased expression of IL10. Differing from the COX-2 pathway, the leukotriene pathway is not relevant in the pathophysiology of the 5-fluorouracil induced oral mucositis model. However, its effect on TNF- α suggests a modulating action specifically on this cytokine.

Keywords: Leukotrienes. Arachidonate. 5-lipoxygenase. Stomatitis. Fluorouracil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Efeitos locais e sistêmicos da radioterapia (RT) e/ou quimioterapia (QT)	16
Figura 2	– Fisiopatologia da mucosite oral	20
Figura 3	– 5-flourouracil	22
Figura 4	– Metabólitos do ácido araquidônico	24
Figura 5	– Metabólitos do ácido araquidônico e seus inibidores	30
Figura 6	– Modelo de mucosite oral induzido por 5-fluorouracil no 1º experimento	40
Figura 7	– Modelo de mucosite oral induzido por 5-fluorouracil no 2º experimento	41
Figura 8	– Escores dos graus de mucosite oral macroscópicos	43
Figura 9	– Escores dos graus histopatológicos de mucosite oral	45
Figura 10	– Avaliação macroscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias	51
Figura 11	– Avaliação microscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias	52
Figura 12	– Avaliação macroscópica da mucosite oral após bloqueio por MK886	54
Figura 13	– Avaliação microscópica da mucosite oral após bloqueio por MK886	55
Figura 14	– Mieloperoxidase após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	57
Figura 15	– Imunoistoquímica para detecção de iNOS2 após bloqueios cisteinil leucotrienos	60
Figura 16	– Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para iNOS2 após bloqueio dos cisteinil leucotrienos	61
Figura 17	– Imunoistoquímica para detecção de iNOS2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	63
Figura 18	– Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para iNOS2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	64
Figura 19	– Imunoistoquímica para detecção de COX-2 após bloqueio do cisteinil leucotrieno por montelucaste	66
Figura 20	– Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para COX-2 após bloqueio do cisteinil leucotrieno	67

Figura 21 – Imunoistoquímica para detecção de COX-2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	69
Figura 22 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para COX-2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	70
Figura 23 – Imunoistoquímica para detecção de IL-1 β . após bloqueio do cisteinil leucotrieno	72
Figura 24 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para IL1- β após bloqueio do cistineil leucotrieno	73
Figura 25 – Imunoistoquímica para detecção de IL1- β após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	75
Figura 26 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para IL1- β após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	76
Figura 27 – Imunoistoquímica para detecção de TNF- α após bloqueio do cisteinil leucotrieno	78
Figura 28 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para TNF- α após bloqueio do cisteinil leucotrieno	79
Figura 29 – Imunoistoquímica para detecção de TNF- α após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	80
Figura 30 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para TNF- α após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	81
Figura 31 – Imunoistoquímica para detecção de IL-10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno	83
Figura 32 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para IL10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno	84
Figura 33 – Imunoistoquímica para detecção de IL10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	86
Figura 34 – Fotomicrografias representativas de imunoistoquímica para IL-10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação macroscópica e microscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias	50
Tabela 2 – Avaliação macroscópica e microscópica da mucosite oral após o bloqueio do 5-lipoxigenase	53
Tabela 3 – Expressão imunoistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno por montelukaste	59
Tabela 4 – Expressão imunoistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
CLP	Laqueadura cecal e perfuração
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cys-LT	Cisteinil leucotrienos
CysLT1R	Antagonista do receptor tipo 1 CysLT
DAB	Cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido
EPM	Erro padrão médio
FLAP	Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
Fc _{RI}	Receptor Fc de alta afinidade para a liberação de imunoglobulina E
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione - s-transferase
HE	Hematoxilina-eosina
HSCT	Transplantes de células tronco hematopoiéticas
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
iPLA2	Cálcio independente fosfolipase A2
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-11	Interleucina-11
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Via intraperitoneal
I/R	Isquemia/reperfusão
Kg	Quilograma
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do

	Câncer
LOX	Lipoxigenases
LPS-induced	Induzida por lipopolissacaride
LTs	Leucotrienos
MC	Mastócitos
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
ml	Militro
MO	Mucosite oral
MPO	Mieloperoxidase
mPGES	Prostaglantina E microsomal sintase
mRNA	RNA mensageiro
MTK	Montelucaste
Neutrophils/mg tissue	Neutrófilos/miligramas de tecido
NOS-1	Óxido nítrico sintetase-1
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear-kapa beta
ON	Óxido nítrico
OTM	Movimento ortodôntico dentário
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Solução tamponada de fosfato
PLA2	Fosfolipase A2
PGs	Prostraglandinas
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Sulfato de protamina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TM	Trauma mecânico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Mucosite por antineoplásicos	15
1.1.1	<i>Definição</i>	15
1.1.2	<i>Epidemiologia</i>	16
1.1.3	<i>Fatores de risco</i>	17
1.1.4	<i>Fisiopatologia</i>	18
1.1.5	<i>Modelo experimental da Mucosite oral induzida por antineoplásicos</i>	21
1.2	5-fluorouracil	22
1.3	Ácido araquidónico	23
1.4	Leucotrienos	28
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Locais do estudo	37
4.2	Tipo de estudo	37
4.3.	Principais fármacos utilizados no estudo	37
4.4	Animais	38
4.5	Protocolos experimentais	38
4.5.1	<i>Modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU e grupos experimentais</i>	38
4.5.2	<i>Escores macroscópicos das mucosas jugais</i>	42
4.5.3	<i>Escores microscópicos das mucosas jugais</i>	44
4.5.4	<i>Imunoistoquímica para detecção de iNOS2, COX-2, IL1-β, TNF-α, IL10</i>	46
4.5.5	<i>Ensaio de mieloperoxidase (MPO)</i>	47
4.6	Análise estatística	47
5	RESULTADOS	49
5.1	Análise macroscópica e histopatológica na coloração por H.E.	49
5.2	Avaliação da mieloperoxidase após bloqueio da 5-lipoxigenase	56
5.3	Análise imunoistoquímica para detecção de iNOS2	58
5.4	Análise imunoistoquímica para detecção de COX-2	65
5.5	Análise imunoistoquímica para detecção de IL1-β	71

5.6	Análise imunoistoquímica para detecção de TNF-α	77
5.7	Análise imunoistoquímica para detecção de IL10	82
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	116

1 INTRODUÇÃO

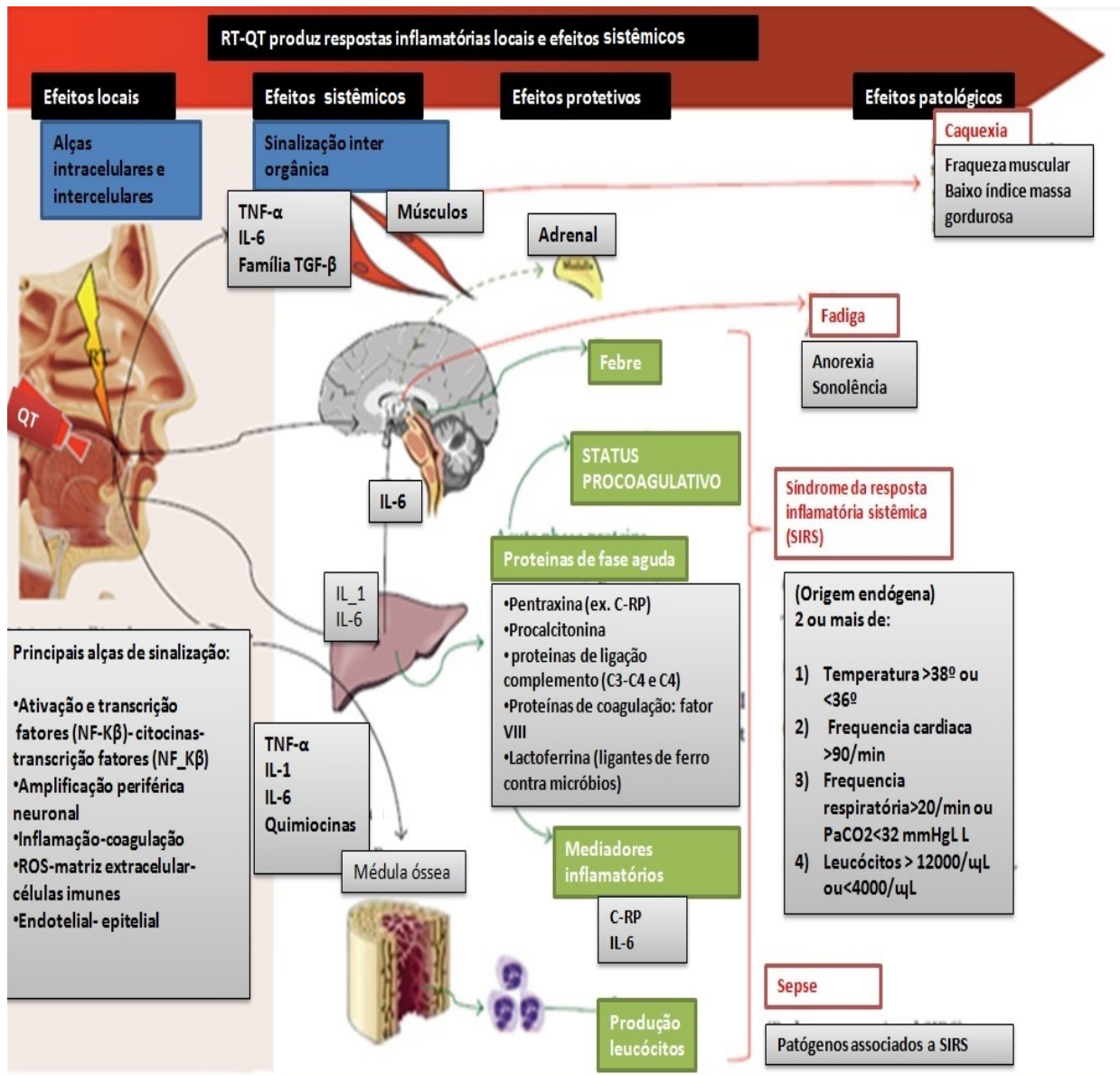
1.1 Mucosite por antineoplásicos

1.1.1 Definição

Mucosite é descrita como uma síndrome e caracteriza-se por úlceras na mucosa de todo o trato digestório, causando dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006; SONIS & FEY, 2002; SONIS, 2004ab). É bastante frequente em pacientes com neoplasias em tratamento, sobretudo nos submetidos ao uso de agentes quimioterápicos diversos, em especial os antimetabólitos e/ou, radioterapia na região de cabeça e pescoço (BALIS *et al.*, 1985; BISHOP *et al.*, 1986; CABALLERO; AUSMAN; QUEBBEMAN, 1985; ROTH *et al.*, 1991; SCULLY; EPSTEIN; SONIS, 2003, 2004; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). Esta síndrome parecia ocorrer por ação dos efeitos inespecíficos das terapias antineoplásicas danificando as células em processo de divisão celular ativo, mesmo sem serem neoplásicas. Entretanto, hoje sabe-se existir um papel efetivo da microbiota local e do tumor como contribuidores biologicamente ativos e modificadores da toxicidade desenvolvida nos tecidos. Diferenças genômicas entre os pacientes têm sido identificadas como determinantes no risco de desenvolvimento da mucosite, além de diversos achados sugerirem a geração de vários mediadores locais e sistêmicos associados aos sinais e sintomas apresentados nestes pacientes (XIAO *et al.*, 2013) (Figura 1).

O Laboratório de Farmacologia da Inflamação do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), grupo de pesquisa do qual faço parte, dedica-se a melhor compreensão da fisiopatologia da mucosite associada à terapia antineoplásica realizando diversas pesquisas com contribuições relevantes e demonstrando o papel de estressores como a cicloxigenase 2 (COX-2), o óxido nítrico (NO) e de diversas citocinas (FREITAS *et al.*, 2012; LEITÃO *et al.*, 2007, 2008; LIMA *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015; SKEFF *et al.*, 2014) na mucosite oral (MO) induzida por 5-Flourouracil (5-FU).

Figura 1 – Efeitos locais e sistêmicos da radioterapia (RT) e/ou quimioterapia (QT)



Fonte: Modificado de Russi, Raber-Durlacher e Sonis (2014).

1.1.2 Epidemiologia

Os dados sobre prevalência e incidência da mucosite são, muitas vezes, inconsistentes, devido à ausência de critérios padronizados, da localização do tumor e de diferentes regimes terapêuticos (VILLA; SONIS, 2015). A mucosite e outros efeitos adversos das terapias contra o câncer são frequentemente subnotificados (MURPHY, 2007; SONIS, 2007). Mucosite ocorre em aproximadamente 60–85% dos pacientes que se submetem a transplantes de células tronco hematopoiéticas (HSCT). De fato, a mucosite ocorre em 75 a 99% dos pacientes submetidos à

quimioterapia ou radioterapia previamente a transplantes de células hematopoiéticas, sobretudo se houver associação de ambas as terapias (BLIJLEVENS; DONNELLY; PAUW, 2000; BLIJLEVENS *et al.*, 2008; DONNELLY *et al.*, 1992; SONIS *et al.*, 2004a). Ocorre em 20–40% dos pacientes recebendo quimioterapia convencional, e em quase todos pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço (BLIJLEVENS *et al.*, 2008; SONIS, 2004a, 2004b; SONIS *et al.*, 2004a). Assim, a frequência descrita da mucosite pode variar de níveis como 30-40% até cerca de 100%, quando todos os graus de mucosite são levados em consideração (KEEFE *et al.*, 2007; MORTENSEN *et al.*, 2012). Aproximadamente 40% dos pacientes em uso de diversos agentes quimioterápicos apresentam mucosite como efeito colateral (BALIS *et al.*, 1985; BISHOP *et al.*, 1986; CABALLERO; AUSMAN; QUEBBEMAN, 1985; ROTH *et al.*, 1991; SCULLY *et al.*, 2003, 2004, 2006). Alguns autores descrevem que a associação de diferentes agentes quimioterápicos eleva a incidência deste efeito adverso de 40 para 70% (BALIS *et al.*, 1985; CABALLERO *et al.*, 1985; ROTH *et al.*, 1991; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006; VILLA; SONIS, 2015).

1.1.3 Fatores de risco

O risco para mucosite parece também depender de fatores genéticos relacionados (FILIPPI; FRANCO; RICARDI, 2006; PETERSON; KEEFE; SONIS, 2012) Estudos em animais demonstraram diversas mudanças de expressão gênica após radiação ou quimioterapia, podendo estar correlacionadas com a substituição de *endpoints* (VILLA; SONIS, 2015). Os polimorfismos dos genes promotores das citocinas influenciam a susceptibilidade dos pacientes a toxicidade induzida pela quimioterapia (SAKAMOTO *et al.*, 2006). Citocinas pró-inflamatórias (exemplo: TNF- α) e metabólitos envolvidos no estresse oxidativo são relacionados ao dano mucosal associado à terapia (LOGAN *et al.*, 2008a; ONG *et al.*, 2010). Polimorfismos nas enzimas metabolizadoras de fármacos podem estar relacionados com danos diretos às células, enquanto polimorfismos dos genes promotores das citocinas podem estar relacionados com o dano celular, e também com a recuperação celular após *stress* tóxico de agentes quimioterapêuticos (SAKAMOTO *et al.*, 2006). Estudos em pacientes com outros tipos de câncer afora o de cabeça e pescoço têm demonstrado que a via de polimorfismo de um nucleotídeo único ou grupos aumenta o risco de

mucosite (COLEMAN *et al.*, 2015; SONIS, 2013). Por exemplo, pacientes submetidos a transplantes alogênicos de células tronco hematopoiéticas (HSCT) com polimorfismo gênico único associado com TNF- α desenvolvem mucosite mais acentuada (SONIS, 2009). A Genômica aplicada poderá ser útil na determinação de critérios de predição para identificação de pacientes com risco de desenvolver mucosite (PETERSON; KEEFE; SONIS, 2012). Existem fatores de risco para mucosite oral relativos tanto à terapia quanto ao paciente. Agentes quimioterápicos de alto risco incluem 5-fluorouracil (5-FU), cisplatina, ciclofosfamida e metotrexate (VILLA; SONIS, 2015). A mucosite oral depende, também, do ciclo quimioterápico. O risco aumenta com o aumento dos ciclos, devido ao efeito cumulativo do fármaco. Múltiplos ciclos de quimioterapia mielossupressiva podem apresentar efeito cumulativo em paciente com história prévia de mucosite. Além disso, a associação quimioterapia e radioterapia aumenta notavelmente esse risco (VILLA; SONIS, 2015).

1.1.4 Fisiopatologia

Sonis *et al.* (2004b, 2013) descreveram a mucosite causada por antineoplásicos como um sistema complexo, onde ocorrem os seguintes eventos de maneira sucessiva e inter-relacionada, podendo ser considerados cinco estágios: iniciação, resposta primária ao dano (regulação positiva/ativação), sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006; SONIS *et al.*, 2004a; VILLA; SONIS, 2015). Nem sempre todos os estágios ocorrem em todos os pacientes, sendo possível um quadro clínico brando onde não aconteça a fase ulcerativa, a mais sintomático (SONIS, 1998; SONIS; FEY, 2002).

A primeira fase, iniciação, ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. O dano celular direto das células epiteliais basais acontece simultaneamente à geração de estresse oxidativo e disfunção celular e à liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SONIS *et al.*, 2004a). Suys *et al.* (2007) definiram o estresse oxidativo como desbalanço pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro componente, com consequente dano às macromoléculas biológicas. Em adição, as células danificadas pela radiação e quimioterapia liberam moléculas endógenas padrão, associadas ao dano (CRAMPs), que se ligam aos seus receptores específicos e contribuem para iniciação do segundo estágio.

Na segunda fase, assiste-se à ativação da resposta imune inata e à uma série de eventos biológicos, incluindo a ativação de pelo menos 14 vias canônicas (clássicas). A via do fator nuclear Kappa- β (NF- κ β) é uma das mais estudadas (LOGAN *et al.*, 2007; SONIS, 2002; SONIS *et al.*, 2002). A via NF- κ β pode ser diretamente ativada pela quimioterapia e/ou radioterapia, ou indiretamente, através da ligação aos receptores CRAMPs ou ROS (LOGAN *et al.*, 2008b). A ativação de NF- κ β leva a expressão de mais de 200 genes. Esses genes são associados com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , citocinas modulatórias; estressores, como a cicloxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), superóxido dismutase (SOD); e moléculas de adesão celular (LOGAN *et al.*, 2007b, 2008a). Caracteriza a segunda fase, a expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ β , verificada nas células e tecidos da submucosa (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006).

Na terceira fase enzimas como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalisam a síntese de ceramida, podem ser ativadas diretamente pela quimio e/ou radioterapia ou indiretamente, pelas ROS e TNF- α , concomitante à ativação do NF- κ β . A via da ceramida induz apoptose tanto em células submucosas, como epiteliais (MADDENS *et al.*, 2002). Além disso, nesta fase da mucosite, também ocorre destruição da fibronectina, levando a ativação de macrófagos e consequente lesão tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- α . Por outro lado, a ativação do NF- κ β pode levar a apoptose celular. O surgimento e/ou ativação de diversas moléculas, induzidas pela resposta primária, tem a capacidade de afetar e alterar, de maneira positiva ou negativa, a resposta tecidual local. Por exemplo, TNF pode realizar um *feedback* positivo na amplificação de sua resposta, e iniciar a sinalização da proteinaquinase ativada, levando à ativação de sinalização *Jun N-terminal kinase* (VILLA; SONIS, 2015). A participação do TNF- α na patogênese da mucosite oral foi demonstrada, sendo verificado que a pentoxifilina e a talidomida inibidores da síntese de TNF- α reduzem significativamente a lesão induzida por 5-FU em *hamster* (LIMA *et al.*, 2005).

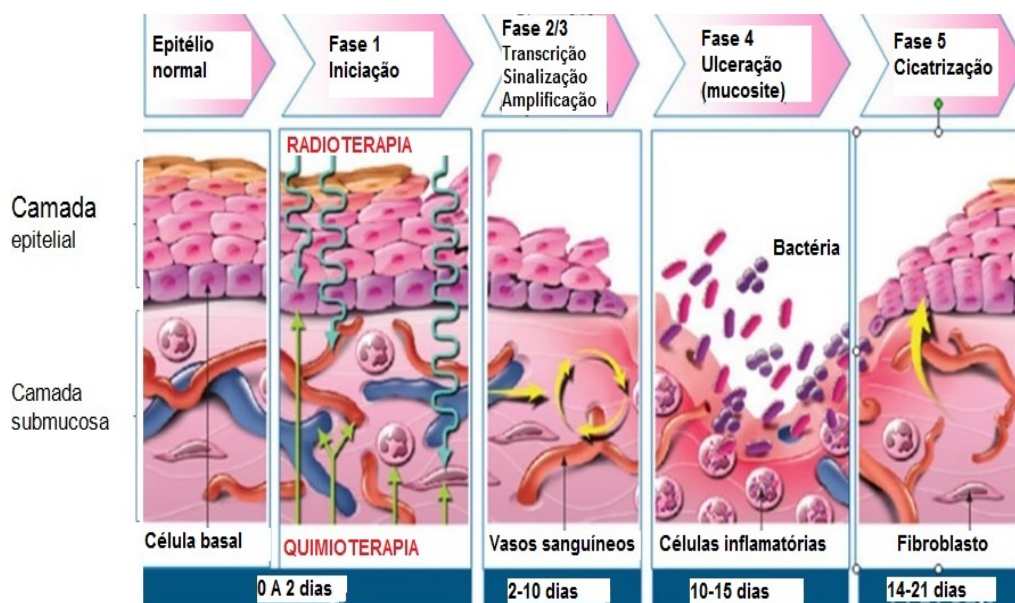
Resumidamente, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimio ou radioterapia, resulta em *feedbacks* positivos, que amplificam e prologam a injúria tecidual, via ativação de fatores de transcrição e das vias da ceramida e

caspses, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

A quarta fase, denominada ulcerativa é a mais sintomática e, frequentemente, acontece durante o período de acentuada neutropenia do paciente. A injúria e morte das células basais epiteliais, decorrente das fases anteriores, causam mudanças atróficas que determinam a deterioração e quebra da mucosa. A infecção secundária ocorre comumente nesta fase, com a colonização das úlceras por bactérias gram negativas e gram positivas. Os produtos da parede celular de bactérias podem penetrar na submucosa e estimular a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, promovendo inflamação, dor, e até mesmo o influxo sistêmico de micro-organismos e toxinas que, concomitante à neutropenia causada pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING; BODEY; KEEFE, 1992, SONIS *et al.*, 2004b; VILLA; SONIS, 2015).

A cicatrização é a quinta e última fase. É biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, que estimula a migração, diferenciação e proliferação epitelial. Observa-se, ainda, o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS *et al.*, 2004b). No último estágio, ocorre a cicatrização espontânea das úlceras com completa restituição *ad integrum* (VILLA; SONIS, 2015). Tem sido demonstrado que glutamina e seu derivado estável alanyl-glutamina aceleram a recuperação da mucosa oral lesada pelo uso de 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Fisiopatologia da mucosite oral



Fonte: Adaptado de Sonis (2004).

1.1.5 Modelo experimental da Mucosite oral induzida por antineoplásicos

Lesões ulcerativas (estomatites) dolorosas são a principal característica da mucosite oral e causam grande desconforto local. A dor intensa frequentemente impede os pacientes de alimentarem-se normalmente. Isto piora o estado nutricional, podendo levar a piora do estado geral do mesmo e necessidade de uso de sondas nasogástricas, hospitalização e, muitas vezes, interrupção temporária ou definitiva da terapia. Conseqüentemente ocorre um aumento dos custos do tratamento e comprometimento do prognóstico (SCULLY; SONIS; DIZ., 2006).

O modelo de mucosite oral proposto por Sonis *et al.* (1990) mostrou-se capaz de reproduzir experimentalmente as características encontradas na mucosite oral em humanos. Foi adaptado, pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da UFC para o estudo da mucosite oral experimental (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005), permitindo uma investigação mais detalhada do desenvolvimento dessa alteração inflamatória. Foi demonstrado nestes estudos participação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α e a importância da COX-2, inclusive com verificação do efeito protetor do celecoxibe, na fisiopatologia da MO (LIMA *et al.*, 2005). Também, foi demonstrado o papel do óxido nítrico (LEITÃO *et al.*, 2007). Verificou-se, ainda, que o 5-FU reduz a salivagem e que esse efeito é revertido pelo inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e que a glutamina e alanil-glutamina aceleram a recuperação da lesão da mucosa oral lesada por 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2008). Além de diversas outras pesquisas que contribuem para um maior conhecimento da fisiopatologia da MO (FREITAS *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015; SKEFF *et al.*, 2014). Entretanto, nosso grupo nunca havia realizado estudos sobre o papel dos leucotrienos na MO induzida por 5-FU.

Chang *et al.* (2015), através de estudo em modelo de camundongos submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, realizaram análise transcriptômica e sugeriram que, pela análise gênica estudada, o modelo de mucosite oral é um processo inflamatório complexo, com a participação de, pelo menos, vinte e três vias gênicas. Este mesmo estudo, investigando a resposta celular após a administração de 5-FU confirmou o papel importante de CD11b, IL1- β e TNF- α , além da regulação negativa de dois genes, Chi314 e Bglap-rs1, o que sugere a participação ativa desses genes na fisiologia da mucosite oral induzida por 5-FU (CHANG *et al.*, 2015).

Até a presente data, a maior parte dos trabalhos publicados em mucosite oral induzida por antineoplásicos foi realizada em *hamsters*. A seleção de *hamster* para o estudo da mucosite oral experimental é justificada pela facilidade de observação de suas mucosas jugais e por sua habilidade em tolerar doses do quimioterápico capazes de induzir mucosite sem mortalidade significativa (SONIS *et al.*, 1990).

1.2 5-fluorouracil

O 5-FU é um antineoplásico utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o colorretal, sendo de maior impacto nesse último. É uma droga antimetabólica da classe das fluoropirimidinas, foi desenvolvido nos anos 50, visando inibir processos essenciais para as células, entre os quais a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para síntese e metabolismo de novas células (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKI, 1954). A citotoxicidade do 5-FU relaciona-se a sua capacidade de incorporar fluoronucleotídeos na molécula de DNA e/ou RNA, assim como a inibição da enzima timidilato sintetase (TS), envolvida na catalisação do fornecimento de grupos timidilatos para o reparo e síntese de DNA (LONGLEY *et al.*, 2003) (Figura 3).

Figura 3 – 5-flourouracil



Fonte: Heron (2009).

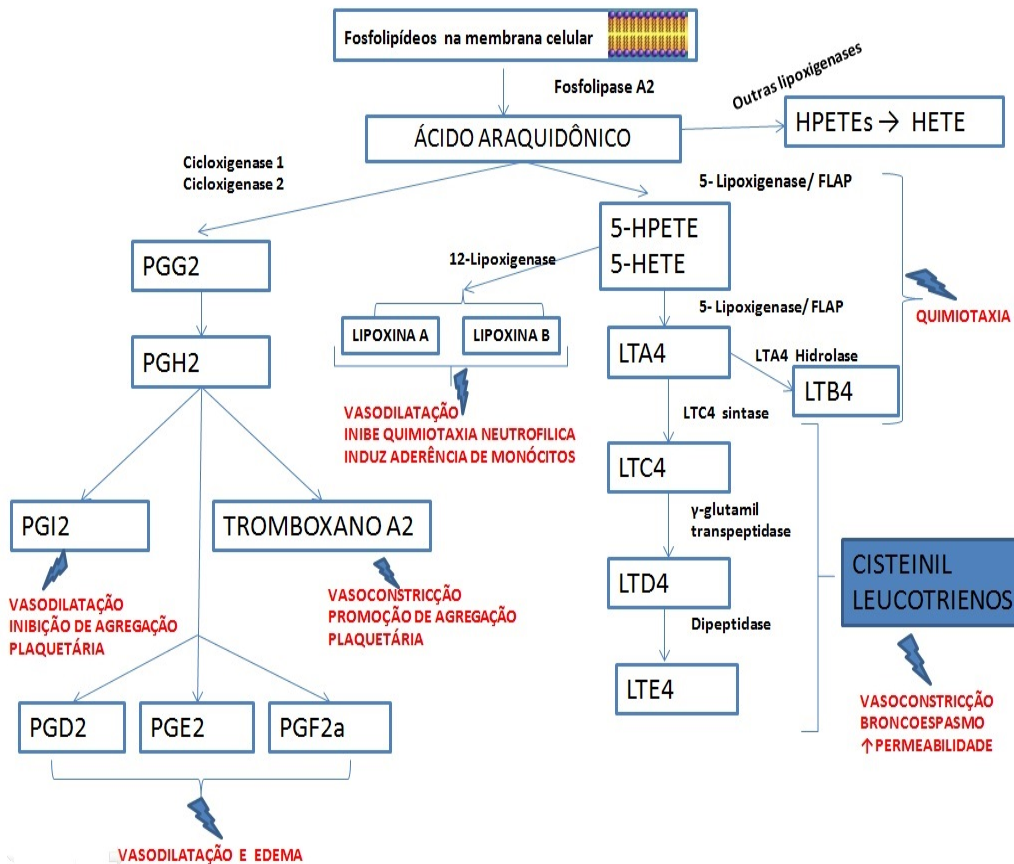
Os antineoplásicos além de agir nas células neoplásicas, podendo atuar também em células normais, e, assim, causar diversos efeitos colaterais, os quais limitam em muitas ocasiões as possibilidades terapêuticas do paciente, podendo ser necessário a interrupção, temporária ou permanente, do tratamento com a medicação quimioterápica.

1.3 Ácido araquidônico

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo essencial presente na membrana celular. Sua liberação depende de estímulos como: a alteração do fluxo sanguíneo, trauma mecânico, ação de citocinas específicas e fatores de crescimento (FUNK, 2001). Os mastócitos (MC) são células efectoras imunitárias derivadas da medula óssea. Eles são proeminentes nas interfaces entre o sistema imunitário e o ambiente externo, tais como a pele e os tratos gastrointestinal e respiratório (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002). Os MCs de roedores e humanos, ativados *in vitro* por ligação cruzada do seu receptor Fc de alta afinidade para a libertação de imunoglobulina E (Fc_{RI}), libertam histamina e proteases pré-formadas a partir de grânulos secretores. Também, geram os mediadores eicosanoides derivados do ácido araquidônico como prostaglandina D₂ (PGD₂) e cisteinil leucotrienos (cys-LT). Subsequentemente, transcrevem, traduzem e segregam várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002).

A geração de eicosanoides é iniciada por uma fosfolipase citosólica dependente de cálcio, conhecida como fosfolipase A₂ (cPLA₂). Esta libera ácido araquidônico a partir de fosfolipídios de membrana para a produção de leucotrieno A₄ (LTA₄) que dará origem aos leucotrienos B₄ (LTB₄) e aos cys-LT. A enzima 5-lipoxigenase (5-LOX), a qual atua em conjunto com a proteína ativadora de 5-LOX (FLAP), converte o ácido araquidônico sequencialmente nos intermediários instáveis ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), depois em leucotrieno A₄ (LTA₄) (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002). Nas células de mamíferos, a liberação de AA, constitui passo dose limitante na biossíntese de eicosanoides incluindo prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) e o fator de ativação plaquetária (PAF), todos atuam como potentes mediadores inflamatórios (WON *et al.*, 2005) (Figura 4).

Figura 4 – Metabólitos do ácido araquidônico



Fonte: próprio autor.

Cicloxygenase (COX)-2 e 5-lipoxygenase (5-LOX) são enzimas chaves envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, levando à formação desses importantes ácidos graxos conhecidos como eicosanoides (CIANCHI *et al.*, 2006; FUNK, 2001; LIN *et al.*, 2006; LOGAN *et al.*, 2007a). A participação desses metabólitos do ácido araquidônico na fisiopatologia do processo inflamatório e em doenças alérgicas está bem estabelecida (DUBOIS *et al.*, 1998; SAMUELSSON *et al.*, 1987). Duas isoformas da cicloxygenase foram identificadas: cicloxygenase-1 (COX-1), que é considerada de expressão constitutiva, na maioria das vezes expressa em condições basais, e COX-2, considerada primariamente como produto gene induzido, cuja síntese pode ser supra regulada por estímulo mitogênico ou inflamatório (DUBOIS *et al.*, 1998). Estudos recentes têm contestado este paradigma tradicional, indicando serem ambas as isoformas supra reguladas em estados patológicos (CHOI; LANGENBACH; BOSETTI, 2008; RUESCHER *et al.*, 1998; ZIDAR *et al.*, 2009).

A participação da fosfolipase A2 (PLA2), COX e LOX na sinalização lipídio-mediada na doença inflamatória ainda é incerta. O envolvimento dependente da via da PLA2 na regulação da expressão gênica de iNOS tem sido estudado. A geração de AA secretada pelo grupo IIA PLA2 (BAEK *et al.*, 2001) e a produção de PGs pela COX-2 são descritas como reguladores positivos para a expressão do gene que codifica a iNOS nos macrófagos (CHEN *et al.*, 1999). A ativação da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e de fosfolipase A2 independente de cálcio, (iPLA2), assim como os metabolitos da via do AA estão envolvidos na expressão do gene que codifica a enzima iNOS em células gliais, após exposição ao lipopolissacarídeo (LPS-induced) bacteriano, por ambas as vias de ativação, dependente e independente de NF- κ B. O gene que codifica a expressão de COX-2 é um gene de resposta imediata, indetectável na maioria dos tecidos normais, mas prontamente ativado após estímulos pró-inflamatórios e mitogênicos, envolvidos na inflamação e em tecidos neoplásicos (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000).

A via da COX é importante na mediação da resposta inflamatória. Ela pode ser ativada diretamente por muitos fármacos quimioterapêuticos em diversos sítios, inclusive na mucosa oral (LOGAN *et al.*, 2007a). Além disso, os agentes antineoplásicos também causam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , as quais podem amplificar ainda mais a resposta inflamatória, por levar à ativação da COX. COX-1 e COX-2 medeiam a conversão de ácido araquidônico em Prostaglandina H2 (PGH2), que é convertida em PGE2 pela PGE sintase e em PGI2 pela prostaciclina sintase (LALLA *et al.*, 2010). Considerando que tanto a PGE2 como a PGI2 causam dor, via receptores de prostaglandina nos neurônios, e que PGE2 também medeia lesão tecidual através da liberação de metaloproteinases, parece provável que as enzimas COX desempenhem um papel importante na dor e inflamação associadas à patogênese da mucosite oral, (LALLA *et al.*, 2010). De fato, vários estudos apontam para participação da via da ciclooxigenase na patogênese da mucosite oral. A radio/quimioterapia demonstrou causar elevações significativas na liberação de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , interleucina-1 alfa (IL-1 α) e interleucina-6 (IL-6), em diversos tecidos (HONG *et al.*, 1999; XUN *et al.*, 1994). Em um modelo de radioterapia em *hamster*, os níveis de RNAm para TNF- α e interleucina-1 beta (IL-1 β) no tecido da mucosa oral correlacionaram-se com a gravidade da lesão da mucosa. Além disso, os animais tratados com a citocina anti-inflamatória interleucina-11 (IL-11) demonstraram

redução significativa na lesão da mucosa acompanhada de níveis reduzidos de TNF- α e IL-1 β (SONIS *et al.*, 2000). TNF- α e IL-1 β , ambos, induzem a expressão de COX-2 (DIAZ *et al.*, 1988). A expressão de COX-2 é supra regulada na mucosa oral do *hamster* irradiado e é maior durante o pico de severidade da mucosite oral (SONIS *et al.*, 2004). Lalla *et al.* (2010) evidenciaram associação significativa entre a expressão de COX-1 e dor, na mucosite, consistente com o conceito emergente de regulação positiva também da COX-1. Tanto COX-1 como COX-2 medeiam a conversão de ácido araquidônico em PGH₂, que por sua vez pode ser convertida em PGE₂ através da prostaglandina E *microsomal sintase* (mPGES). Uma vez que a PGE₂ é conhecida por atuar nos receptores de dor nos neurônios, a descoberta de uma associação significativa entre os valores de mPGES e de dor é consistente com um papel potencial para a via da ciclooxigenase na patogênese da. A COX-2 é expressa por estimulação em células endoteliais vasculares, células inflamatórias, epitélio canceroso e fibroblastos. Como já descrito, diferentemente da COX-1, a COX-2 não é expressa em tecido saudável (LALLA *et al.*, 2010). A expressão de COX-2 é induzida por várias citocinas, fatores de crescimento, bem como por LPS, e radiação. NF- κ B é um componente chave do caminho pelo qual esses estímulos regulam para cima a COX. Além da ativação direta de NF- κ B por radiação, esse fator de transcrição é regulado, ainda, citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , resultando em maior expressão, de COX-2 e de outros mediadores inflamatórios. Conseqüentemente, o ácido araquidônico é metabolizado para produzir prostaglandinas. Um destes produtos, PGE₂, mostrou ativar a via p38 MAPK que, subsequentemente, conduz à estabilização do mRNA para COX-2 (LALLA *et al.*, 2010). É possível que isto ocorra através da ativação de NF- κ B. A radiação leva à supra regulação COX-2 em fibroblastos e em endotélio vascular da mucosa oral. Além disso, a regulação positiva da COX-2 é seguida pelo aumento da produção de novos vasos, indicativo de angiogênese. A cinética da expressão da COX-2 é diretamente proporcional ao aparecimento de úlceras orais no modelo da mucosite em *hamsters*. Portanto, infere-se que a COX-2 amplifica MO e não é um condutor desta, mas amplifica a condição (LALLA *et al.*, 2010).

Em adição as PGs, LTs são potentes mediadores lipídicos que têm papel importante na regulação funcional de células, tanto na presença como na ausência de processo inflamatório. A sintase de LTs é iniciada pelas enzimas pertencentes à família das lipoxigenases (LOX). Três isoformas de LOX têm sido identificadas: 5-

LOX, 15-LOX, e 12-LOX (NATHOO; BARNETT, G. H.; GOLUBIC, 2004). Metabólitos da 5-LOX, como o ácido 5-hidroperoxi eicosatetraenoico (5-HPETE), leucotrienos B4 (LTB4), e cys-LT, são mediadores pró-inflamatórios, que exercem efeitos em numerosas funções celulares, incluindo a contração do músculo liso, produção de muco e quimiotaxia (DAHLEN *et al.*, 2000). Foi demonstrado a contribuição para o desenvolvimento de diversos tumores humanos, como pancreático (HENNING *et al.*, 2005), esofágico (CHEN *et al.*, 2004), e de cólon (ÖHD *et al.*, 2003). Öhd *et al.* (2000.) demonstraram que o cisteinil leucotrieno D4 (LTD4) pode aumentar a sobrevivência tanto de células não transformadas como de células de câncer de colon, via ativação de seus receptores de membrana [ex.: O receptor CysLT1 (CysLT1R)].

A literatura relata a supra regulação simultânea de COX-2 e 5-LOX no câncer colorretal (ÖHD *et al.*, 2003; YE *et al.*, 2005). O fato dessas duas enzimas metabólicas do ácido araquidônico, COX-2 e 5-LOX, apresentarem semelhantes mecanismos de ações, sugere que o bloqueio de uma dessas vias, pode resultar na ativação da outra. O questionamento é se a administração de inibidores da COX-2 pode levar a um desvio ou *shunt* do metabolismo do ácido araquidônico em direção à via da 5-LOX com um aumento da produção de leucotrienos tumorigênicos (CIANCHI *et al.*, 2006). Ye *et al.* (2005) mostraram que a inibição da COX-2 pode levar a um desvio do metabolismo do ácido araquidônico em direção a via dos leucotrienos durante a tumorigênese colônica promovida por tabagismo, enquanto a supressão da 5-LOX não resultou na ativação da via de COX-2.

Dados de imunistoquímica e *Western blot* claramente demonstram que as duas maiores vias metabólicas do ácido araquidônico, ou seja, COX-2 e 5-LOX encontram-se simultaneamente supra reguladas no câncer colorretal humano e foi observado que os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e Cys-LT estão significativamente mais aumentados nos tecidos tumorais que na mucosa de colon (CIANCHI *et al.*, 2006). Encontrou-se que a inibição tanto da 5-LOX ou COX-2 leva a um desvio do metabolismo do ácido araquidônico em direção a outra via enzimática ativa. Ainda mais interessante, foi observado que simultaneamente os inibidores das vias COX-2 e 5-LOX podem prevenir, ambos, o aumento da PGE2 mediado por MK886 (inibidor da 5-LOX) e o aumento mediado pelo celecoxibe dos níveis de Cys-LT nas duas linhas celulares neoplásicas (HT29 e Caco-2) (CIANCHI *et al.*, 2006). Ou seja, a inibição de um braço da cascata do ácido araquidônico pode resultar em amplificação de um outro braço, com potenciais efeitos indesejáveis. Em particular, a

inibição da via da COX-2 pode determinar a ativação da 5-LOX com aumento da produção de leucotrienos, tais como LTD₄ (CIANCHI *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado o papel do cys-LT, através de seus receptores, na indução da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e secreção de proteínas por mastócitos do cordão humano (hMCs) que não envolve exocitose. Uma implicação chave destes achados é que os cys-LT, produzidos e expressos por eosinófilos, macrófagos e mastócitos, podem induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , por mastócitos, mesmo sem evidência de degranulação desta célula (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002).

1.4 Leucotrienos

O nome “leucotrieno” origina-se do fato de sua molécula ter sido inicialmente isolada de leucócitos e sua estrutura ser formada por três ligações duplas conjugadas de carbono ou *triene structure* (HAY, 1997).

Como explicado, anteriormente, as prostaglandinas, e os leucotrienos são sintetizados a partir do ácido araquidônico. A 5-lipoxigenase catalisa a conversão em dois passos do ácido araquidônico para leucotrieno A₄ (LTA₄). O primeiro passo consiste na oxidação do ácido araquidônico para o instável intermediário ácido 5-hydroperoxyeicosatetraenoico (5-HPETE), e o segundo passo é a desidratação de 5-HPETE para forma LTA₄. Estes eventos são as primeiras reações em direção a síntese de todos os leucotrienos e representam controle crítico na produção destes. A 5-Lipoxigenase apresenta estruturação complexa e mecanismos regulatórios para permitir realizar este papel altamente especializado. A função enzimática, estrutura proteica e gênica são cofatores essenciais em muitos mecanismos regulatórios de sua expressão (SILVERMAN; DRAZEN, 1999).

O passo limitante na síntese dos leucotrienos é a enzima 5-lipoxigenase. Existe um número de diferentes tipos de leucotrienos, mas eles podem ser convenientemente subdivididos em duas principais subclasses: leucotrieno B₄ (LTB₄) e os peptídeos-leucotrienos ou cys-LT (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) (WALLACE; MA, 2001).

A síntese dos leucotrienos ocorre principalmente nas células epiteliais imunológicas e células endoteliais. Na mucosa, os mastócitos são a principal fonte de cys-LT, enquanto os neutrófilos parecem ser a fonte predominante de

leucotrienos B₄. LTB₄ é um quimiotático muito potente para neutrófilos. Ele tem pouco ou nenhum efeito na permeabilidade vascular e no fluxo sanguíneo mucosal, mas pode promover recrutamento leucocitário da vascularização através de supra regulação da expressão de integrinas (CD11/CD18) nessas células. LTB₄ pode também estimular a liberação de metabólitos de reações oxidativas dos neutrófilos, que contribuem significativamente para a lesão tecidual na inflamação da mucosa (WALLACE; MA, 2001). Os leucotrienos são conhecidos por serem fatores importantes em uma variedade de doenças sistêmicas e locais e doenças alérgicas/inflamatórias (NOGUCHI; OKUBO, 2011).

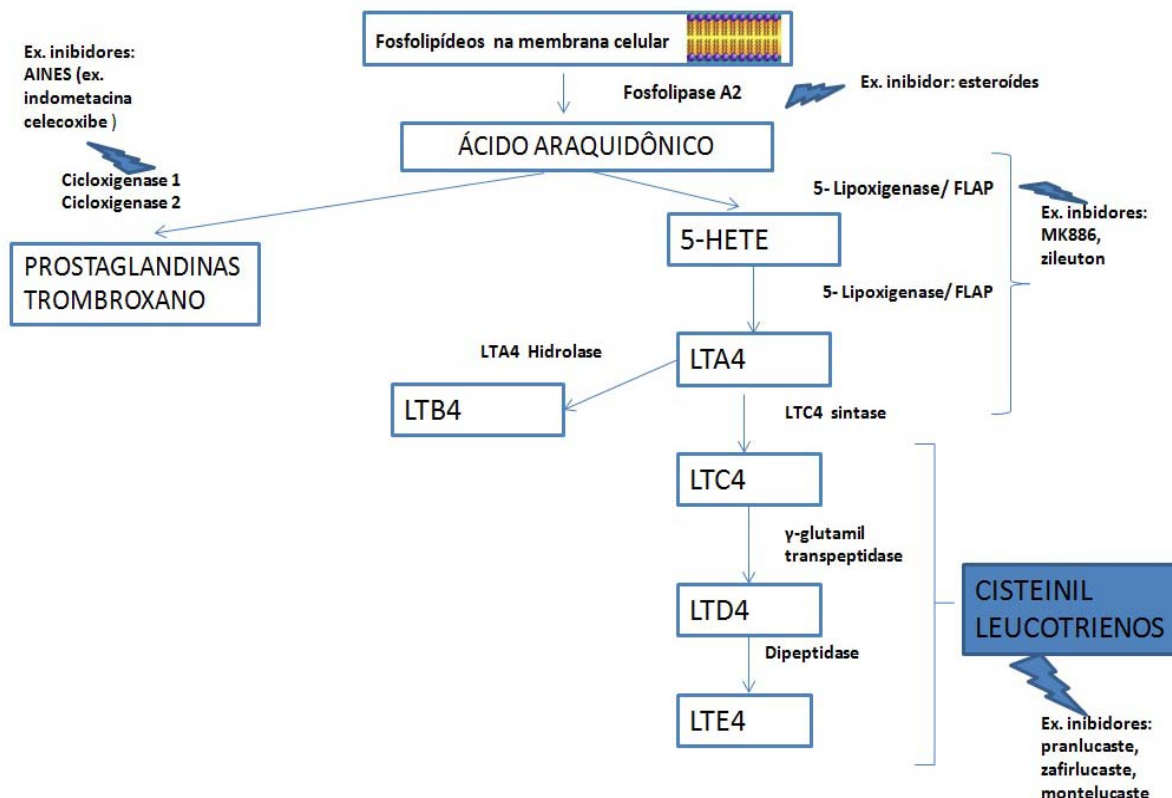
Chen, Restivo e Reis (2001) estudaram o papel dos leucotrienos na encefalite causada pelo vírus da estomatite vesicular aguda em camundongos, em um período de 14 dias, através do uso de Zileuton (um antagonista da enzima) e em camundongos geneticamente modificados, sendo *knockout* para 5-Lipoxigenase (5-LOX). Eles observaram que a inibição ou deleção de 5-LOX resultou em: alteração no processo de infiltração precoce pelos neutrófilos no sistema nervoso central (SNC) durante a infecção viral; menor expressão de óxido nítrico sintetase-1 (NOS-1); maiores títulos virais 1 dia após a infecção viral; e aumento da quebra da barreira sanguínea encefálica. Sugerindo terem, os leucotrienos, um papel importante na imunidade durante a patogênese do vírus da estomatite viral vesicular e que são benéficos ao hospedeiro no controle precoce da replicação viral.

Nakamori *et al.* (2010) estudaram o papel do cys-LT na resposta ulcerogênica gástrica aguda à isquemia/reperfusão (I/R) em camundongos. A gravidade da lesão gástrica induzida por I/R foi reduzida pela administração prévia de pranluaste (antagonista do receptor tipo 1 Cys-LT (CysLT1R), assim como, por TMK688 (inibidor da 5-lipoxigenase). Ao contrário, estas lesões foram agravadas pelo tratamento prévio com indometacina e esta resposta foi anulada pela administração concomitante de TMK688 ou pranluaste. A expressão gênica de CysLT1R, mas não de 5-LOX estava regulada para cima no estômago após I/R, mas ambas expressões foram aumentadas sob I/R na presença de indometacina. A expressão de CysLT1 é supra regulada no estômago na I/R; Cys-LTs tem um papel na patogênese da lesão gástrica induzida por I/R através da ativação de CysLT1R. O agravamento pela indometacina dessas lesões pode ocorrer pelo aumento da produção de Cys-LT e pela regulação para cima da expressão de 5-LOX, em adição a diminuição de prostaglandina (NAKAMORI *et al.*, 2010).

O papel dos leucotrienos como mediadores na inflamação da mucosite oral ainda é pouco definido, entretanto, já existem pesquisas que procuram evidenciar sua atividade no sistema digestório (NAKAMORI *et al.*, 2010; SENER *et al.*, 2005; SKLYAROV; PANASYUK; FOMENKO, 2011). Estudos demonstram, por exemplo, que a 5-LOX apresenta uma base celular para a síntese aumentada de leucotrieno B₄, como observado na mucosa colônica e retal dialisada de pacientes com doença inflamatória intestinal ativa, o que contribui para o influxo de neutrófilos e injúria colônica (JUPP *et al.*, 2007).

Os antileucotrienos, drogas usadas na asma e rinite, incluem: inibidores da 5-LOX, que inibem a biossíntese de leucotrieno; zileuton (Zyflo), usada principalmente no EUA. Antagonistas do CysLT₁: montelucaste (Singulair), zarfirlucaste (Accolate), e o pranlucaste (Ono) que é usado sobretudo no Japão. Ainda em investigação, indisponíveis para o atendimento clínico, existem os conhecidos como inibidores da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) que inibem a 5-LOX ativando proteínas (MASTALERZ; KUMIK, 2010) (Figura 5). Exemplos de inibidores FLAP são o MK886, MK571 e Bay x 1005 (Figura 5).

Figura 5 – Metabólitos do ácido araquidônico e seus inibidores



Fonte: Modificado de Dempsey (2000).

Montelucaste (MTK) e zafirlucaste são os dois antagonistas do receptor dos leucotrienos mais utilizados pelo mundo. Eles dividem algumas propriedades farmacocinéticas incluindo absorção oral rápida (pico de concentração plasmática com três horas), próximo à máxima (99%) de conjugação proteica plasmática, e após extensiva biotransformação hepática, excreção principalmente na bile. A meia vida terminal das duas drogas é de 10 e 5 horas, respectivamente (DEMPSEY, 2000). Zafirlucaste pode inibir as isoenzimas hepáticas CYP2C9 e CYP3A4 do citocromo microsomal P450 em concentrações terapêuticas, que clinicamente pode resultar em interações medicamentosas usando estas enzimas. Similarmente como MTK é metabolizado pela CYP3A4, deve-se ter cuidado particularmente em crianças quando o MTK é coadministrado com indutores dessa enzima. Outro ponto clinicamente relevante é a coadministração de comida com o zafirlucaste que pode reduzir biodisponibilidade em aproximadamente 40%, o que significa que pacientes devem evitar esta medicação logo antes ou depois de alimentarem-se, pois pode ter implicações na resposta terapêutica do paciente (DEMPSEY, 2000).

Os antagonistas do receptor dos leucotrienos têm sido usados com sucesso em condições como a asma e a rinite, que frequentemente coexiste nos pacientes asmáticos. Seu uso também pode ser indicado em condições como dermatite atópica e gastroenterite eosinofílica (DEMPSEY, 2000). Várias pesquisas têm tentado demonstrar um papel preventivo secundário em outras condições inflamatórias ou patológicas. Citaremos alguns destes estudos a seguir.

Foram demonstrados, em um estudo de coorte, dados indicativos para um potencial papel do montelucaste com efeito secundário preventivo para doença cardiovascular devido sua ação na inibição da via do leucotrieno associada ao risco cardiovascular aumentado (INGELSSON; YIN; BÄCK, 2012).

Avaliando os efeitos do montelucaste na inibição das mudanças induzidas na bexiga por sulfato de protamina (PS) em ratos *Wistar* fêmeas, foi observado que o MTK parece ter uma função protetora neste modelo de injúria da bexiga, através de seus efeitos anti-inflamatórios (ÇETINEL *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou um possível benefício do MTK nos efeitos decorrentes da cistite intersticial (TRAUT *et al.*, 2011).

Pesquisas sugerem que a efetividade do uso sistêmico do montelucaste é similar ao da prednisona em pacientes com estomatite aftosa recorrente. A ausência de efeitos adversos sérios do MTK faz dele um candidato a ser uma droga de

escolha nos casos onde o tratamento farmacológico da estomatite aftosa recorrente é necessário por um período prolongado (FEMIANO *et al.*, 2010).

Coskun *et al.* (2011) estudaram os efeitos do montelucaste nas enzimas antioxidantes e citocinas pró-inflamatórias no coração, fígado, pulmões e rins em modelo de sepse induzida em rato por laqueadura cecal e perfuração (CLP). Os ratos tratados com 10 e 20mg/kg de MTK apresentaram decréscimo significativo das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 após CLP. O nível tecidual de peróxido lipídico aumentou no pulmão, coração, fígado e rim após CLP-sepse induzida, e a atividade tecidual da mieloperoxidase (MPO) aumentou nos pulmões, coração e fígado. MTK atenuou essa elevação em todos estes tecidos exceto no rim, de maneira dose dependente. Os níveis de atividade da glutatona e superóxido dismutase (SOD) foram significativamente aumentados nos tecidos do pulmão, fígado e rim após o tratamento com MTK. A mortalidade após CLP foi potencialmente reduzida com o tratamento com MTK. Os tecidos do pulmão e rim foram os mais protegidos pelo MTK na condição de sepse. Foi sugerido que MTK reverte à reação inflamatória sistêmica relacionada à sepse polimicrobiana, e, portanto, reduz a falência sistêmica de órgãos (COSKUN *et al.*, 2011).

Sener *et al.* (2005) analisaram os possíveis efeitos protetores dos bloqueadores do receptor de leucotrieno na lesão gástrica por alendronato. Em seu estudo foram administrados, em ratos, 20mg/kg de alendronato através de gavagem, por 4 dias, associados ou não, a tratamento prévio com montelucaste (10mg/kg). No último dia, após a administração da droga, foi realizada ligação do piloro e 2 horas depois, os ratos foram eutanasiados e o estômago, fígado e rins coletados. A acidez gástrica, índices de lesão tecidual da úlcera gástrica e níveis de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, e glutatona (GSH), um antioxidante chave, assim como a atividade da MPO, um marcador indireto de infiltração tecidual neutrofilica, foram determinados, e a aparência histológica do estômago, fígado e rins foram estudados. Foi verificado que a administração crônica oral de alendronato induz danos gástricos significantes, aumentando a atividade da mieloperoxidase e peroxidação lipídica, enquanto os níveis teciduais de glutatona são reduzidos. De maneira semelhante, no grupo de animais tratados com alendronato, os níveis teciduais de atividade de MDA e MPO do fígado e rins estavam aumentados e GSH estava diminuído. O tratamento com MTK preveniu a lesão, bem como, as mudanças nos parâmetros bioquímicos em todos os tecidos estudados. Os achados

sugerem que o alendronato é um irritante local que causa inflamação através da infiltração por neutrófilos e a lesão oxidativa nos tecidos e que o MTK tem uma atividade protetora contra esses danos através de seus efeitos anti-inflamatórios (SENER *et al.*, 2005).

Em estudo comparando montelucaste, lansoprazol, famotidina e ranitidina, em lesões gástricas agudas induzidas por indometacina, todos reduziram o desenvolvimento de lesão, com esta redução ocorrendo em uma magnitude maior com o MTK, famotidina e lansoprazol que com ranitidina. Tanto MTK como ranitidina aliviaram aumentos no nível de atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) resultantes da injúria gástrica. MTK e ranitidina preveniram as reduções nos níveis de GSH e as atividade da SOD e enzimas glutathione redutase (GR) causadas pela administração de indometacina e todas as doses de MTK, lansoprazol e ranitidina diminuiriam a amplificação da atividade de MPO resultante das injúrias gástricas. Esses resultados sugerem que os efeitos gastroprotetores do MTK nas ulcerações induzidas pela indometacina podem ser atribuídos pelo seu efeito na melhora da lesão oxidativa e atividade da MPO (DENGIZ *et al.*, 2007).

Uma análise retrospectiva preliminar observou que pacientes que faziam uso de antagonista de longa duração do receptor do leucotrieno apresentaram baixa incidência de alterações endoscópicas da esofagite (LEE *et al.*, 2012).

De Maeyer *et al.* (2011) sugeriram o uso do montelucaste como adjuvante na terapia de pacientes com gastroenterite eosinofílica, ressaltando que, apesar de não substituir a terapia com corticosteroides, a revisão da literatura demonstra ser uma droga eficiente no tratamento da gastroenterite eosinofílica; seu menor custo e baixo número de efeitos colaterais e eficiência transformam o MTK em alternativa interessante em casos relapsos ou dependentes de corticosteroides.

2 JUSTIFICATIVA

A prevalência de câncer tem aumentado e sabe-se que a terapia antineoplásica pode causar diversos efeitos colaterais, que ocasionam grandes prejuízos ao resultado do tratamento oncológico. A mucosite oral, um dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico com 5-FU e outros antineoplásicos, em diversas ocasiões é um fator limitante em vários pacientes em tratamento contra o câncer, levando algumas vezes a interrupção da terapia. Ocorre, também, risco aumentado de sepse devido a imunossupressão, decorrente do tratamento quimioterápico, em concomitância com as úlceras existentes na mucosite oral. A busca de uma melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da mucostite induzida por quimioterápicos é importante para, assim, ser possível definir uma estratégia terapêutica para minimizar ou mesmo abolir esse efeito colateral, o qual tanto interfere e prejudica o paciente em terapia contra o câncer.

O grupo de pesquisa do LAFICA, do qual faço parte e que estuda a fisiopatologia da MO, tem bem estabelecido em suas pesquisas a relação da via da COX-2 com a mucosite oral induzida por quimioterápicos. Entretanto, não havia, até então, estudado a participação da via do leucotrieno (outro metabólito do AA) na MO induzida por 5-FU. De fato, após extensa revisão da literatura, não foram encontrados estudos sobre o papel dos leucotrienos na mucosite oral por antineoplásicos. Os leucotrienos têm sido apontados como um dos atores nos processos inflamatórios da mucosa intestinal. Sabe-se que a mucosite oral e intestinal apresentam similaridades em sua fisiopatologia. Portanto, saber qual a efetiva participação dos leucotrienos nos processos inflamatórios da mucosa oral merecem, também, a nossa atenção no desafio de elucidar os seus mecanismos fisiopatológicos e possíveis métodos de prevenção e controle.

Considerando, ainda, que os bloqueadores dos receptores de leucotrienos é uma classe de drogas ainda em investigação quanto a sua total aplicabilidade clínica, uma pesquisa detalhada sobre suas potenciais aplicações, objetivando a diminuição do dano tecidual em diversas lesões causadas pelo processo inflamatório, onde a via da lipoxigenase/leucotrieno exerce um papel chave ou adjuvante deve ser considerado.

A proposta deste trabalho, portanto, foi de realizar um estudo experimental de mucosite oral induzida por 5-FU, em *hamsters*, para investigar a participação, dos cisteinil leucotrienos na sua fisiopatologia, utilizando como ferramentas farmacológicas: montelucaste (MTK), bloqueador do receptor de cisteinil leucotrienos (cys-LT), e o MK-886, inibidor da 5-lipoxigenase (5-LOX), avaliando parâmetros inflamatórios como as citocinas (IL1 β , TNF α e IL10), estressores (iNOS e COX-2) e MPO.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a participação dos cisteinil leucotrienos (cys-LT), através administração de montelucaste (MTK), antagonista de receptores de leucotrieno, e de MK886, inibidor da síntese de leucotrienos, na fisiopatologia no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU, em *hamsters*.

3.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos do bloqueio do cys-LT por MTK nas alterações inflamatórias associadas à mucosite oral induzida por 5-FU, através da avaliação dos seguintes aspectos:

- a) Macroscópico e histopatológico utilizando escores previamente padronizados do grau de lesão na mucosa.
- b) Imunomarcagem de iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 nas mucosas orais.
- c) Investigação da participação da 5-Lipoxigenase através do bloqueio de sua síntese por MK886 administrado nos primeiros 4 dias do modelo experimental, a fim de definir se os leucotrienos são mediadores inflamatórios relevantes na fisiopatologia da mucosite oral induzida por 5-FU.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais do estudo

O estudo foi realizado na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) e no Núcleo de Estudos em microscopia e Processamento da Imagem (NEMPI).

4.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo experimental, com avaliações quantitativa e qualitativa dos dados amostrais.

4.3 Principais fármacos utilizados no estudo

- 5-fluorouracil

Ampola de 10 ml (25 mg/ml) – Fluoro-acil® (Roche, Rio de Janeiro, Brasil). A manipulação foi feita em capela com exaustor e com a utilização dos equipamentos de proteção individual (óculos, luvas, gorro, máscara, avental).

- Montelukaste

(Singulair®, Merck Sharp and Dohme, Hoddesdon, HRT, Reino Unido).

- MK 886

MK-886 *sodium salt hydrate*- (M2692 SIGMA) >98% (HPLC) -Synonym: 3-[3-*tert*-Butylthio-1-(4-chlorobenzyl)-5-isopropyl-1H-indol-2-yl]-2,2-dimethylpropionic acid, sodium salt hydrate.

- Celecoxibe

(Celebra ®, cápsulas com 200mg, Pfizer, São Paulo, Brasil).

- Tribromoetanol 2,5%

(25mg/ml)

4.4 Animais

Foram utilizados 84 *hamsters* machos *Golden sirian* (*Mesocricetus auratus*), com massa corpórea entre 100 a 150 gramas, fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*, sendo a alimentação balanceada à base de sementes e cereais, como aveia, milho, semente de girassol e abóbora. Os *hamsters* ficaram alojados em caixas de polipropileno, em número de, no máximo, cinco animais por caixa, e foram mantidos sob condições de temperatura adequada e ciclos claro escuros controlados durante os experimentos.

Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número, o sofrimento e o estresse dos animais utilizados. Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa em animais (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC para uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado por este comitê sob o título: Estudo da participação de leucotrienos e sua relação com óxido nítrico e citocinas na patogênese da mucosite oral experimental induzida por quimioterápicos antineoplásicos (processo nº 033/2012) (Anexo A).

4.5 Protocolos experimentais

4.5.1 Modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU e grupos experimentais

O modelo de mucosite oral experimental utilizado foi o descrito por Sonis *et al.* (1990) e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, UFC (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005).

A mucosite oral foi induzida em *hamsters* através da administração de doses de 60 e 40mg/kg de 5-FU, nos dias 1 e 2, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.). No 4º dia, após anestesia com tribromoetanol 2,5% (250mg/kg ou 1ml/100g do peso do animal; i.p.), foram realizadas escoriações (ranhuras) nas mucosas jugais do lado direito, com o auxílio de agulha de ponta romba. Este procedimento (trauma mecânico) teve como finalidade potencializar a mucosite, a fim de reproduzir os sinais clínicos de irritações mecânicas crônicas que,

comumente, acometem a cavidade oral de humanos, como restaurações e/ou próteses mal adaptadas. As ranhuras foram feitas em ambas as faces da mucosa jugal direita, dispostas em número de três na horizontal, e cruzadas por mais três. A eutanásia dos animais, foi realizada no 10º dia experimental, que corresponde ao pico inflamatório observado nesse modelo experimental (LIMA *et al.*, 2005).

O montelucaste foi administrado por via oral mediante gavagem (sondagem esofágica por pequena cânula metálica). As demais drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

Os animais foram divididos em grupos controles e experimentais:

Os Grupos Controles foram constituídos, cada um deles, por, no mínimo, 5 animais por grupo e foram distribuídos da seguinte forma:

- 5-FU: animais submetidos à mucosite oral, ou seja, administração de 5-FU 60mg/Kg/dia; i.p. no dia 1 e 40mg/Kg/dia; i.p. no dia 2 e trauma mecânico na mucosa jugal no dia 4 do experimento (controle positivo).
- SAL: animais não submetidos à mucosite oral, ou seja, controle normal.
- TM: animais submetidos apenas às escoriações nas mucosas jugais no dia 4 do experimento.
- CLX: animais submetidos à mucosite oral que receberam Celecoxibe (7,5mg/kg/dia; i.p.) 1 hora antes da administração de 5-FU (dias 1 e 2 do experimento) e, diariamente até o 10º dia do experimento (CLX). Esse grupo foi adicionado como padrão ouro, levando-se em consideração resultados prévios que demonstram efeitos positivos dessa intervenção, reduzindo consideravelmente os achados inflamatórios induzidos pela mucosite oral.

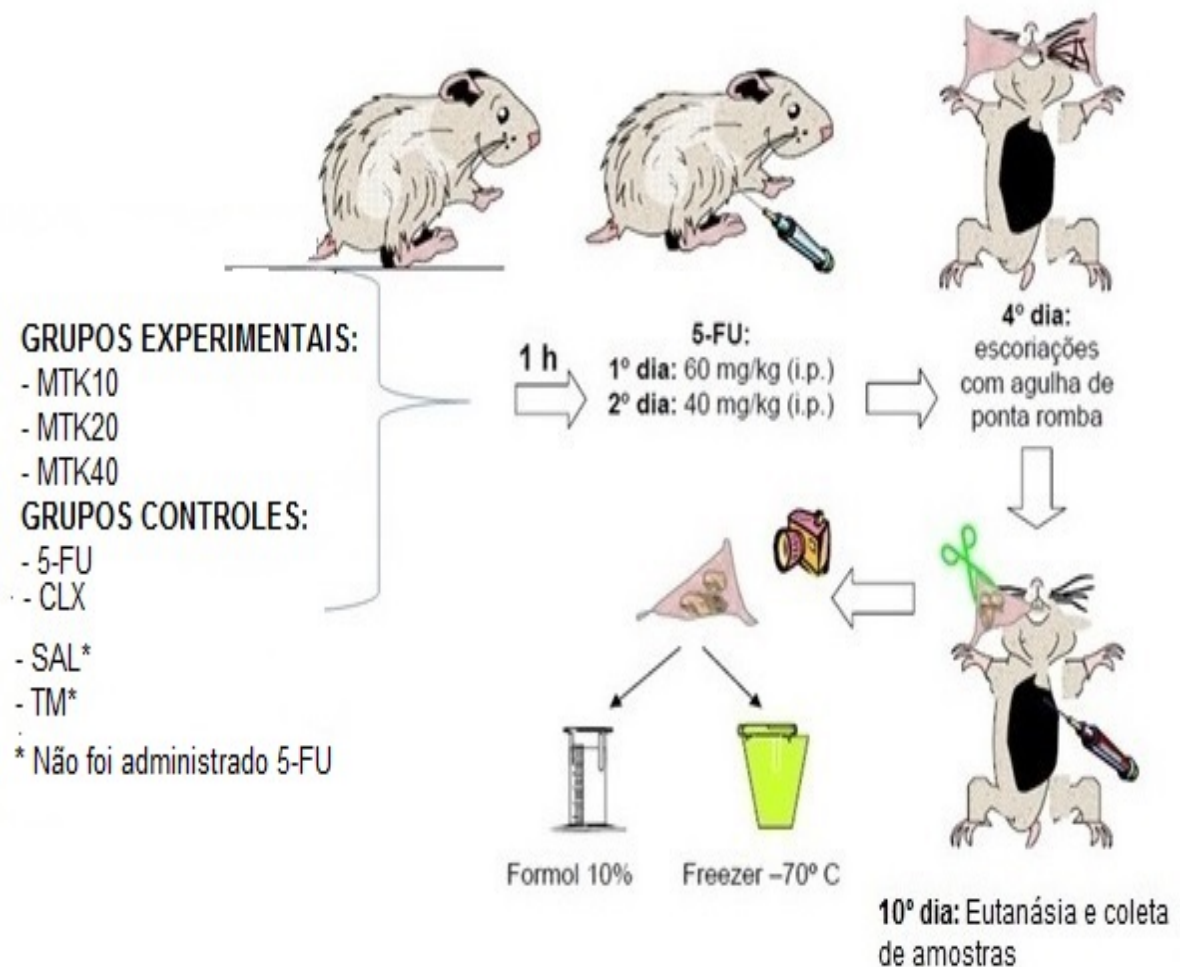
Grupos Experimentais, com pelo menos 6 animais em cada grupo:

- MTK10: animais submetidos à mucosite oral que receberam Montelucaste (10mg/Kg/dia; via gavagem) 1 hora antes da administração de 5-FU (dias 1 e 2) e diariamente, por 10 dias.
- MTK20: animais submetidos à mucosite oral que receberam Montelucaste (20mg/Kg/dia; via gavagem) 1 hora antes da administração de 5-FU (dias 1 e 2 do experimento) e, diariamente, por 10 dias.

- MTK40: animais submetidos à mucosite oral que receberam Montelucaste (40mg/Kg/dia; via gavagem) 1 hora antes da administração de 5-FU (dias 1 e 2 do experimento) e, diariamente, até o 10º dia.
- MK886: animais submetidos à mucosite oral que receberam MK886 (3mg/kg/dia, i.p.) 1 hora antes da administração de 5-FU (dias 1 e 2 do experimento) e, diariamente, por 4 dias.

O presente estudo foi dividido em duas partes: no primeiro experimento, foi investigado o efeito do bloqueio dos cys-LT através do uso de montelucaste (10 ou 20 ou 40mg/Kg/dia; gavagem) por 10 dias (Figura 6).

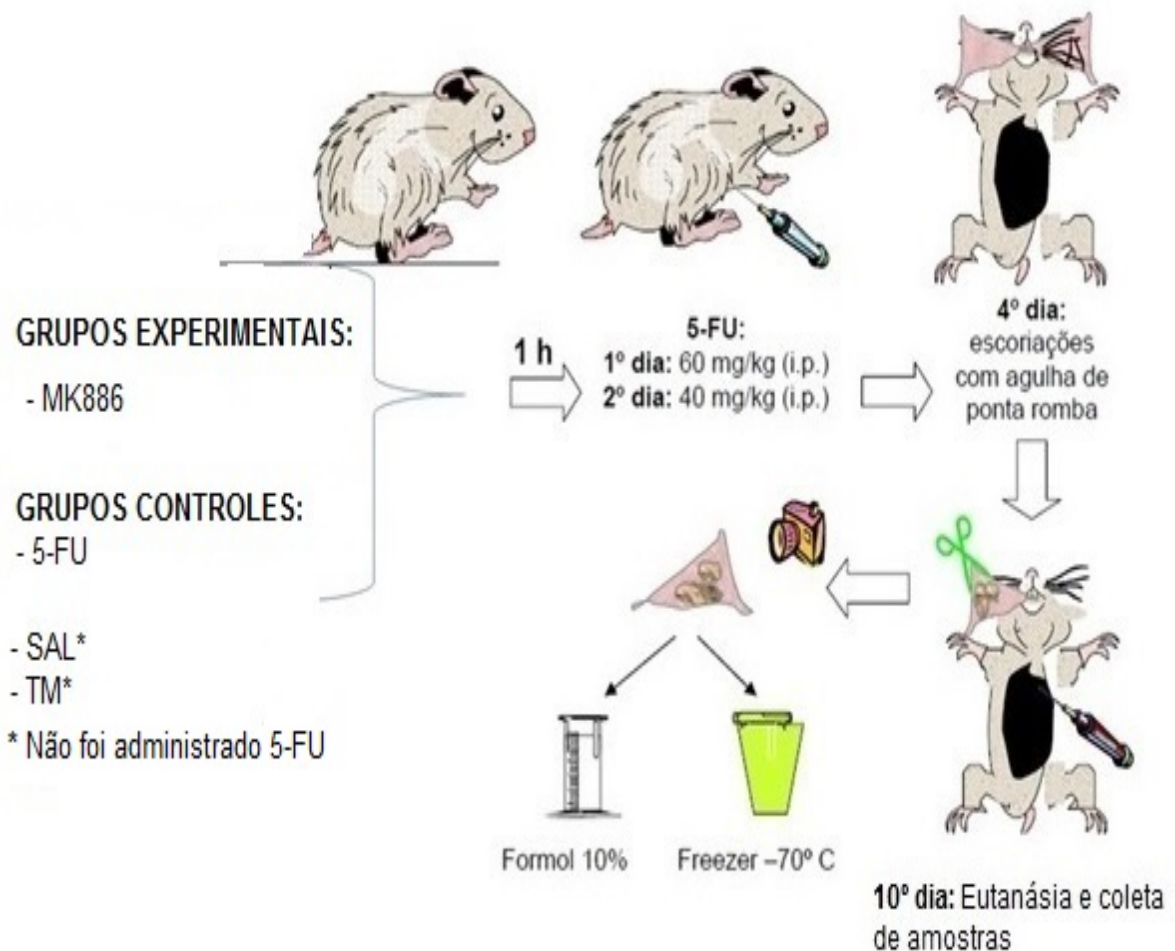
Figura 6 – Modelo de mucosite oral induzido por 5-fluorouracil no 1º experimento



Fonte: Modificado de Leitão *et al.* (2007).

A segunda investigação (2º experimento) objetivou investigar o bloqueio da cascata de síntese de leucotrienos em um passo mais inicial, inibindo, dessa forma, todas as classes de leucotrienos, e não somente os cys-LT (já avaliado através da administração do MTK no 1º experimento). Utilizou-se o MK886 (3mg/kg/dia; i.p.), um inibidor da síntese da 5-lipoxigenase, administrado 1 hora antes das administrações de 5-FU (dias 1 e 2 do experimento) e, diariamente, até o 4º dia experimental. A utilização dessa droga por 4 dias, baseou-se em estudos anteriores, utilizando o mesmo modelo experimental do presente trabalho, sugerindo que uma intervenção nos 4 primeiros dias é suficiente para prevenir, ou minimizar, as alterações inflamatórias observadas no 10º dia (MEDEIROS *et al.*, 2011). Os grupos controles, utilizados foram os mesmos descritos para o 1º experimento, com exceção do grupo celecoxibe (CLX). Da mesma forma, os animais foram eutanasiados no 10º dia de experimento (Figura 7).

Figura 7 – Modelo de mucosite oral induzido por 5-fluorouracil no 2º experimento



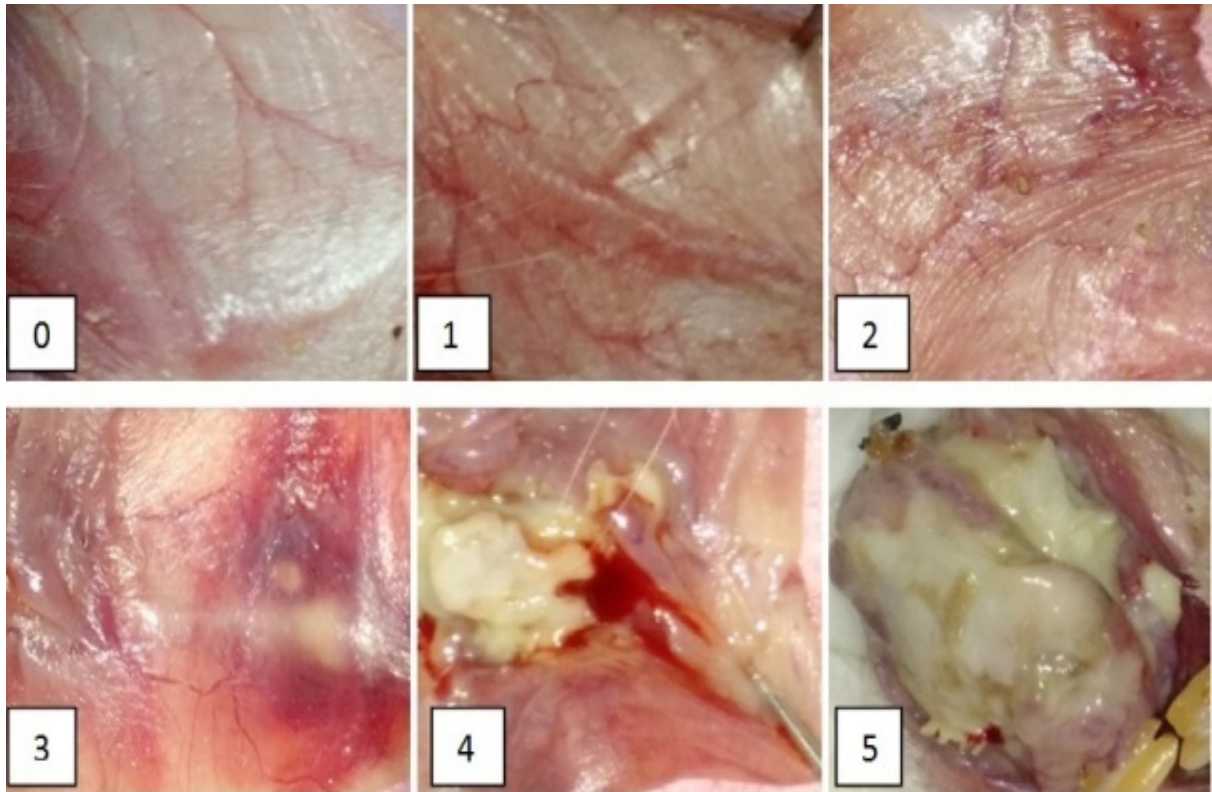
Fonte: Modificado de Leitão *et al.* (2007).

4.5.2 Escores macroscópicos das mucosas jugais

Os animais foram anestesiados e suas mucosas jugais foram fotografadas para a análise macroscópica, coletadas amostras e eutanasiados, ainda sob anestesia, no 10º dia do modelo experimental. Os parâmetros avaliados foram presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados por Sonis *et al.* (2000) e citados a seguir (Figura 8):

- *Escore 0*: mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação.
- *Escore 1*: presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa.
- *Escore 2*: eritema severo, vasodilatação e erosão superficial.
- *Escore 3*: formação de úlceras em uma ou mais faces, mas não afetando mais de 25% da área de superfície da bolsa. Severo eritema e vasodilatação.
- *Escore 4*: formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da bolsa.
- *Escore 5*: virtualmente completa ulceração da mucosa da bolsa. Impossibilidade de exposição da mucosa.

Figura 8 – Escores dos graus de mucosite oral macroscópicas



Fonte: próprio autor.

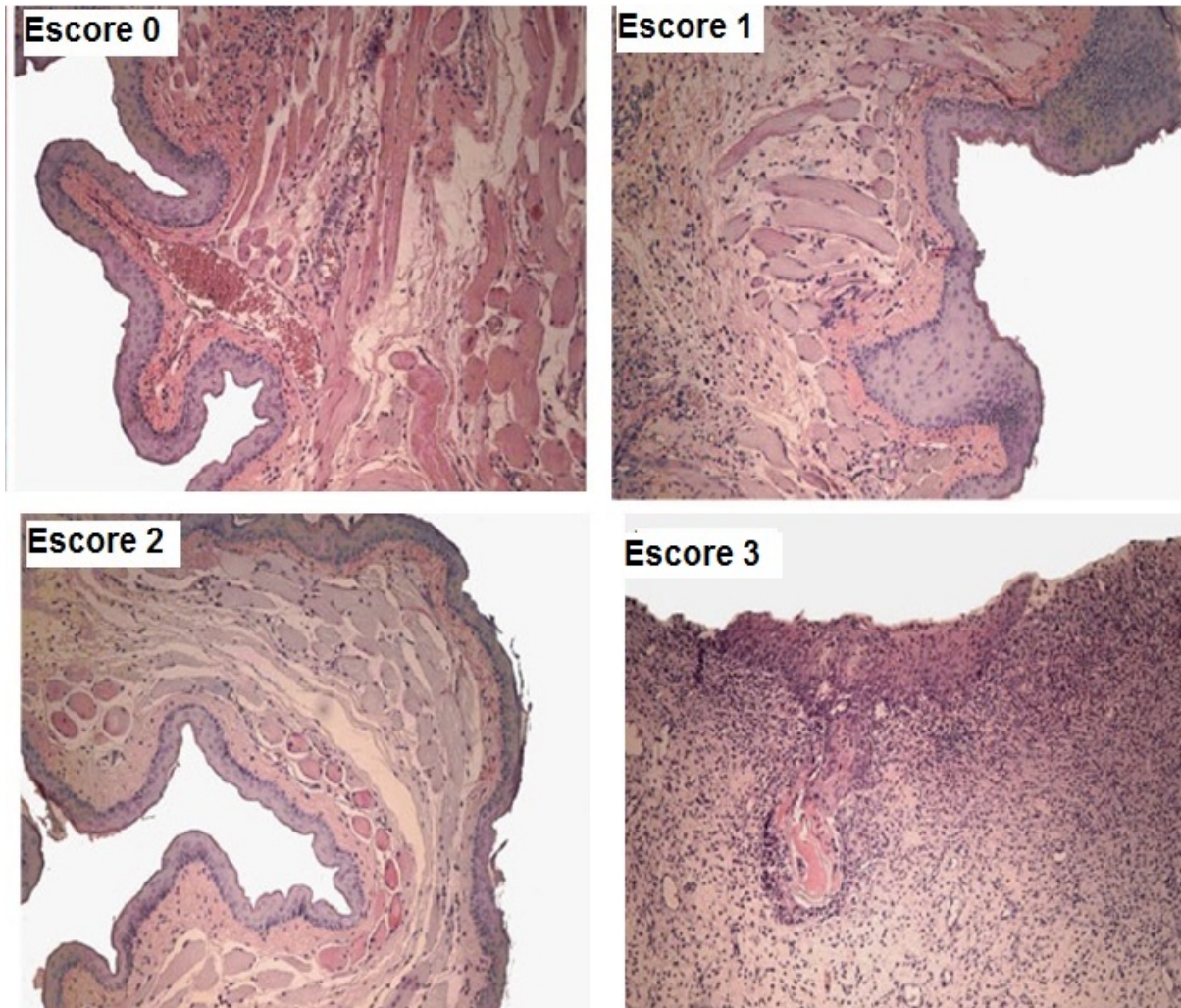
Escore 0: mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação. *Escore 1:* presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa. *Escore 2:* eritema severo, vasodilatação e erosão superficial. *Escore 3:* formação de úlceras em uma ou mais faces, mas não afetando mais de 25% da área de superfície da bolsa. Severo eritema e vasodilatação. *Escore 4:* formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da bolsa. *Escore 5:* virtualmente completa ulceração da mucosa da bolsa. Impossibilidade de exposição da mucosa.

4.5.3 Escores microscópicos das mucosas jugais

A análise histopatológica das mucosas jugais foi realizada em cortes seriados de 4 mm de espessura, ao microscópio óptico (40x). No 10º dia do modelo experimental, os animais foram eutanasiados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas. As mucosas foram, então, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, e em seguida as amostras foram incluídas em parafina. Posteriormente foi realizada coloração pela hematoxilina-eosina (H.E). A análise microscópica foi realizada de forma cega, por um único avaliador experiente, avaliando-se os aspectos inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vascular, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados em nosso laboratório (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005) e citados a seguir (Figura 9):

- *Escore 0*: epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Escore 1*: ingurgitamento vascular discreto; áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, com maior número de leucócitos mononucleares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Escore 2*: ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
- *Escore 3*: ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

Figura 9 – Escores dos graus histopatológicos de mucosite oral



Fonte: Modificado de Medeiros *et al.* (2011)

Fotomicrografias ilustrativas das mucosas jugais. Cortes histopatológicos de 4 mm de espessura, coloração H.E no aumento de (40x). *Escore 0:* epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos. *Escore 1:* ingurgitamento vascular discreto; áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, com maior número de leucócitos mononucleares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos. *Escore 2:* ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos. *Escore 3:* ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

4.5.4 Imunoistoquímica para detecção de iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α , IL10

No 10^o dia de experimento, os animais foram eutanasiados e tiveram suas mucosas jugais removidas e fixadas em formol 10% por 24 horas para a confecção de lâminas para imunoistoquímica. A imunoistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α , IL10 foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE; FANGER, 1981). Os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídos em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunoistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0 e 9.0). Sob aquecimento em banho maria, por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína (*protein in block*) por 20 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário de cabra anti-iNOS2 (1:200), COX-2 (1:100), IL1- β (1:100), TNF- α (1:100) e IL10 (1:100) todos (Santa Cruz) diluído em *antibody* diluente (Abican). Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) bitinilado IgG anti cabra, coelho e anti mouse diluído 1:400 (Santa Cruz), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-albumina sérica bovina (BSA) 5%.

A quantificação das células imunomarcadas foram obtidas, de maneira cega, por um único avaliador experiente, a partir de imagens capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (leica DM1000, Alemanha), utilizando o image j. Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo, considerando-se 10 campos por corte histológico, utilizando o aumento de 400x. Foram consideradas células imunomarcadas aquelas que

apresentaram coloração citoplasmática marrom. Os resultados foram expressos como o número de células imunomarcadas por grupo.

4.5.5 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do infiltrado de neutrófilos nos tecidos foi determinada através do ensaio da atividade de MPO, esta enzima é encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador indireto da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Um fragmento de tecido foi coletado no 10º dia da indução da MO por 5-FU, os animais foram eutanasiados e suas mucosas jugais fotografadas, removidas e congeladas em freezer a 80°C negativos. O tecido congelado de cada animal foi inicialmente incubado em 200µL de tampão (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron) e centrifugado a 3.000 rpm/15 min/4°C. Realizou-se um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de solução de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm/15 min/4°C, o *pellet* foi suspenso novamente em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizou-se novamente em triturador Pollytron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, 4°C e após centrifugação, 50 µL do sobrenadante obtido foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min a 37 °C. A seguir, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1x10⁵ neutrófilos/50 µL no primeiro poço). Realizou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido.

4.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como Média ± erro padrão (Média ± EPM) ou mediana e mínimo e máximo, quando apropriado. Antes da escolha do teste estatístico (paramétrico ou não paramétrico) os grupos comparados foram avaliados

quanto a sua normalidade com os testes D'Agostino & Pearson omnibus e Shapiro-Wilk. Análise de variância (ANOVA) com teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's foi utilizado nas comparações entre dados dos diversos grupos. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 *Software*, La Jolla, CA, USA. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise macroscópica e histopatológica na coloração por H.E.

A análise macroscópica das mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, no 10^o dia de experimento, mostrou hiperemia, hemorragia acentuada e úlceras. Essas alterações foram significantes ($P < 0,05$) em relação aos animais normais (SAL) e aos *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) (Tabela 1, Figura 10). A análise realizada para a avaliação quantitativa dos aspectos morfológicos, observados microscopicamente na coloração por HE, corrobora com as alterações inflamatórias características da mucosite no grupo 5-FU. Esse grupo apresentou um escore histopatológico mediano de 3, e variação significativa em relação aos grupos SAL, TM e CLX (Tabela 1, Figura 11) ($P < 0,05$).

O montelucaste, nas concentrações de 10 e 20 mg/kg/dia, não foi capaz de prevenir os danos macroscópicos à mucosa oral. Observou-se, no entanto, que os *hamsters* tratados com MTK na dose de 40 mg/kg/dia apresentaram menores danos induzidos pelo 5-FU na mucosa oral, evidenciados pelo escore macroscópico mediano 3 (1-3) e ausência de diferença estatística significativa em relação aos grupos SAL (mediana: 0), TM (mediana: 1,5) e CLX (mediana: 2,0) (grupos controles normais e de tratamento padrão). O fato de não ter sido observado diferenças significantes macroscópicas entre os grupos MTK40 e SAL sugere um efeito protetor parcial da dose mais alta do inibidor do cys-LT utilizada no presente estudo.

Na análise histopatológica, entretanto, todos os grupos em que foi administrado o MTK, não importando a dose (10, 20 ou 40mg/Kg/dia), apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle normal (SAL) (mediana: 0).

Como era de se esperar, o tratamento com celecoxibe (escore mediano macroscópico de 2,0 e histopatológico de 1,0) preveniu, de forma significativa, os danos à mucosa oral quando comparados ao grupo controle 5-FU (mediana histopatológica: 3,0), tanto macroscopicamente quanto na avaliação histopatológica, justificando a escolha do seu uso como tratamento padrão ouro no presente estudo (Tabela 1) e (Figuras 10 e 11) ($p < 0,05$). Esse resultado reforça que a COX-2 tem uma influência contundente no processo inflamatório associado à mucosite oral por

5-FU. Já os cys-LT não demonstram atividade importante na redução das alterações inflamatórias da MO por 5-FU nestas análises, pois a inibição dos cys-LT, por MTK, apresentou um efeito aparentemente protetor, macroscopicamente, somente na dose de 40mg/Kg/dia e quando comparado ao grupo SAL, mas este efeito não é corroborado quando o mesmo é comparado com o grupo 5-FU (padrão para as alterações inflamatórias da mucosa jugal com mucosite).

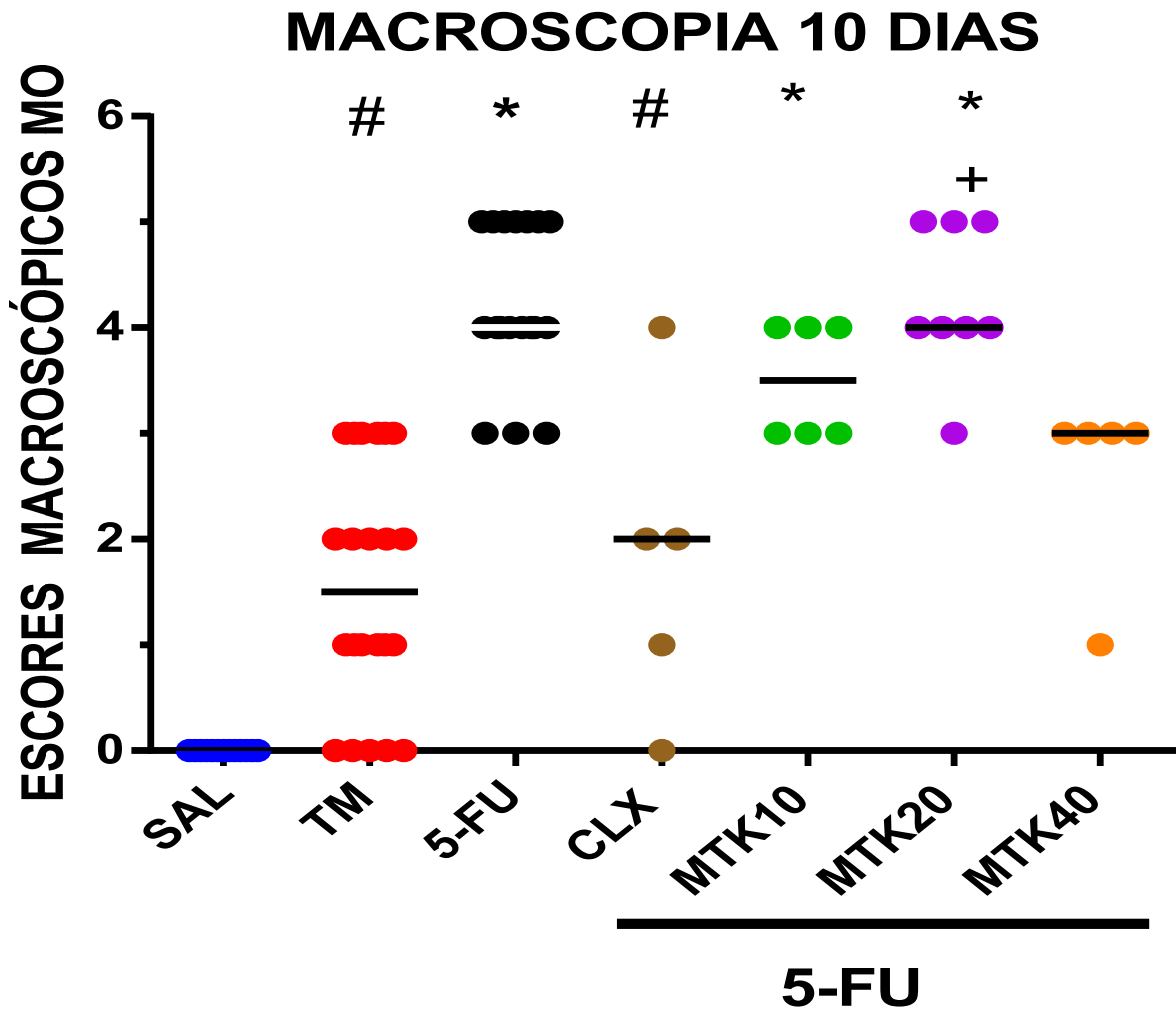
Tabela 1 – Avaliação macroscópica e microscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias

Grupos	SAL	TM	5-FU	5-FU			
				CLX	MTK10	MTK20	MTK40
Análise macroscópica	0(0-0)	1,5(0-3)#	4,0(3-5)*	2,0 (0-4)#	3,5 (3-4)*	4,0(3-5)*+	3,0(1-3)
Análise microscópica	0(0-2)	1,0(0-3)#	3,0(2-3)*	1,0(0-1)#	3,0(3-3)*+\$	3,0(1-3)*+	3,0(1-3)*

Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 1° experimento. * p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # p<0,05 comparação com o grupo 5-FU. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

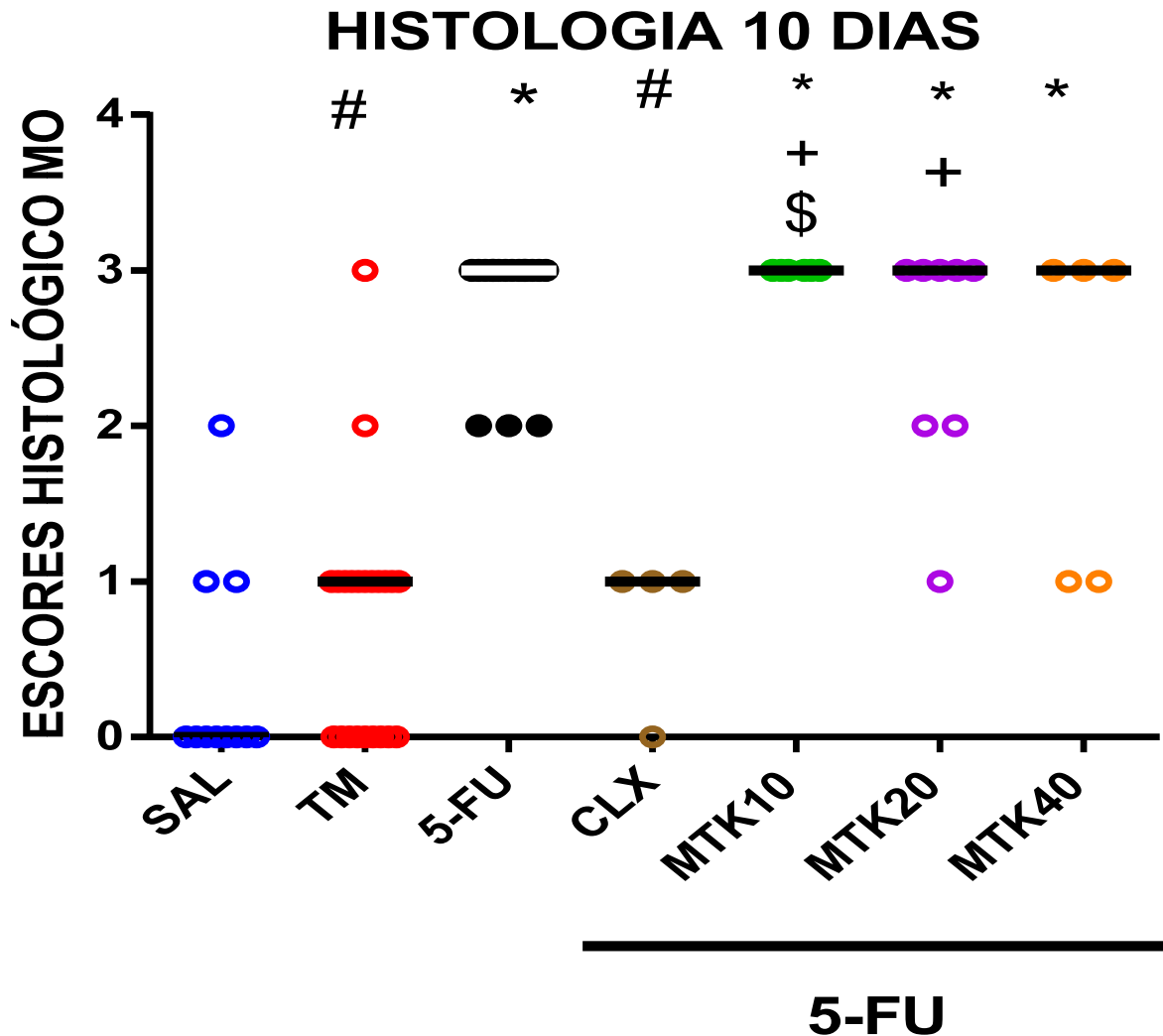
Figura 10 – Avaliação macroscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias



Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 1º experimento. * p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); # p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; \$ p<0,05 comparação com o grupo 5-FU. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 11 – Avaliação microscópica da mucosite oral após bloqueio do cisteinil leucotrienos por 10 dias



Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 1° experimento. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

No segundo experimento, o bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886, que realiza uma inibição da via dos leucotrienos em sua raiz, assim, impedindo a produção tanto dos cys-LT quanto dos demais tipos de leucotrienos, avalia se os outros leucotrienos, além dos cys-LT, teriam papel diferente na mucosite oral por 5-FU.

A avaliação macroscópica das lesões que ocorrem na mucosa do *hamster* com mucosite oral induzida por 5-FU, realizada no décimo dia do experimento e utilizando a classificação anteriormente citada, demonstrou que no segundo experimento, os grupos onde houve a indução de MO (5-FU com escore mediano 4 e MK886 com escore mediano 3) apresentavam alterações sugestivas de processo inflamatório intenso em comparação com os controles SAL (escore mediano 0) e TM (escore mediano 3) (Tabela 2) (Figura 12) ($p < 0,05$). Ou seja, a administração do bloqueador da 5-LOX (MK886) não foi capaz de diminuir a intensidade dos sinais inflamatórios. Não sendo, portanto, capaz de proteger os animais da mucosite.

Ao ser realizada a avaliação histopatológica, observou-se achados semelhantes, corroborando que o bloqueio de todas as classes de leucotrienos através da inibição da 5-LOX não foi capaz de diminuir a intensidade da MO, tendo em vista que o escore mediano do grupo 5-FU foi 3 e do grupo MK886 foi, também, 3, sendo que ambos os grupos apresentaram diferença significativa em relação aos controles normais (SAL e TM) (Tabela 2) (Figura 13) ($p < 0,05$).

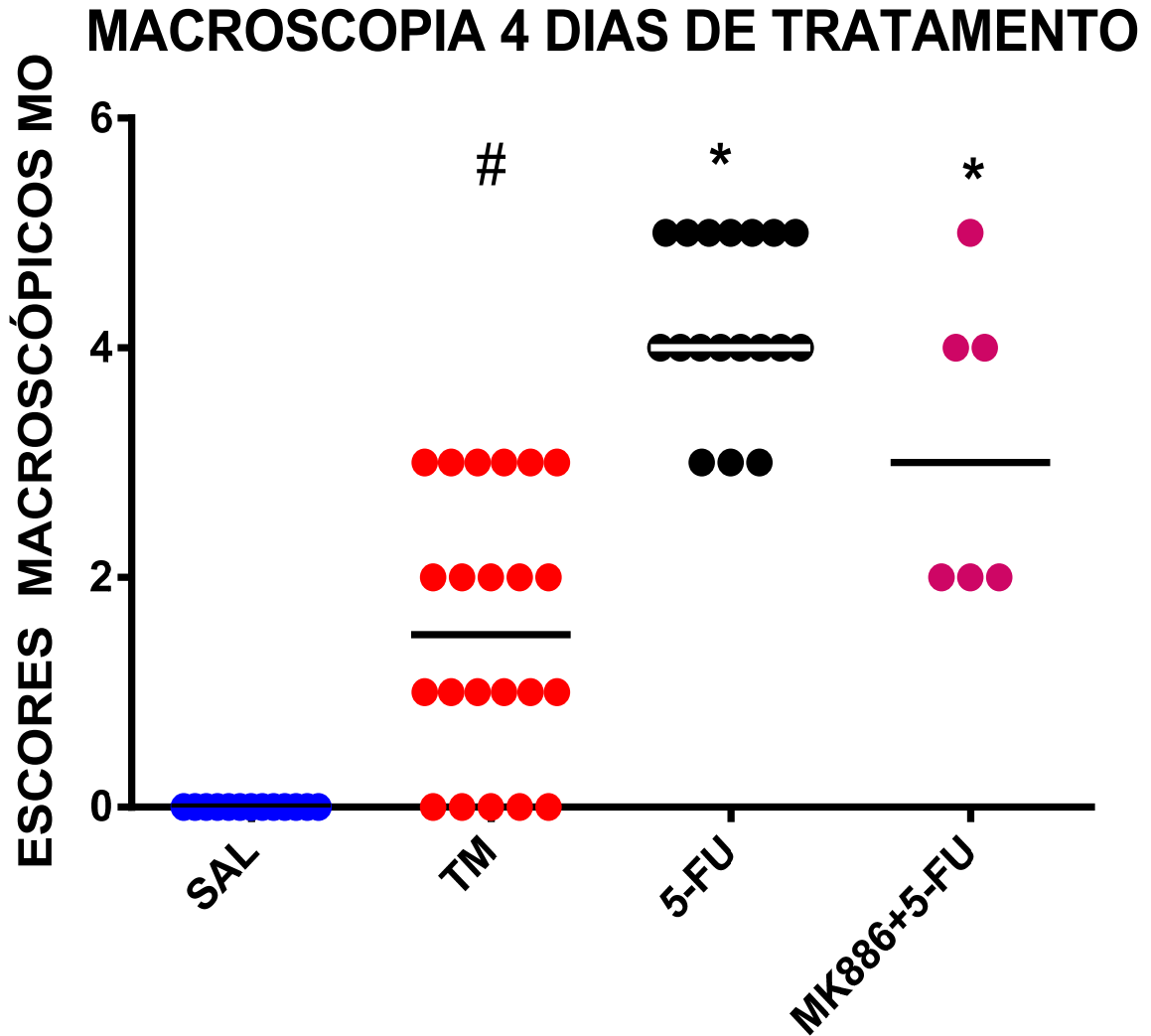
Tabela 2 – Avaliação macroscópica e microscópica da mucosite oral após o bloqueio do 5-lipoxigenase

Grupos	SAL	TM	5-FU	MK886 + 5-FU
Análise macroscópica	0 (0-0)	2 (0-3)#	4 (3-5)*	3 (2-5)*
Análise microscópica	0 (0-2)	1(0-3)#	3 (2-3)*+	3 (3-3)*+

Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 2° experimento. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

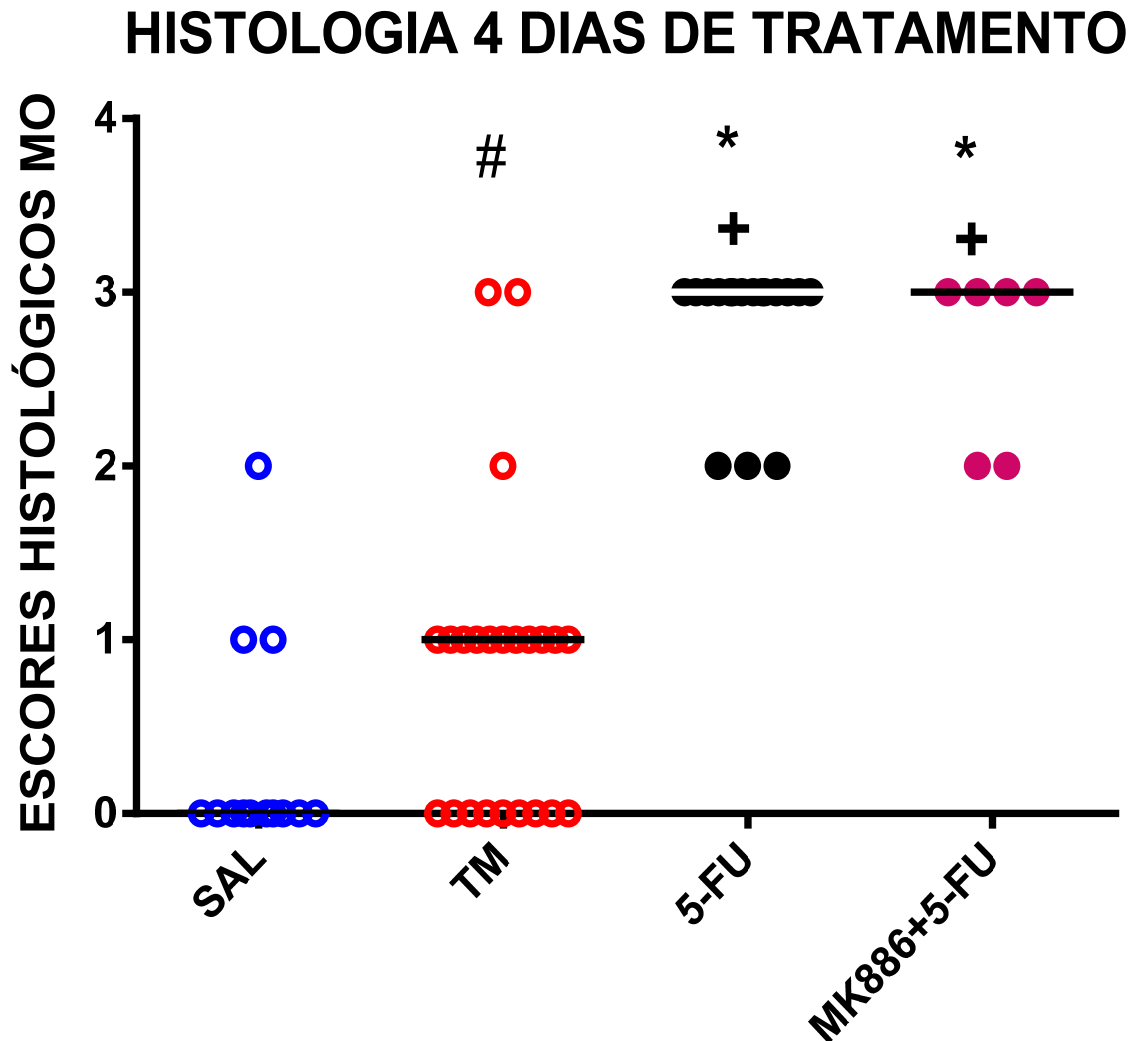
Figura 12 – Avaliação macroscópica da mucosite oral após bloqueio por MK886



Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 2º experimento. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 13 – Avaliação microscópica da mucosite oral após bloqueio por MK886



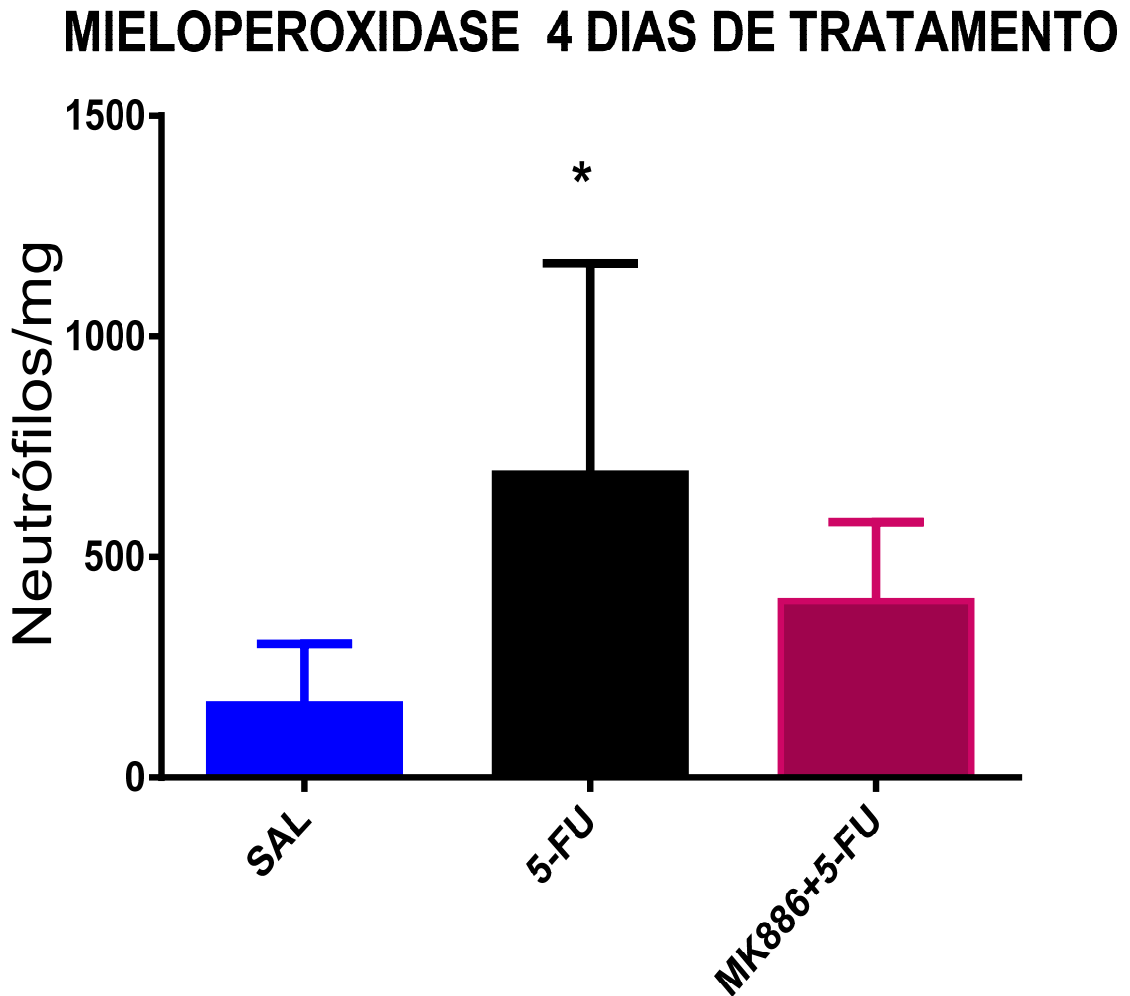
Fonte: próprio autor.

Os dados representam medianas dos escores (e variação) de pelo menos cinco animais por grupo do 2º experimento. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. As barras horizontais representam as medianas de cada grupo. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

5.2 Avaliação da mieloperoxidase após bloqueio da 5-lipoxigenase

Ao quantificar a MPO nos grupos salina, MK886 e 5-FU, verificou-se um aumento significativo nos grupos onde houve indução da MO por 5-FU, sobretudo no grupo 5-FU (controle positivo) sugerindo, assim, aumento da migração neutrofílica nestes tecidos (Figura 14) ($p < 0,05$). Observou-se, ainda, que administração de MK886 não conseguiu diminuir de maneira significativa o número de neutrófilos por mg de tecido da mucosa jugal dos *hamsters* (Figura 14) ($p < 0,05$). Pois não há diferença significativa entre o grupo 5-FU e o grupo MK886, embora ocorra diferença significativa entres os grupos 5-FU e SAL (Figura 14) ($p < 0,05$). Os achados sugerem que o bloqueio da 5-lipoxigenase não apresentou inibição da atividade neutrofílica importante no modelo de mucosite oral por 5-FU.

Figura 14 – Mieloperoxidase após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

Quantificação dos neutrófilos feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1×10^5 neutrófilos/50 μ L no primeiro poço). Realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados expressos como número de neutrófilos/mg de tecido. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudáveis (SAL); não houve diferença significativa do grupo MK886 em relação ao grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

5.3 Análise imunistoquímica para detecção de iNOS2

Buscando avaliar a ação do bloqueio dos cys-LTs sobre a produção de óxido nítrico (ON) na mucosite oral induzida por 5-FU e comparar com o efeito da inibição da COX-2, foi realizada a análise quantitativa da marcação celular por imunistoquímica para iNOS2. Tendo em vista que o ON é sintetizado a partir da conversão da L-arginina à L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a demonstração de maior expressão celular da mesma sugere maior produção de ON e, por tanto, maior intensidade inflamatória.

Observou-se que a mucosite induzida por 5-FU resultou em aumento significativo de iNOS2 na mucosa jugal dos *hamsters*. Pois o grupo 5-FU apresentou diferença significativa do número de células marcadas para iNOS2 em relação aos grupos SAL e TM (Figura 15, Figura 16) ($p < 0,05$), estes dados demonstram a participação ON através da presença de atividade de iNOS2 aumentada devido a indução da mucosite. O tratamento com MTK não foi capaz de prevenir ao aumento da expressão de iNOS2 (Figura 15, Figura 16) ($p < 0,05$). Todos os grupos submetidos a indução da mucosite apresentaram maior número de células imunomarcadas para iNOS2 que o grupo SAL e TM. Entretanto, esta diferença somente foi significativa para o grupo 5-FU e para os que utilizaram o inibidor de leucotrienos (Figura 15, Figura 16) ($p < 0,05$). O grupo CLX, como esperado, apresentou redução, de maneira significativa, da imunomarcagem das células dos animais submetidos a MO, demonstrando uma ação protetora. Por outro lado, observa-se, que o bloqueio dos cys-LT com MTK não conseguiu diminuir de maneira significativa a expressão de células marcadas para iNOS2 em relação ao controle 5-FU (Figura 15, Figura 16) ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Expressão imunistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno por montelucaste.

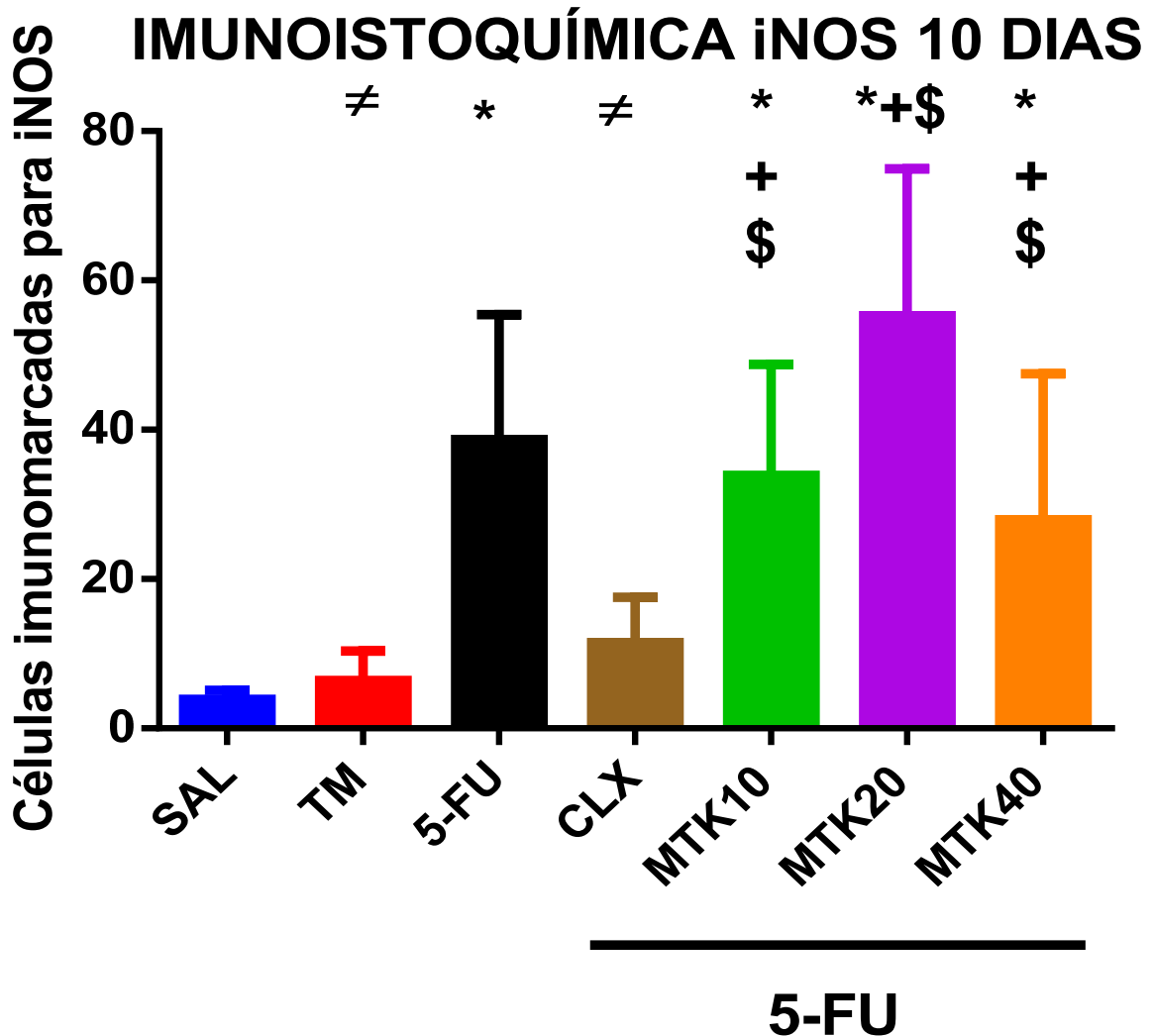
GRUPOS	SAL	TM	5-FU	5-FU			
				CLX	MTK10	MTK20	MTK40
iNOS 2	4,10(\pm 0,31)	6,85(\pm 0,58) #	38,87 (\pm 2,58) *	11,67(\pm 0,93) #	34,07(\pm 2,32) *	55,47(\pm 3,08) *	28,17(\pm 3,05) *
COX-2	3,96(\pm 0,50)	6,32(\pm 0,72) #	26,65 (\pm 2,54)	*1,70 (\pm 0,22) #	21,41 (\pm 2,00) *	18,52(\pm 1,44) *	19,87(\pm 2,42) *
IL1- β	2,15(\pm 0,47)	4,20(\pm 0,66) #	45,91 (\pm 0,82) *	3,83 (\pm 0,57) #	24,50(\pm 3,21) *	14,76(\pm 1,40) *	15,84(\pm 3,09) *
TNF- α	16,00(\pm 1,05)	14,83(\pm 1,07) #	53,62(\pm 2,34) *	13,29(\pm 1,33) #	20,34 (\pm 1,52)#	18,76(\pm 1,88) #	20,52(\pm 2,89) #
IL10	19,22(\pm 1,80)	29,72(\pm 2,06) #	57,71(\pm 3,64) *	44,45(\pm 2,00) *	42,88(\pm 2,30) *	52,35 (\pm 2,48) *	38,57(\pm 2,95) * #

Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas \pm EPM; * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU.

Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

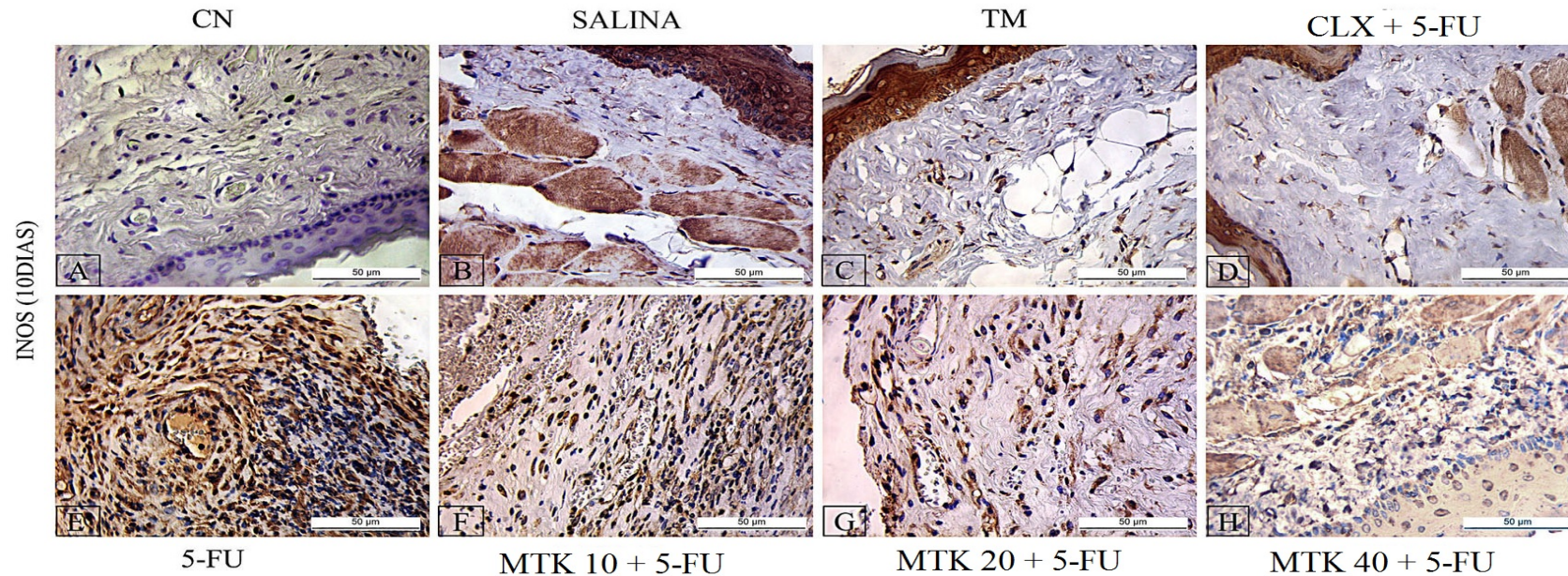
Figura 15 – Imunoistoquímica para detecção de iNOS2 após bloqueio dos cisteinil leucotrienos



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas * p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudios (SAL); + p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # p<0,05 comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 16 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para iNOS2 após bloqueio dos cisteinil leucotrienos.



Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para iNOS2 (aumento de 400x). (A) Controle negativo (CN) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para iNOS2, (B) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (C) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam celecoxibe 7,5 mg/dia/10dias, i.p. (CLX), (E) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU), (F) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 10 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK10) (G) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 20 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK20), (H) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 40 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK40).

Tentando avaliar a ação do bloqueio da 5-LOX sobre a produção de óxido nítrico (ON) na mucosite oral induzida por 5-FU foi realizada a análise quantitativa da marcação celular por imunistoquímica para iNOS2. Tendo em vista a relação, já descrita, entre a expressão desta enzima e os níveis de ON e a demonstração de que uma maior expressão celular da mesma sugere uma maior produção de ON e, portanto, maior intensidade inflamatória. Observou-se que a mucosite induzida por 5-FU resultou em aumento significativo de iNOS2 na mucosa jugal dos *hamsters*. Pois o grupo 5-FU apresentou diferença significativa do número de células marcadas para iNOS2 em relação aos grupos SAL e TM (Figura 17, Figura 18) ($p<0,05$), estes dados demonstram, mais uma vez, a participação ON através da presença de atividade de iNOS2 aumentada devido a indução da mucosite. O tratamento com MK886 não foi capaz de prevenir o aumento da expressão de iNOS2 (Figura 17, Figura 18) ($p<0,05$). Enfatizamos, que o bloqueio da 5-LOX não conseguiu diminuir de maneira significativa a expressão de células marcadas para iNOS2 em relação ao controle 5-FU (Figura 17, Figura 18) ($p<0,05$). Ou seja, o bloqueio da lipoxigenase não diminui a produção de ON na mucosite oral por 5-FU (Tabela 4).

Tabela 4 – Expressão imunistoquímica para iNOS2, COX-2, IL1- β , TNF- α e IL10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

GRUPOS	SAL	TM	5-FU	MK886+5FU
iNOS 2	4,10(\pm 0,31)	6,65(\pm 0,58) #	38,87(\pm 2,58) *	33,79(\pm 3,33)*
COX-2	3,96(\pm 0,50)	6,32(\pm 0,72) #	26,69(\pm 2,54) *	23,78 (\pm 1,53)*
IL1- β	2,15(\pm 0,47)	4,20(\pm 0,66) #	45,91(\pm 5,82) *	13,86 (\pm 2,59)*
TNF- α	16,00(\pm 1,05)	14,83(\pm 1,07) #	53,62(\pm 2,34) *	14,24 (\pm 0,93)#
IL 10	19,22(\pm 1,80)	29,72(\pm 2,06) # *	57,71(\pm 3,64) *	35,93(\pm 2,38) # *

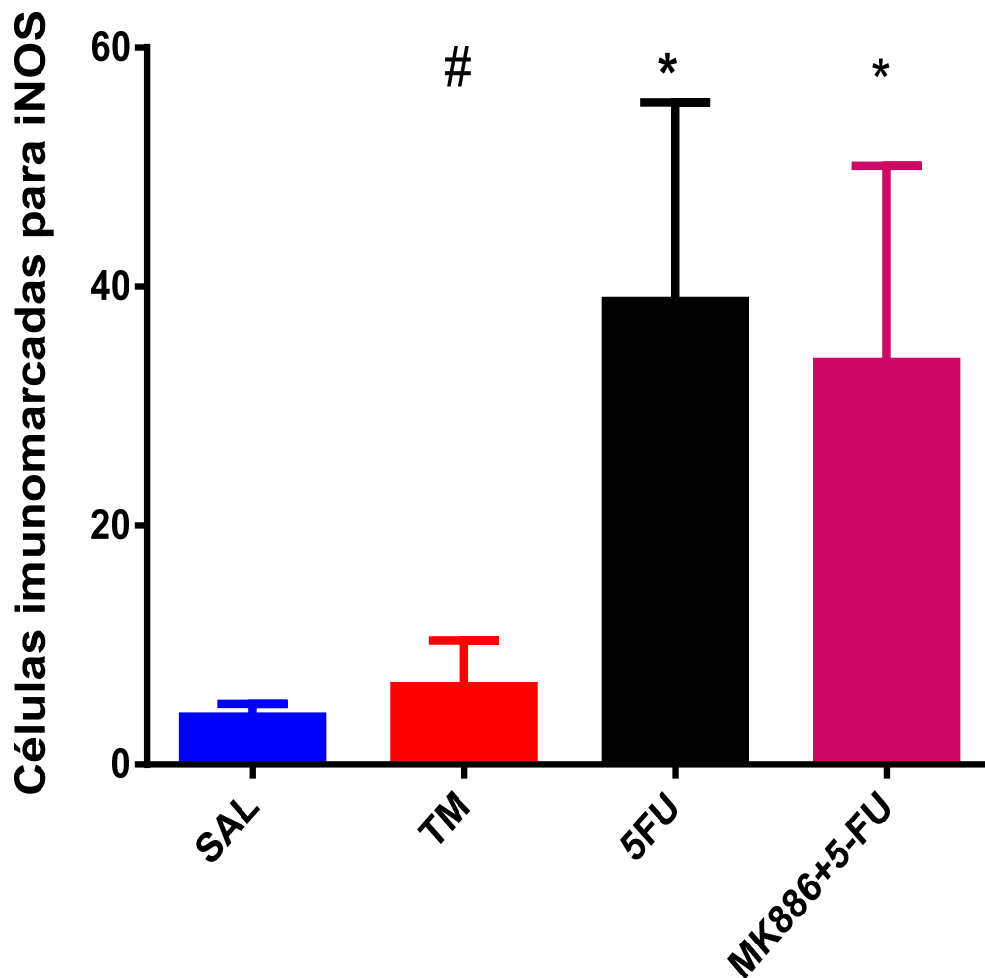
Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas \pm EPM; * $p<0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); # $p<0,05$ comparação com o grupo 5-FU.

Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 17 – Imunoistoquímica para detecção de iNOS2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

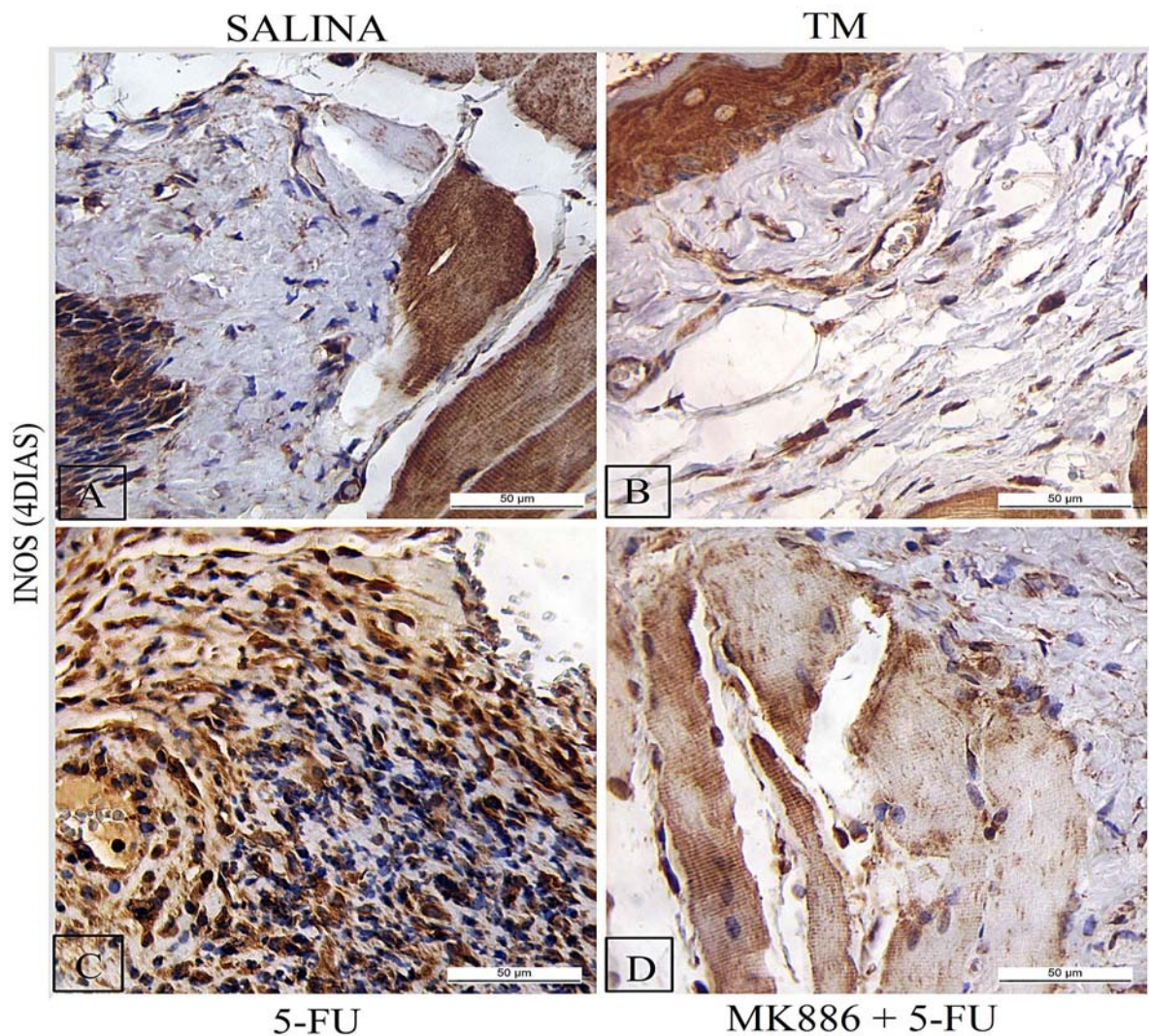
IMUNOISTOQUÍMICA iNOS 4 DIAS DE TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ou nuclear. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 18 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para iNOS2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

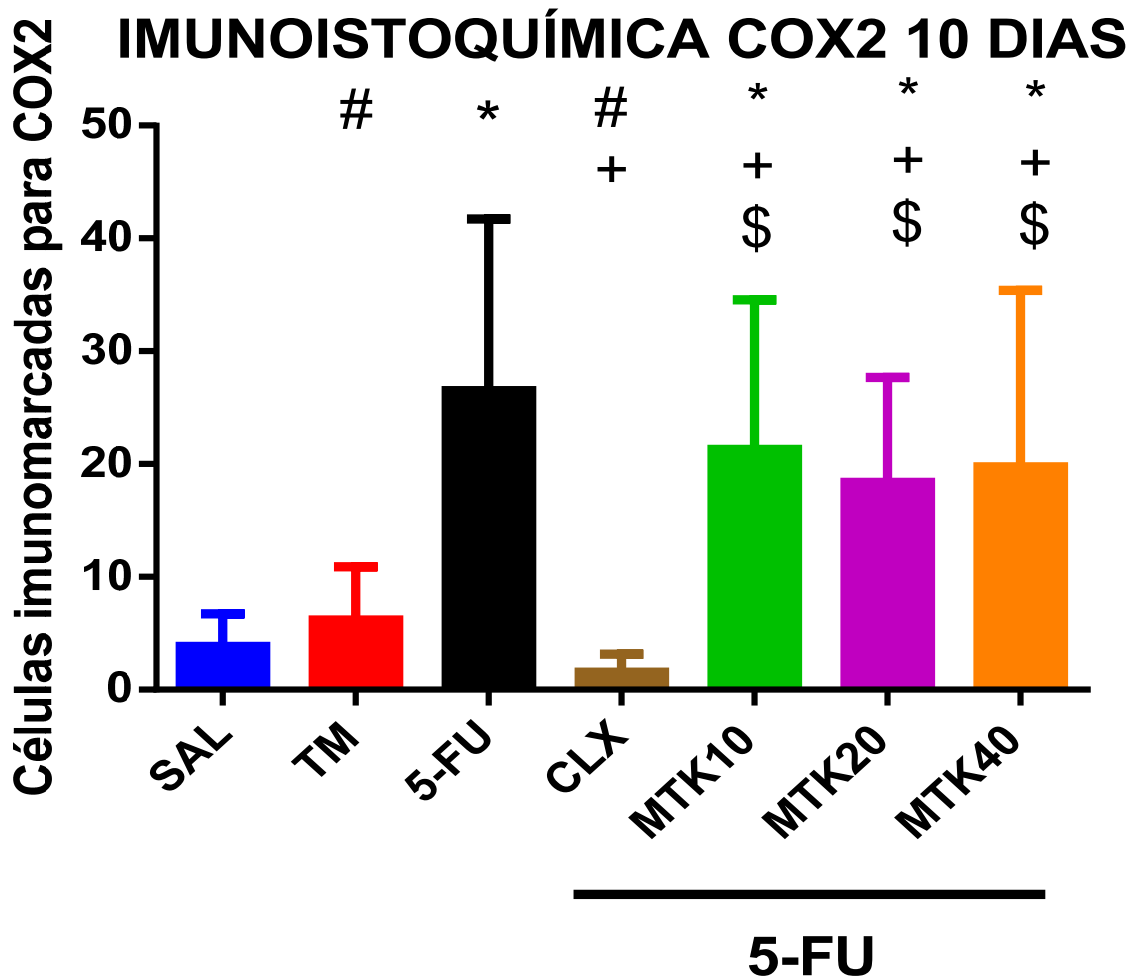
No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para IL1- β (aumento de 400x). (A) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (B) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (C) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU) (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam MK886 3,0mg/Kg/dia/10dias, i.p.

5.4 Análise imunoistoquímica para detecção de COX-2

Para analisar a importância da via da COX-2 em comparação com o bloqueio da via dos cys-LTs foi avaliada a imunomarcagem das células para COX-2 de maneira quantitativa. A indução da mucosite por 5-FU nas mucosas jugais dos animais, sobretudo no grupo 5-FU, promoveu um aumento significativo da expressão de células marcadas para COX-2, evidenciando a grande estimulação da via da cicloxigenase por este estímulo inflamatório. Entretanto, no grupo CLX, onde foi administrado um inibidor da COX-2, ocorreu uma importante redução do número de células imunomarcadas (Figura 19, Figura 20) ($p < 0,05$). Estes dados demonstram um bloqueio adequado da via da COX-2 no experimento, bem como uma indução do processo inflamatório da mucosite nos grupos onde houve indução da MO por 5-FU, evidenciando a ação protetora do celecoxibe (Tabela 3).

A administração de MTK, nas doses de 10, 20 e 40mg/Kg/dia, aos animais que sofreram indução de MO, não foi capaz de promover redução significativa do número de células imunomarcadas, quando os grupos foram comparados com o controle 5-FU (Figura 19, Figura 20) ($p < 0,05$). Ou seja, os cys-LTs não interferem de maneira significativa na mediação da expressão de COX-2 e seu bloqueio não consegue, portanto, exercer efeito protetor na MO induzida por 5-FU. Observou-se que quando comparados com o grupo SAL, os grupos TM e CLX não apresentaram diferenças significantes, semelhante ao visto na imunoistoquímica para iNOS2 (Figura 19, Figura 20) (Tabela 3) ($p < 0,05$).

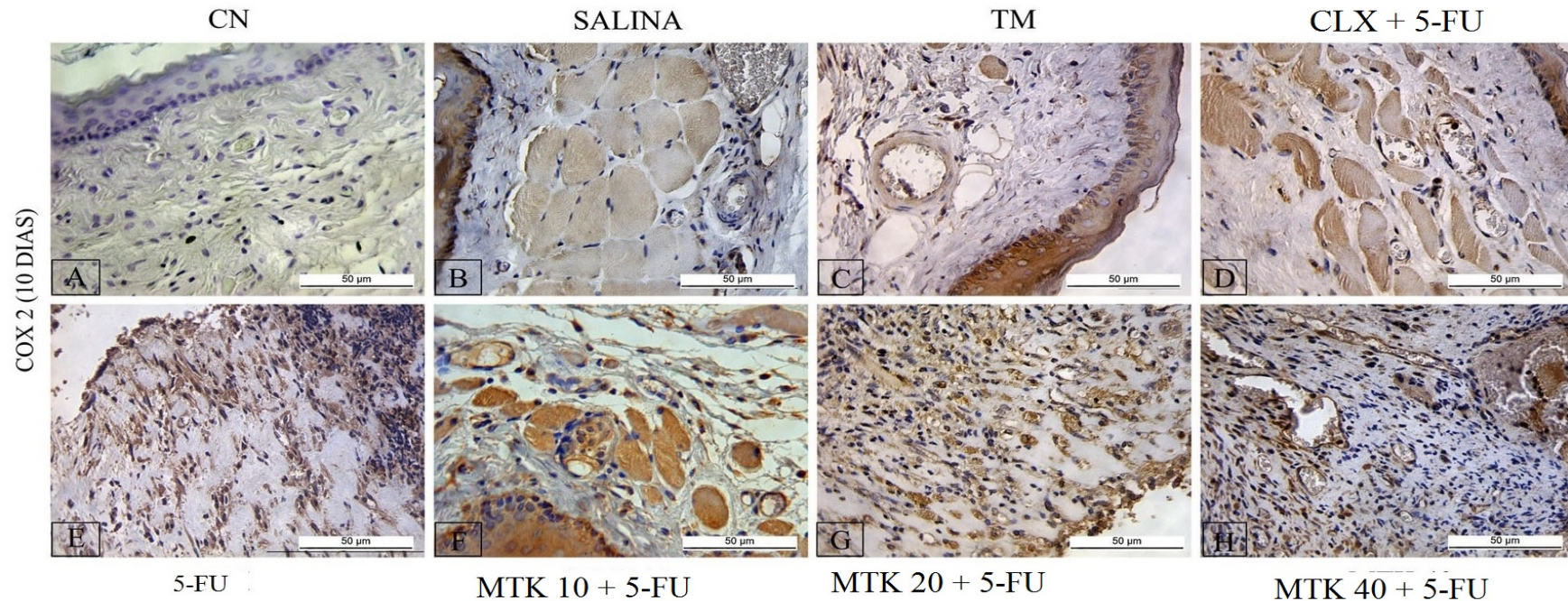
Figura 19 – Imunoistoquímica para detecção de COX-2 após bloqueio do cisteinil leucotrieno por montelukaste



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 20 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para COX-2 após bloqueio do cisteinil leucotrieno



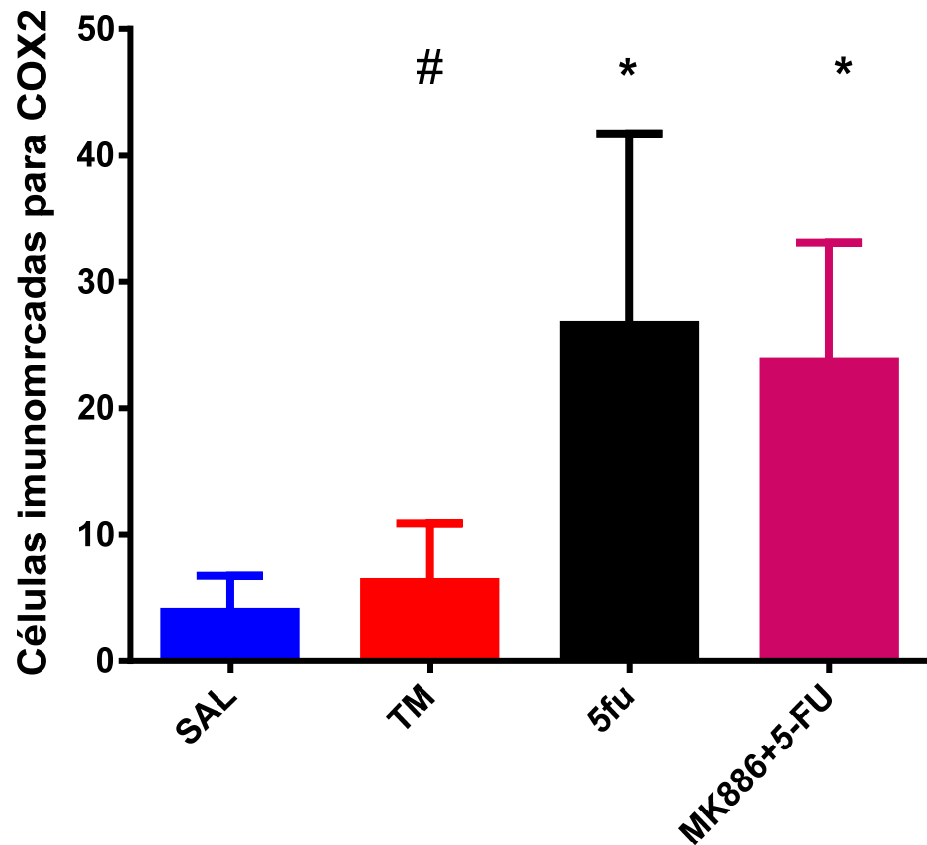
Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para COX-2 (aumento de 400x). (A) Controle negativo (CN) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para COX-2, (B) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (C) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam celecoxibe 7,5 mg/dia/10dias, i.p. (CLX), (E) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU), (F) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 10 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK10) (G) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 20 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK20), (H) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 40 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK40).

Para analisar a importância da via da COX-2 após o bloqueio da 5-LOX foi avaliada a imunomarcção das células para COX-2 de maneira quantitativa. A indução da mucosite por 5-FU nas mucosas jugais dos animais promoveu um aumento significativo da expressão de células marcadas para COX-2, evidenciando, mais uma vez, a estimulação da via da cicloxigenase por este estímulo inflamatório. (Figura 21, Figura 22) ($p < 0,05$). Ao realizar a análise em relação ao grupo 5-FU e o grupo MK886 não apresentaram diferenças significantes, mas os grupos SAL e TM foram diferentes significativamente do grupo 5-FU (Figura 21, Figura 22) ($p < 0,05$). A administração de MK886, aos animais que sofreram indução de MO, portanto, não foi capaz de promover redução significativa do número de células imunomarcadas, quando os grupos foram comparados com o controle 5-FU (Figura 21, Figura 22) (Tabela 4) ($p < 0,05$).

Figura 21 – Imunoistoquímica para detecção de COX-2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

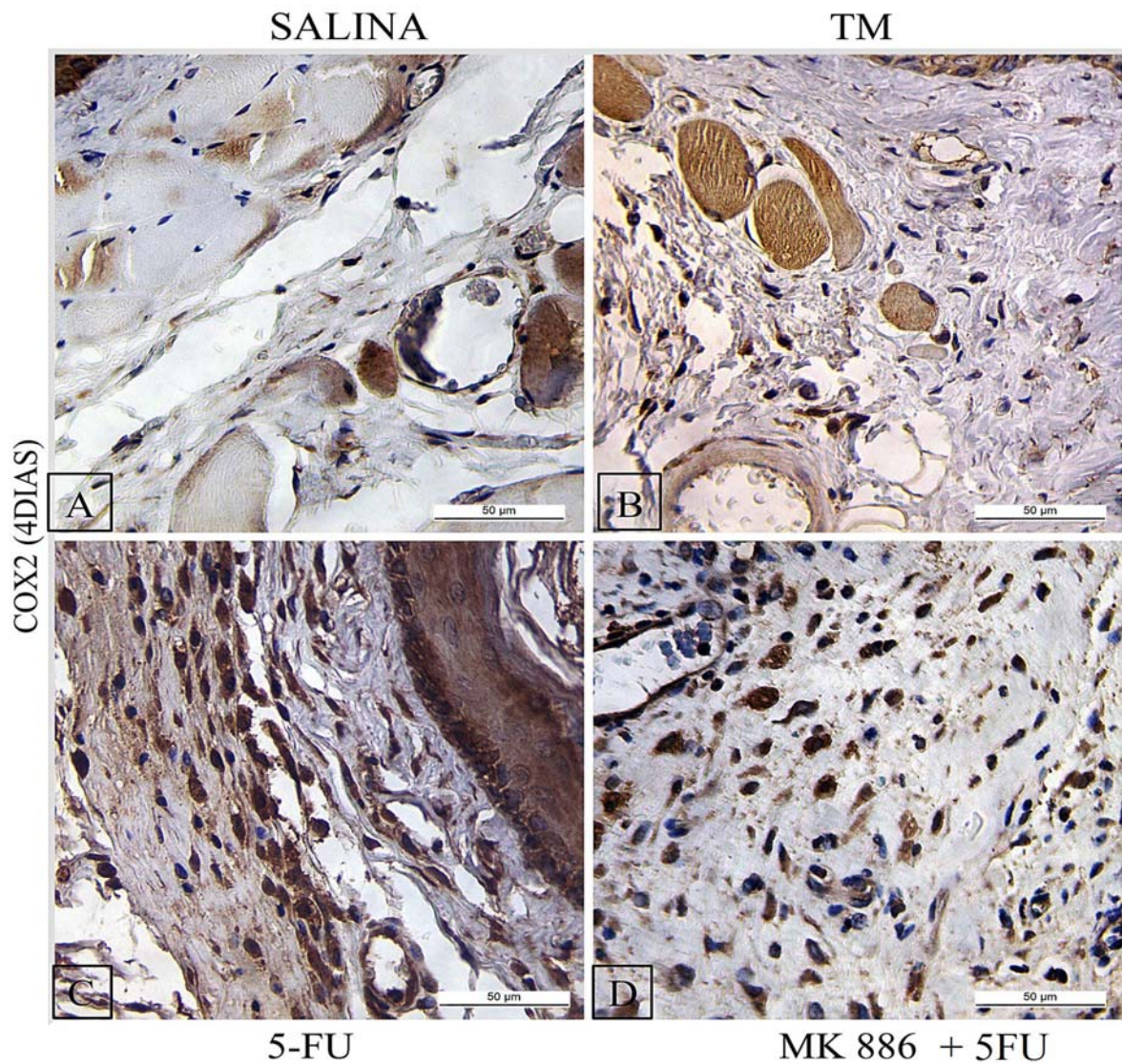
IMUNOISTOQUÍMICA COX2 4 DIAS DE TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ou nuclear. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudios (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 22 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para COX-2 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para COX-2 (aumento de 400x). (A) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (B) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (C) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU) (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam MK886 3,0mg/Kg/dia/10dias, i.p.

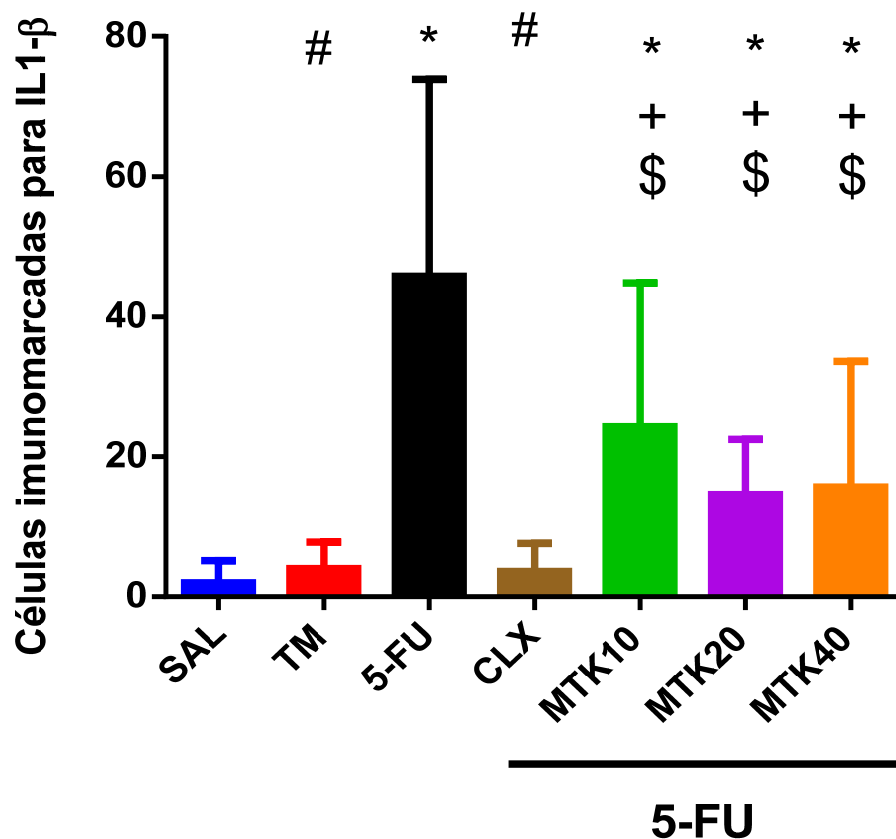
5.5 Análise imunoistoquímica para detecção de IL1- β

Com intuito de detectar a produção IL1- β , uma citocina pró-inflamatória, é modificado devido ao uso de antileucotrienos na mucosite oral induzida por 5-FU, foi realizado o estudo de sua expressão nesta pesquisa. Observou-se que ocorre aumento da expressão de células imunomarcadas para IL1- β nos grupos onde houve indução de MO. O grupo 5-FU apresentou um aumento importante da imunomarcagem em relação aos controles sadios (SAL e TM) e ao controle considerado padrão ouro de tratamento neste estudo (CLX). Não houve diferenças significativas com os grupos que utilizaram MTK em nenhuma das doses administradas, embora apresente uma tendência à redução a qual não se confirma com a aplicação dos testes estatísticos quando compara-se com os controles SAL, TM e CLX (Figura 23, Figura 24) ($p < 0,05$). Os achados sugerem que os cys-LT não tem influência importante sobre a expressão de IL1- β no modelo de mucosite induzido por 5-FU. Demostram, ainda, que a presença de IL1- β é bastante afetada pelo bloqueio da COX-2 provocando uma mudança significativa, para menos, na expressão desta na mucosa inflamada deste modelo de mucosite por 5-FU (Tabela 3).

A presença de células marcadas para IL1- β seguiu o mesmo padrão verificado para INOS2 e COX-2, sendo observado, não haver proteção significativa ao bloquear os cys-LT, mesmo utilizando doses diferentes, expressa através de não ocorrer uma diminuição significativa do número de células imunomarcadas nos grupos MTK10, MTK20 e MTK40 (Figura 23, Figura 24) ($p < 0,05$). E, também, foi observado uma proteção significativa no grupo CLX (bloqueio da via da COX-2), além de um aumento marcante da expressão no grupo 5-FU (controle positivo da MO) (Figura 23, Figura 24) (Tabela 3) ($p < 0,05$).

Figura 23 – Imunoistoquímica para detecção de IL-1 β . após bloqueio do cisteinil leucotrieno

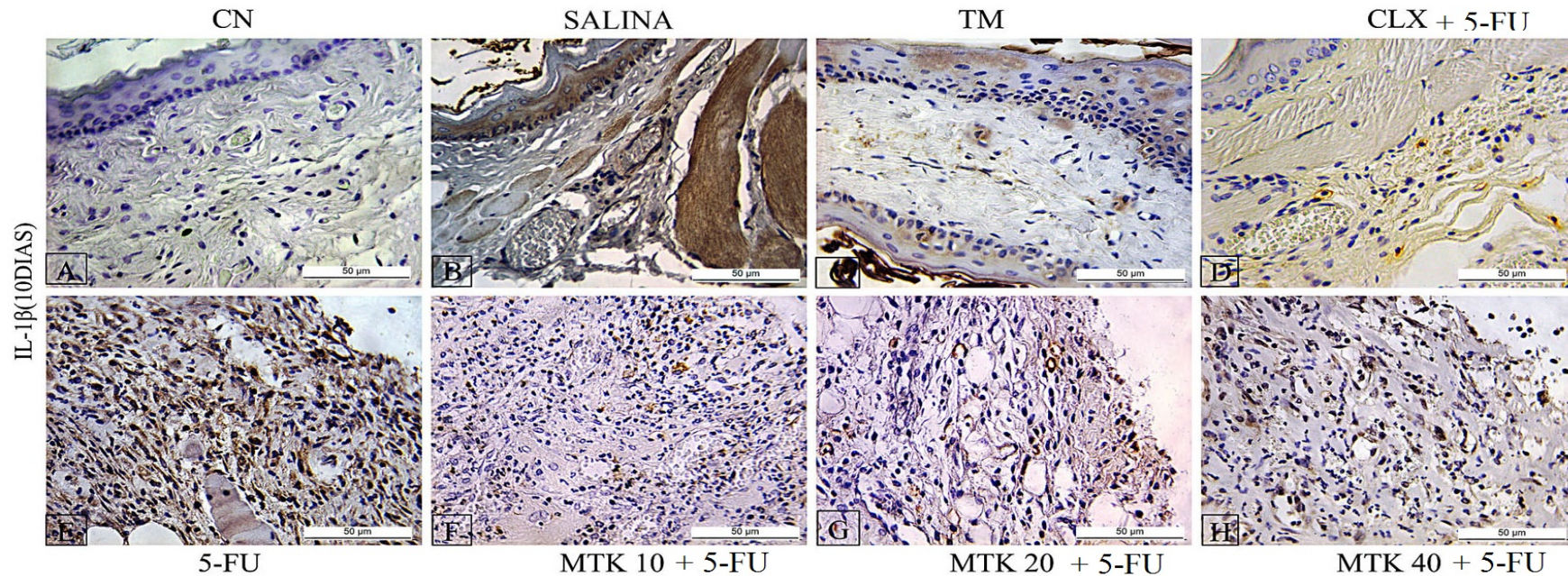
IMUNOISTOQUÍMICA IL1- β 10 DIAS TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas * p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudáveis (SAL); + p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX ; # p<0,05 comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 24 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para IL1- β após bloqueio do cistineil leucotrieno



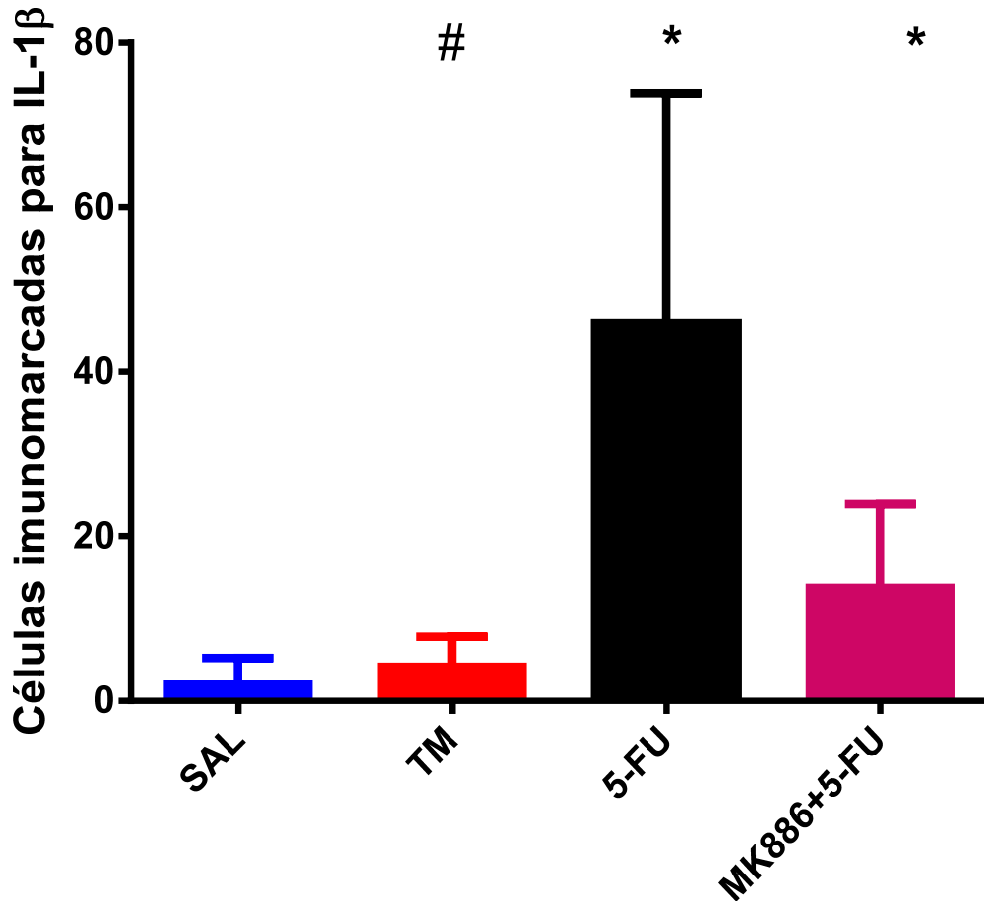
Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para IL1- β (aumento de 400x). (A) Controle negativo (CN) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para IL1- β , (B) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (C) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam celecoxibe 7,5 mg/dia/10dias, i.p. (CLX), (E) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU), (F) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 10 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK10) (G) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 20 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK20), (H) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 40 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK40).

Com o intuito de detectar se a produção desta citocina pró-inflamatória é modificada devido à inibição da 5-LOX por MK886 na mucosite oral por 5-FU, foi realizado o estudo de sua expressão nesta pesquisa. Observou-se que ocorre aumento da expressão de células imunomarcadas para IL1- β nos grupos onde houve indução de MO. O grupo 5-FU apresentou um aumento importante da imunomarcagem em relação aos controles sadios (SAL e TM). Não houve diferença significativa com o grupo que utilizou MK 886 e o grupo 5-FU (Figura 25, Figura 26) ($p < 0,05$), embora o grupo no qual foi inibido a 5-LOX tenha apresentado uma tendência à redução, esta não se confirma com a aplicação dos testes estatísticos quando comparam-se com os controles SAL, TM (Figura 25, Figura 26) (Tabela 4) ($p < 0,05$).

Figura 25 – Imunoistoquímica para detecção de IL1- β após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

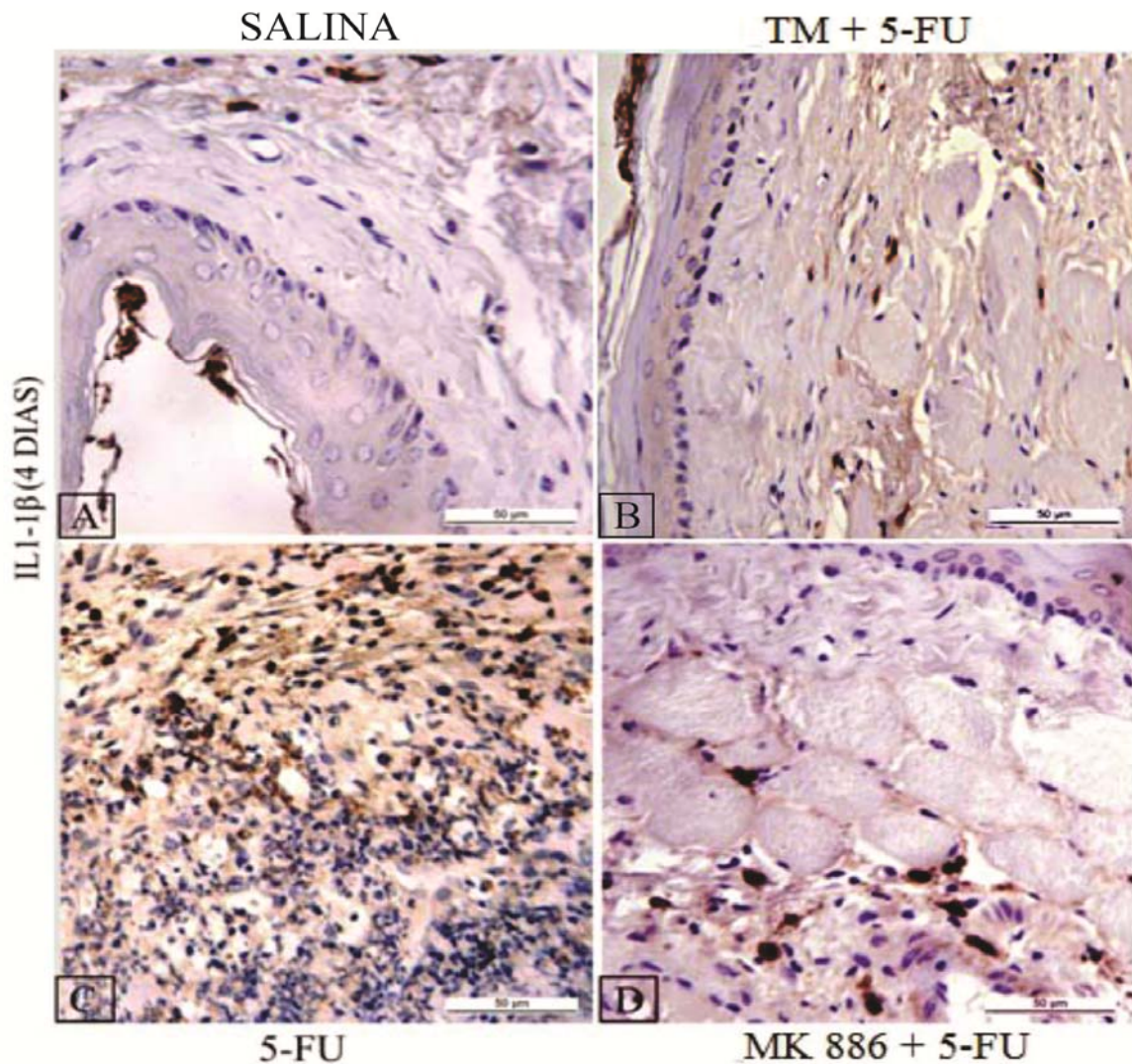
IMUNOISTOQUÍMICA IL1- β 4 DIAS DE TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ou nuclear. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudáveis (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 26 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para IL1- β após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

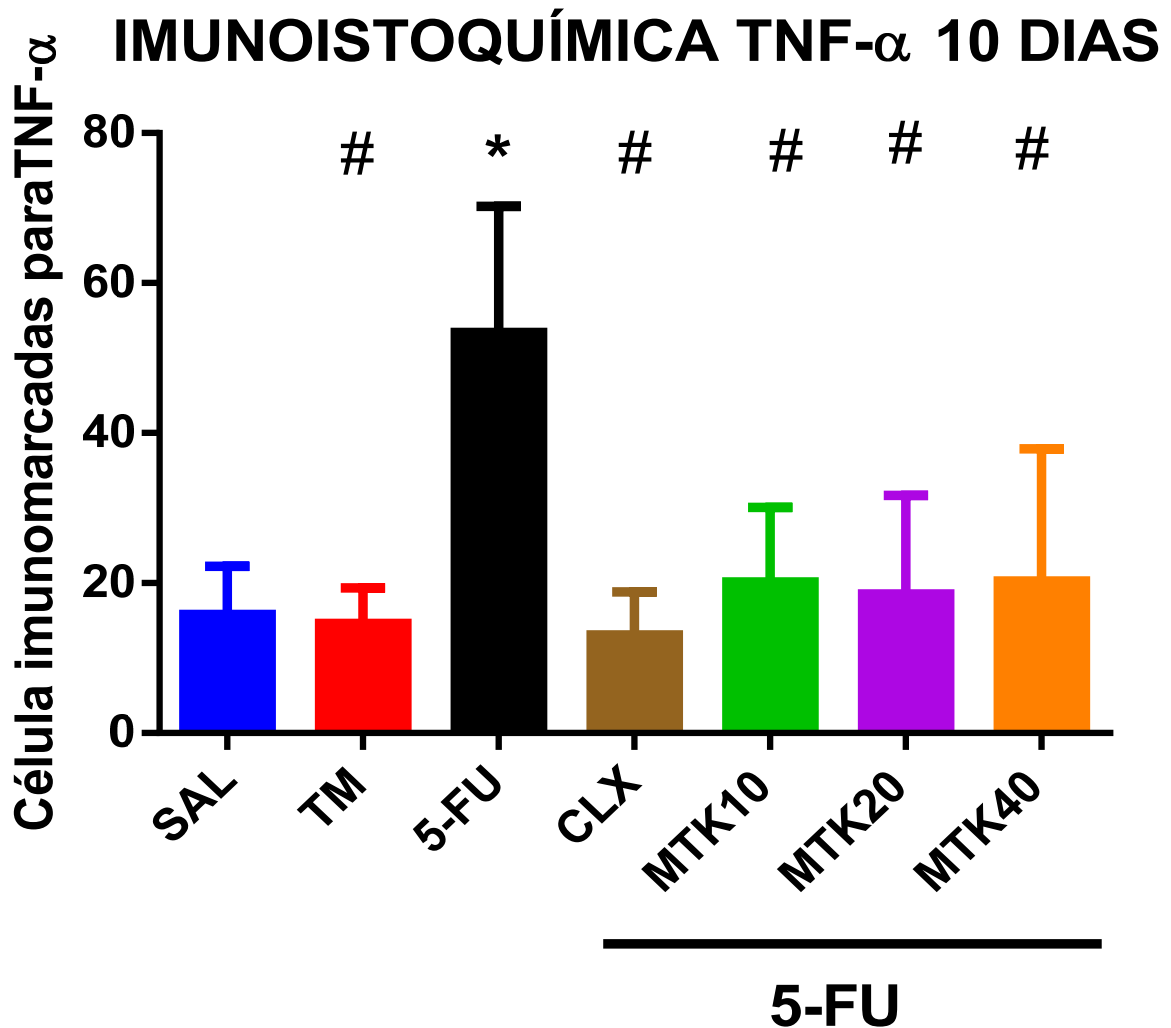
No 10^o dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para IL1- β (aumento de 400x). (A) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (B) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (C) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU) (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam MK886 3,0mg/Kg/dia/10dias, i.p.

5.6 Análise imunoistoquímica para detecção de TNF- α

A pesquisa de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, por imunoistoquímica, foi realizada e evidenciou um aumento significativo de sua expressão no grupo 5-FU (controle positivo de indução da MO). Assim demonstrando sua ação inflamatória neste grupo (Figura 27, Figura 28) ($p < 0,05$). A administração de celecoxibe promoveu uma redução significativa da expressão desta citocina, assim como, a inibição do cys-LT através do uso de MTK nas diversas doses utilizadas (Figura 27, Figura 28) (Tabela 3) ($p < 0,05$), demonstrando, desta maneira, uma proteção e/ou diminuição deste marcador inflamatório tanto pela inibição da via da cicloxigenase 2 quanto pela inibição da via dos cisleucotrienos.

Ao analisar o efeito do bloqueio da 5-LOX por MK886, o estudo para identificar a expressão celular de TNF- α , por imunoistoquímica, ostenta um aumento significativo de sua expressão no grupo 5-FU (controle positivo de indução da MO). Assim demonstrando sua ação inflamatória neste grupo (Figura 29, Figura 30) ($p < 0,05$). A administração de MK886 com consequente inibição da 5-LOX, promoveu uma redução significativa da expressão do número de células marcadas para esta citocina, demonstrando, desta maneira, uma proteção observada através da diminuição deste marcador inflamatório pela inibição da via dos leucotrienos (Tabela 4).

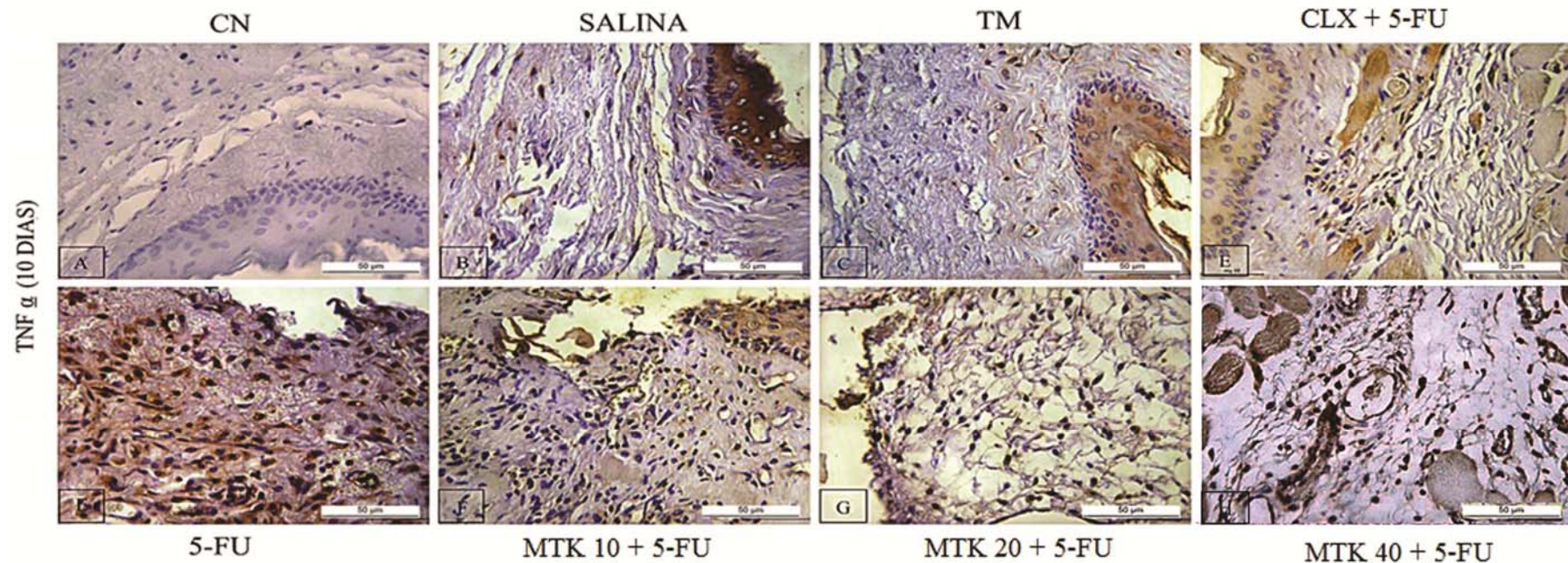
Figura 27 – Imunoistoquímica para detecção de TNF- α após bloqueio do cisteinil leucotrieno



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas* $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudáveis (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 28 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para TNF- α após bloqueio do cisteinil leucotrieno

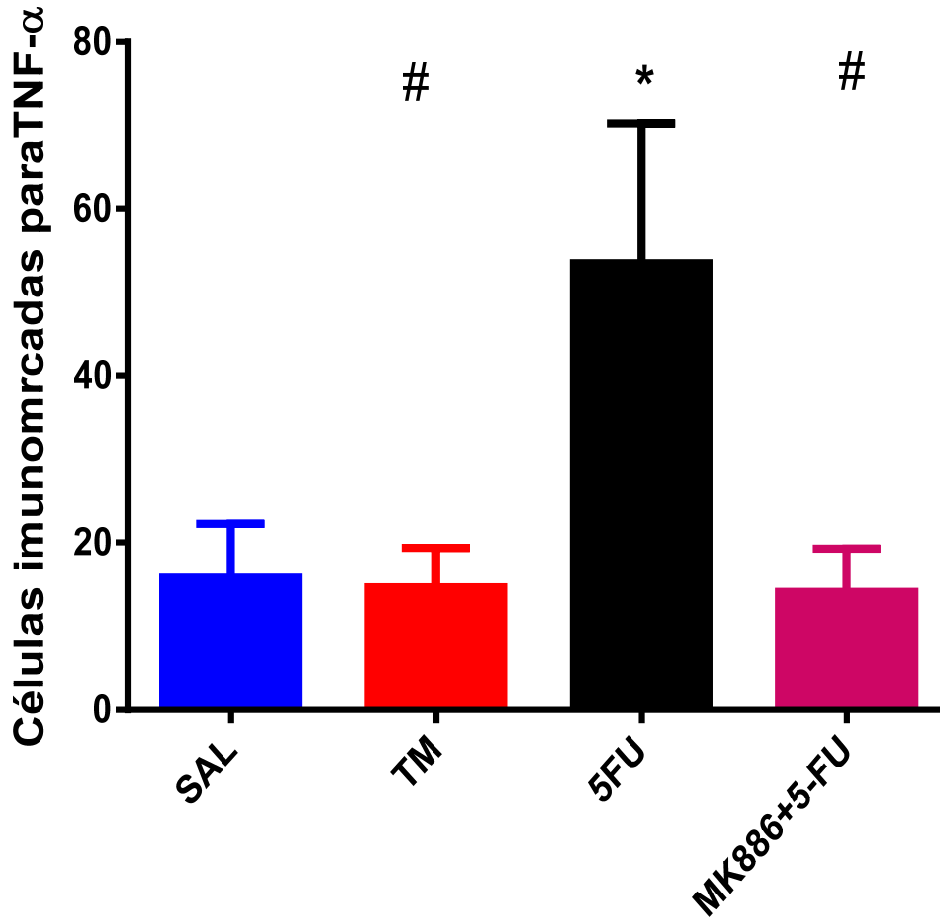


Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para TNF- α (aumento de 400x). (A) Controle negativo (CN) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para TNF- α , (B) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (C) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam celecoxibe 7,5 mg/dia/10dias, i.p. (CLX), (E) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU), (F) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 10 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK10) (G) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 20 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK20), (H) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 40 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK40).

Figura 29 – Imunoistoquímica para detecção de TNF- α após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

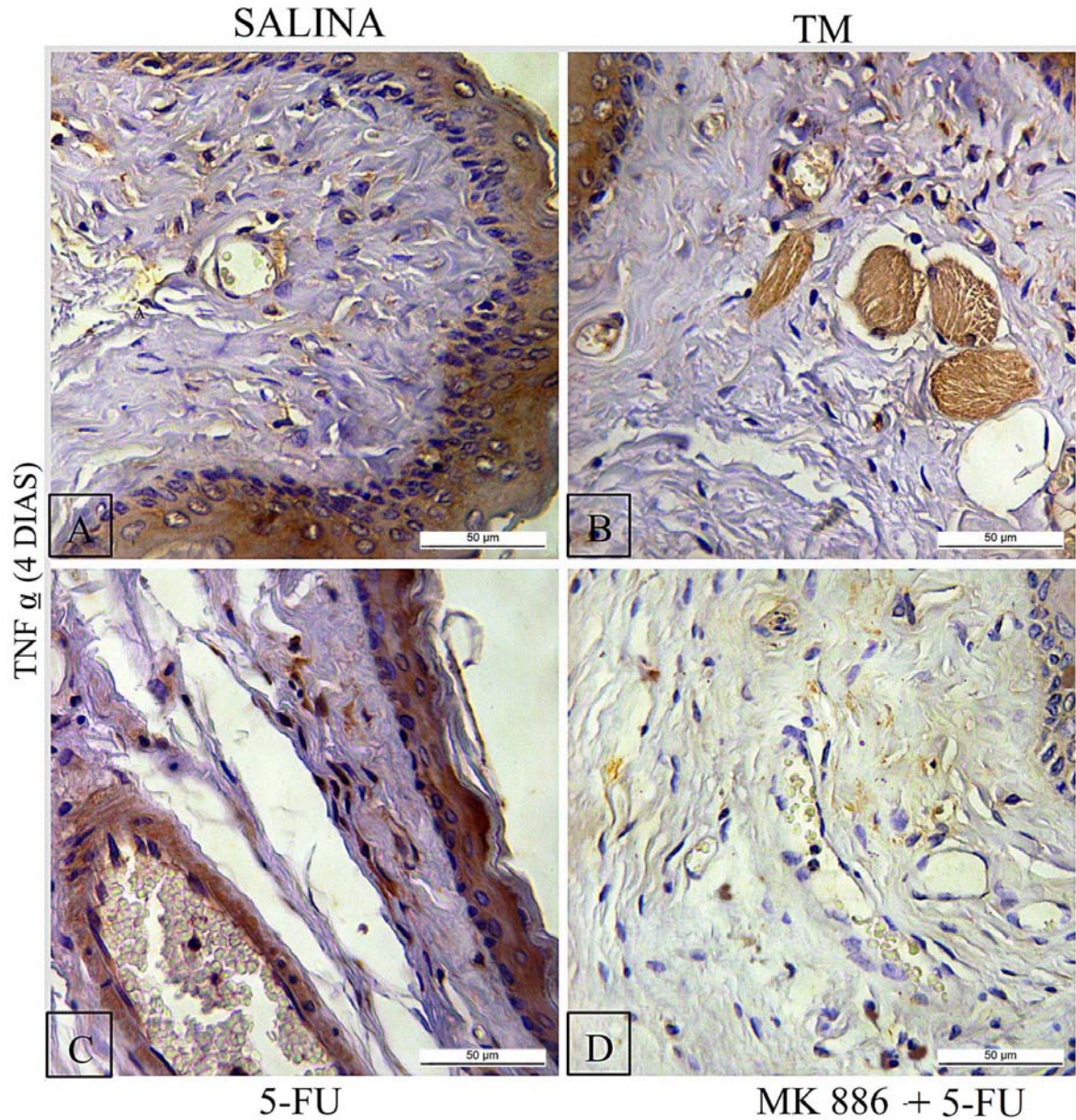
IMUNOISTOQUÍMICA TNF- α 4 DIAS DE TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ou nuclear. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudios (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 30 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para TNF- α após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

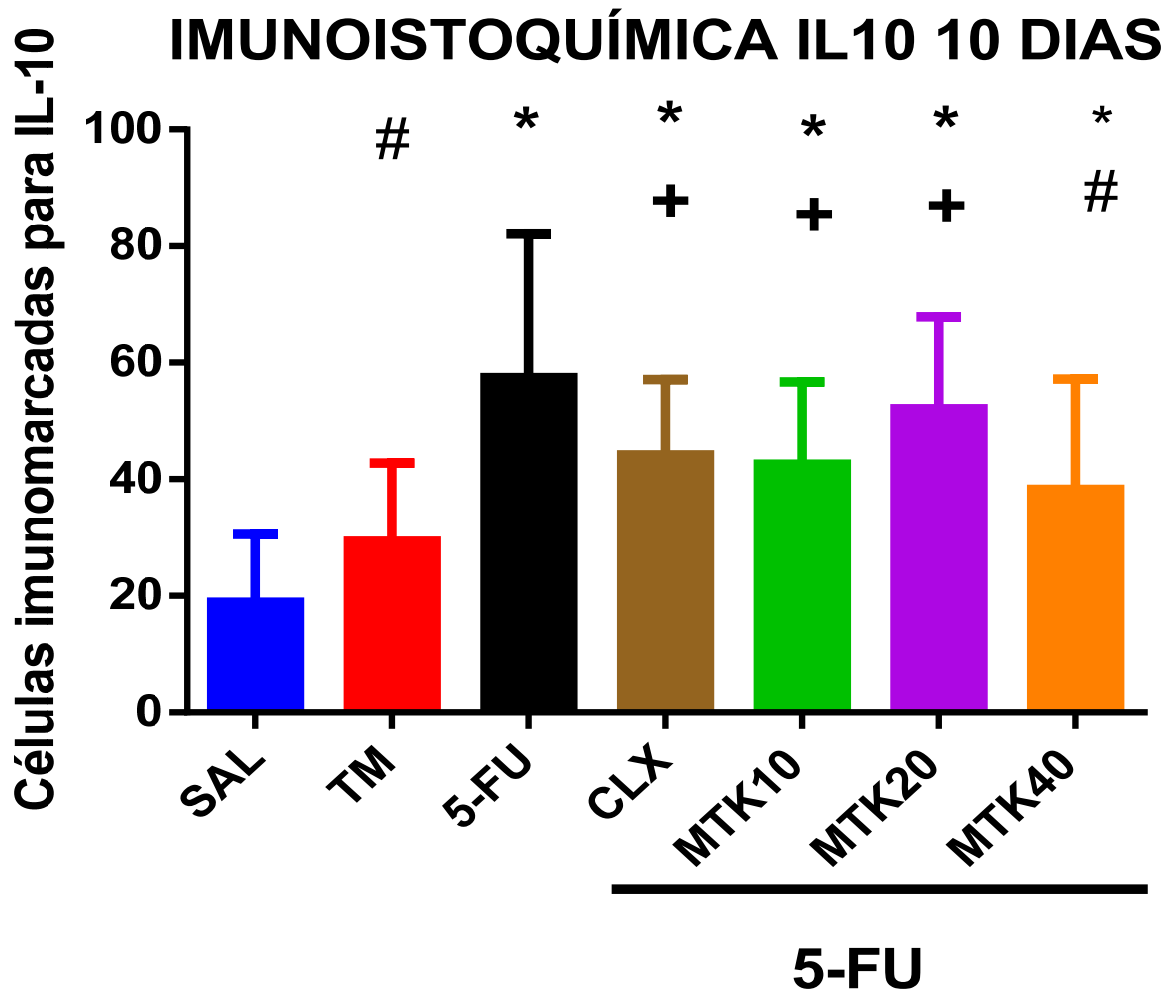
No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para TNF- α (aumento de 400x). (A) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (B) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (C) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU) (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam MK886 3,0mg/Kg/dia/10dias, i.p.

5.6 Análise imunoistoquímica para detecção de IL10

Procurando verificar o comportamento de uma citocina de características anti-inflamatórias ao efeito da inibição dos cys-LT e da COX-2, durante a mucosite oral por 5-FU, o estudo imunohistoquímico para a detecção de IL10 foi realizado. Todos os grupos com indução de MO por 5-FU (5-FU, MTK10, MTK20, MTK40 e CLX) apresentaram um aumento da expressão de células da mucosa jugal dos *hamsters* para IL10 (Figura 31, Figura 32) ($p < 0,05$). Interessante observar que o grupo CLX (tratamento padrão), também, apresentou um aumento significativo da expressão quando comparado com os grupos SAL e TM (controles normais, não submetidos a indução da MO). Assim, a análise estatística deste estudo, quando a referência foi o grupo salina, demonstrou semelhança com o grupo trauma mecânico e diferença com todos os outros grupos na avaliação estatística (Figura 31, Figura 32) (Tabela 3) ($p < 0,05$).

Entretanto, quando o grupo alvo para análise comparativa foi o 5-FU, este foi divergente estatisticamente dos grupos salina, trauma mecânico e curiosamente, também, do grupo que foi administrado à dose de 40mg/kg por dia de montelucaste (Figura 31, Figura 32) (Tabela 3) ($p < 0,05$). Todavia, o grupo 5-FU não apresentou diferença significativa em relação aos grupos que utilizaram as doses de 10 e 20mg/Kg por dia de MTK e ao grupo que recebeu celecoxibe (Figura 31, Figura 32) (Tabela 3) ($p < 0,05$).

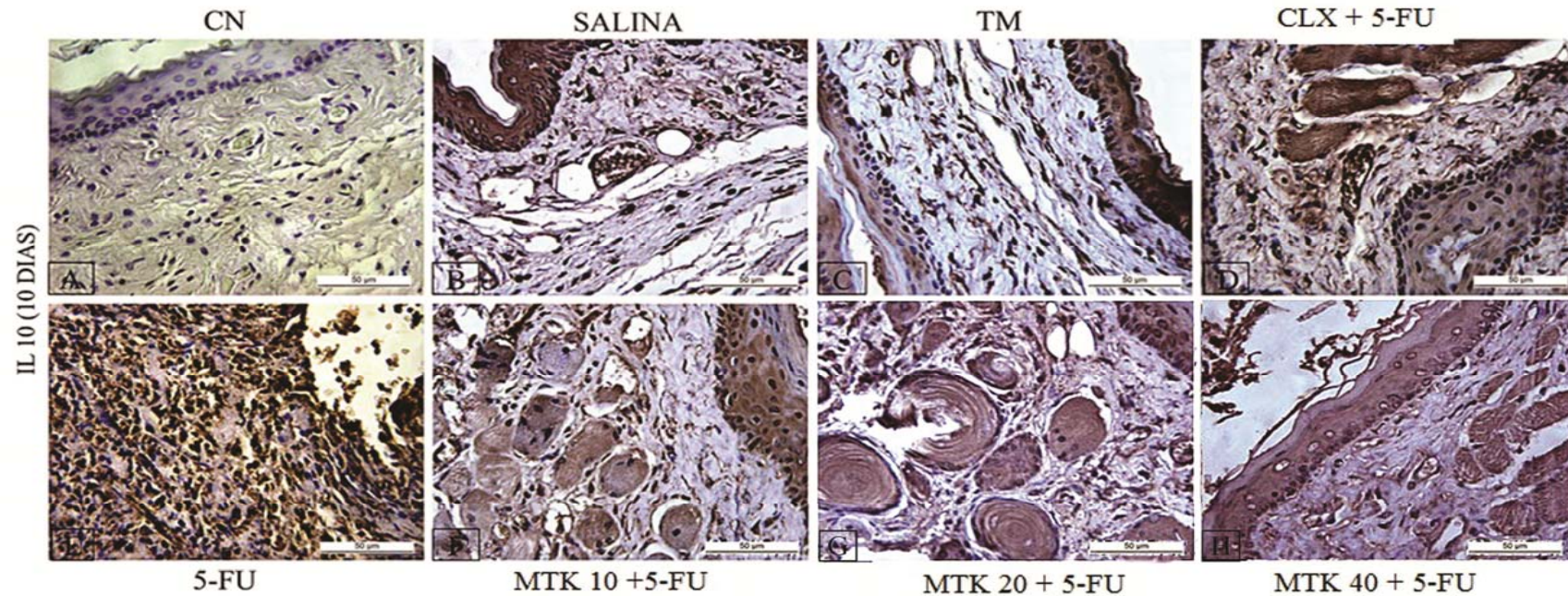
Figura 31 – Imunoistoquímica para detecção de IL-10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas* $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais saudáveis (SAL); + $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais submetidos a trauma mecânico (TM); \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído CLX; # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 32 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para IL10 após bloqueio do cisteinil leucotrieno



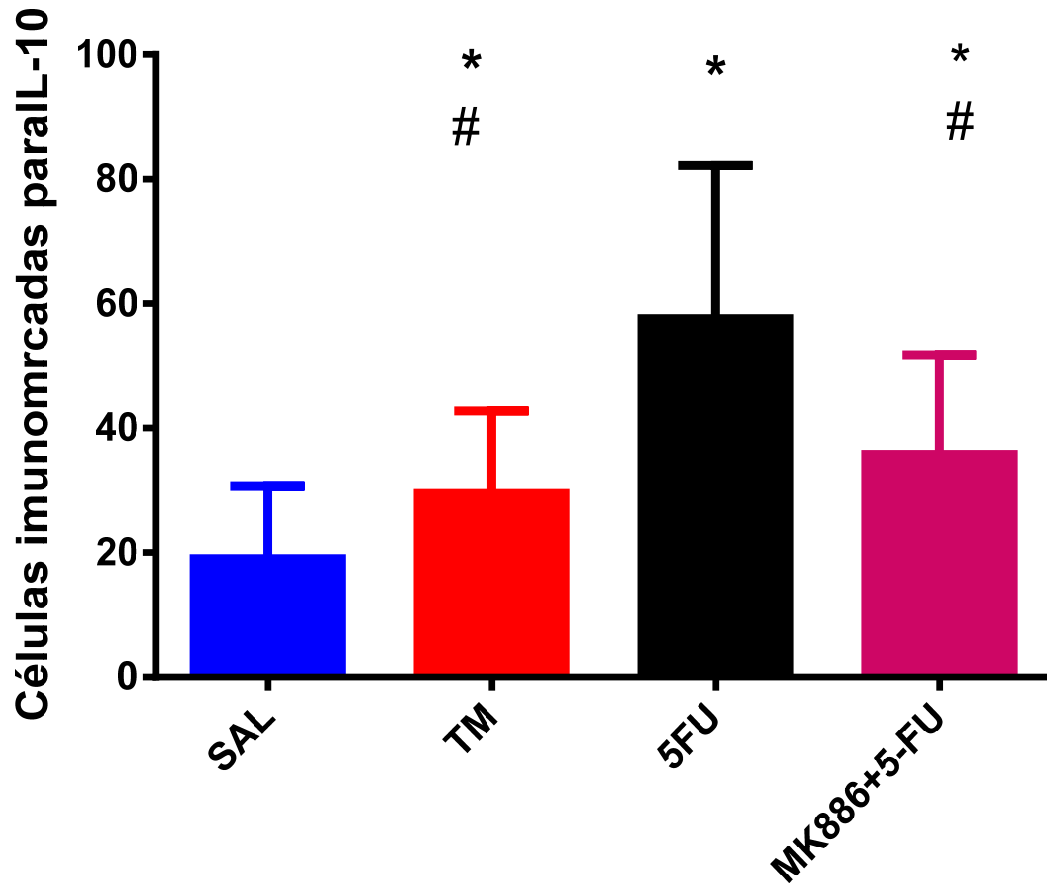
Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para IL10 (aumento de 400x). (A) Controle negativo (CN) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para IL10, (B) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (C) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam celecoxibe 7,5 mg/dia/10dias, i.p. (CLX), (E) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU), (F) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 10 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK10) (G) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 20 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK20), (H) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam montelucaste 40 mg/Kg/dia por 10 dias (MTK40).

Procurando verificar o comportamento de uma citocina de características anti-inflamatórias ao efeito da inibição 5-LOX durante a mucosite oral por 5-FU, o estudo imunohistoquímico para a detecção de IL10 foi realizado. Todos os grupos com indução de MO por 5-FU (5-FU, MK886) apresentaram um aumento da expressão de células da mucosa jugal dos *hamsters* para IL10 quando comparados com o grupo SAL (Figura 30, Figura 31) (Tabela 4) ($p < 0,05$). Interessante observar que o grupo TM também, apresentou um aumento significativo da expressão quando comparado com os grupos SAL (ambos controles normais, não submetidos a indução da MO) (Figura 30, Figura 31) (Tabela 4) ($p < 0,05$). Assim, a análise das células marcadas para IL10 apresenta diferença significativa estatisticamente entre o grupo salina e todos os outros, inclusive o grupo TM (Figura 30, Figura 31) (Tabela 4) ($p < 0,05$). Por outro lado, ao efetuar-se a comparação em relação ao grupo 5-FU ocorre diferença significativa com os grupos salina, TM e MK886. Portanto, a inibição dos leucotrienos através do bloqueio da 5-LOX por apenas quatro dias interfere na expressão de IL10.

Figura 33 – Imunoistoquímica para detecção de IL10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886

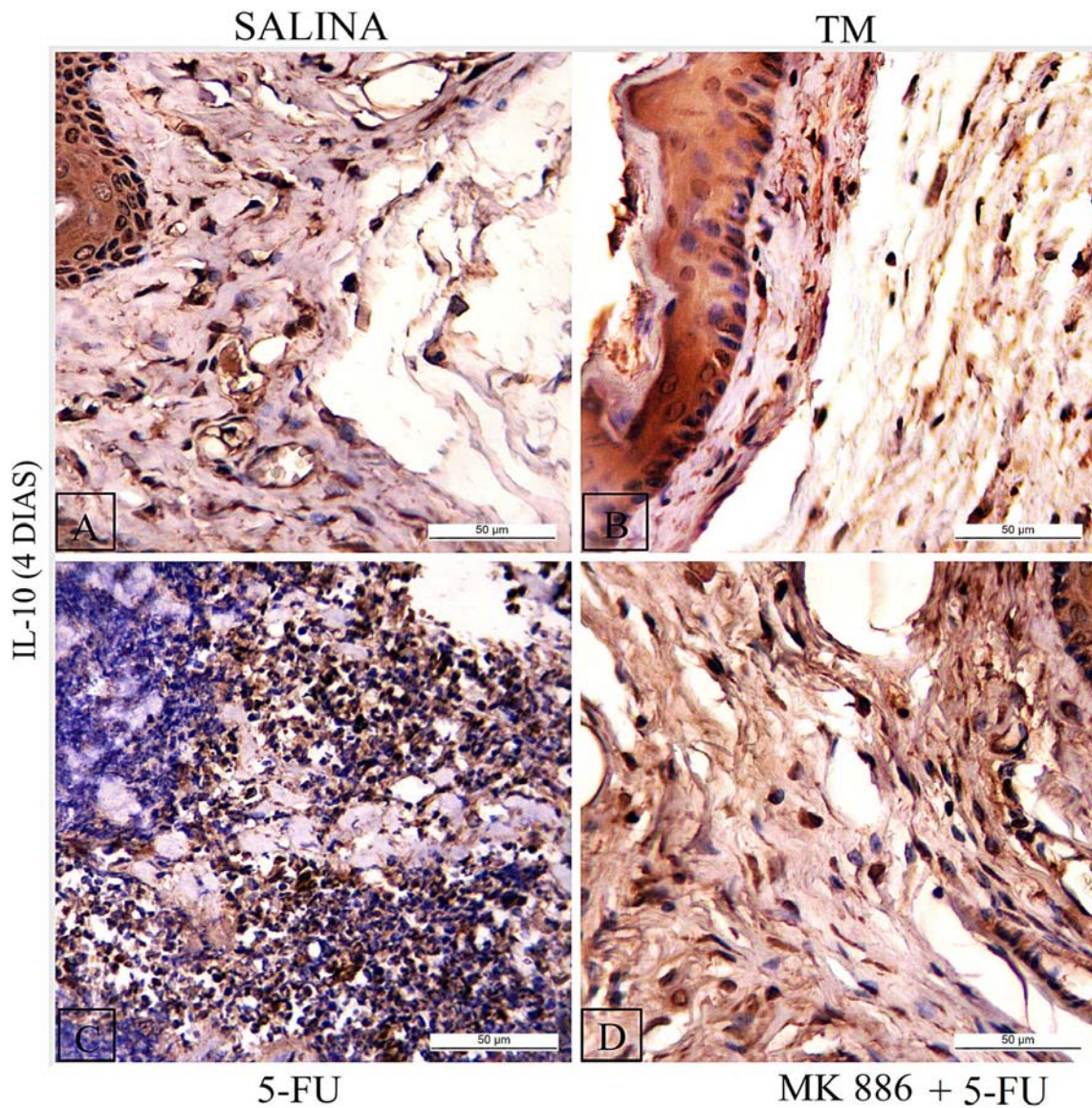
IMUNOISTOQUÍMICA IL10 4 DIAS DE TRATAMENTO



Fonte: próprio autor.

Foram avaliados pelo menos 4 animais por grupo e analisados 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o image j. Consideradas células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ou nuclear. Os dados representam médias do número de células imunomarcadas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle constituído de animais sadios (SAL); # $p < 0,05$ comparação com o grupo 5-FU. Gráfico demonstra média com desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's.

Figura 34 – Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para IL-10 após bloqueio da 5-lipoxigenase por MK886



Fonte: próprio autor.

No 10º dia do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para IL-10 (aumento de 400x). (A) mucosa jugal de *hamsters* normais (sem indução de mucosite oral e que receberam salina (SALINA), (B) mucosa jugal de *hamsters* submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), (C) mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (5-FU) (D) mucosa jugal de *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU que receberam MK886 3,0mg/Kg/dia/10dias, i.p.

6 DISCUSSÃO

A mucosite oral como efeito colateral ao uso de quimioterápicos ainda apresenta lacunas em seus mecanismos fisiopatológicos. Este estudo procurou esclarecer alguns aspectos do papel dos leucotrienos, sobretudo dos cys-LTs, no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU através do uso de inibidor do cys-LT, o montelucaste (MTK), e do inibidor da 5-lipoxigenase (5-LOX), o MK886.

Os *hamsters* foram utilizados no modelo de mucosite oral pela facilidade de observação de suas mucosas jugais e por sua habilidade em tolerar doses do quimioterápico capazes de induzir mucosite sem mortalidade significativa (SONIS *et al.*, 1990). O modelo de mucosite oral em *hamster* por 5-FU foi proposto inicialmente por Sonis *et al.* (1990), posteriormente foi modificado por Lima *et al.* (2005) e Leitão *et al.* (2007) no nosso grupo de pesquisa. Nos estudos prévios de Lima *et al.* (2005), Leitão *et al.* (2007, 2008) e Medeiros *et al.* (2011) foi verificado ocorrer o auge do processo inflamatório neste modelo no décimo dia do experimento, fenômeno evidenciado nos achados histopatológicos na coloração por HE. Por isso, escolhemos, no presente trabalho, o 10º dia para a coleta de amostras das mucosas. Os animais submetidos ao modelo de mucosite por 5-FU, no presente estudo, apresentaram processo inflamatório intenso no décimo dia, sobretudo no grupo controle positivo (5-FU), com eritema, hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras extensas e abscesso. Estes achados são concordantes com o pico do processo inflamatório.

Nesse estudo foi observado que macroscopicamente, quando aumentada à dose do bloqueador dos cys-LT para 40mg/Kg/dia durante 10 dias, ocorreu proteção parcial, pouco intensa em comparação com o bloqueio da COX-2, na mucosite oral por 5-FU. Este achado esteve ausente na avaliação histopatológica, talvez devido ao menor número de escores na análise histopatológica alterações mais sutis de sinais de melhora passem despercebidas.

Demonstrou-se anteriormente que no quinto dia do experimento já existe processo inflamatório no modelo de mucosite oral por 5-FU e que com quatro dias de intervenção pode-se observar resposta farmacológica (MEDEIROS *et al.*, 2011). Assim, o uso de MK886 nos primeiros quatro dias já nos permite uma inferência de sua ação ao avaliarmos os animais no décimo dia do experimento.

Durante o processo inflamatório a presença de leucócitos pode ser um fator marcante agindo tanto para o seu controle quanto para sua exacerbação (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). A dosagem de MPO é um bom método para avaliar a presença de neutrófilos em diversos tecidos, assim devido ao grande aumento de neutrófilos na MO a MPO está aumentada no auge do processo inflamatório da mucosite por 5-FU (LIMA *et al.*, 2005). Também, neste estudo observou-se um aumento da MPO nos grupos submetidos à mucosite por 5-FU. Por outro, lado sua redução nos grupos tratados sugeriria uma redução do número de neutrófilos nestes tecidos, e conseqüente diminuição das alterações inflamatórias, fenômeno ausente nos grupos tratados com MK886 por 4 dias.

Diversos mediadores inflamatórios participam no processo inflamatório (ex.: prostaglandinas e citocinas) e estes podem também influenciar o aumento dos neutrófilos (WAGNER; ROTH, 2000). Apesar da conhecida atividade quimiotática dos leucotrienos (WALLACE; MA, 2001), o presente bloqueio da 5-lipoxigenase não reduziu a migração neutrofílica inferida pela dosagem de MPO nas mucosas jugais dos animais com mucosite por 5-FU, o que pode ser explicado devido à ação de outros mediadores quimiotáticos inalterados pelo bloqueio farmacológico.

Em estudo sobre a ação das vias da COX e LOX sobre células de câncer colorretal, demonstrou-se que a inibição de um braço da cascata do ácido araquidônico pode resultar em amplificação potencial de outro, com possíveis efeitos desagradáveis, como a inibição da via da COX-2 pode determinar a ativação da 5-LOX com um aumento da produção de leucotrienos com ação tumorigena como LTD4. Observou-se, ainda, que a combinação de baixas doses de inibidores da COX-2, como celecoxibe, e 5-LOX, como MK886, poderia prevenir esse efeito de desvio e prover uma ação antitumor por pelo menos dois mecanismos pró-apoptóticos diferentes, porém sendo necessários maiores estudos para um completo esclarecimento (CIANCHI *et al.*, 2006). Esse efeito de desvio ou *shunting*, também, poderia explicar a presente ausência de redução da MPO nos animais com a via dos leucotrienos bloqueada, pois pode ocorrer um aumento da via da COX-2 que reconhecidamente promove um aumento da MPO no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU.

Lima *et al.* (2005) verificaram que o 5-FU, nas doses capazes de induzir a mucosite oral, causou aumento significativo do número de úlceras, de petéquias, áreas hemorrágicas, edemaciadas ou perdas de pregas das mucosas gástricas,

quando comparado as de animais normais. Sener *et al.* (2005) apresentaram um estudo demonstrando os possíveis efeitos protetores dos bloqueadores do receptor de leucotrienos na lesão gástrica por alendronato, sendo verificado que a administração crônica oral de alendronato induz danos gástricos importantes, aumentando a atividade da mieloperoxidase e peroxidação lipídica, enquanto os níveis teciduais de glutathiona são reduzidos, e que o tratamento com MTK previne a lesão, bem como, as mudanças nos parâmetros bioquímicos estudados, sugerindo ter o MTK atividade protetora contra esses danos via efeitos anti-inflamatórios (SENER *et al.*, 2005). Em outro estudo comparando MTK, lansoprazol, famotidina e ranitidina, em lesões gástricas induzidas por indometacina, todos reduziram o desenvolvimento de lesão, ocorrendo esta redução em uma magnitude maior com o MTK, famotidina e lansoprazol que com ranitidina. Esses resultados sugeriram que os efeitos gastroprotetores do MTK nas ulcerações induzidas pela indometacina podem ser atribuídos pelo seu efeito na melhora da lesão oxidativa e atividade da MPO (DENGIZ *et al.*, 2007). Uma análise retrospectiva preliminar observou que pacientes que faziam uso de antagonista de longa duração do receptor dos leucotrienos apresentaram baixa incidência de mínimas mudanças endoscópicas da esofagite (LEE *et al.*, 2012). No presente estudo optamos deixar de avaliar eventuais alterações gástricas por 5-FU e os efeitos do MTK sobre estas.

Anteriormente foi verificado, ter o celecoxibe efeito dual na mucosite oral por 5-FU. Na dose de 7,5 mg/kg/dia o celecoxibe reduz de maneira significativa a mucosite por 5-FU. Em doses maiores, este bloqueador seletivo da COX-2, foi incapaz de reduzir o processo inflamatório. Dentre as possíveis explicações para este fato estariam seletividade relativa para COX-2 e o aumento da dose provocaria também inibição da COX-1 e/ou que a COX-2, a qual poderia ser expressa constitutivamente em diversos sítios, poderia produzir mediadores benéficos e os mesmos efeitos úteis da COX-1 (LIMA *et al.*, 2005). Assim, optou-se neste estudo por utilizar a dose com conhecidos efeitos positivos. É interessante citar que a perda completa do efeito anti-inflamatório do celecoxibe pode ocorrer, também, em altas doses devido à superestimulação da transcrição de NF- κ B e consequente aumento de proteínas pró-inflamatórias como COX-2 e TNF- α , enquanto em doses terapêuticas este estaria sendo inibido e, assim, promovendo o efeito anti-inflamatório (NIEDERBERGER *et al.*, 2001).

Sabe-se o óxido nítrico participar da patogenia da mucosite oral por 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2007; SONIS *et al.*, 2002), portanto, se algo diminui ou aumenta a expressão de iNOS terá consequentemente efeito anti-inflamatório ou inflamatório da mucosite oral. No presente estudo, os achados na análise imunoistoquímica para iNOS2 são similares entre o grupo 5-FU e os grupos tratados com MTK, sugerindo ausência de efeito protetor. Entretanto, o inibidor da COX-2, celecoxibe, diminuiu de modo notável a expressão de iNOS2. Estes achados reforçam aparente interação entre a via da COX-2 e a produção de iNOS2. Por outro lado, também, sugere que ausência desta interação em relação aos cys-LT e iNOS2 na MO por 5-FU. Aliás, no modelo de colite por TNBS, o inibidor da 5-lipoxigenase, zileuton, manteve inalterada a expressão de iNOS no colon destes animais, tendo o zileuton modificado a produção de leucotrieno B4 sem apresentar nenhum efeito na atividade da mieloperoxidase, sugerindo que no modelo de colite por TNBS, o leucotrieno B4, seria um fator quimiotático pouco importante para os neutrófilos na fase aguda (HOLMA *et al.*, 2001). Na mucosite oral induzida por 5-FU o bloqueador da 5-LOX, MK886 também foi incapaz de reduzir os níveis de iNOS2 e a atividade da MPO de maneira significativa em relação ao grupo controle positivo de MO por 5-FU. Sugerindo, assim, que mesmo o bloqueio de toda a via dos leucotrienos é impotente em alterar o seu efeito sobre a expressão de iNOS2 neste modelo de MO, sem conferir, portanto, nenhum efeito de proteção neste processo inflamatório.

Baixos níveis de TNF- α e iNOS sugerem diminuição do processo inflamatório no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU (SKEFF *et al.*, 2014). O efeito biológico do óxido nítrico é francamente dependente da sua concentração (RALSTON *et al.*, 1995; LEITÃO *et al.*, 2004). O óxido nítrico parece estimular células inflamatórias a secretarem maior quantidade de fatores de crescimento como o TGF- β , conhecido por estimular a diferenciação miofibroblástica (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005). Dados da literatura demonstram que as citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas estimulam a expressão de óxido nítrico sintase induzida em vários tipos de células (BOGDAN, 2001; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) com consequente produção aumentada de óxido nítrico. Por outro lado, sabe-se que os glicocorticóides e citocinas com ações anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e o fator de transformação β (TGF- β) tendem a diminuir a produção de óxido nítrico via iNOS (BOGDAN, 2001; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Entretanto, a inibição da iNOS promove aumento de produção de IL-10 (MUHL; DINARELLO, 1997). No

presente estudo mesmo na ausência de redução da expressão de iNOS2 foi observado maior expressão de IL10 em todos os grupos em que a MO foi induzida. Leitão *et al.* (2007) demonstraram a participação do óxido nítrico na mucosite oral induzida por 5-FU corroborando os achados de Sonis *et al.* (2002).

Ao ser observado um aumento da expressão de células marcadas para iNOS2 na imunoistoquímica é sugerido que haver maior síntese de óxido nítrico no tecido. O óxido nítrico possui efeitos benéficos como atividade antimicrobiana e a modulação imunitária (ALLAKER *et al.*, 2001; KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Mas pode apresentar efeitos prejudiciais que incluem uma ação citotóxica para os tecidos adjacentes do hospedeiro, resultando em lesão tecidual em diversos processos inflamatórios (BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; CHEN; INOUE; OKADA, 1996; DICKINSON *et al.*, 1999; FANG, 1997; FORD *et al.*, 1997; HUTCHESON; WHITTLE; BOUGHTON-SMITH, 1993; KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994; LEITÃO *et al.*, 2004; LOHINAI *et al.*, 2001; MIDDLETON; SHORTHOUSE; HUNTER, 1993; PARKINSON; MITROVIC; MERRILL, 1997; PETROS; BENNETT; VALLANCE, 1994; PETROS *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 2002; SINGER *et al.*, 1996; SORRELLS *et al.*, 1996; SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; STEFANOVIC-RACIC; STADLER; EVANS, 1993; TEPPERMAN; BROWN; WHITTLE, 1993; UNNO *et al.*, 1997). Leitão *et al.* (2007) argumentam que níveis basais de óxido nítrico são importantes para a manutenção da homeostase, enquanto níveis elevados de óxido nítrico, produzidos pela iNOS durante os processos inflamatórios estão relacionados a lesão tecidual como proposto por outros pesquisadores (AJUEBOR *et al.*, 1998; BRENNER *et al.*, 1997; HIERHOLZER *et al.*, 1998). Semelhante ao observado por Leitão *et al.* (2007), foi verificado a presença de células marcadas para iNOS mesmo em animais não submetidos a mucosite induzida por 5-FU, corroborando os seus achados.

O peroxinitrito promove peroxidação lipídica (RADI *et al.*, 1991b), oxidação de proteínas (RADI *et al.*, 1991a), além da nitrosilação de resíduos de tirosina de uma grande variedade de proteínas, resultando na inativação de enzimas e/ou de receptores (BRENNER *et al.*, 1997), com consequente injúria tecidual, maior infiltração de células inflamatórias e amplificação da inflamação (SKEFF *et al.*, 2014). Ademais, tem sido demonstrado que o ON produzido em grandes quantidades pela iNOS, promove a liberação de vários mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e quimiocinas, que por sua vez, induzem a liberação de

quantidades adicionais de ON (AJUEBOR *et al.*, 1998; BRENNER *et al.*, 1997; HIERHOLZER *et al.*, 1998). O S-nitrosoglutationa (GSNO) é um doador de óxido nítrico (ON) que atua liberando este radical livre nos tecidos. Em trabalho anterior do nosso laboratório, verificou-se que o tratamento com GSNO 0,5 mM reduziu significativamente os danos na mucosa ulcerada (alterações inflamatórias e morte celular), no 14º dia, mas não no 10º e que o tratamento com GSNO também reverteu o efeito inibidor de 5-FU sobre a proliferação celular no 14º dia da indução sugerindo que a GSNO acelera a recuperação das lesões, provavelmente, devido as suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-apoptótica e efeito proliferativo (SKEFF *et al.*, 2014).

Na presente pesquisa pode-se constatar que a via da COX-2 tem relação com o aumento de iNOS2 e consequente produção de óxido nítrico na mediação inflamatória da mucosite oral por 5-FU, entretanto, os cys-LTs demonstraram pouca influência para o aumento da expressão de iNOS2, sendo observado que o bloqueio destes manteve inalterada sua expressão. Ou seja, parece ser ineficaz ao aumentar a dose do bloqueador de cys-LT, montelucaste. Portanto, observa-se que na mucosite oral induzida por 5-FU, os cys-LT exercem efeito pouco importante na expressão da iNOS2 e consequentemente na produção de óxido nítrico.

Nas células gliais a ativação de fosfolipase A2, e metabólitos do ácido araquidônico da via da 5-lipoxigenase estão envolvidos na expressão gênica de iNOS induzida por lipopolissacaride (LPS), tanto via ativação de NF κ - β dependente quanto independente (WON *et al.*, 2005). Estes achados podem, similarmente, explicar o fato de na mucosite oral induzida por 5-FU a inibição dos leucotrienos não ter sido tão efetiva na redução da expressão da iNOS2. Won *et al.* (2005), em estudo sobre células da glia, sugerem a lipoxigenase como um dos mediadores que podem regular a mediação da PLA2 na indução do gene iNOS pelas vias dependente ou independente do NF- κ β nas células; na verdade eles observaram que o inibidor geral da lipoxigenase (NDGA) e o inibidor específico da 5-LOX, mas nenhum dos inibidores da COX (INDO, NS398 ou SC560) e da 12-LOX usados, inibiu a expressão gênica de iNOS induzida por LPS. Finalmente, a ativação LPS-induzida de NF- κ β foi inibida pelos inibidores da cPLA2, iPLA2 e o inibidor geral da LOX, mas não pelo inibidor específico da 5-LOX, entretanto, nenhum envolvimento da COX na regulação da gênica de iNOS foi observado nas células gliais (WON *et al.*, 2005).

Won *et al.* (2005), afirmam que as diferenças entre estes tipos celulares para o papel da COX-2 na expressão gênica de iNOS permanece ainda discutível, mas os níveis indetectáveis de proteína COX-2 em células da glia em repouso e o papel oposto do cAMP na regulação da expressão de iNOS entre os macrófagos e as células da glia pode contribuir, pelo menos, em parte para estas diferenças (WON *et al.*, 2005). Por conseguinte, em células ativadas cPLA2 pode ser idealmente posicionada para prover ácido araquidônico livre para 5-LOX no núcleo.

Foi observado que o MK886 (inibidor da 5-LOX) inibiu a expressão gênica induzida de iNOS por LPS sem alterar a ativação NF- κ B e que o MK886 (inibidor da LOX) inibiu a expressão gênica induzida de iNOS por LPS sem alterar a ativação NF- κ B (WON *et al.*, 2005).

O envolvimento de leucotrienos na regulação da expressão de gênica de iNOS tem sido relatado em vários tipos de células. Nas células musculares lisas vasculares de rato, o produto 12-LOX, 12-HETE, aumentou a produção de nitrito dependente da dose induzida por IL-1 β (SHIMPO *et al.*, 2000). Além disso, BCL (12-LOX inibidor) inibe expressão gênica de iNOS em macrófagos (CHEN *et al.*, 2001; HASHIMOTO *et al.*, 2003). Contudo, não foi observado o envolvimento de 12-LOX na expressão de gênica de iNOS ou na ativação de NF- κ B em células de glioma de rato C6 bem como em astrócitos primários. Por conseguinte, acredita-se que o envolvimento de 12-LOX na expressão gênica de iNOS seja um evento específico do tipo de célula, ou seja, os resultados documentam que PLA2 e LOX desempenham um papel essencial na ativação da expressão gênica de iNOS através de vias NF- κ B dependente e independente (WON *et al.*, 2005). Estes achados podem, também, explicar o fato de no presente estudo a inibição dos cys-LT e da 5-LOX não terem reduzido a expressão de iNOS, devido provavelmente as células envolvidas no processo inflamatório da mucosite oral por 5-FU serem desprovidas da capacidade para o aumento da iNOS pelos leucotrienos.

O uso do bloqueador dos cys-LT aparentemente teve pouca influência na diminuição da expressão de COX-2 e na inflamação mediada por esta via, pois o número de células marcadas para COX-2 foi estatisticamente equivalente para os grupos 5-FU e os grupos onde o inibidor dos cys-LT ou da 5-LOX foi utilizado. Holma *et al.* (2001) demonstraram em um modelo de colite em ratos que o montelukaste aumentou a prostaglandina E2 e tendeu a diminuir a expressão da COX-2, mas não influenciou a severidade da colite. Ele observou que os fármacos bloqueadores dos

receptores de cys-LTs têm um potencial limitado para melhorar a colite aguda induzida por TNBS, embora exercem alguns efeitos benéficos que os tornam capazes de modular o curso da colite (HOLMA *et al.*, 2001). Estes achados são compatíveis com o observado no presente modelo de mucosite oral por 5-FU, onde o bloqueio do leucotrienos promove uma tendência à redução de expressão de COX-2, porém sem significância estatística na severidade da mucosite oral por 5-FU. Outros estudos demonstraram que diferentes antagonistas dos receptores leucotrienos C4/D4 aumentam a síntese gástrica de prostanoídes na lesão gástrica (WALLACE; BECK; MORRIS, 1988) e no modelo de colite experimental (NISHIKAWA *et al.*, 1995; SJOGREN; COLLETON; SHEA-DONOHUE, 1994). Os achados deste presente estudo sugerem que nem o MTK, nem o MK886 interferem na via da COX-2, de maneira significativa, no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU. Estes dados conflitantes podem ser explicados pelo efeito de *shunt* entre as vias da ciclooxigenase e dos leucotrienos (CIANCHI *et al.*, 2006).

Níveis aumentados de expressão de COX-2 (por imunistoquímica) na mucosa oral humana após a administração de quimioterapia foi demonstrado por alguns pesquisadores (LALLA *et al.*, 2010; LOGAN *et al.*, 2007b). Sonis *et al.* (2004b) demonstraram aumento dos níveis de COX-2 após radiação em um modelo animal de mucosite por radiação, e foi observado que a cinética da expressão da COX-2 foi paralela à gravidade da mucosite. Dados atuais estendem esses achados por medição quantitativa de COX-2 e outros mediadores inflamatórios em tecidos humanos usando RT-PCR quantitativa e inicialmente definem a relação entre os tecidos e os níveis salivares desses mediadores inflamatórios e a extensão da lesão e sintomas mucosos (LALLA *et al.*, 2010). A relação entre os níveis sanguíneos periféricos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) e a toxicidade não hematológica induzida pela quimioterapia foi reconhecida e os níveis teciduais de TNF- α e IL-1 β acompanham de perto a lesão da mucosa induzida pela terapia contra o câncer (CHENG, 2007) como faz a expressão do gene da citocina pró-inflamatória. Parece provável que o fator de transcrição nuclear, NF- κ B, possa ser importante no desenvolvimento da mucosite oral, pois atua como um *gatekeeper* para várias vias (DIAZ *et al.*, 1998). Tanto as radiações ionizantes quanto as drogas quimioterápicas são ativadores efetivos de NF- κ B e entre os genes que se demonstrou serem regulados por NF- κ B está a COX-2 (LALLA; PETERSON, 2006). Lalla *et al.* (2010) sugerem a hipótese que a COX-2 não é um condutor de mucosite,

mas na verdade um amplificador da toxicidade, possivelmente aumentando a duração ou mesmo a gravidade das úlceras formadas, pois a expressão de COX-2 atinge o pico ao mesmo tempo em que a mucosite.

O modelo de mucosite oral por 5-FU apresenta um aumento de expressão de TNF- α e IL1- β no seu pico inflamatório (10^o dia) (MEDEIROS *et al.*, 2011) corroborando os estudos de mucosite oral induzida por radioterapia (EPSTEIN; STEVENSON-MOORE, 1986; EPSTEIN *et al.*, 2000, 2001). O papel das citocinas inflamatórias, sobretudo, TNF- α e IL1- β , na mediação da mucosite oral está bem descrito na literatura (SONIS, 2004a, 2004b). O presente estudo corrobora estes dados demonstrando aumento considerável na expressão de TNF- α e IL1- β no grupo controle positivo (5-FU). Ao realizar a análise estatística, da expressão de células marcadas por imunistoquímica para IL1- β e TNF- α os presentes achados sugerem que os cys-LT têm influência sobre a expressão de TNF- α no modelo de mucosite induzido por 5-FU. Demonstram, ainda, que a presença de TNF- α e, sobretudo, IL1- β são bastante afetadas pelo bloqueio da COX-2 provocando grande mudança, para menos, na expressão destas nas mucosas inflamadas neste modelo de mucosite por 5-FU.

A expressão, mediante imunistoquímica, do TNF- α nas células dos animais que utilizaram o montelucaste, apresentou-se reduzida em todas as doses utilizadas, semelhante à produzida com o uso do celecoxibe, demonstrando, assim, terem os cys-LT influência no processo inflamatório mediado pelo TNF- α na mucosite oral por 5-FU. Por outro lado, o uso do celecoxibe (inibidor seletivo da COX-2) foi capaz de promover uma redução significativa da expressão de ambas citocinas (TNF- α e IL1- β) em comparação com o grupo 5-FU, confirmando os dados já descritos na literatura (LIMA *et al.*, 2005).

O bloqueio da 5-LOX por MK886 foi incapaz de promover redução da expressão e IL1- β , mas diminuiu a expressão de TNF- α . Na verdade, em relação a IL1- β , inexistem diferenças significativas com os grupos que utilizaram MTK em nenhuma das doses administradas, embora tenha ocorrido uma tendência à redução a qual não se confirmou com a aplicação dos testes estatísticos quando compara-se com os controles SAL, TM e CLX. A participação de cys-LT endógena na regulação da geração de TNF- α foi demonstrada num modelo murino de inflamação e hiperreatividade brônquica induzida por SCF, onde o pré-tratamento com MK886 atenuou a hiperreatividade (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002). Ao observar uma produção

residual de TNF- α , Mellor, Austen e Boyce (2002), sugerem que poderia refletir vias de sinalização adicionais e fatores de transcrição, tais como o NF- κ B, que estaria envolvido no controle transcricional da produção de TNF- α dependente de IgE na linha MC de rato transformada. A diversidade de cascatas de sinalização dependentes de cálcio em MCs pode incluir vias de sobreposição induzidas pelos receptores cys-LT, receptores P2Y e TLR4 para induzir produção de citocinas/quimiocinas sem exocitose (MELLOR; AUSTEN; BOYCE, 2002). Ou seja, a diversidade de cascatas e a sobreposição de ações de vários mediadores poderia explicar o comportamento diverso destas duas citocinas (TNF- α e IL1- β) em relação aos efeitos do bloqueio dos cys-LT e da 5-LOX no presente estudo do modelo de MO.

A IL10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, em macrófagos e monócitos, ao diminuir a produção de mediadores e inibir a apresentação de antígenos, embora estimule a captação de antígenos (SABAT *et al.*, 2010). De Araújo *et al.* (2015) verificaram aumento nos níveis de IL-10 em *hamsters* submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU em comparação com animais saudáveis. O presente estudo, em conformidade, encontrou um aumento da expressão de IL10 em todos os animais submetidos à indução da mucosite oral por 5-FU em comparação com o controle normal. Interessante observar que o uso dos inibidores da COX-2, dos cys-LTs (nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia por 10 dias), também, não reduziram de maneira significativa a expressão desta citocina. Mas o inibidor da 5-LOX por 4 dias e o MTK na dose de 40 mg/kg/dia 10 dias reduziram de maneira significativa a sua expressão em relação ao grupo 5-FU, sugerindo ser necessário um bloqueio muito intenso dos cys-LTs para interferir em sua expressão, mas que, por outro lado, existe um nível basal de IL10 e que inibições moderadas dos cys-LTs não interferem na mesma, sugerindo um efeito modulador, embora parcial, dos leucotrienos sobre IL10.

Moura *et al.* (2014) demonstraram que a remodelação óssea é prejudicada na ausência de 5-LOX, ou bloqueio farmacológico de 5-LOX ou do receptor CysLT, observados através da expressão reduzida de citocinas e marcadores reguladores ósseos, verificaram que LTB4 aumentou a diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL, e tanto LTB4 como LTD4 aumentaram liberação de TNF- α *in vitro*. Reforçando, assim, o papel dos Cys-LTs na remodelação óssea. A redução das contagens de osteoclastos e movimento ortodôntico dentário (OTM),

em ambos os ratos tratados com zileuton (bloqueador da 5-LOX) e MTK levantam a questão se estes fármacos poderiam afetar o metabolismo ósseo com seu uso em longo prazo, de fato, níveis mais baixos de TNF- α , foram encontrados quando 5-LOX estava ausente, inibido ou quando o receptor Cys-LT era antagonizado (MOURA *et al.*, 2014).

Já foi descrito que o TNF- α ativa a fosfolipase A2 desencadeando, assim, a cascata de liberação de AA e conseqüentemente a produção de LTs (HOECK *et al.*, 1993). Interessante, em experimentos *in vitro* demonstram que quando LTB₄ ou LTD₄ são adicionados com RANKL, há um aumento da liberação de TNF- α pelos osteoclastos (MOURA *et al.*, 2014). Na cultura de fibroblastos sinoviais, coletados de pacientes com artrite reumatoide, há aumento da expressão de TNF- α após a estimulação de LTB₄ (XU *et al.*, 2012), deste modo, mostrando que não só TNF- α desencadeia a liberação de LTs, mas também LTs podem estimular a liberação de TNF- α *in vitro*. Moura *et al.* (2014) observaram menor expressão de IL-10 com diminuído OTM e osteoclastos. Contudo, o tratamento com MTK aumentou a expressão de IL-10 em doentes asmáticos, enquanto num modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina essa expressão foi diminuída (SHIMBORI; SHIOTA; OKUNISHI, 2011; YÜKSEL *et al.*, 2009). Os diferentes fenótipos observados entre os estudos podem variar em vista das vias distintas desencadeadas pelos diferentes estímulos (BOYCE; XING, 2008). Em resumo a IL10 pode apresentar diferentes respostas ao estímulo dos leucotrienos de acordo com o meio e estímulo inflamatório.

Nesse estudo, o papel da via dos leucotrienos na mucosite oral induzida por 5-FU não está relacionado ao processo inflamatório da MO, ao contrário do observado para a via da COX-2, que se apresenta como importante modulador. Os cys-LTs apresentam ação marcante sobre a expressão de TNF- α e parcial sobre IL-10; mas não apresentam ação significativa na expressão de iNOS, COX-2 e IL-1 β na MO. Mesmo a inibição da 5-LOX não apresenta efeito significativo sobre a expressão de iNOS, COX-2 e IL-1 β . Porém promove diminuição de expressão de TNF- α ; sugerindo que o LTB₄ tenha importância na modulação desta citocina. A inibição dos cys-LTs e da 5-LOX, não tiveram papel importante sobre a expressão de diversos mediadores inflamatórios importantes da MO, sendo exceção sua ação sobre o TNF- α . Pensando no efeito de desvio, que pode existir entre de ambas as vias do AA (LOX e COX), a inibição simultânea talvez promova efeitos positivos mais

exacerbados no controle da MO induzida por 5-FU que a inibição de somente uma das vias, sendo necessária maior investigação neste sentido.

7 CONCLUSÕES

O uso de montelucaste por 10 dias não altera, de maneira significativa, a evolução da mucosite oral induzida por 5-FU nas doses de 10 e 20mg/Kg/dia, embora apresente uma proteção parcial na dose de 40mg/kg/dia, do ponto de vista macroscópico. O uso do montelucaste por 10 dias não altera, de maneira significativa a evolução da mucosite oral induzida por 5-FU, em relação as alterações inflamatórias avaliadas em nível histopatológico na coloração HE, ou seja, não protege os animais submetidos a mucosite oral, neste parâmetro.

O montelucaste utilizado 10 dias não altera a expressão de iNOS2, COX-2 e IL1- β na mucosite oral induzida por 5-FU. Montelucaste diminui a expressão de TNF- α com todas as doses utilizadas e promove diminuição da expressão de IL10 com uso de uma dose de 40mg/kg/dia.

A utilização de MK886 nos 4 primeiros dias do modelo experimental, não modifica os achados observados com o uso de montelucaste por 10 dias para mucosite oral induzida por 5-FU. Além disso, a atividade da MPO não é modificada pelo uso de MK886 por 4 dias no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU.

Neste modelo de mucosite oral induzida por 5-FU, diferindo da via da COX-2, a via dos leucotrienos não é relevante na fisiopatologia. Entretanto o seu efeito sobre o TNF- α sugere uma ação moduladora especificamente sobre esta citocina.

REFERÊNCIAS

- AJUEBOR, M. N.; VIRÁG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABÓ, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, Medford, v. 95, n. 4, p. 625-630, 1998.
- ALLAKER, R. P.; SILVA MENDEZ, L. S.; HARDIE, J. M.; BENJAMIN, N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Medford, v. 16, p. 253-256, 2001.
- BAEK, S. H.; LIM, J. H.; PARK, D. W.; KIM, S. Y.; LEE, Y. H.; KIM, J. R.; KIM, J. H. Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kappaB in macrophages. **Eur. J. Immunol.**, Medford, v. 31, p. 2709-2717, 2001.
- BALIS, F. M.; SAVITCH, J. L.; BLEYER, W. A.; REAMAN, G. H.; POPLACK, D. G. Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 3, n. 4, p. 485-489, 1985.
- BISHOP, J. F.; JOSHUA, D. E.; LOWENTHAL, R. M.; KRONENBERG, H.; WHITESIDE, M. G; COBCROFT, R.; DODDS, A.; WOLF, M.; MANOHARAN, A. A phase I-II study of cytosine arabinoside, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust. N. Z. J. Med.**, Bethesda, v. 6, n. 1, p. 48-51, 1986.
- BLIJLEVENS, N. M.; DONNELLY, J. P.; PAUW, B. E. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant**, London, v. 25, p. 1269-1278, 2000.
- BLIJLEVENS, N.; SCHWENKGLINKS, M.; BACON, P.; D'ADDIO, A.; EINSELE, H.; MAERTENS, J.; NIEDERWIESER, D.; RABITSCH, W.; ROOSAAR, A.; RUUTU, T.; SCHOUTEN, H.; STONE, R.; VOKURKA, S.; QUINN, B.; MCCANN, S. Prospective oral mucositis audit: oral mucositis in patients receiving high-dose melphalan or BEAM conditioning Chemotherapy-European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 26, p. 1519-1525, 2008.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, Bethesda, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- BOUGHTON-SMITH, N. K., EVANS, S. M.; HAWKEY, C. J.; COLE, A. T.; BALSITIS, M.; WHITTLE, B. J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet**, London, v. 342, n. 8867, p. 338-340, 1993.
- BOYCE, B.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch. Biochem. Biophys.**, Amsterdam, v. 473, p. 139-146, 2008.

- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, Washington, DC, v. 60, p. 618-622, 1982.
- BRENNER, T.; BROCKE, S.; SZAFER, F.; SOBEL, R. A.; PARKINSON, J. F.; PEREZ, D. H.; STEINMAN, L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, Rockville, v. 158, n. 6, p. 2940-2946, 1997.
- CABALLERO, G. A.; AUSMAN, R. K.; QUEBBEMAN, E. J. Longterm, ambulatory, continuous IV infusion of 5-FU for the treatment of advanced adenocarcinomas. **Cancer Treat. Rep.**, Bethesda, v. 69, n. 1, p.13-15, 1985.
- ÇETINEL, S.; ÇANILLIOĞLU, Y. E.; ÇIKLER, E.; SENER, G.; ERCAN, F. Leukotriene D4 receptor antagonist montelukast alleviates protamine sulphate-induced changes in rat urinary bladder. **BJU Int.**, Medford, v. 107, n. 8, p. 1320-1325, 2011.
- CHANG, C. T.; HSIANG, C. Y.; HO, T. Y.; WU, C. Z.; HONG, H. H.; HUANG, Y. F. Comprehensive assessment of host responses to 5-fluorouracil-Induced oral mucositis through transcriptomic analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0135102, 2015.
- CHEN, C. C.; CHIU, K. T.; SUN, Y. T.; CHEN, W. C. Role of the cyclic AMPprotein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 274, p. 31559-31564, 1999.
- CHEN, K.; INOUE, M.; OKADA, A. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in rat digestive tissues after endotoxin and its role in intestinal mucosal injury. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 224, n. 3, p. 703-708, 1996.
- CHEN, N.; RESTIVO, A.; REISS, C. S. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 94-102, 2001.
- CHEN, X.; WANG, S.; WU, N.; SOOD, S.; WANG, P.; JIN, Z.; BEER, D. G.; GIORDANO, T. J.; LIN, Y.; SHIH, W. C.; LUBET, R. A.; YANG, C. S. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 10, p. 6703-6709, 2004.
- CHEN, Y. C.; SHEN, S. C.; CHEN, L. G.; LEE, T. J.; YANG, L. L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 61, p. 1417-1427, 2001.
- CHENG, K. K. Oral mucositis and quality of life of Hong Kong chinese patients with cancer therapy. **Eur. J. Oncol. Nurs.**, Amsterdam, v. 11, p. 36-42, 2007.

CHOI, S. H.; LANGENBACH, R.; BOSETTI, F. Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury. **FASEB J.**, [s. l.], v. 22, p. 1491-1501, 2008.

CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; MAGNELLI, L.; FANTI, E.; PAPUCCI, L.; SCHIAVONE, N.; MESSERINI, L.; VANNACCI, A.; CAPACCIOLI, S.; PERNA, F.; LULLI, M.; FABBRONI, V.; PERIGLI, G.; BECHI, P.; MASINI, E. Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**, Philadelphia, v. 5, n. 11, p. 2716-2726, 2006.

COLEMAN, E. A.; LEE, J. Y.; ERICKSON, S. W.; GOODWIN, J. A.; SANATHKUMAR N., RAJ, V. R.; ZHOU, D.; MCKELVEY, K. D.; APEWOKIN, S.; STEPHENS, O.; ENDERLIN, C. A.; VANGSTED, A. J.; REED, P. J.; ANAISSIE, E. J. GWAS of 972 autologous stem cell recipients with multiple myeloma identifies 11 genetic variants associated with chemotherapy-induced oral mucositis. **Support Care Cancer**, New York, v. 23, n. 3, p. 841-849, 2015.

COSKUN, A. K.; YIGITER, M.; ORAL, A.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; MENTES, O.; CADIRCI, E.; ATALAY, F.; SULEYMAN, H. The Effects of Montelukast on Antioxidant Enzymes and Proinflammatory Cytokines on the Heart, Liver, Lungs, and Kidneys in a Rat Model of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. **Scientific World Journal**, London, v. 11, p. 1341-1356, 2011.

DAHLEN, S. E.; HAEGGSTROM, J. Z.; SAMUELSSON, B.; RABE, K. F.; LEFF, A. R. Leukotrienes as targets for treatment of asthma and other diseases. Current basic and clinical research. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 61, n. 2, pt. 2, p. S1. 2000.

DE ARAÚJO, A. A.; VARELA, H.; DE MEDEIROS, C. A.; DE CASTRO BRITO, G. A.; DE LIMA, K. C., DE MOURA, L. M., DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F. Azilsartan reduced TNF- α and IL-1 β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- α in an oral mucositis model. **PLoS ONE**, San Francisco, v.10, n. 2, p. 1-16, 2015.

DE MAEYER, N.; KOCHUYT, A. M.; VAN MOERKERCKE, W.; HIELE, M. Montelukast as a treatment modality for eosinophilic gastroenteritis. **Acta Gastroenterol. Belg.**, Wetteren, v. 74, n. 4, p. 570-575, 2011.

DEMPSEY, O. J. Leukotriene receptor antagonist therapy. **Postgrad Med. J.**, London, v. 76, p. 767-773, 2000.

DENGIZ, G. O.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; CADIRCI, E.; SULEYMAN, H. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Montelukast on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. **J. Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 105, p. 94-102, 2007.

DIAZ, A.; CHEPENIK, K. P.; KORN, J. H.; REGINATO, A. M.; JIMENEZ, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, Amsterdam, v. 241, p. 222-229, 1998.

- DICKINSON, E.; TUNCER, R.; NADLER, E.; BOYLE, P.; ALBER, S.; WATKINS, S.; FORD, H. NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 277, p. 1281-1287, 1999.
- DONNELLY, J. P.; MUUS, P.; SCHATTEBERG, A.; DE WITTE, T.; HORREVORTS, A.; DEPAUW, B. E. A scheme for daily monitoring of oral mucositis in allogeneic BMT recipients. **Bone Marrow Transplant**, London, v. 9, p. 409-413, 1992.
- DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, [s. l.], v. 12, p. 1063-1073, 1998.
- ELTING, L. S.; BODEY, G. P.; KEEFE, B. H. Septicemia e shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 1201-1207, 1992.
- EPSTEIN, J. B.; STEVENSON-MOORE, P. Benzylamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 145-148, 1986.
- EPSTEIN, J. B.; GORSKY, M.; GUGLIETTA, A.; LE, N.; SONIS, S.T. The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. **Cancer**, Medford, v. 89, n. 11, p. 2258-2265, 2000.
- EPSTEIN, J. B.; SILVERMAN, S. JR.; PAGGIARINO, D. A.; CROCKETT, S.; SCHUBERT, M. M.; SENZER, N. N.; LOCKHART, P. B.; GALLAGHER, M. J.; PETERSON, D. E.; LEVEQUE, F. G. Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Cancer**, Medford, v. 92, n. 4, p. 875-885, 2001.
- FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, Bethesda, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, 1997.
- FEMIANO, F.; BUONAIUTO, C.; GOMBOS, F.; LANZA, A.; CIRILLO, N. Pilot study on recurrent aphthous stomatitis (RAS): a randomized placebo-controlled trial for the comparative therapeutic effects of systemic prednisone and systemic montelukast in subjects unresponsive to topical therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 402-407, 2010.
- FILIPPI, A. R.; FRANCO, P.; RICARDI, U. Is clinical radiosensitivity a complex genetically controlled event? **Tumori**, Milano, v. 92, n. 2, p. 87-91, 2006.
- FORD, H.; WATKINS, S.; REBLOCK, K.; ROWE, M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **J. Pediatr. Surg.**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 275-282, 1997.

FREITAS, A. P. F.; BITENCOURT, F. S.; BRITO, G. A. C.; ALENCA, N. M. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RAMOS, M. V.; VALE, M. L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 385, n. 10, p. 981-990, 2012.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, Washington, DC, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

HASHIMOTO, T.; KIHARA, M.; YOKOYAMA, K.; FUJITA, T.; KOBAYASHI, S.; MATSUSHITA, K.; TAMURA, K.; HIRAWA, N.; TOYA, Y.; UMEMURA, S. Lipoxygenase products regulate nitric oxide and inducible nitric oxide synthase production in interleukin-1beta stimulated vascular smooth muscle cells. **Hypertens. Res.**, London, v. 26, p. 177-184, 2003.

HAY, D. W. P. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists: more than inhibitors of bronchoconstriction. **Chest**, Amsterdam, v. 111, n. 31, suppl, p. 31-45, 1997.

HENNIG, R.; GRIPPO, P.; DING, X. Z.; RAO, S. M.; BUCHLER, M. W.; FRIESS, H.; TALAMONTI, M. S.; BELL, R. H.; ADRIAN, T. E. 5-lipoxygenase, a marker for early pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 65, p. 6011-6016, 2005.

HERON, J. F. **5-Fluorouracil**. [S. l.], 2009. Disponível em: <http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09-gb_comp11.html>. Acesso em: 20 jan. 2016

HIERHOLZER, C.; HARBRECHT, B.; MENEZES, J. M.; KANE, J.; MACMICKING, J.; NATHAN, C. F.; PEITZMAN, A. B.; BILLIAR, T. R.; TWEARDY, D. J. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. **J. Exp. Med.**, New York, v. 187, n. 6, p. 917-928, 1998.

HOECK, W. G.; RAMESHA, C. S.; CHANG, D. J.; FAN, N.; HELLER, R. A. Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 90, p. 4475-4479, 1993.

HOLMA, R.; SALMENPERÄ, P.; RIUTTA, A. V.; TANEN, I.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist, montelukast, on experimental colitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 429, p. 309-318, 2001.

HONG, J. H.; CHIANG, C. S.; TSAO, C. Y.; LIN, P. Y.; MCBRIDE, W. H.; WU, C. J. Rapid induction of cytokine gene expression in the lung after single and fractionated doses of radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, Oxfordshire, v. 75, p. 1421-1427, 1999.

HSU, S. M, RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, Thousand Oaks, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HUTCHESON, I. R.; WHITTLE, B. J.; BOUGHTON-SMITH, N. K. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, Medford, v. 101, n. 4, p. 815-820, 1990.

INGELSSON, E.; YIN, L.; BÄCK, M. J. Nationwide cohort study of the leukotriene receptor antagonist montelukast and incident or recurrent cardiovascular disease. **Allergy Clin. Immunol.**, Amsterdam, v. 129, n. 3, p. 702-707, 2012.

JUPP, J.; HILLIER, K.; ELLIOTT, D. H.; FINE, D. R.; BATEMAN, A. C.; JOHNSON, P. A.; CAZALY, A. M.; PENROSE, J. F.; SAMPSON, A. P. Colonic expression of Leukotriene-Pathway enzymes in inflammatory bowel diseases. **Inflamm. Bowel Dis.**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 537-546, 2007.

KEEFE, D. M.; SCHUBERT, M. M.; ELTING, L. S.; SONIS, S. T.; EPSTEIN, J. B.; RABER-DURLACHER, J. E.; MIGLIORATI, C. A.; MCGUIRE, D. B.; HUTCHINS R. D.; PETERSON, D. E. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, Medford, v. 109, p. 820-831, 2007.

KOLB-BACHOFEN, V.; FEHSEL, K.; MICHEL, G.; RUZICKA, T. Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. **Lancet.**, London, v. 344, n. 8915, p. 139, 1994.

KRÖNCKE, K.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? **Nitric. Oxide. Biol. Chem.**, Amsterdam, v.2, p. 107-120, 1997.

LALLA, R. V.; PETERSON, D. E. Treatment of mucositis, including new medications. **Cancer J.**, Philadelphia, v. 12, p. 348-354, 2006.

LALLA, R. V.; PILBEAM, C. C.; WALSH, S. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M.; PETERSON, D. E. Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. **Support Care Cancer**, New York, v.18, n.1, p. 95-103, 2010.

LEE, H.; PARK, J. C.; SHIN, S. K.; LEE, S. K.; LEE, Y. C. Efficacy of leukotriene receptor antagonist for erosive esophagitis: a preliminary retrospective comparative study. **Dis. Esophagus**, Medford, v. 25, n. 7, p. 595-599, 2012.

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

LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; LIRA, A. M.; SILVA, L. R.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SOUSA, R. B.; BRITO, G. A. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in *hamster*. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v. 61, p. 215-222, 2008.

LEITÃO, R. F.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 75, n. 9, p. 1227-1232, 2004.

LIMA, V.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifyline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in *hamsters*. **Eur. J. Oral Sci.**, Medford, v. 113, p. 210-217, 2005.

LIN, C. R.; AMAYA, F.; BARRETT, L.; WANG, H.; TAKADA, J.; SAMAD, T. A.; WOOLF, C. J. Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 319, n. 3, p.1096-103, 2006.

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

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p. 395-401, 2007a.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Serum levels of NF kappa β and proinflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol. Ther.**, Oxfordshire, v. 7, n. 7, p. 1139-1145, 2008.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, A. S.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treat. Rev.**, Amsterdam, v. 33, p. 448-460, 2007b.

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; VIRÁG, L.; SZÉKELY, A. D.; HASKÓ, G.; SZABÓ, C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 80, n. 2, p. 470-475, 2001.

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; VIRÁG, L.; SZÉKELY, A. D.; HASKÓ, G.; SZABÓ, C. The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. **Semin. Oncol.**, Amsterdam, v. 30, n. 3 Suppl. 6, p. 3-9, 2003.

- LONGLEY, D. B.; LATIF, T.; BOYER, J.; ALLEN, W. L.; MAXWELL, P. J.; JOHNSTON, P.G. The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells. **Semin Oncol.**, Amsterdam, v. 30, n. 3, suppl. 6, p. 3-9, 2003
- MADDENS, S.; CHARRUYER, A.; PLO, I.; DUBREUIL, P.; BERGER, S.; SALLES, B.; LAURENT, G.; JAFFRÉZOU, J. P. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, Washington, DC, v. 100, p. 1294-1301, 2002.
- MASTALERZ, L.; KUMIK, J. Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, Bethesda, v. 120, n. 3, p. 103-108, 2010.
- MEDEIROS, C. A.; LEITÃO, R. F.; MACEDO, R. N.; BARBOZA, D. R.; GOMES, A. S.; NOGUEIRA, N. A.; ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v. 67, p. 1085- 1100, 2011.
- MELLOR, E. A.; AUSTEN, K. F.; BOYCE, J. A. Cysteinyl Leukotrienes and Uridine Diphosphate Induce Cytokine Generation by Human Mast Cells Through an Interleukin 4-regulated Pathway that Is Inhibited by Leukotriene Receptor Antagonists. **J. Exp. Med.**, New York, v. 195, n. 5, p. 583-592, 2002.
- MIDDLETON, S. J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J. O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, London, v. 341, n. 8843, p. 465-466, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, Bethesda, v. 43, p. 109, 1991.
- MORTENSEN, H. R.; OVERGAARD, J.; SPECHT, L. OVERGAARD, M.; JOHANSEN, J.; EVENSEN, J. F.; ANDERSEN, L. J.; ANDERSEN, E.; GRAU, C. Prevalence and peak incidence of acute and late normal tissue morbidity in the DAHANCA 6&7 randomised trial with accelerated radiotherapy for head and neck cancer. **Radiother. Oncol.**, Amsterdam, v. 103, p. 69-75, 2012.
- MOURA, A. P.; TADDEI, S. R.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F.; RODRIGUES, L. F.; GARLET, G. P.; SOUZA, D. G.; MACHADO, F. S.; ANDRADE, I. JR.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, T. A. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. **Bone**, Amsterdam, v. 69, p. 133-138, 2014.
- MOURA, J. F.; MOTA, J. M.; LEITE, C. A.; WONG, D. V.; BEZERRA, N. P.; BRITO, G. A.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.A. Novel model of megavoltage radiation-induced oral mucositis in *hamsters*: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. **Int. J. Radiat. Biol.**, Oxfordshire, v. 91, n. 6, p. 500-509, 2015.
- MÜHL, H.; DINARELLO, C. A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is

inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. **J. Immunol.**, Rockville, v. 159, n. 10, p. 5063-5069, 1997.

MURPHY, B. A. Clinical and economic consequences of mucositis induced by chemotherapy and/or radiation therapy. **J. Support Oncol.**, Bethesda, v. 5, n. 9, suppl. 4, p.13-21, 2007.

NAKAMORI, Y.; KOMATSU, Y.; KOTANI, T.; KOJIMA, S.; TAKEUCHI, K. Pathogenic Importance of Cysteinyl Leukotrienes in Development of Gastric Lesions Induced by Ischemia/Reperfusion in Mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 333, n. 1, p. 91-98, 2010.

NATHOO, N.; BARNETT, G. H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 57, p. 6-13. 2004.

NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; VETTER, G.; SCHMIDTKO, A.; SCHMIDT, H.; EUCHENHOFER, C.; BRÄUTIGAM, L.; GRÖSCH, S.; GEISSLINGER, G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF- κ B. **FASEB J.**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 1622-1624, 2001.

NISHIKAWA, M.; HIKASA, Y.; HORI, K.; TANIDA, N.; SHIMOYAMA, T. Effect of leukotriene C4/D4 antagonist on colonic damage induced by intracolonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **J. Gastroenterol.**, Berlin, v. 30, p. 34-40, 1995.

NOGUCHI, K.; OKUBO, M. Leukotrienes in Nociceptive Pathway and Neuropathic/Inflammatory. **Pain Biol. Pharm. Bull.**, Bethesda, v. 34, n. 8, p. 1163-1169, 2011.

ÖHD, J. F.; WIKSTRÖM, K.; SJÖLANDER, A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 119, p. 1007-1018, 2000.

ÖHD, J. F.; NIELSEN, C. K.; CAMPBELL, J.; LANDBERG, G.; LÖFBERG, H.; SJÖLANDER A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 124, p. 57-70, 2003.

ONG, Z. Y.; GIBSON, R. J.; STRINGER, A. M.; DARBY, J. M.; LOGAN, R. M.; YEOH, A. S.; KEEFE, D. M. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Radiat. Oncol.**, London, v. 16, p. 5-22, 2010.

PARKINSON, J. F.; MITROVIC, B.; MERRILL, J. E. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 75, n. 3, p. 174-186, 1997.

PETERSON, D. E.; KEEFE, D. M.; SONIS, S. T. New frontiers in mucositis. **Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book**, Bethesda, p. 545-551, 2012.

PETROS, A.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet**, London, v. 338, n. 8782/8783, p. 1557-1558, 1991.

PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc. Res.**, Bethesda, v. 28, n. 1, p. 34-39, 1994.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem., Rockville**, v. 266, n. 7, p. 4244-4250, 1991a.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, Amsterdam, v. 288, n. 2, p. 481-487, 1991b.

RALSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M. H.; GRABOWSKI, P. S.; JOHNSTON, P. W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulation of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.**, Medford, v. 10, p. 1040-1049, 1995.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, Medford, v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

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

RUESCHER, T. J.; SODEIFI, A.; SCRIVANI, S. J.; KABAN, L. B.; SONIS, S. T. The impact of mucositis on alphahemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. **Cancer**, Medford, v. 82, p. 2275-2281, 1998.

RUSSI, E. G.; RABER-DURLACHER, J. E.; SONIS, S.T. Local and systemic pathogenesis and consequences of regimen-induced inflammatory responses in patients with head and neck cancer receiving chemoradiation. **Mediators Inflamm.**, London, v. 2014, p. 1-14, 2014.

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

SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT, J. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Amsterdam, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAKAMOTO, K.; OKA, M.; YOSHINO, S.; HAZAMA, S.; ABE, T.; OKAYAMA, N.; HINODA, Y. Relation between cytokine promoter gene polymorphism and toxicity of 5-fluorouracil plus cisplatin chemotherapy. **Oncol. Rep.**, Athens, v. 16, p. 381-387, 2006.

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C. A.; SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, Washington, DC, v. 237, p. 1171-1176, 1987.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J. SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis. **Head Neck**, Medford, v. 26, n.1, p. 77-84, 2004.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head Neck**, Medford, v. 25, n. 12, p. 1057-1070, 2003.

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

SENER, G.; KAPUCU, C.; CETINEL, S.; CIKLER, E.; AYANOĞLU-DÜLGER, G. Gastroprotective effect of leukotriene receptor blocker montelukast in alendronat-induced lesions of the rat gastric mucosa Prostaglandins. **Leukot. Essent. Fatty Acids**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 1-11, 2005.

SHIMBORI, C.; SHIOTA, N.; OKUNISHI, H. Effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist, on the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 650, p. 424-430, 2011.

SHIMPO, M.; IKEDA, U.; MAEDA, Y.; OHYA, K.; MURAKAMI, Y.; SHIMADA, K. Effects of aspirin-like drugs on nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, Bethesda, v. 35, p. 1085-1091, 2000.

SILVERMAN, E. S.; DRAZEN, J. M. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, Bethesda, v. 111, n. 6, p. 525-536, 1999.

SINGER, I. I.; KAWKA, D. W.; SCOTT, S.; WEIDNER, J. R.; MUMFORD, R. A.; RIEHL, T. E.; STENSON, W. F. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 871-885, 1996.

SJOGREN, R. W.; COLLETON, C.; SHEA-DONOHUE, T. Intestinal myoelectric response in two different models of acute enteric inflammation. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 267, p. 329-337, 1994.

SKEFF, M. A.; BRITO, G. A.; DE OLIVEIRA, M. G.; BRAGA, C. M.; CAVALCANTE, M. M.; BALDIM, V.; HOLANDA-AFONSO, R. C.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COLOMBO, A. P.; RIBEIRO, R. A.; MOURA-NETO, V.; LEITÃO, R. F. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1-25, 2014.

SKLYAROV, A. Y.; PANASYUK, N. B.; FOMENKO, I. S. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. **J. Physiol. Pharmacol.**, Kraków, v. 62, n. 1, p. 65-73, 2011.

SMITH, W.L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenase: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 69, p. 145-182, 2000.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacol. Rep.**, Amsterdam, v. 57, p. 108-119, 2005.

SONIS, S. T. A biological approach to mucositis. **J. Support Oncol.**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 21-36, 2004a.

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

SONIS, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 45, n. 12, p. 1015-1020, 2009.

SONIS, S. T. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. **Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book**, Bethesda, 2013. DOI 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e236

SONIS, S. T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J. Support Oncol.**, Bethesda, v. 5, n. 9, suppl. 4, p. 3-11. 2007.

SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor-kappa β in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Thousand Oaks, v.13, n. 5, p. 380-389, 2002.

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

SONIS, S. T.; FEY, E. G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**, Basel, v. 16, n. 5, p. 680-686, 2002.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury:

pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, Medford, v. 100, n. 9, p. 1995-2025, 2004a.

SONIS, S. T.; O'DONNELL, K. E.; POPAT, R.; BRAGDON, C.; PHELAN, S.; COCKS, D.; EPSTEIN, J. B. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 40, p. 170-176, 2004b.

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MASON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES, G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L. L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in *hamsters*. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 36, p. 373-381, 2000.

SONIS, S. T.; SCHERER, J.; PHELAN, S.; LUCEY, C. A.; BARRON, J. E.; O'DONNELL, K. E.; BRENNAN, R. J.; PAN, H.; BUSSE, P.; HALEY, J. D. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. **Cell Prolif.**, Medford, v. 35, n. 1, p. 93-102, 2002.

SONIS, S.; ANTIN, J.; TEDALDI, M.; ALTEROVITZ, G. SNP-based Bayesian networks can predict oral mucositis risk in autologous stem cell transplant recipients. **Oral Dis.**, Medford, v. 19, n. 7, p. 721-727, 2013.

SONIS, S. T.; TRACEY, C.; SHKLAR, G.; JENSON, J.; FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Amsterdam, v. 69, p. 437-443, 1990.

SORRELLS, D. L.; FRIEND, C.; KOLTUKSUZ, U.; COURCOULAS, A.; BOYLE, P.; GARRETT, M.; WATKINS, S.; ROWE, M. I.; FORD, H. R. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. **Arch. Surg.**, Bethesda, v. 131, n. 11, p. 1155-1163, 1996.

SOUZA-FIHO, M. V.; LIMA, M. V.; POMPEU, M. M.; BALLEJO, G.; CUNHA F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 150, n. 1, p.247-256, 1997.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C. H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum.**, Medford, v. 36, n. 8, p.1036-1044, 1993.

SUYS, B.; DE BEECK, L. O.; ROOMAN, R.; KRANSFELD, S.; HEUTEN, H.; GOOVAERTS, I.; VRINTS, C.; DE WOLF, D.; MATTHYS, D.; MANUEL-Y-KEENOY, B. Impact of oxidative stress on the endothelial dysfunction of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: protection by superoxide dismutase? **Pediatr. Res.**, London, v. 62, p. 456-461, 2007.

TEPPERMAN, B. L.; BROWN, J. F.; WHITTLE, B. J. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 265, p. 214-218, 1993.

- TRAUT, J. L.; MACDONALD, E. S.; SPANGLER, M. L.; SAXENA, S. Montelukast for symptom control of interstitial cystitis. **Ann. Pharmacother.**, Thousand Oaks, v. 45, n. 9, p. 1164, 2011.
- UNNO, N.; WANG, H.; MENCONI, M. J.; TYTGAT, S. H.; LARKIN, V.; SMITH, M.; MORIN, M. J.; CHAVEZ, A.; HODIN, R. A.; FINK, M. P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology**, Amsterdam, v. 113, n. 4, p. 1246-1257, 1997.
- VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: pathobiology and management. **Curr. Opin. Oncol.**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 159-164, 2015.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanism, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.**, Bethesda, v. 52, p. 349-374, 2000.
- WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory Mediators in Gastrointestinal Defense and Injury. **EBM**, [s. l.], v. 226, p. 1003-1015, 2001.
- WALLACE, J. L.; BECK, P. L.; MORRIS, G. P. Is there a role for leukotrienes as mediators of ethanol-induced gastric mucosal damage? **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 254, p. 117-123, 1988.
- WON, J. S.; IM, Y. B.; KHAN, M.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Involvement of phospholipase A2 and Lipoxygenase in Lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in glial cells. **Glia**, Medford, v. 51, p. 13-21, 2005.
- XIAO, C.; HANLON, A.; ZHANG, Q.; ANG, K.; ROSENTHAL, D. I.; NGUYEN-TAN, P. F.; KIM, H.; MOVSAS, B.; BRUNER, D. W. Symptom clusters in patients with head and neck cancer receiving concurrent chemoradiotherapy. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 49, n. 4, p. 360-366, 2013.
- XU, S.; LU, H.; LIN, J.; CHEN, Z.; JIANG, D. Regulation of TNF- α and IL- β in rheumatoid arthritis synovial fibroblast by leukotriene B4. **Rheumatol. Int.**, Berlin, v. 30, p. 1183-1189, 2012.
- XUN, C. Q.; THOMPSON, J. S.; JENNINGS, C. D.; BROWN, S. A.; WIDMER, M. B. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2- incompatible transplanted SCID mice. **Blood**, Washington, DC, v. 83, p. 2360-2367, 1994
- YE, Y. N.; WU, W. K.; SHIN, V. Y.; BRUCE, I. C.; WONG, B. C.; CHO, C. H. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 26, p. 827-834, 2005.
- YÜKSEL, B.; AYDEMİR, C.; USTÜNDAG, G.; ELDEŞ, N.; KUTSAL, E.; CAN, M.; DEMİRTAŞ, S.; TOMAÇ, N. The effect of treatment with montelukast on levels of serum interleukin-10, eosinophil cationic protein, blood eosinophil counts, and clinical

parameters in children with asthma. **Turk. J. Pediatr.**, Ankara, v. 51, p. 460-465, 2009.

ZIDAR, N.; ODAR, K.; GLAVAC, D.; JERSE, M.; ZUPANC, T.; STAJER, D.
Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **J. Cell Mol. Med.**, Medford, v. 13, n. 9B, p. 3753-3763, 2009.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 33/2012, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE LEUCOTRIENOS E SUA RELAÇÃO COM ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS NA PATOGÊNE DA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS”**, de responsabilidade de Marcos Rabelo de Freitas e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 29 de novembro de 2012


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA