



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM

LAURO INÁCIO DE MOURA NETO

**EFEITO DA PENTAMIDINA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO, DO
ESTRESSE OXIDATIVO E NAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MUCOSITE
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

FORTALEZA

2016

LAURO INÁCIO DE MOURA NETO

**EFEITO DA PENTAMIDINA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO, DO
ESTRESSE OXIDATIVO E NAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MUCOSITE
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Enfermagem da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem. Área de concentração: Enfermagem.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

Coorientadora: Ms. Deiziane Viana da Silva Costa.

FORTALEZA

2016

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)

M887e Moura Neto, Lauro Inácio de.
EFEITO DA PENTAMIDINA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO, DO ESTRESSE OXIDATIVO E
NAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL / Lauro
Inácio de Moura Neto. – 2016.
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão..

Coorientação: Prof. Me. Deiziane Viana da Silva Costa..

1. Mucosite intestinal. 2. 5-fluorouracil. 3. S100β. 4. Inflamação. . I. Título.

CDD 610.73

LAURO INÁCIO DE MOURA NETO

**EFEITO DA PENTAMIDINA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO, DO
ESTRESSE OXIDATIVO E NAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MUCOSITE
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Enfermagem da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem. Área de concentração: Enfermagem.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

Coorientadora: Ms. Deiziane Viana da Silva Costa.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Enfermeira Ms. Deiziane Viana da Silva Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Bióloga Ms. Conceição da Silva Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus,

Por ser grande, por ser amor. A Ele seja a honra e a glória, pelos séculos dos séculos!

À Soraya, minha mãe,

Por ter me amado e demonstrado esse amor em todos os momentos e circunstâncias. Por ser o motivo que me fez querer voltar pra casa todos os dias.

Ao Lauro Filho, meu pai,

Por ter sido meu maior exemplo de vida. Por, ainda que inconscientemente, me fazer mais forte, mais independente e mais reativo às adversidades.

Às minhas irmãs Luciana e Letícia,

Por todas as vezes que me fizeram rir quando eu voltei pra casa.

Ao meu irmão Paulo,

Por me fazer querer ser exemplo, como meu pai foi pra mim.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pelas incontáveis vezes em que fez sentir-me parte essencial de grandes projetos. Por abraçar-me como orientadora quando tudo parecia estar perdido! Por dedicar parte do seu tempo a mim, às minhas dúvidas, e principalmente a esse projeto, que é fruto do trabalho de toda uma equipe.

À Professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por ser a inspiração que todos os alunos precisam ter! Lembro-me quando a conheci, ainda no primeiro semestre da graduação, e de como a admirei, e quis, no subconsciente, ser parecido com ela um dia. Agradeço por ter aberto as portas do laboratório para mim, acreditando no meu potencial, como fez com tantas outras pessoas.

À doutoranda Deiziane Viana da Silva Costa, por ter visto em mim qualidades que nem eu mesmo via. Por ter me adotado, me ensinado, me orientado, e por ter acreditado em mim. Agradeço por ter confiado a mim este estudo. Todos sabemos o quanto você se esforçou e trabalhou, liderando toda uma equipe, para a obtenção destes resultados. Sinceramente, eu devo muito do que sou a ti, pois tive a sorte de te conhecer no início da graduação, e de lá pra cá, muito do que eu tenho feito tem muitos dedos seus! Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho. Você é o maior exemplo de Enfermeira que eu tenho!

À doutoranda Conceição da Silva Martins (Josyane), por exalar alegria! Por dar sempre um ar aconchegante e amigável a tudo o que faz, fazendo-me sentir a vontade, como ninguém mais consegue fazer! Agradeço por todos os conselhos, e pela confiança.

A todas e todos os amigos de graduação, que me proporcionaram uma experiência formidável de crescimento profissional e pessoal. Agradeço em especial às amigas Êmile Costa e Emanuelle Moura pela força, alegria e leveza que deram a esta jornada. Também agradeço à Olívia Maria, Igor de Freitas, Mairton Rodrigues e Essyo Pedro, que compartilharam comigo inúmeros momentos de crescimento. Vocês foram tão necessários pra minha formação acadêmica quanto qualquer professor foi!

A todas as gestões do Centro Acadêmico Grasiela Barroso (Enfermagem UFC) das quais participei, pois me fizeram muito mais humano do que eu jamais pensei que pudesse ser. Agradeço especialmente às amigas Ingrid Nunes e Eva Anny Wélly pela amizade, companheirismo e ensinamentos que compartilhamos durante tantos anos. Também agradeço ao Wesley Amora, Ana Cláudia Maia, Matheus Silva, Amanda Andrade e Guadallupi Bezerra,

Vielcketlin e Rogério Vieira por me mostrarem que todo o conhecimento político que pudermos adquirir é tão importante quanto o conhecimento científico.

Aos amigos e amigas da Executiva Nacional dos Estudantes de Enfermagem (ENEEnf) que fiz Brasil a fora. Queria poder citar todas e todos, mas posso cometer a injustiça de esquecer alguém. Simbolicamente, agradeço ao Leonardo Rocha (Unicamp), ao Marllon Rodrigo (UEPA) e ao Kainan Machado (UVA-RJ)! Vocês são amigos, irmãos! Nossa amizade significa amor, luta e emponderamento. Obrigado por tudo o que me proporcionaram nestes anos de graduação.

À mestranda em Farmacologia Dainesy Santos Martins e a todos os meus amigos de Iniciação Científica do NEMPI, em especial os amigos Gutierres Bernardo, Angeline Pascoal, Márcio Guanabara e Juliana Pontes, por todos os momentos compartilhados e por se tornarem companheiros, em muitos aspectos.

Aos mestrandos Cíntia Braga Marques e Ariel Valente, por todo o incentivo e inspiração que me deram desde que nos conhecemos.

A todas e todos os docentes do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da UFC, que me encantaram com seus conhecimentos, e me incentivaram a ser monitor de histologia e Embriologia Humanas, minha porta de entrada no NEMPI.

A todas e todos os docentes do Departamento de Enfermagem da UFC, por toda a contribuição na minha formação acadêmica e profissional. Levarei comigo o melhor de cada um de vocês!

À Professora Dra. Maria Josefina, por ter me acolhido em todos os momentos da graduação em que precisei. Por ser uma pessoa que irradia amor e confiança.

Ao Leonardo de Oliveira Campos, por ter me dado amparo mental, físico, emocional e financeiro em muitos momentos da graduação. Sobretudo agradeço sua amizade.

“Os sonhos de Deus não têm fim. Os sonhos de Deus são pra mim. São eternos. São impossíveis aos olhos mortais.”

Eyshila Santos

RESUMO

Efeito da pentamidina na modulação da inflamação, do estresse oxidativo e nas alterações histológicas na mucosite induzida por 5-fluorouracil

5-fluorouracil (5-FU) é amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama e de colorretal. Após a primeira dose de 5-FU, 40% dos pacientes apresentam mucosite intestinal que pode ser acompanhada por diarreia. A mucosite intestinal ocasionada por 5-FU pode apresentar importante relação com possíveis alterações nas CGEs, uma vez que essas células estão envolvidas na interação tanto com neurônios quanto células epiteliais. Células gliais entéricas sintetizam S100 β , que é considerada uma citocina pró-inflamatória devido à sua capacidade de promover inflamação, aumentando a expressão gênica de iNOS, de IL-6 e de TNF- α via S100 β -RAGE-NF κ B. Diante disso, este estudo se propôs a investigar o efeito da pentamidina, inibidor de S100 β , na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os camundongos Swiss machos receberam salina (0,9%, i.p.) ou 5-FU (450 mg/Kg, i.p. dose única). Após 24h da administração do quimioterápico, administraram-se pentamidina, inibidor de S100 β (P0,8 mg/Kg +5FU; P4 mg/Kg +5FU; ou somente P4mg/Kg, i.p.) durante dois dias e os animais foram eutanasiados no quarto dia do protocolo experimental. Os animais foram acompanhados diariamente para analisar a perda ponderal. Os segmentos do intestino delgado e do cólon foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: aspectos histopatológicos (identificando as alterações histopatológicas e mensurando a altura das vilosidades, incluindo o comprimento das criptas intestinais), estresse oxidativo (dosando os níveis de glutathiona reduzida-GSH- e de malondialdeido-MDA) e inflamação (mensurando os níveis de nitrito e nitrato-NO x - e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6) nos segmentos intestinais. 5-FU promoveu perda ponderal significativa, ocasionou redução da altura das vilosidades e do comprimento das criptas intestinais, incluindo intenso infiltrado de células inflamatórias. Adicionalmente, 5-FU aumentou os níveis de MDA, NO x , TNF- α e IL-6, bem como reduziu os de GSH no intestino quando comparado ao grupo controle. Ao passo que Pentamidina (inibidor de S100 β) reduziu essas alterações promovidas por 5-FU no intestino. Com base nos achados apresentados, S100 β é um importante mediador da patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU, uma vez que a sua inibição atenua a perda de peso, as alterações histológicas, o estresse oxidativo e a inflamação induzidos por esse quimioterápico. Portanto, S100 β demonstra ser uma importante molécula alvo para o desenvolvimento de terapêuticas futuras para atenuar os danos do 5-FU sobre a mucosa intestinal.

Palavras-chave: Mucosite intestinal. 5-fluorouracil. S100 β . nflamação.

ABSTRACT

Effect of pentamidine in the modulation of 5-FU-induced inflammation, oxidative stress and histological changes during intestinal mucositis

5-fluorouracil (5-FU) is widely used in the treatment of breast and colorectal cancer. After the first dose of 5-FU, 40% of the patients can exhibit intestinal mucositis that may be accompanied by diarrhea. 5-FU-induced intestinal mucositis may have an important relation with alterations in Enteric glial cells, since these cells are involved in the interaction with both neurons and epithelial cells. Enteric glial cells synthesize S100 β , which is considered a proinflammatory cytokine because of its ability to promote inflammation, enhancing the gene expression of iNOS, IL-6 and TNF- α via S100 β -RAGE-NF κ B. Therefore, this study aimed to investigate the effect of pentamidine, a S100 β inhibitor, on the 5-FU-induced intestinal mucositis. Male Swiss mice received saline (0.9%, i.p.) or 5-FU (450 mg / kg, i.p. single dose). After 24 hours of chemotherapeutic administration, pentamidine (P0.8 mg / kg + 5FU, P4 mg / kg + 5FU, or only P4mg / kg, ip) was injected for two days and the animals were euthanized in the fourth day of the experimental protocol. The animals were monitored daily to analyze the weight loss. The segments of the small intestine and colon were collected for analysis of the following parameters: histopathological aspects (identifying histopathological changes and measuring villus height, including intestinal crypt length), oxidative stress (by measuring the levels of GSH-reduced glutathione - and malondialdehyde-MDA) and inflammation (measuring levels of nitrite and nitrate-NO x - and proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6) in the intestinal samples. 5-FU promoted significant weight loss, reduced villus height and intestinal crypt length, including intense infiltrate of inflammatory cells. In addition, 5-FU increased the levels of MDA, NO x , TNF- α and IL-6, as well as reduced GSH levels in the intestine when compared to the control group. Whereas Pentamidine (a S100 β inhibitor) reduced these 5-FU promoted changes in the gut. Based on the findings, S100 β is an important mediator on the pathogenesis of the 5-FU-induced intestinal mucositis, since its inhibition attenuates weight loss, histological changes, oxidative stress and inflammation induced by this chemotherapeutic agent. Therefore, S100 β is shown to be an important target molecule for the development of future therapies to attenuate 5-FU-induced damage on the intestinal mucosa.

Keywords: Intestinal mucositis. 5-fluorouracil. S100 β . Inflammation.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	- Efeito do inibidor de S100 β no escore histopatológico de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	37
----------	---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mecanismo de ativação e regulação de RAGE.....	21
Figura 2	- Efeito da ativação do receptor RAGE por S100 β em diferentes células....	22
Figura 3	- Desenvolvimento da mucosite intestinal.....	26
Figura 4	- Efeito do inibidor de S100 β nas alterações histopatológicas do intestino delgado e do cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	36
Figura 5	- Inibição de S100 β aumenta o comprimento das vilosidades e da profundidade das criptas no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	38
Figura 6	- Inibição de S100 β reduz parcialmente a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	40
Figura 7	- Inibidor de S100 β aumenta os níveis de GSH no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	42
Figura 8	- Inibidor de S100 β diminui os níveis de MDA no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	43
Figura 9	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de NOx no duodeno, no jejuno e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	45
Figura 10	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de TNF- α no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	47
Figura 11	- Inibidor de S100 β reduz os níveis de IL-6 no duodeno e no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU..	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μmol	Micromol
5-FU	5-Fluorouracil
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
BSA	Albumina sérica bovina
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CGEs	Células gliais entéricas
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
COX-2	Ciclooxygenase-2
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DSS	Sulfato de sódio dextrano
DHFU	Diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GSH	Glutationa reduzida

GSNO	S-nitrosoglutationa
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H&E	Hematoxilina e eosina
IκB	Proteína inibitória kappa B
IA	Intestino anterior
ICC	Células intersticiais de cajal
IEC-6	Células epiteliais intestinais-6
IL-1β	Interleucina -1β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IM	Intestino médio
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IP	Intestino posterior
JNK	C-JUN kinase aminoterminal
kDa	KiloDalton
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LEICA	Sistema de aquisição de imagens
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mDia1	<i>Diaphanous-1</i>

mg	Miligrama
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
Min	Minuto
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteinases
N	Número
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamina-dicloridrato
NFκB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NK1	Neurocinina-1
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
Nox	Metabólitos de óxido nítrico
P	Página
PAF	Fator ativador plaquetário
PAFR	Receptor do fator ativador plaquetário
PAR-2	Receptor ativado por protease-2
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pg	Picograma
PGD2	Prostaglandina D2
pH	Potencial hidrogeniônico
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
S100 β	Fração beta da proteína S100
SF	Soro fisiológico
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
sRAGE	Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TGI	Trato gastrointestinal
TK	Tirosina quinase
TK	Timidina quinase
TLRs	Receptores toll-like
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TP	Timidina fosforilase
TS	Timidilato sintetase
V	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
K	Kappa
Γ	Gama
Δ	Delta
®	Marca registrada
+	Mais
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
&	E

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Via S100β/RAGE/NFκB	19
1.2	Isotiocianato de Pentamidina	23
1.3	5-Fluorouracil e alterações gastrintestinais	23
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizadas no estudo	29
4.2	Aspectos éticos	29
4.3	Animais	29
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU	29
4.5	Grupos experimentais	29
4.6	Parâmetros avaliados	30
4.6.1	<i>Análise ponderal</i>	30
4.6.2	<i>Análise morfométrica e histopatológica</i>	30
4.6.3	<i>Determinação de glutathiona reduzida (GSH)</i>	31
4.6.4	<i>Dosagem de malondialdeido (MDA)</i>	32
4.6.5	<i>Dosagem de nitrito/nitrato</i>	32
4.6.6	<i>Dosagem de citocinas (TNF-α e IL-6)</i>	33
4.7	Análise estatística	33
5	RESULTADOS	35
5.1	Efeito da pentamidina, inibidor de S100β, nas alterações histológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU	35
5.2	Efeito da pentamidina na perda de peso induzida pelo 5-FU	39
5.3	Efeito da pentamidina nos níveis de GSH e MDA, marcadores de estresse oxidativo, no intestino de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU	41

5.4	Avaliação do efeito da pentamidina nos níveis de nitrito e nitrato (NO_x) no intestino de camundongos submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	44
5.5	Verificar o efeito da pentamidina nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6) na mucosite induzida por 5-FU.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	
	APÊNDICE.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Via S100 β /RAGE/NF κ B

A família das proteínas S100 são constituídas por 21 membros. As proteínas S100 são pequenas proteínas (9-13 kDa) ligantes de cálcio do tipo EF-*hand* (HEIZMANN; FRITZ; SCHAFER, 2002).

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

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

No SNC, o S100 β é uma proteína solúvel secretada por astrócitos que apresenta efeitos pró-apoptóticos e pró-sobrevivência dependendo da concentração presente no meio extracelular. Além disso, caracteriza-se como proteína de ligação ao cálcio abundante no citoplasma de astrócitos cerebrais (KLIGMAN; HILT, 1988). Essa proteína apresenta várias ações intracelulares, incluindo a regulação da homeostase do cálcio (XIONG *et al.*, 2000), controla a estabilidade de microtúbulos (SORCI *et al.*, 2000) e modula a mitose (DONATO, 2003).

Em adição as suas ações intracelulares, o S100 β também exibe atividade extracelular que é mediada por sua interação com o receptor RAGE (DONATO *et al.*, 2009). No SNC, a liberação de S100 β por astrócitos é aumentada quando essas células são estimuladas com 5-HT, por meio da ativação do receptor 5-HT_{1A}, ácido lipofosfatídico, glutamato e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e submetidas ao estresse metabólico (CICCARELLI *et al.*, 1999; DONATO *et al.*, 2009; EDWARDS; ROBINSON, 2006; PINTO *et al.*, 2000).

De forma semelhante, as células gliais entéricas quando expostas às citocinas pró-inflamatórias, *in vitro*, também liberam S100 β e produzem óxido nítrico (CIRILLO *et al.*, 2011).

Quando S100 β é liberado em grandes concentrações para o meio extracelular, ele funciona como padrão molecular associado ao dano (DAMP) devido a sua capacidade de

estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de RAGE (SAVIDGE *et al.*, 2007).

O RAGE é um receptor de superfície celular que pertence a uma família de proteínas de receptores de imunoglobulinas que compartilha homologia estrutural com outros receptores de imunoglobulinas (BARCLAY, 2003; LECLERC *et al.*, 2009). Em relação à sua estrutura, RAGE é constituído por um domínio extracelular, um transmembranar e uma extremidade citosólica (domínio intracelular). Vale enfatizar que o domínio extracelular de RAGE é denominado como região do RAGE de ligação para o ligante extracelular (sRAGE). O RAGE pode ser encontrado em neurônios, células musculares lisas, células mensangiais, células gliais entéricas, endotélio vascular, células epiteliais intestinais, macrófagos e linfócitos (CIRILLO *et al.*, 2011; LECLERC *et al.*, 2009; TURCO *et al.*, 2009).

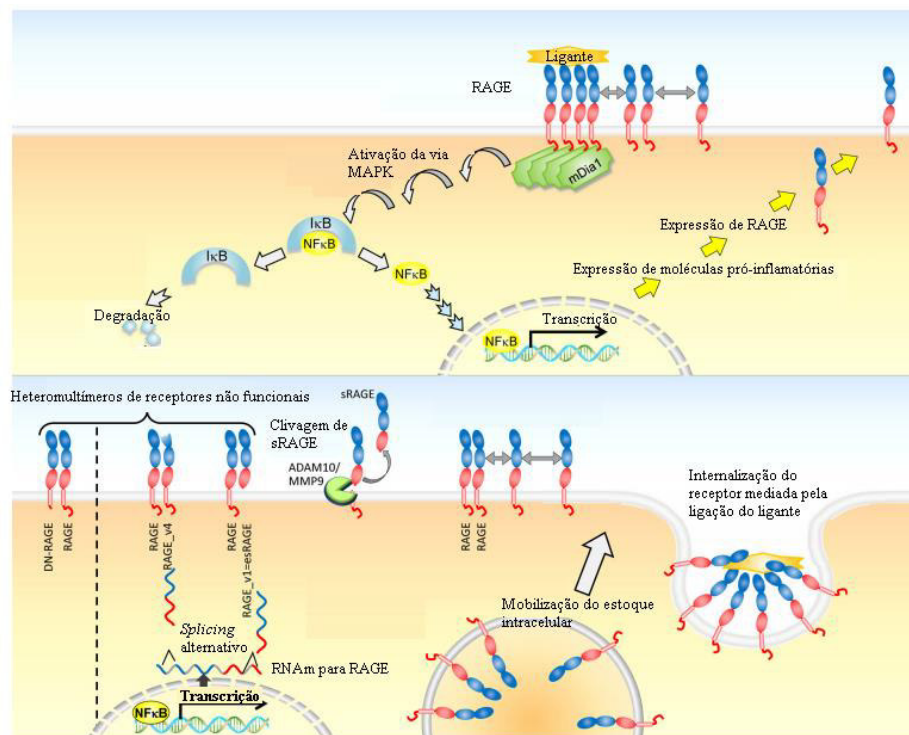
Na maioria dos casos, a interação do ligante ao receptor RAGE promove o recrutamento de *diaphanous-1* (mDia1) que ativa a via da MAPK, resultando na fosforilação da proteína inibitória kappa B (I κ B) e na liberação de NF κ B, ao qual se transloca para o núcleo, estimulando a expressão de moléculas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

A ativação do receptor RAGE por seus ligantes promove uma retroalimentação positiva na ativação dessa via por aumentar a expressão desse receptor na membrana citoplasmática. Este evento pode ser promovido de duas formas: pelo aumento da expressão gênica de RAGE e pela reciclagem do receptor. Nesta última forma, os ligantes promovem a internalização do receptor por endocitose e as vesículas contendo os receptores se fundem a membrana plasmática (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 01).

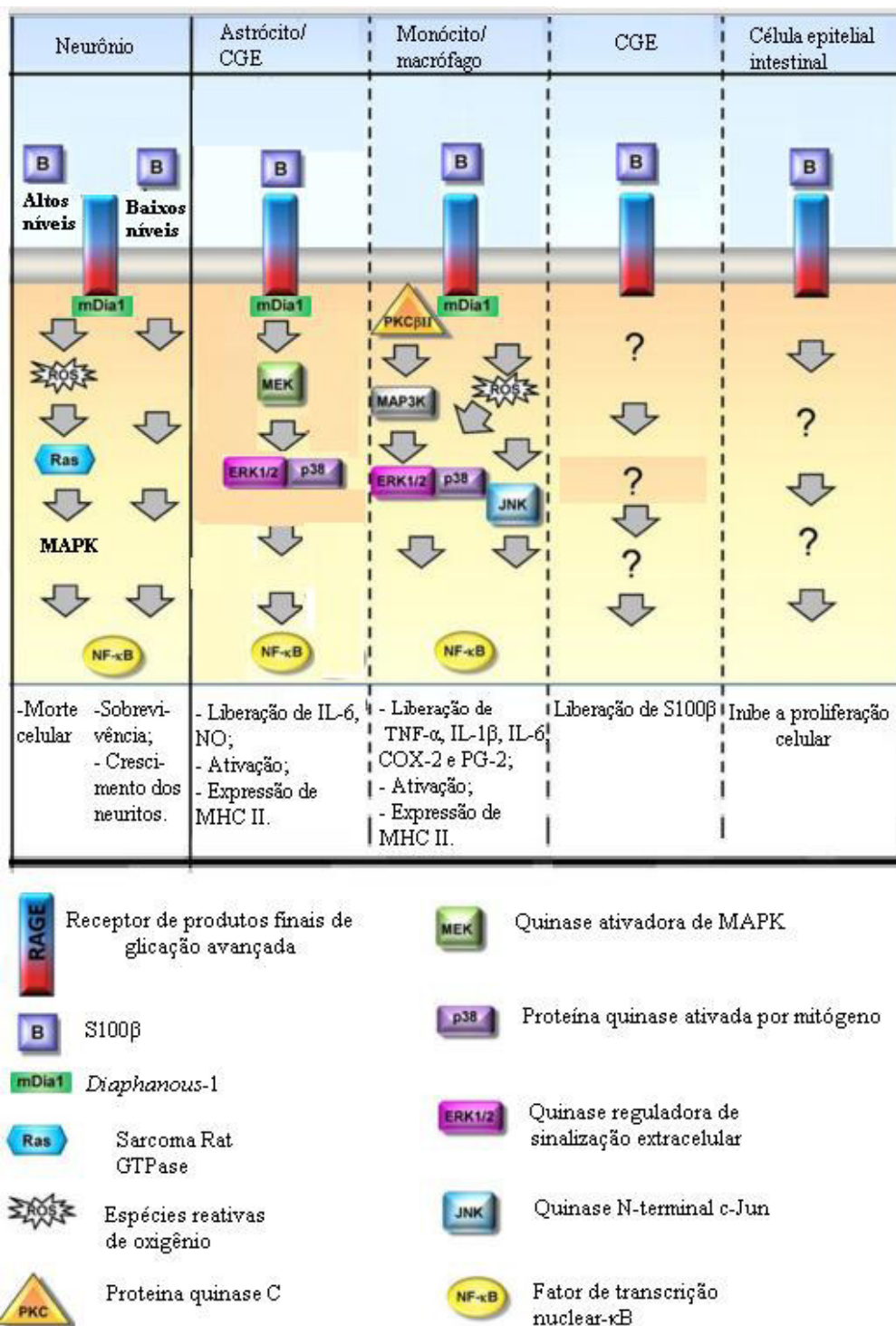
Os efeitos celulares de S100 β por meio de RAGE são variáveis e depende, conforme já mencionado anteriormente, da concentração de S100 β no meio extracelular e do tipo de célula a ser estimulada. Em neurônios, altos níveis de S100 β promove a formação de espécies reativas de oxigênio que culmina com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

envolvida na liberação de S100 β por via autócrina é desconhecida, assim como a via envolvida na inibição da proliferação de células epiteliais intestinais por S100 β /RAGE (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 02).

Figura 1 - Mecanismo de ativação e regulação de RAGE.



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

Figura 2 - Efeito da ativação do receptor RAGE por S100 β em diferentes células.

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

1.2 Isotiocianato de Pentamidina

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

O isotiocianato de pentamidina foi descoberto em 1938, como um fármaco antiprotozoário, e aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de *Pneumocystis carinii* e de doenças causadas por protozoários, como a Leishmaniose e a tripanossomíase (DRAKE *et al.*, 1985; RYBNIKER *et al.*, 2010).

A pentamidina inibe S100 β por interagir com resíduos aromáticos na hélice 4 e na alça C-terminal de S100 β (MARKOWITZ *et al.*, 2004). O mecanismo de inibição de S100 β por pentamidina ocorre devido à ligação de duas moléculas desse fármaco ao S100 β .

1.3 5-Fluorouracil e Alterações gastrintestinais

O 5-FU é um fármaco antimetabólico da classe das fluoropirimidinas e que foi desenvolvido a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais para as células como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para síntese e metabolismo de novas células (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

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

5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o coloretal, sendo de maior impacto nesse último tipo. Seus efeitos adversos variam consideravelmente de acordo com o tratamento, dose utilizada e via de administração e são mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação. Na medula óssea resulta em granulocitopenia e trombocitopenia, no trato gastrintestinal resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, entre outros (KOENIG; PATEL, 1970). Cerca de 40% dos pacientes em uso de doses padrões de

quimioterápicos, como o 5-FU, apresentam mucosite e há relatos de pacientes que a apresentam na primeira dose administrada (GIBSON *et al.*, 2013).

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

A mucosite oral caracteriza-se por apresentar cinco fases fisiopatológicas: (1) fase de iniciação, (2) resposta primária ao dano, (3) amplificação, (4) ulceração e (5) cicatrização (SONIS, 2004) (figura 03).

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

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

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

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

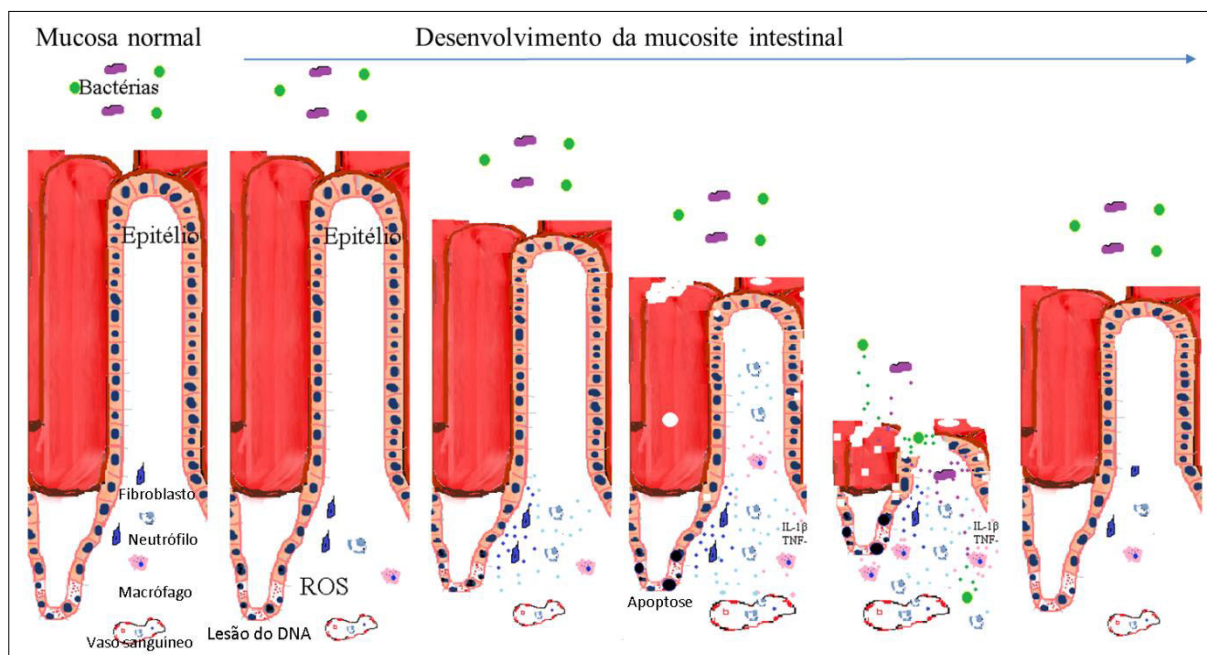
A fase de ulceração da mucosite é considerada a mais significativa em pacientes e modelos murinos. A perda da integridade da mucosa propicia a invasão de produtos da parede celular de bactérias que colonizam o intestino, os quais estimulam células mononucleares a liberarem e produzirem citocinas pró-inflamatórias,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

Por fim, na fase de cicatrização ocorre a resolução da lesão induzida pelo quimioterápico (SONIS, 2004); com proliferação e diferenciação celular, retorno normal das células sanguíneas periféricas e controle da flora bacteriana (PICO *et al.*, 1998). Contudo, estas fases ainda não estão bem definidas para a mucosite intestinal.

Observa-se na literatura que essas alterações de motilidade induzidas por inflamação podem ocorrer por distúrbios de liberação de neurotransmissores do plexo mioentérico, por hipertrofia e por hiperplasia muscular (MOREELS *et al.*, 2001). É possível, portanto, o envolvimento do sistema nervoso entérico nestes quadros, tanto dos neurônios quanto das CGE.

Assim, a realização deste projeto poderá contribuir para elucidar o papel de células gliais entéricas na patogênese da inflamação e distúrbios de contratilidade encontrados na mucosite induzida por 5-FU.

Figura 3 – Desenvolvimento da mucosite intestinal.



Fonte: Costa (2016). Em condições normais (mucosa normal), há a presença de macrófagos em estado inativo e poucos neutrófilos. Inicialmente, ocorre lesão do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Neutrófilos são estimulados a liberar mieloperoxidase e elastases que estimulam a apoptose das células epiteliais intestinais e diversas vias de sinalização são ativadas, levando a liberação extensa de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , culminando com a perda da integridade do epitélio intestinal que propicia a invasão de bactérias e intensifica a inflamação, levando ao recrutamento de neutrófilos para a lesão. Após a cessação do quimioterápico, ocorre a resolução da lesão.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

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

As células gliais desempenham importantes funções no trato gastrintestinal. Um dos produtos das CGE é o S100 β . Este, no sistema nervoso central tem mostrado atuar como citocina pró-inflamatória em condições de neuroinflamação por induzir a expressão de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6 (VILLARREAL *et al.*, 2011). No intestino, S100 β é sintetizado exclusivamente pelas células gliais entéricas localizadas no plexo mucoso, submucoso e mioentérico (RAO *et al.*, 2015).

Em modelo experimental de colite ulcerativa, Cirillo *et al.* (2009) demonstrou que a produção aumentada de óxido nítrico na mucosa nesse tipo de afecção é decorrente, em parte, de expressão aumentada de S100 β por CGE.

Nesse contexto, Vários estudos têm demonstrado que na mucosite intestinal induzida por 5-FU há aumento da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, assim como alterações na função epitelial e na motilidade intestinal (CHANG *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2008). Dessa forma, S100 β pode ter importante papel na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil (5-FU). Este estudo é de grande relevância, uma vez que propiciará melhor entendimento do papel desse mediador na patogênese da mucosite induzida por 5-FU e possibilitará o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes para minimizar os efeitos desse quimioterápico no intestino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da pentamidina no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da pentamidina, inibidor de S100 β , nas alterações histológicas em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Analisar o efeito da pentamidina na perda de peso induzida pelo 5-FU;
- Verificar o efeito da pentamidina no estresse oxidativo (avaliando o níveis intestinais de GSH e MDA), no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar o efeito da pentamidina na inflamação (mensurando os níveis de óxido nítrico, avaliado indiretamente por nitrito, e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizadas no estudo

Os fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizadas neste estudo encontram-se detalhados no apêndice.

4.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 80/2015).

4.3 Animais

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

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, tocadas duas vezes por semana, receberam água e ração padrão *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento (temperatura: 22°C ± 2°C; com exaustão de ar e ciclo 12 horas claro/12 horas escuro).

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

O modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU foi realizado conforme descrito por Soares *et al.* (2008). O 5-FU (450 mg/kg, dose única) foi administrado por via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados três dias após a administração do quimioterápico, com cetamina (Syntec, 100mg/kg) e xilazina (Agner União, 10mg/kg). Este período, de acordo com o modelo proposto, é capaz de mimetizar os efeitos inflamatórios e funcionais no intestino ocasionados pelo uso desse quimioterápico.

4.5 Grupos experimentais

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

- **Grupo controle:** Animais tratados com solução salina estéril 0,9% por via intraperitoneal.
- **Grupo 5-FU:** Os animais receberam 5-FU (450mg/Kg de animal, dose única) no primeiro dia do protocolo experimental por via intraperitoneal.
- **Grupo P0,8+5-FU:** Os animais receberam 5-FU (450mg/Kg de animal, dose única, intraperitoneal) no primeiro dia do protocolo experimental, e nos dois dias consecutivos após 24h da administração do quimioterápico, receberam isotiocianato de pentamidina (0,8 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal).
- **GrupoP4+5-FU:** Os animais receberam 5-FU (450mg/Kg de animal, dose única, intraperitoneal) no primeiro dia do protocolo experimental, e nos dois dias consecutivos após a administração do quimioterápico, receberam isotiocianato de pentamidina (4 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal).
- **GrupoP4:** Este grupo foi utilizado como controle para avaliar o efeito isolado da pentamidina. Dessa forma, os animais receberam apenas pentamidina (4 mg/Kg de animal, uma vez ao dia, intraperitoneal) no segundo e terceiro dias do protocolo experimental.

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

4.6 Parâmetros avaliados

4.6.1 Análise ponderal

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

4.6.2 Análise morfométrica e histopatológica

Os segmentos obtidos do duodeno, jejuno, íleo e colón foram fixados em formol temponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Em seguida, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura no micrótomo, e as lâminas foram adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilos e as profundidades de 10 criptas de cada segmento intestinal. As medidas foram obtidas em µm

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

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

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

4.6.3 Determinação de Glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de GSH nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e colon) foi avaliada utilizando o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-

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

4.6.4 Dosagem de malondialdeído (MDA)

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

4.6.5 Dosagem de nitrito/nitrato

A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) no intestino através da concentração total nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em 100 μ L de uma solução gelada de cloreto de potássio (KCL) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. O nível total de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ foi determinado como NO_3^- das amostras (0,04 mL) convertido em NO_2^- pela incubação em uma solução de 0,04

mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada “overnight”. Foram utilizadas placas de 96 poços, adicionando 80 μL da amostra experimental em cada poço, em duplicata. Uma série de diluições da curva-padrão de referência de NO_2^- (640 μM , 320 μM , 160 μM , 80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 1.25 μM e 0.625 μM) foram preparadas. Em seguida, foram adicionados 80 μL da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão e expressos em NO_x ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido).

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

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α nos segmentos intestinais (duodeno e jejuno) foram quantificados por ELISA. Os tecidos intestinais coletados foram homogeneizados em PBS 1% como descrito por Safieh-Garabedian (1995). A detecção das citocinas IL-6 e TNF- α foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4°C com 100 μL por poço de anticorpo de captura para IL-6 e TNF- α . Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e bloqueadas com 200 μL por poço BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100 μL das amostras e da curva padrão, foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-6 e TNF- α . Após o período de incubação à 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μL de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μL de tampão de lavagem e 100 μL da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems Catalog – DY999) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H_2SO_4) e, enfim, a absorbância medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.7 Análise estatística

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

Para a realização da análise estatística dos dados desse presente estudo foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos, foram utilizados os seguintes testes: o teste de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; para os escores histológicos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn; e para a variável de perda ponderal, utilizou-se o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

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

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da pentamidina, inibidor de S100 β , nas alterações histológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

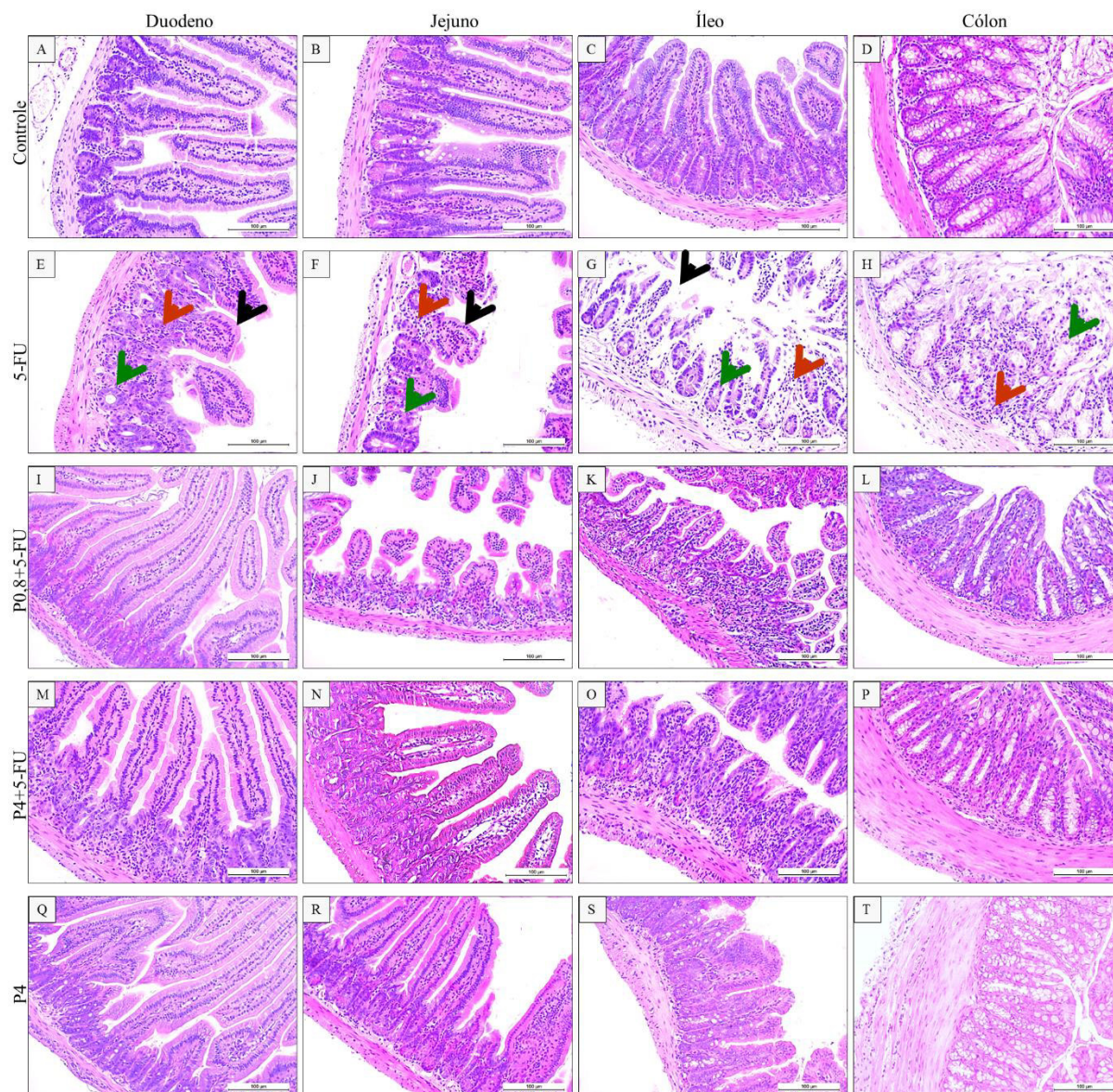
Observando histologicamente o intestino delgado e o cólon do grupo controle,, observou-se integridade das criptas e das vilosidades intestinais, incluindo as demais camadas intestinais, bem como escassa presença de células inflamatórias (figura 4A-D).

Ao passo que 5-FU ocasionou perda da integridade da barreira epitelial intestinal com vacuolização destas células, diminuição das vilosidades e cripas intestinais, bem como promoveu a formação de intenso infiltrado de células inflamatórias, resultando em aumento significativo do escore histológico em todos os segmentos intestinais avaliados quando comparado ao grupo controle (tabela 1). (figura 4E-H). Enquanto que pentamidina(inibidor de S100 β) na dose de 0,8 mg/Kg (figura 4I-L) e na dose de 4 mg/Kg (figura 4M-P) diminuíram essas alterações histológicas induzidas por 5-FU, resultando em redução ($p < 0,05$) do escore histológico no duodeno e no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal experimental

Conforme apresentado na figura 5, Observa-se que o tratamento com 5-FU reduziu ($p < 0,05$) a altura das vilosidades e também a profundidade das criptas intestinais, em comparação ao grupo controle. Ao passo que pentamidina na dose de 4 mg/kg aumentou a altura das vilosidades em todos os segmentos intestinais avaliados (figura 5A, C e E) e aumentou a profundidade das criptas apenas do íleo (figura 5F) de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Ressalta-se que não houveram diferenças estatísticas no escore histológico (tabela 1), na profundidade das criptas e altura das vilosidades (figura 5) dos segmentos intestinais avaliados entre o grupo tratado apenas com pentamidina e o grupo controle, com exceção do jejuno, em que ocorreu aumento da profundidade das criptas intestinais (figura 5E).

Figura 4 - Efeito do inibidor de S100 β nas alterações histopatológicas do intestino delgado e do cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



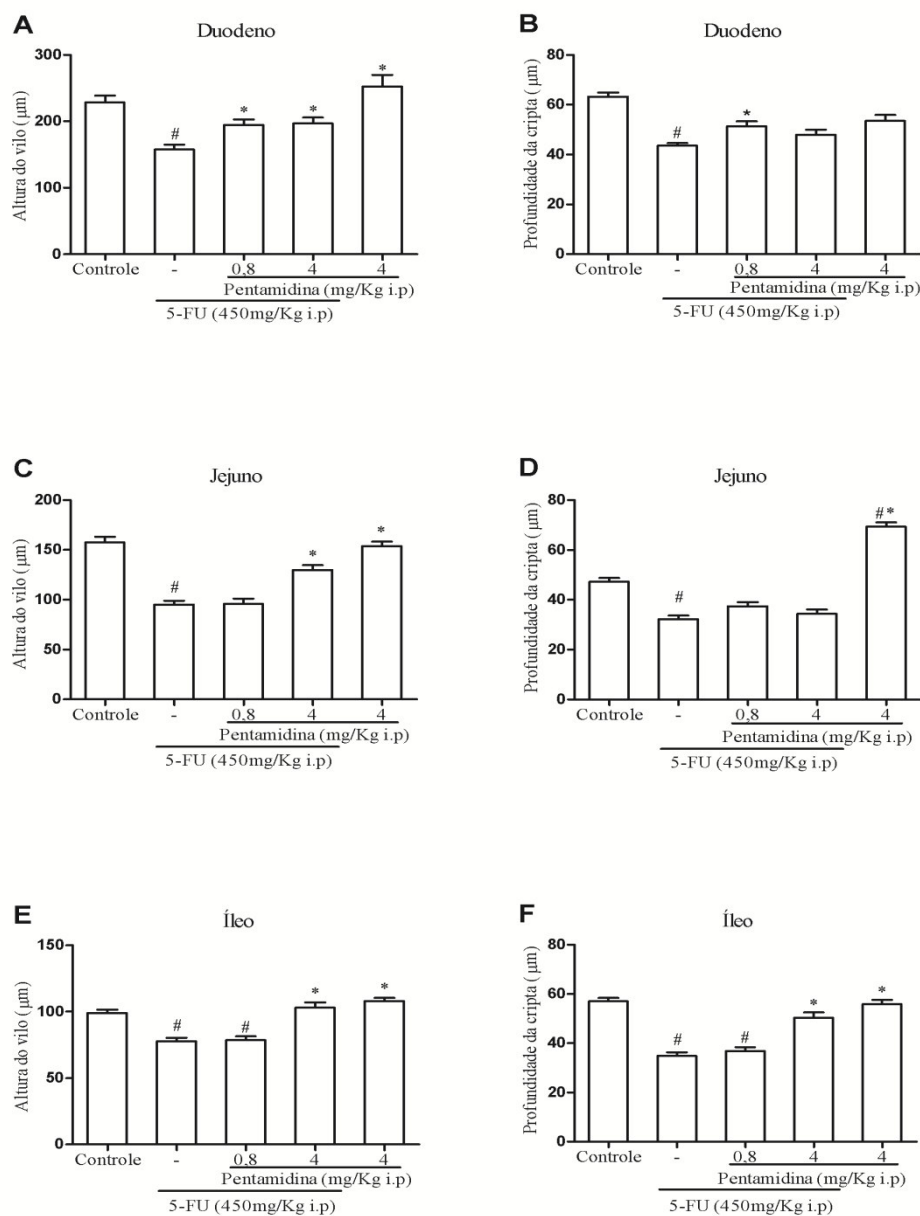
Segmentos do duodeno, do jejunum, do íleo e do cólon foram removidos e corados pelo método de H&E para análise histopatológica. O duodeno (painel A), o jejunum (painel B), o íleo (painel C) e o cólon (painel D) do grupo controle apresenta integridade das vilosidades e das criptas. Enquanto que a administração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

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

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

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

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



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

5.2 Efeito da pentamidina na perda de peso induzida pelo 5-FU.

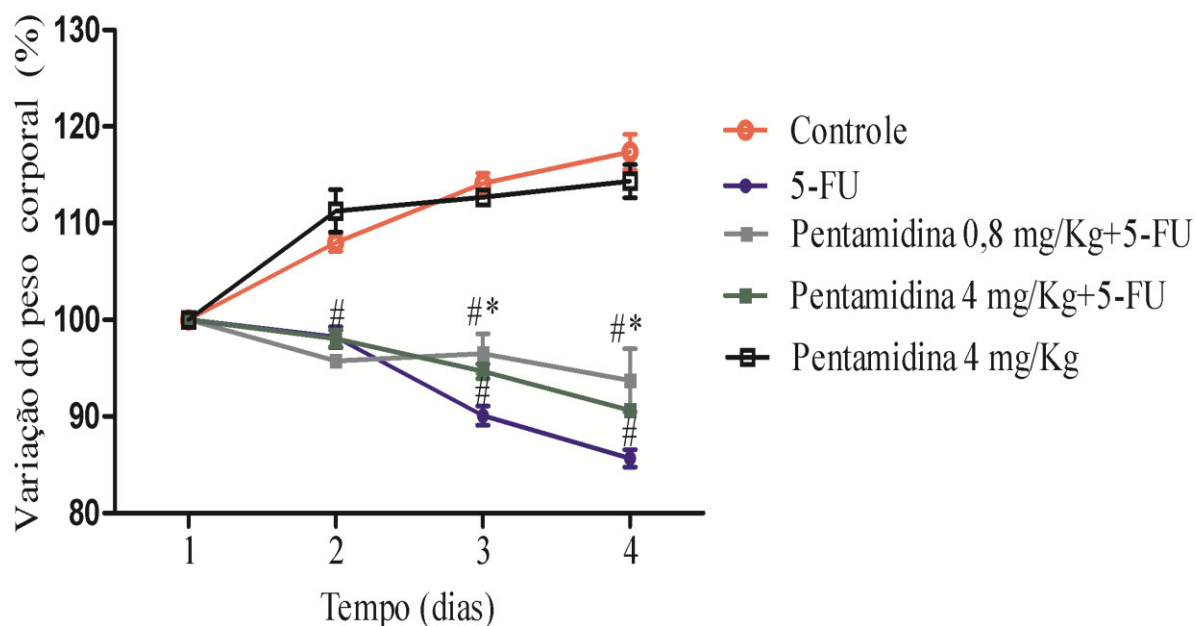
A avaliação da perda de peso configura-se um dos parâmetros de confirmação da eficácia do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, pois, na clínica, pacientes que fazem uso de quimioterápicos, como 5-FU, apresentam perda de peso.

De acordo com a figura 6, 5-FU promoveu perda ponderal em todos os grupos tratados a partir de 24h da administração de 5-FU, quando comparados ao grupo controle. Também é possível observar que no grupo submetido ao modelo de mucosite intestinal experimental em que utilizou-se a pentamidina (somente na dose de 0,8 mg/Kg), a perda de peso foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com o quimioterápico. Ressalta-se que não houve diferença estatística na perda ponderal entre o grupo tratado apenas com pentamidina (P4) e o grupo controle

Afere-se, portanto, que os dados da perda ponderal em conjunto com os dados das alterações histológicas do modelo, confirmaram o estabelecimento do modelo experimental de mucosite intestinal.

Além disso, evidenciou-se que S100 β tem participação relevante nas alterações histopatológicas induzidas por 5-FU, e, em parte, na perda de peso.

Figura 6 - Inibição de S100 β reduz parcialmente a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



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

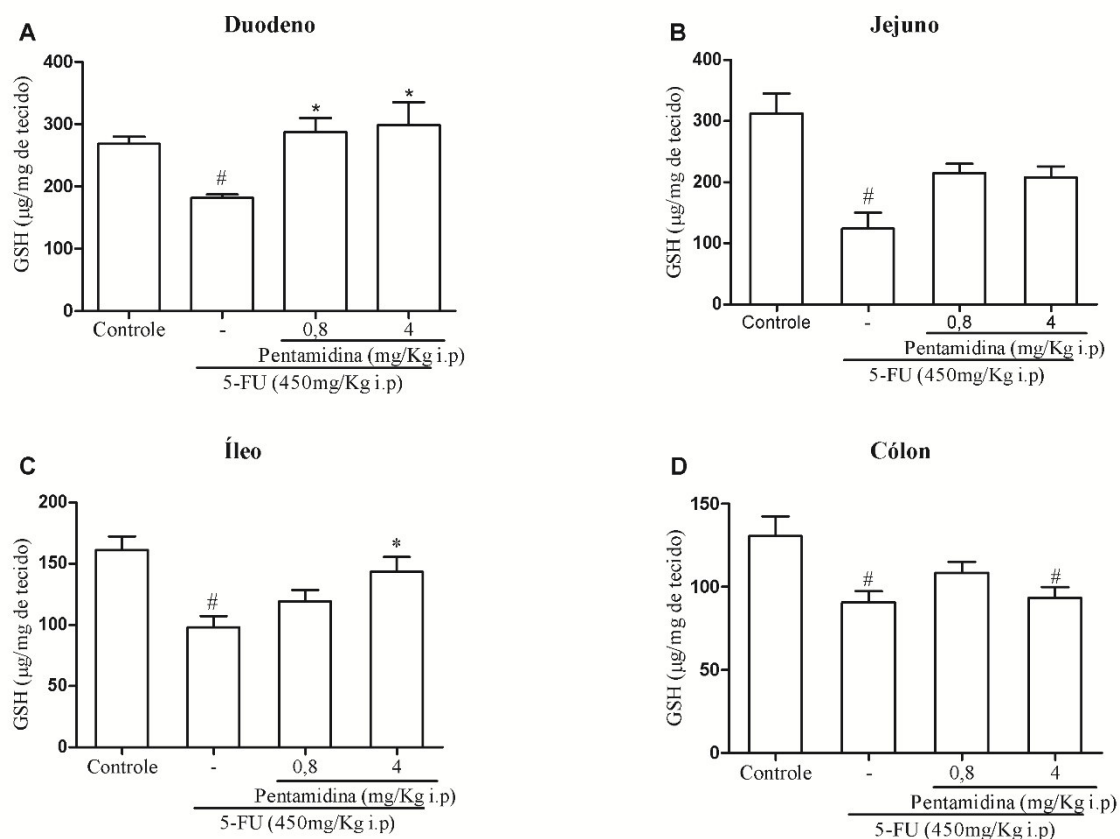
5.3 Efeito da pentamidina nos níveis de GSH e MDA, marcadores de estresse oxidativo, no intestino de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

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

De acordo com a figura 7, O 5-FU foi capaz de reduzir estatisticamente ($p < 0,05$) os níveis de GSH em todas as porções do intestino delgado e cólon (duodeno: $181,60 \pm 5,35$; jejuno: $124,20 \pm 25,94$; íleo: $98,01 \pm 9,27$; cólon $90,60 \pm 6,89$), quando comparado ao grupo controle (duodeno: $268,40 \pm 11,32$; jejuno: $312,10 \pm 33,19$; íleo: $161,30 \pm 11,15$; cólon: $130,50 \pm 11,92$). Contudo, o inibidor de S100 β aumentou significativamente os níveis deste antioxidante fisiológico ($p < 0,05$) no duodeno (P0,8: $287,10 \pm 22,95$; P4: $298,60 \pm 36,84$) e no íleo (P0,8: $119,30 \pm 9,30$; P4: $143,50 \pm 12,06$) dos animais submetidos ao modelo de mucosite intestinal por 5-FU .

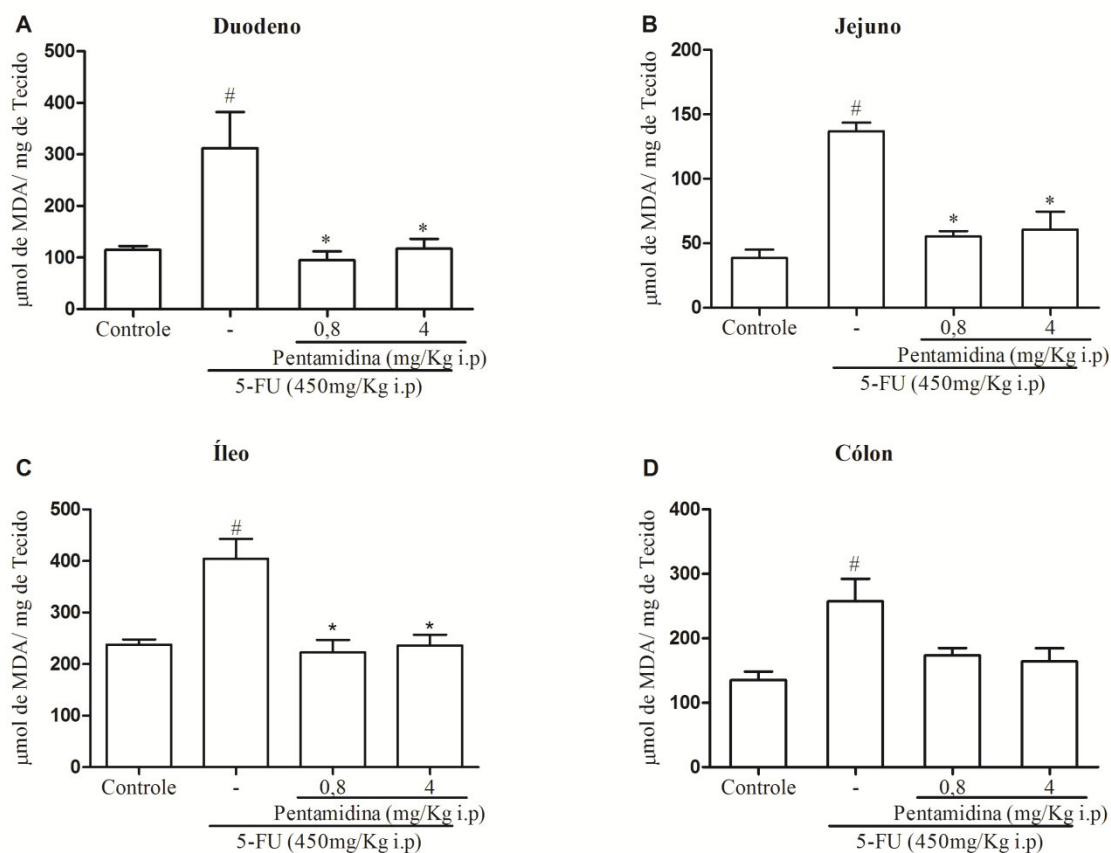
Em relação aos níveis de MDA, pode-se observar na figura 8 que o 5-FU aumentou de forma significante ($p < 0,05$) os níveis no intestino delgado deste marcador de peroxidação lipídica (duodeno: $312,40 \pm 69,96$; jejuno: $137,0 \pm 6,63$; íleo: $404,30 \pm 38,87$) e no cólon ($257,40 \pm 35,08$) quando comparado ao grupo controle. Observa-se também que a pentamidina diminuiu ($p < 0,05$) os níveis deste marcador no intestino delgado dos animais tratados com 5-FU (P0,8- duodeno: $94,95 \pm 17,64$; jejuno: $55,31 \pm 4,09$; íleo: $223,10 \pm 23,61$; P4- duodeno: $117,4 \pm 19,18$; jejuno: $60,58 \pm 13,92$; íleo: $236,40 \pm 20,35$).

Figura 7 - Inibidor de S100 β aumenta os níveis de GSH no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



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

Figura 8 - Inibidor de S100 β diminui os níveis de MDA no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



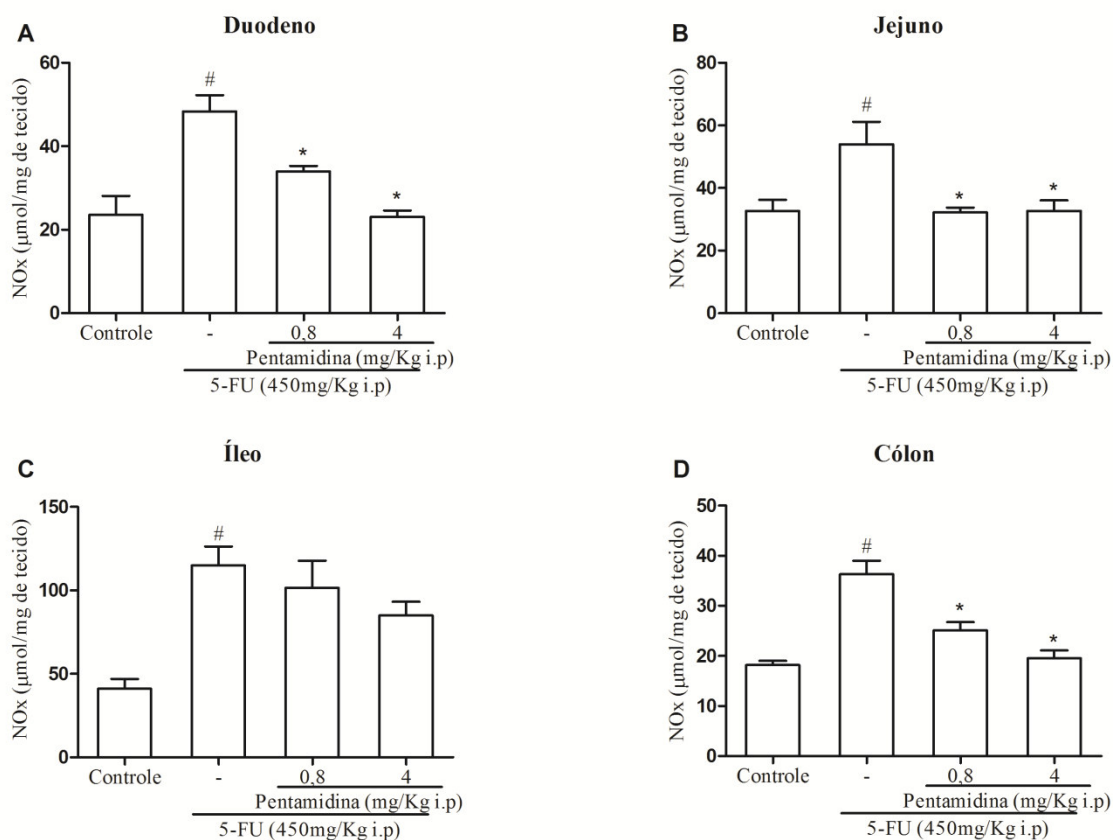
Segmentos do duodeno (A), do jejuno (B), do íleo (C) e do cólon (D) foram coletados para mensurar os níveis de MDA, um produto da peroxidação lípidica. Observa-se que 5-FU aumenta os níveis de MDA no duodeno (A), no jejuno (B), no íleo (C) e no cólon (D) quando comparado ao grupo controle. A inibição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

5.4 Avaliação do efeito da pentamidina nos níveis de nitrito e nitrato (NO_x) no intestino de camundongos submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU.

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

Conforme observado na figura 9, no grupo controle, os níveis de nitrito/nitrato detectados no intestino delgado e no cólon são baixos (duodeno: $23,57 \pm 4,50$; jejuno: $32,68 \pm 3,50$; íleo: $41,03 \pm 5,90$; cólon $18,18 \pm 0,82$). Em comparação a este grupo, 5-FU aumentou ($p < 0,05$) os níveis de nitrito/nitrato em todos os segmentos intestinais avaliados (duodeno: $48,37 \pm 3,85$; jejuno: $54,00 \pm 7,18$; íleo: $115,0 \pm 11,38$; cólon: $36,33 \pm 2,67$). Ao passo que pentamidina (inibidor de S100 β) diminuiu ($p < 0,05$) os níveis destes metabólitos do óxido nítrico no duodeno, no jejuno e no cólon (duodeno: P0,8: $33,98 \pm 1,29$; P4: $23,06 \pm 1,57$; jejuno: P0,8: $32,21 \pm 1,57$; P4: $32,72 \pm 3,31$; cólon: P0,8: $25,13 \pm 1,61$; P4: $19,53 \pm 1,56$) de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Figura 9 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de NOx no duodeno, no jejuno e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



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

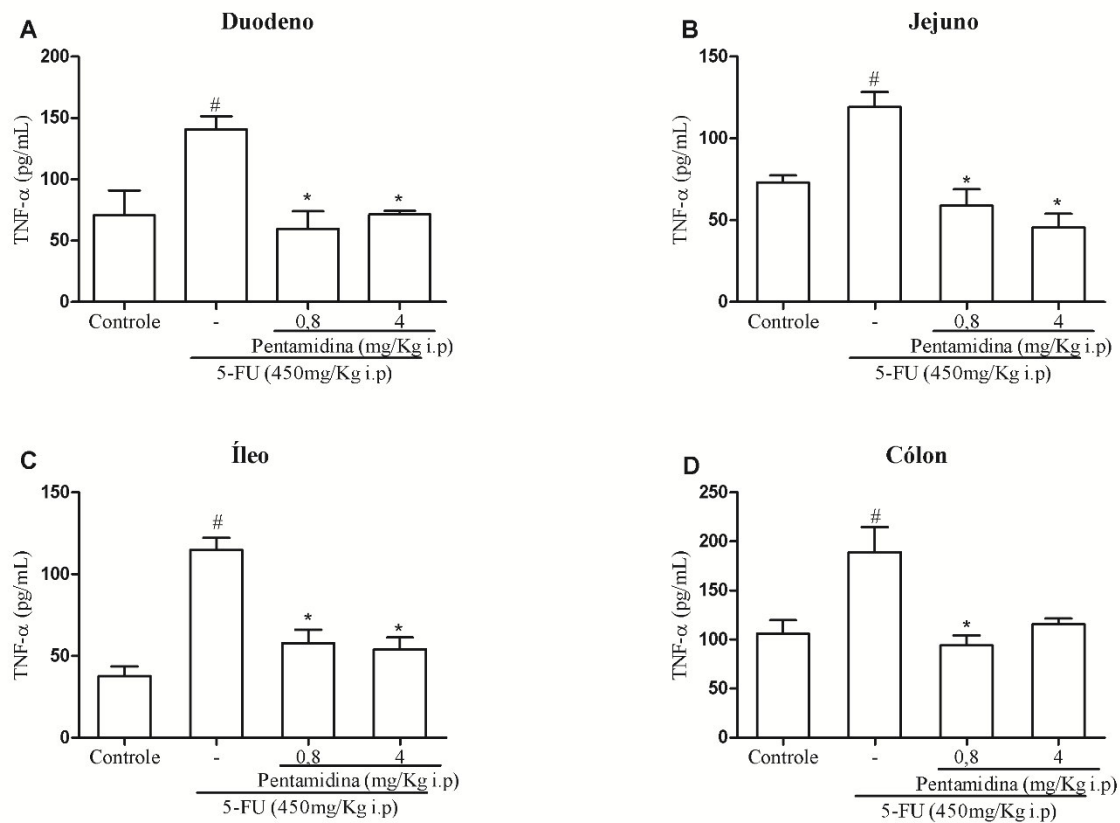
5.5 Verificar o efeito da pentamidina nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) na mucosite induzida por 5-FU.

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

Observando a figura 10, observa-se que 5-FU aumentou ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α no intestino delgado e no cólon (duodeno: $140,80 \pm 10,54$; jejuno: $119,10 \pm 9,27$; íleo: $114,80 \pm 7,51$; cólon: $189,10 \pm 25,57$) quando comparado ao grupo controle (duodeno: $70,80 \pm 20,18$; jejuno: $73,10 \pm 4,20$; íleo: $37,70 \pm 6,02$; cólon: $106,10 \pm 13,57$). Enquanto que pentamidina diminuiu ($p < 0,05$) a síntese dessa citocina pró-inflamatória em todos os segmentos intestinais de animais submetidos à mucosite intestinal experimental (P0,8 - duodeno: $59,80 \pm 14,11$; jejuno: $58,90 \pm 9,92$; íleo: $57,80 \pm 8,29$; cólon: $94,30 \pm 10,01$; e P4 - duodeno: $74,55 \pm 2,78$; jejuno: $45,50 \pm 8,42$; íleo: $53,90 \pm 7,42$; cólon: $115,6 \pm 5,78$).

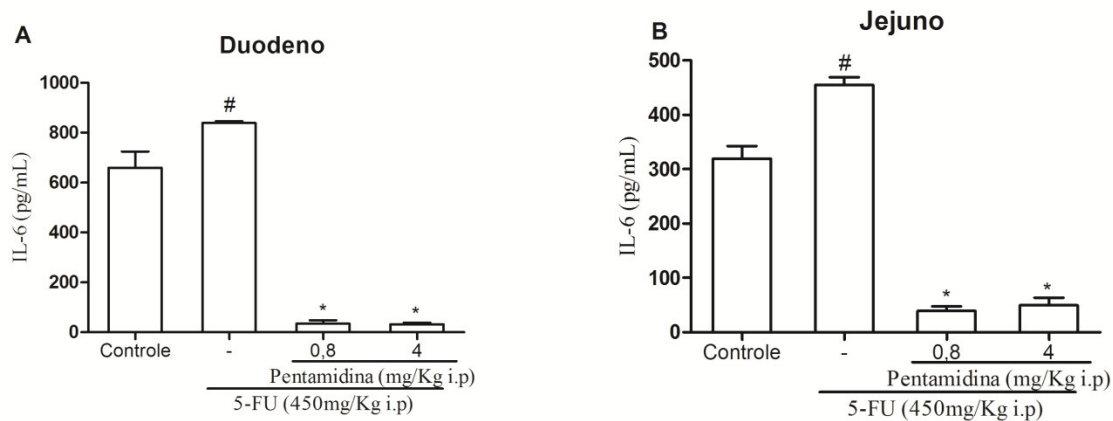
Em relação à IL-6, 5-FU a aumentou ($p < 0,05$) nos segmentos intestinais avaliados (duodeno e jejuno) quando comparado ao grupo controle. Ao passo que pentamidina reverteu ($p < 0,05$) o efeito do 5-FU sobre essa citocina pró-inflamatória no duodeno e jejuno (figura 11).

Figura 10 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de TNF- α no intestino delgado e no cólon de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



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

Figura 11 - Inibidor de S100 β reduz os níveis de IL-6 no duodeno e no jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



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

6 DISCUSSÃO

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

Inicialmente, demonstrou-se, no presente estudo, que 5-FU ocasiona redução das vilosidades com intenso infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal e promove vacuolização de células epiteliais, conforme já observado por estudos anteriores (GAO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2008, 2013; STEIN; VOIGT; JORDAN, 2010; WU *et al.*, 2011).

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

De acordo com a concentração presente no meio extracelular, S100 β pode apresentar efeitos pró-apoptóticos ou pró-sobrevivência em neurônios. Em condições fisiológicas, S100 β é liberado em concentrações nanomolares, favorecendo a sobrevivência de neurônios e estimulando o crescimento dos neuritos, ao passo que em concentrações micromolares ele promove inflamação tecidual e apoptose em células neuronais (VAN ELDIK;

WAINWRIGHT, 2003). Após liberado, o S100 β ativa o receptor RAGE levando a fosforilação MAPK e a ativação de NF κ B, que por sua vez promove, então, a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias e de iNOS (CIRILLO *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2001).

Vale destacar que S100 β tem sido considerada como uma citocina pró-inflamatória devido à sua capacidade de promover inflamação, aumentando a expressão gênica de iNOS, de IL-6 e de TNF- α via S100 β -RAGE-NF κ B (VILLARREAL *et al.*, 2011).

O isotiocianato de pentamidina foi descoberto em 1938, como um fármaco antiprotozoário, e aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de *Pneumocystis carinii* e de outras doenças causadas por protozoários como Leishmaniose (DRAKE *et al.*, 1985; RYBNIKER *et al.*, 2010). Nas pesquisas experimentais, vem sendo utilizado como ferramenta farmacológica para estudar o papel de S100 β em doenças que acometem o SNC, como a doença de Alzheimer (CIRILLO *et al.*, 2015). No intestino, foi utilizado pela primeira vez em modelo de colite experimental induzida por DSS (ESPOSITO *et al.*, 2012). Nesses modelos, a pentamidina é utilizada devido a sua capacidade de se ligar ao S100 β , impedindo a sua interação com o receptor RAGE (CIRILLO *et al.*, 2015).

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

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

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

O S100 β também pode inibir a proliferação de células epiteliais por meio da ativação do receptor RAGE expresso por células epiteliais (TURCO *et al.*, 2012; ZEN *et al.*, 2007). Dessa forma esses dados sugerem que o S100 β pode potencializar o efeito tóxico do 5-FU sobre as células epiteliais intestinais por inibir a sua proliferação. Portanto esses achados sugerem que o S100 β pode estar envolvido na redução do comprimento das vilosidades intestinais promovidas por 5-FU, devido a sua atividade antiproliferativa em células epiteliais intestinais.

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

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

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

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

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

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

Na etapa seguinte, investigou-se se o inibidor de S100 β seria capaz de atenuar o estresse oxidativo. De fato, evidenciou-se neste estudo que o inibidor de S100 β aumentou os níveis de GSH e reduziu a formação de MDA no intestino de animais submetidos à mucosite intestinal. Conforme demonstrado em modelo de colite ulcerativa, pentamidina é capaz de reduzir os níveis de MDA (CIRILLO *et al.*, 2015).

Ao reduzir os níveis de óxido nítrico, S100 β diminuiu a formação de ROS e os danos no intestino, promovendo a redução da utilização de GSH que é um antioxidante fisiológico e formação de MDA, que é um produto da peroxidação lipídica. Em suma, este estudo evidenciou que 5-FU promove a síntese de TNF- α , IL-6 e NO no intestino, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo por intensificar a resposta inflamatória, reduzindo os níveis de GSH e aumentando os de MDA. Em conjunto contribuem para o encurtamento das vilosidades e criptas intestinais, assim como para o recrutamento de células inflamatórias. Enquanto que o inibidor de S100 β (a pentamidine) por reduzir a ativação da via S100 β /RAGE/NF κ B foi capaz de reverter esses efeitos promovidos pelo 5-FU no intestino.

7 CONCLUSÕES

Com base nos achados deste estudo, conclui-se que o S100 β é um importante mediador da patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU, uma vez que a sua inibição atenua a perda de peso e as alterações histológicas induzidas por 5-FU, assim como diminui a inflamação (TNF- α , IL-6 e NO) e o estresse oxidativo (aumenta GSH e diminui MDA).

Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de mais estudos que permitam de fato entender o mecanismo da participação do S100 β na patogênese na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIKHANI, M. *et al.* LPS indirectly stimulates apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 52901–52908, 2003.
- AZEVEDO, O. G. R. *et al.* Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Gastroenterology**, v.1 2, n. 35, p. 1-18, 2012.
- BAMBA, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. **J. Gastroenterol.**, v. 38, p. 548–554, 2003.
- BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains –a master superfamily of interaction molecules. **Semin. Immunol.**, v. 15, p. 215-223, 2003.
- BARKER, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 19-33, 2014.
- BERNARDINI, N. *et al.* Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 318–327, 2012.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Animal models of mucositis: implications for therapy. **J. Support Oncol.**, v. 9, p. 161-168, 2011.
- BROWN, I. A. M. *et al.* Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 2015 (article in press).
- BUCKLEY, M. M. *et al.* Modulation of enteric neurons by interleukin-6 and corticotropin-releasing factor contributes to visceral hypersensitivity and altered colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome. **The Journal of Physiology**, v. 23, n. 592, p. 5235-5250, 2014.
- CHANG, C. T. *et al.* 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- CIRILLO, C. *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209-1218, 2009.
- CIRILLO, C. *et al.* S100 β inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- CIRILLO, C. *et al.* Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n. 9, p. 372-382, 2011.

COSTA, DVS. **Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-fluorouracil**: desregulação de células gliais e de neurônios entéricos. 2016. 155f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza. 2016.

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

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

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

DONATO, R. *et al.* S100 β 's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 1008-1022, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RAO, M. *et al.* Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. **Glia**, v. 63, p. 2040-2057, 2015.

RATTHE, C. *et al.* Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. **Mediators Inflamm.**, v. 2009, 2009.

RENCK, D. *et al.* Human uridine phosphorylase-1 inhibitors: a new approach to ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Invest. New Drugs**, v. 32, p. 1301-1307, 2014.

RYBNIKER, J. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 522-525e, 2010.

RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization. **Cancer research**, v. 14, n. 2, p. 119–123, 1954.

SAVIDGE, T. C. *et al.* Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1344–1358, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron Glia Biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2011.

WANG, J. *et al.* Autocrine and exogenous transforming growth factor beta control cell cycle inhibition through pathways with different sensitivity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40237-40244, 2004.

WANG, J. *et al.* Genetic polymorphisms of RAGE and risk of ulcerative colitis in a chinese population. **Immunol. Lett.**, v. 15, p. 30027-30034, 2015.

WANG, Z. *et al.* RAGE gene three polymorphism with Crohn's disease susceptibility in chinese an population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 9, p. 2397-2402, 2014.

WU, Z. Q. et al. Interleukin receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 87-96, 2011.

WU, Z. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 339-344, 2011b.

XIONG, S. *et al.* Neuronal hypertrophy in acute appendicitis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, n. 10, p. 1429-1433, 2000.

APÊNDICE

Fármacos

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

Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130-5
Kit de citocinas para TNF- α	R&D Systems	DY410
Kit de citocinas para IL-6	R&D Systems	DY406
NADPH	Sigma-Aldrich	N5130
NEED	Sigma-Aldrich	222488
Nitrato redutase	Sigma-Aldrich	N7265
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
Tris Base	Promega	H5135

Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Solução de DTNB	13,2 mg de DTNB

	3,33 mL de metanol Observação: Proteger a solução da luz.
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9