



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

**CAROLINE ADDISON CARVALHO XAVIER DE MEDEIROS**

**ESTUDO DO EFEITO DA ATORVASTATINA NA  
MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL  
EM HAMSTERS**

**FORTALEZA  
2010**

**CAROLINE ADDISON CARVALHO XAVIER DE MEDEIROS**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará – UFC

**FORTALEZA  
2010**

M438e Medeiros, Caroline Addison Carvalho Xavier

Estudo do efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters / Caroline Addison Carvalho Xavier Medeiros. – Fortaleza, 2010.

163 f. : Il.

Orientador: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-CE, 2010

1. Estomatite 2. Fluorouracil 3. Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutase I. Brito, Gerly Anne de Castro (orient.) II. Título

CDD: 616.31

**CAROLINE ADDISON CARVALHO XAVIER DE MEDEIROS**

**ESTUDO DO EFEITO DA ATORVASTATINA NA MUCOSITES ORAL INDUZIDA  
POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS**

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

Aprovada em: 05/11/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gerly Anne de Castro Brito (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Prof. Luiz Eurico Nasciutti  
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Lobo Borges  
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Accioly Pinto Nogueira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

**Ao meu esposo, Martinho**  
**Meu maior incentivador**  
**Pelo seu amor e companheirismo em todas as horas**  
**Paciência e entusiasmo que me fizeram perseverar até o fim**

**Ao meu filho, Tasso**  
**Pelo novo sentido que você deu a minha vida**  
**Pela paz, alegria e amor que me transmite**

**Aos meus pais Addison e Fátima,**  
**as minhas irmãs Maria do Carmo, Sara e Ana Carolina**  
**por vibrarem com as minhas conquistas**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar todos os meus caminhos, por iluminar os meus passos, pela proteção nas inúmeras viagens e por tornar o percurso Mossoró-Fortaleza mais agradável.

À professora Gerly Anne de Castro Brito, meu profundo reconhecimento pela orientação firme e competente. Agradeço pela forma sábia como conduziu o desenvolvimento do presente trabalho, interpretando as minhas dificuldades, necessidades e dando-me as ferramentas para seguir em frente e superar as adversidades. Sou profundamente grata pela confiança em mim depositada e, sobretudo, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À professora Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pelo exemplo profissional e pessoal, pela amizade, gentileza, atenção e disponibilidade em todos os momentos. Sou eternamente grata pelas sugestões e colaboração na elaboração desse trabalho.

Aos professores Ronaldo de Albuquerque Ribeiro e Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza pela convivência e ensinamentos

À professora Mariana Vale pela amizade, atenção, disponibilidade e pelas indispensáveis imunohistoquímicas realizadas nesse trabalho

À professora Nylane Maria Nunes de Alencar pela amizade, pelas contribuições nas análises bioquímicas, por me receber tão bem em seu laboratório e por compor a minha banca examinadora

À professora Nadia Accioly Pinto Nogueira pela importante colaboração no estudo microbiológico e por prontamente aceitar o convite para compor a minha banca examinadora

Ao professor Reinaldo Oriá pela atenção e valiosa contribuição na técnica de Western Blot

À amiga Andressa Aby Faraj Linhares Maciel e ao seu esposo Leonardo Maciel, que inúmeras vezes me receberam tão bem, em sua residência em Fortaleza, Obrigada amiga, você foi uma grande incentivadora para que eu fizese a seleção do doutorado, sem a sua ajuda eu não teria dado os primeiros passos, em busca do meu objetivo.

A todos os professores da Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação nesse curso

À amiga Jozi Godoy pela decisiva colaboração durante os experimentos bioquímicos. Alguém que convivi pouco mais de um ano e aprendi a admirar como pessoa e profissional. Obrigada por dividir comigo não apenas o apartamento, mas também os meus sonhos, medos e alegrias.

Ao amigo Flávio Bitencourt, pessoa extremamente amável, que sempre me transmitiu paz e confiança, e pelas fundamentais análises bioquímicas.

Aos estudantes de iniciação científica, Rafael Macedo, Alana Lira, Daniela Rosa, Carla Antoniana, não tenho palavras para expressar a minha gratidão e reconhecimento. Suas participações foram decisivas, fundamentais e indispensáveis. Vocês foram profissionais dedicados. Obrigada por todas as contribuições, momentos de amizade e descontrações. Meu agradecimento especial.

À estudante de iniciação científica, Mirlayne Olga, pelas indispensáveis análises microbiológicas realizadas nesse trabalho.

À Ana Paula Macedo, Deysi Viviana, Roberto César e Patrícia Lobo amigos prestativos e presentes.

À todos os amigos do LAFICA, especialmente Roberta Dalcico, Denusa, Rosemayre Freire, Larisse Lucite, Pedro Soares, Antoniella Souza, Renata Bessa, Jand-Venes, André Luis e tantos outros, pela convivência agradável e amizade.

À Vandinha, por sua presteza em ajudar e gentileza. Sempre atendendo as minhas necessidades com zelo e dedicação. Obrigada pela sua amizade.

À Ivan, e a Socorro, pela boa vontade e dedicação na confecção das lâminas.

À Aura Rhanes pela convivência, amizade e ajuda nas questões burocráticas

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial ao Haroldo, Seu Bento, Jucier e Chiquinho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Entrega teu caminho ao senhor,  
confia nele e o mais ele fará.

**SI 37:5**

## RESUMO

**Estudo do efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters. Tese submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil. Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros; Orientadora: Dra. Gerly Anne de Castro Brito.**

A mucosite oral (MO) é um efeito colateral freqüente e dose limitante da terapia do câncer, caracterizada por intensa reação inflamatória na mucosa e formação de úlceras na cavidade orofaríngea. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da atorvastatina (ATV), droga utilizada para reduzir os níveis séricos de colesterol e que tem atividade antiinflamatória, na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil (5-FU) em hamsters Golden Sirian. A mucosite oral foi induzida pela administração intraperitoneal (i.p.) de 5-FU no 1º e 2º dias do experimento (60 e 40 mg/kg, respectivamente), com subseqüentes escoriações na mucosa jugal, no quarto dia. Os animais foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com ATV 1, 5 ou 10 mg/kg ou salina ou salina/etanol 5% vol/vol 30 minutos antes de cada injeção do 5-FU e diariamente por 5 ou 10 dias. Os animais foram sacrificados no 5º ou 10º dia e amostras de mucosa jugal e dos principais órgãos vitais foram coletados para análise histopatológica. A determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , nitrito, grupos sulfidrila não proteicos (NP-SH), ensaio da mieloperoxidase (MPO), imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , óxido nítrico sintase induzida (iNOS), NF-kB-p50, NF-kB-p50 NLS (sequência de localização nuclear) e a expressão do NF-kB-p50 por Western Blot foram outros parâmetros avaliados em amostras coletadas da mucosa jugal dos animais. O sangue foi coletado para leucograma, análise dos parâmetros bioquímicos e análise da bacteremia. Atorvastatina nas doses de 1 e 5 mg/kg reduziu o dano na mucosa e a inflamação, bem como os níveis de citocinas, nitrito e a atividade da MPO no 5º e 10º dia da MO. Ademais, atorvastatina 1 e 5 mg/Kg diminuiu a marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , NOSi, NF-kB-p50, NF-kB-p50 NLS, bem como a expressão do NF-kB-p50 na mucosa jugal dos hamsters submetidos a MO, no 5º dia. ATV 1 mg/Kg aumentou os níveis de NP-SH na mucosa jugal dos animais, quando comparado com os grupos 5-FU no 10º dia da MO. A associação de ATV 5 mg/Kg e 5-FU diminuiu a taxa de sobrevivência, amplificou a leucopenia dos animais, aumentou os níveis séricos de transaminases e causou lesão hepática. Nós também detectamos a presença de bacilos Gram negativos no sangue de 100% dos animais tratados com ATV 5mg/Kg + 5-FU. Esses resultados sugerem que a atorvastatina previne o dano na mucosa oral e a inflamação associada com MO induzida por 5-FU, entretanto a combinação de altas doses de ATV com 5-FU induz hepatotoxicidade, amplificação da leucopenia e bacteremia, que merecem atenção e futuros estudos em humanos.

Palavras-chaves: Mucosite oral, 5-fluorouracil, atorvastatina, estatinas

## ABSTRACT

**Study of the effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. Thesis submitted in parcial fulfillment to obtain Doctors Degree in Biological Sciences (Pharmacology) to the Post-Graduate Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil. Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros; Principal guide: Dra. Gerly Anne de Castro Brito.**

Oral mucositis (OM) is a frequent side effect and dose-limiting of cancer therapy, characterized by intense inflammatory mucosal reaction and formation of ulcers in oropharyngeal cavity. The aim of this study was to evaluate the effect of atorvastatin (ATV) – cholesterol lowering drug with anti-inflammatory activity - in oral mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU) in Golden Sirian hamsters. Oral mucositis was induced by intraperitoneal (i.p.) administration of 5-FU in the first and second days of experiment (60 and 40 mg/kg i.p., respectively), with subsequent excoriations of the cheek pouch mucosa on the fourth day. The animals were treated by intraperitoneal route (i.p.) with ATV 1, 5 or 10 mg/kg or saline or saline and 5% vol/vol ethanol 30 min before 5-FU injection and daily for 5 or 10 days. The animals were sacrificed on the 5<sup>th</sup> or 10<sup>th</sup> day and samples of cheek pouches and major vital organs were removed for histopathological analysis. The determination of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , nitrite, non-protein sulfhydryl group (NP-SH) levels, myeloperoxidase (MPO) assay, immunohistochemistry for TNF- $\alpha$ , induced nitric oxide synthase (iNOS), NF-kB-p50, NF-kB-p50 NLS and the expression of NF-kB-p50 by Western Blot were other parameters evaluated in the samples collected from the oral mucosa of animals. Blood was collected for a leukogram, analysis of biochemical parameters and analysis of bacteremia. Atorvastatin at doses of 1 and 5 mg/kg reduced mucosal damage and inflammation, as well as the levels of cytokines, nitrite, and myeloperoxidase activity on the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day of OM. Moreover, ATV 1 and 5 mg/kg decreased the immunohistochemical staining for TNF- $\alpha$ , iNOS, NF-kB-p50, NF-kB-p50 NLS and expression of NF-kB-p50 of the cheek pouch mucosa on the 5<sup>th</sup> day of OM. ATV at 1 mg/kg increased cheek pouch NP-SH when compared to 5-FU groups on the 10<sup>th</sup> day of OM. The association of ATV 5 mg/kg and 5-FU decreased the survival rate, amplified the leukopenia of animals, increased transaminase serum levels and caused liver lesions. We also detected the presence of Gram negative bacillus in the blood of 100% of the animals treated with ATV 5 mg/kg + 5-FU. These results suggest that atorvastatin prevent mucosal damage and inflammation associated with 5-FU-induced OM, but the association of a higher dose of ATV with 5-FU induced hepatotoxicity, amplified leucopenia and bacteremia, which deserves attention and further research in humans.

**Keywords:** oral mucositis, 5-Fluorouracil, atorvastatin, statin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Cinco fases da fisiopatologia da mucosite oral.....	21
Figura 2	Estrutura química da molécula de uracila e 5-fluorouracil.....	29
Figura 3	Biosíntese do colesterol e efeitos das estatinas.....	32
Figura 4	Estrutura química das estatinas disponíveis clinicamente.....	35
Figura 5	Regulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) mediada por estatinas.....	38
Figura 6	Protocolo experimental da avaliação farmacológica e sistêmica dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.....	52
Figura 7	Aspecto macroscópico e microscópico da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosa oral (5° dia).....	68
Figura 8	Aspecto macroscópico e microscópico da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosa oral (10° dia).....	71
Figura 9	Atorvastatina reduziu a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B).....	74
Figura 10	Quantificação dos níveis de nitrito na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B).....	79
Figura 11	Quantificação dos estoques de glutathione (NP-SH) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B).....	81
Figura 12	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral (5° dia).....	84
Figura 13	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NOSi da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral (5° dia).....	86
Figura 14	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF-kB-p50 da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral (5° dia).....	89
Figura 15	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF-kB-p50 NLS da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral (5° dia).....	91

Figura 16	Efeito da atorvastatina na expressão do NF-kB-p50 (MW ~50kDa) na mucosa jugal de hamsters.....	93
Figura 17	O pré-tratamento de hamsters com atorvastatina (ATV 5 e 10 mg/Kg) reduziu a taxa de sobrevida dos animais com mucosite oral.....	95
Figura 18	Efeito da atorvastatina (ATV 5mg/Kg) no histopatológico do fígado de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, durante 5 dias.....	97
Figura 19	Atorvastatina aumentou os níveis séricos das enzimas aspartato amino transferase (AST) (A) e alanina amino transferase (ALT) (B) em animais com mucosite oral.....	98
Figura 20	Atorvastatina amplificou a leucopenia de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e TM.....	101
Figura 21	Atorvastatina amplificou a neutropenia e linfopenia de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e TM.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Terapias disponíveis para a prevenção da mucosite oral.....	25
Tabela 2	Análise macroscópica e microscópica da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral e tratados com atorvastatina durante 5 dias.....	69
Tabela 3	Análise macroscópica e microscópica da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral e tratados com atorvastatina durante 10 dias.....	72
Tabela 4	Níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ (pg/mL) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral, durante 5 dias.....	76
Tabela 5	Níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ (pg/mL) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral, durante 10 dias.....	77
Tabela 6	Efeito da atorvastatina na função renal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	99
Tabela 7	Bacteremia no soro de hamsters submetidos a MO induzida por 5-FU durante cinco dias e identificação do microorganismo.....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ m	micrômetro
ATV	Atorvastatina
5-FU	Fluorouracil
Anova	Análise de variância
DAB	3,3`diaminobenzidina-peróxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
epm	Erro padrão da média
FPP	Farnesilpirofosfato
FdUMP	5-fluoro-2'-desoxiuridina
FUTP	Trifosfato de 5-fluorouridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodesoxiuridina
G	Gramma
G-CSF	Fator estimulador de crescimento de granulócitos
GGPP	Geranylgeranylpirofosfato
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos/ macrófagos
GTP	Guanosina trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
H&E	Hematoxilina e eosina
HMG-CoA	Hidroxi-metilglutaril coenzima A
ICAM	Molécula de adesão intercelular
I $\kappa$ B	Proteína inibitória do NF $\kappa$ B
IL-	Interleucina
INF-	Interferon
Ip	Via intra-peritoneal
Kg	Kilograma
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LFA-1	Antígeno funcional leucocitário -1
LPS	Lipopolissacarídeo
MapK	Proteína quinase ativada por mitógenos
M	Molar
MAP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinases
MO	Mucosite oral
MPO	Mieloperoxidase
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade maior de classe II
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NF- $\kappa$ B- NLS	Fator de transcrição nuclear kappa B-sequência de localização nuclear

Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS <sub>e</sub>	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS <sub>i</sub>	Óxido nítrico sintase induzida
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
RNA	Ácido ribonucléico
ROCK	Rho quinases
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TCA	Ácido tricloracético
TGF $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TM	Trauma mecânico
TS	Timidilato sintase
TNF	Fator de necrose tumoral
TTP	Trifosfato de timidina
VCAM	Moléculas de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VSMC	Células do músculo liso vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1</b>	<b>Mucosite Oral – Uma complicações do tratamento do câncer</b> .....	17
1.1.1	Fisiopatologia da mucosite oral.....	20
1.1.2	Tratamento da mucosite oral.....	24
<b>1.2</b>	<b>Agentes antineoplásicos- 5-Fluorouracil</b> .....	28
<b>1.3</b>	<b>Modulação farmacológica- Estatinas</b> .....	30
1.3.1	Efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	35
1.3.2	Reações adversas e interações medicamentosas das estatinas.....	41
<b>1.4</b>	<b>Justificativa</b> .....	46
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	47
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	47
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	47
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3.1</b>	<b>Animais</b> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Drogas, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados</b> .....	48
3.2.1	Soluções para o ensaio da mieloperoxidase.....	49
3.2.2	Reagentes para a dosagem de citocinas.....	49
3.2.3	Soluções para o ensaio da dosagem de nitrito/nitrato.....	49
3.2.4	Soluções para o ensaio da dosagem de glutaciona.....	49
3.2.5	Reagentes para o ensaio de imunohistoquímica.....	50
3.2.6	Anticorpos.....	50
<b>3.3</b>	<b>Mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters</b> .....	50
3.3.1	Modelo experimental.....	50
3.3.2	Grupos experimentais.....	54
3.3.2.1	Grupos controles.....	54
3.3.2.2	Grupos tratados com atorvastatina.....	55
<b>3.4</b>	<b>Parâmetros avaliados para o estudo da modulação farmacológica com atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b> .....	56

3.4.1	Análise macroscópica das mucosas jugais.....	56
3.4.2	Análise histopatológica das mucosas jugais.....	57
3.4.3	Dosagem da mieloperoxidase.....	58
3.4.4	Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ).....	59
3.4.5	Dosagem de Nitrito.....	59
3.4.6	Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)	60
3.4.7	Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , NOSi, NF-kB-p50 e NF-kB-p50 NLS.....	61
3.4.8	Avaliação da expressão de NF-kB p50 por western Blot.....	62
<b>3.5</b>	<b>Parâmetros sistêmicos avaliados para o estudo da atorvastatina em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.....</b>	<b>63</b>
3.5.1	Avaliação da sobrevida.....	63
3.5.2	Análise histopatológica do fígado, pulmão, coração e rim.....	63
3.5.3	Leucograma.....	63
3.5.4	Parâmetros Bioquímicos.....	64
3.5.5	Bacteremia.....	64
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>64</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Modulação farmacológica na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.....</b>	<b>65</b>
4.1.1	Efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU – Análise Macroscópica.....	65
4.1.2	Efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU – Análise Microscópica.....	66
4.1.3	Efeito da atorvastatina sobre a atividade da mieloperoxidase na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	73
4.1.4	Efeito da atorvastatina sobre a dosagem de citocinas IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	75
4.1.5	Efeito da atorvastatina sobre os níveis de nitrito na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	78

4.1.6	Efeito da atorvastatina sobre os níveis de glutatona na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	80
4.1.7	Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	82
4.1.8	Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para NOSi na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	82
4.1.9	Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para NF-kB-p50 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.....	87
4.1.10	Efeito da atorvastatina na expressão do NF-kB-p50 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental - Western Blot.....	92
<b>4.2</b>	<b>Efeito da atorvastatina nas mudanças sistêmicas em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.....</b>	<b>94</b>
4.2.1	Efeito da atorvastatina na taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral.....	94
4.2.2	Efeito da atorvastatina na análise histopatológica do fígado, rim, coração e pulmão dos hamsters submetidos à mucosite oral.....	96
4.2.3	Efeito da atorvastatina nas dosagens bioquímicas de hamsters submetidos à mucosite oral.....	96
4.2.4	Efeito da atorvastatina no leucograma de hamsters submetidos à mucosite oral.....	100
4.2.5	Efeito da atorvastatina na bacteremia de hamsters submetidos à mucosite oral.....	103
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>147</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Mucosite Oral – Uma complicação do tratamento do câncer**

A quimioterapia e radioterapia são altamente eficazes no tratamento de muitas formas de cânceres, mas possuem uma significativa toxicidade dose limitante (JANSMAN *et al.*, 2001; SONIS, 1998). A terapia do câncer é direcionada para as células neoplásicas, entretanto as células progenitoras saudáveis de vários tecidos do corpo podem ser afetadas, resultando em disfunção (PARIS *et al.*, 2001). O epitélio do trato digestivo é, em particular, muito susceptível a essas terapias, uma vez que as células deste tecido proliferam com rapidez. Inflamação grave, lesão, ulceração e sangramento na boca, no esôfago e no intestino são efeitos colaterais decorrentes do uso dessas terapias (ALVAREZ *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 1998).

A cavidade oral é um sítio comum para a mucosite e várias outras complicações. Mucosite descreve uma síndrome caracterizada por ulceração da mucosa do trato digestivo, resultando em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (SONIS; FEY, 2002; SONIS *et al.*, 2004a; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). As complicações orais mais associadas com a terapia do câncer incluem estomatite, sangramento, dor, xerostomia e mucosite (LALLA; PETERSON, 2005; SONIS *et al.*, 2004-a). O termo mucosite oral (MO) surgiu em 1980 e representa a forma mais comum de complicação oral, decorrente da terapia antineoplásica não-cirúrgica. Caracteriza-se como uma inflamação aguda na cavidade oral e é considerada como uma entidade distinta das estomatites devido a sua transitoriedade, particularidades clínicas, severidade e formas de tratamentos (SONIS *et al.*, 2004-a).

Em torno de 500.000 pacientes por ano, em todo o mundo, sofrem de alguma complicação oral decorrente da terapia do câncer (DUNCAN; GRANT, 2003). A mucosite oral é a maior complicação não hematológica associada com a toxicidade da quimioterapia e /ou radioterapia (BITRAN *et al.*, 1996; PATRONE *et al.*, 1995). A incidência dessa reação adversa depende das características do paciente, bem como das variáveis relacionadas com o tipo de tratamento utilizado. Para os pacientes submetidos à quimioterapia convencional para o tratamento dos

tumores sólidos, a porcentagem de mucosite oral é em torno de 40% (ELTING *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2006). Observa-se nos pacientes transplantados com células hematopoiéticas que receberam altas doses de quimioterapia ou radioterapia, uma porcentagem ainda maior, em torno de 75-80 % (VERA-LLONCH *et al.*, 2007). A ocorrência de mucosite chega a atingir 99% dos pacientes, particularmente nos casos em que se associa irradiação e quimioterapia (BLIJLEVENS *et al.*, 2000; DONNELLY *et al.*, 1992). A incidência de MO, para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia, é em torno de 80 % (TROTTI *et al.*, 2003).

A manifestação primária da mucosite oral é uma mudança na coloração da mucosa, tornando-se esbranquiçada devido à insuficiente descamação de ceratina. A seguir, ocorre perda desta camada com a substituição por mucosa atrófica, que é caracterizada por edema e eritema. Em geral, essas alterações são seguidas por ulceração no tecido afetado. As úlceras, na grande maioria, são recobertas por uma pseudomembrana fibrinopurulenta, amarelada e destacável. Dor, queimação e desconforto podem se intensificar durante a alimentação e pelos procedimentos de higiene oral (LALLA; PETERSON, 2005; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008).

As lesões induzidas por quimioterapia acometem geralmente áreas não queratinizadas, incluindo porção lateral e ventral da língua, mucosa bucal, palato mole, raramente afetando o dorso da língua, o palato duro e a gengiva. As lesões decorrentes da radiação são limitadas no campo onde a radiação incide e freqüentemente também afetam áreas não queratinizadas (EPSTEIN *et al.*, 2000). A cicatrização das lesões ocorrem cerca de 2 a 4 semanas após a última dose da terapia estomatotóxica (LALLA; PETERSON, 2005; TREISTER; SONIS, 2007).

A etiologia da mucosite está associada a dois mecanismos distintos: a toxicidade direta sobre as células do epitélio basal devido à terapia do câncer e a toxicidade indireta resultante da mielossupressão que predispõe a invasão bacteriana e fúngica (SONIS; FEY, 2002). A mucosa oral apresenta uma cinética de alta taxa de renovação celular. Dessa forma, a perda freqüente de células da superfície epitelial, devido a traumas mecânicos, é compensada através de uma contínua proliferação das células da camada basal. A quimioterapia e/ou

radioterapia reduz a renovação celular e causam morte celular por interferir no crescimento e nos mecanismos de diferenciação (PARULEKAR *et al.*, 1998).

O desequilíbrio entre a proliferação e a perda celular resulta em um epitélio com menor espessura, atrofia muscular, úlceras localizadas ou difusas e inflamação (TURHAL *et al.*, 2000). A quimioterapia não altera apenas a integridade da mucosa, interfere também com a flora microbiana da boca, com a quantidade de saliva e compromete a funcionalidade da barreira da mucosa oral. Esses fatores, em conjunto, contribuem para a mortalidade e morbidade de pacientes com câncer e imunossuprimidos (CHAN *et al.*, 2003).

Dentre os fatores diretamente relacionados ao aparecimento da MO, pode-se citar: o tipo de agente quimioterápico empregado, a dose e o esquema terapêutico. A gravidade das lesões é diretamente afetada pelo tipo e dose do quimioterápico utilizado. Os antimetabólitos, como o metotrexato e o 5-fluorouracil estão associados com alta incidência e gravidade da mucosite oral (BARASCH; PETERSON, 2003). Outros fatores que contribuem para o risco de mucosite oral referem-se ao paciente, e inclui saúde bucal deficiente, pouca produção salivar, traumas por restaurações ou próteses mal-adaptadas, focos de infecção, idade e até mesmo debilidades sistêmicas podem propiciar o aparecimento e definir a severidade da mucosite (DENHAM; HAUER-JENSEN, 2002; KOSTLER *et al.*, 2001; SONIS; FEY, 2002).

Os efeitos da idade e do sexo na susceptibilidade à mucosite não estão totalmente esclarecidos (BARASCH, PETERSON, 2003; MCCARTHY *et al.*, 1998). Em geral, os jovens e idosos são mais propensos a mucosite. A maior susceptibilidade dos jovens é explicada pela elevada renovação celular na mucosa bucal e também pela maior prevalência de imunossupressão como consequência de doenças hematológicas malignas. Por outro lado, o idoso também apresenta maior predisposição a mucosite devido alterações metabólicas e maior incidência de imunossupressão (MCCARTHY *et al.*, 1998). Outros autores sugerem que as mulheres têm maior risco para mucosite, entretanto esses dados em relação ao sexo são inconclusivos (TSALIC *et al.*, 2003).

A mucosite oral é extremamente debilitante e se associa com infecções que podem causar sepse durante períodos de profunda imunossupressão, principalmente em pacientes neutropênicos. Em geral, pacientes que recebem quimioterapia para tratamento de tumores sólidos ou linfoma, a taxa de infecção durante ciclos com mucosite é duas vezes maior quando comparados com os ciclos de tratamento, sem mucosite (ELTING *et al.*, 2003). Ademais, a maioria dos pacientes submetidos à radioterapia para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço não conseguem se alimentar normalmente por via oral, devido à dor intensa, decorrente da mucosite oral. Dessa forma, há necessidade de alimentação por meio de sondas gástricas, maior tempo de hospitalização e, nos casos mais graves, interrupção temporária ou definitiva do tratamento, o que resulta no aumento dos custos e comprometimento do prognóstico do caso (ELTING *et al.*, 2007; HERRSTEDT *et al.*, 2000; SCULLY *et al.*, 2006; TROTTI *et al.*, 2003).

#### 1.1.1 Fisiopatologia da mucosite oral

A fisiopatologia da mucosite oral é complexa e multifatorial, inclui uma série de eventos biológicos que ocorrem na submucosa e no epitélio (DUNCAN; GRANT, 2003; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006; SONIS, 1998; SONIS; FEY, 2002; SONIS, 2004a; SONIS, 2004b; SONIS *et al.*, 2004b;). Sendo descrita como uma seqüência de eventos interligados (Figura 1), que inclui: iniciação, geração de sinais mensageiros, amplificação, ulceração e cicatrização.

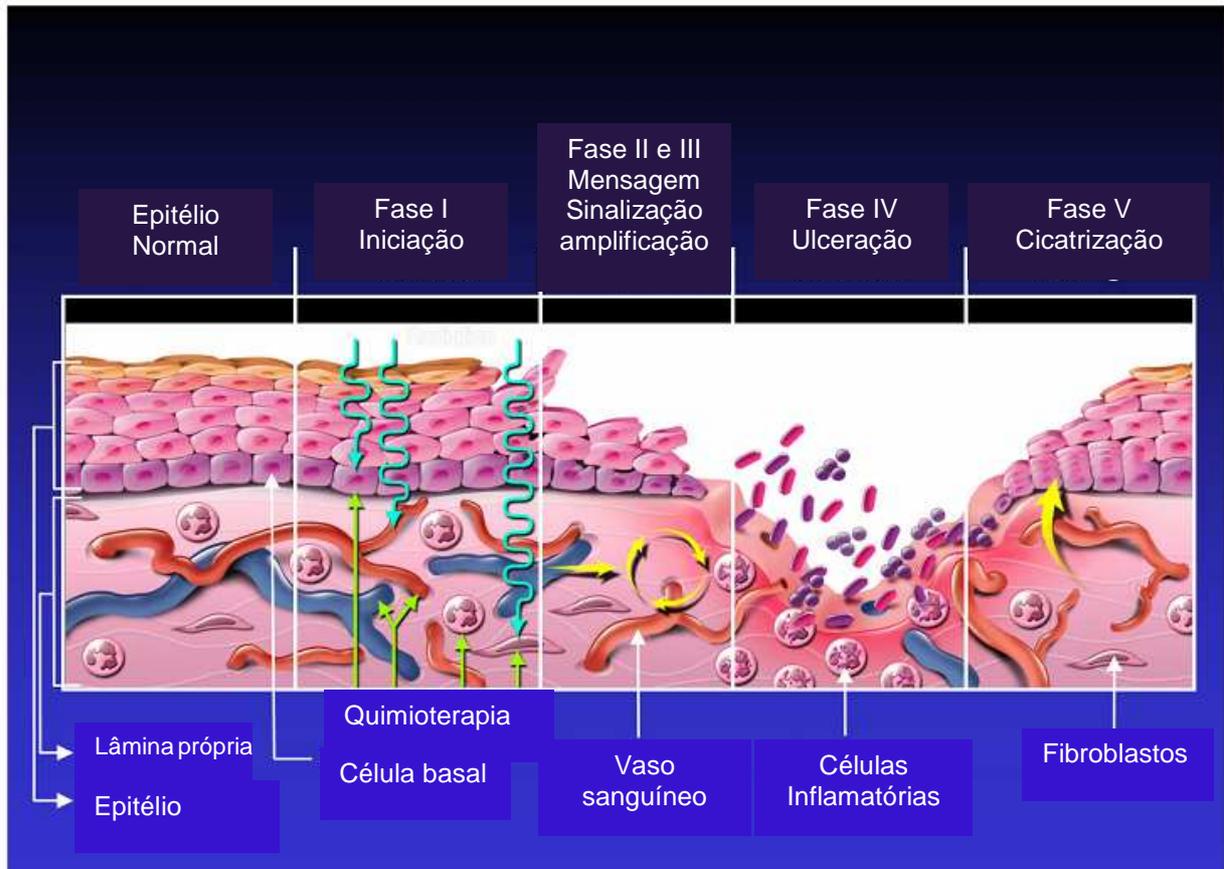


Figura 1. Cinco fases da fisiopatologia da mucosite oral. Adaptado de Sonis *et al.* (2004).

A fase de iniciação caracteriza-se pela ação da radiação e/ou quimioterapia sobre as células do epitélio basal, com conseqüente apoptose e inibição da proliferação celular. Na verdade o evento que melhor caracteriza a primeira fase da MO é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do estresse oxidativo (SONIS *et al.*, 2004). Essas pequenas moléculas reativas causam danos as células, tecidos e vasos sanguíneos. De fato, a produção de espécies reativas de oxigênio acontece após exposição a agentes estomatotóxicos (GATE *et al.*, 1999). Outros autores sugerem que agentes capazes de bloquear, ou remover os radicais livres atenuam a mucosite oral (CULY; SPENCER, 2001). A geração dos radicais tóxicos de oxigênio e sua capacidade de estimular uma série de fatores de transcrição caracteriza a resposta aguda do tecido ao agente quimioterápico e consiste no marco da fase inicial da mucosite, que, segundo Sonis, precede os outros eventos biológicos (SONIS *et al.*, 2004a).

Durante a segunda fase, as espécies reativas de oxigênio (ROS) causam dano ao DNA das células epiteliais que resulta em apoptose. A lesão no DNA das células e as espécies reativas de oxigênio estimulam indiretamente a formação de esfingomielinase e/ou a ativação da via da ceramida, que promovem apoptose (CHMURA *et al.*, 1997; MADDENS *et al.*, 2002;). Vale ressaltar que a fibronectina, liberada pelos danos as células, ativa macrófagos, com subsequente ativação de metaloproteinases que promovem lesão tecidual direta (BAMBA *et al.*, 2003). O evento mais importante dessa fase é a ativação do fator de transcrição NF-κB, que constitui o elemento chave na gênese da mucosite. A resposta primária da maioria dos agentes quimioterápicos e/ou radiação é caracterizada pela ativação do NF-κB. Uma vez ativado, o NF-κB, aumenta a transcrição de genes envolvidos na produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6. Subseqüentemente, essas citocinas promovem ativação da via da ciclooxigenase 2, angiogênese e aumento da transcrição de moléculas de adesão (SONIS *et al.*, 2002).

O NF-κB foi descoberto em 1986 e representa um fator nuclear (NF) que quando ativado por vários agentes inflamatórios, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κB) (SEN; BALTIMORE, 1986). O termo NF-κB autêntico designa a combinação p50/p65(RelA). Outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52 são sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente (HUXFORD *et al.*, 1998).

Normalmente o NF-κB encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, ligado à proteína inibitória, IκB. Esse complexo impede a translocação do NF-κB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do IκB são necessárias para que ocorra a translocação (DELHASE; KARIN, 1999). Uma particularidade importante da mucosite é o fato do NF-κB regular elementos chaves que levam a toxicidade do tecido normal, mais especificamente por promover apoptose. Na verdade, existe um paradoxo entre o efeito pró-apoptótico do NF-κB em células

normais e o potencial anti-apoptótico e citoprotetor que o NF- $\kappa$ B promove nas células tumorais (SONIS, 2002).

A amplificação dos danos a mucosa oral, iniciado pela radiação e/ou quimioterapia, ocorre pela ação de citocinas pró-inflamatórias, que além do impacto direto sobre as células da mucosa, desempenham um papel indireto na amplificação da mucosite oral. Por exemplo, o TNF- $\alpha$  é capaz de ativar uma série de caminhos que levam a lesão tecidual, incluindo a via da ceramida e as caspases e a transcrição mediada pelo NF- $\kappa$ B. Na verdade, uma série de “feedbacks” positivos aumentam o dano tecidual e ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Estes processos resultam no aumento da produção de mais citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  ativam metaloproteinases, levando a injúria direta no tecido, conforme descrito previamente (LIMA *et al.*, 2005; REDDING, 2005; SONIS *et al.*, 2004a).

Além disso, existem evidências do envolvimento do óxido nítrico na patogenia da mucosite oral. Recentemente, um estudo realizado no nosso laboratório demonstrou que os inibidores seletivo da NOSi, aminoguanidina e 1400W, preveniram a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters (LEITÃO *et al.*, 2007). A participação do NO na mucosite oral induzida por radiação também foi sugerida por Sonis *et al.*, através da detecção da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), envolvida na síntese de óxido nítrico (NO), através de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), em tecido de mucosa jugal de hamsters (SONIS *et al.*, 2002).

A ulceração da mucosa oral usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente e representa a fase mais significativa. A fase ulcerativa normalmente é dolorosa e compromete a nutrição e a qualidade de vida do paciente, bem como aumenta o risco para o paciente desenvolver infecção local e sistêmica. A injúria e apoptose das células epiteliais basais resultam em perda da integridade do epitélio. Observa-se um intenso infiltrado de células inflamatórias, notadamente polimorfonucleares. Adicionalmente, nessa fase é comum infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos (REDDING, 2005; SONIS *et al.*, 2004a).

Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria microbiota oral, como bactérias oportunistas Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*), microrganismos Gram-positivos (*Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis* e *Staphylococcus*), além de fungos como a *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*, como *kruseitropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *aspergillus*. Infecções virais também ocorrem principalmente herpes simples, citomegalovírus e varicela zoster (EPSTEIN; WONG, 1994; FELD, 1997; MCCARTHY; SKILLINGS, 1992; WINGARD *et al.*, 1991). De fato, os produtos destes microrganismos como componentes da parede celular de bactérias penetram na submucosa e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, amplificando a inflamação.

Finalmente, inicia-se a fase de cicatrização da mucosa oral, onde componentes da matrix extracelular estimulam a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. A microbiota oral é estabelecida e a contagem de leucócitos retorna a valores normais. Entretanto as mudanças no tecido epitelial, secundárias ao tratamento quimioterápico, permanecem. Essas mudanças representam fatores de riscos para o posterior desenvolvimento de mucosite oral, no curso da terapia do câncer (HERRSTEDT, 2000).

### 1.1.2 Tratamento da mucosite oral

O tratamento da mucosite oral é necessário para melhorar a condição nutricional, a hidratação e a qualidade de vida dos pacientes afetados. Além disso, a prevenção e controle são fundamentais para o prognóstico oncológico, evitando a redução das doses dos quimioterápicos, ou até mesmo a interrupção temporária ou definitiva do tratamento (REDDING, 2005).

Uma grande variedade de tratamentos foi estudada, entretanto os dados são conflitantes porque os parâmetros para avaliar a severidade da mucosite são bastante variáveis e a falta de padronização limita a interpretação dos dados. A Tabela 1 ilustra de forma resumida, as principais terapias estudadas para prevenção e tratamento da mucosite oral. Não existe consenso a respeito do tratamento ou prevenção, em geral, a terapêutica disponível é de suporte e/ou essencialmente

paliativo, envolvendo instruções que variam de higiene oral, suporte nutricional e principalmente direcionamento para remissão da dor e prevenção da infecção (SONIS *et al.*, 2004a).

Tabela 1. Terapias disponíveis para a prevenção da mucosite oral. Adaptado de Redding (2005).

---

Terapias para mucosite oral
1-Higiene oral
2-Prevenção das infecções
a) Antibióticos, Antifúngicos, Antivirais
b) Clorexidina
3-Agentes Antiinflamatórios
a) Misoprostol, dinoprostona, benzidamina, prednisona
4-Inibidores de espécies reativas de oxigênio
a) Amifostina, N-acetilcisteína
5- Modificadores da função salivar
a) Propantelina, pilocarpina
6- Crioterapia
7- Glutamina
8-Laser terapia
9- Bioaderentes (sucralfato)
10- Fatores de crescimento
a) Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF)
b) Fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ 3)
c) Fator de crescimento dos queratinócitos humanos-1 (palifermina)

---

A observação de que os microorganismos que colonizam as lesões orais exacerbam a severidade da mucosite oral sugere que a descontaminação oral e uma boa higiene oral podem reduzir a mucosite oral. A higiene oral é fundamental para evitar possíveis fontes de infecções, bem como para prevenir complicações mais graves como a osteoradionecrose, induzida por radioterapia, bem como o sangramento na mucosa oral, associada com a quimioterapia (RANKIN; JONES; REDDING, 2004).

Os dados sobre a eficácia da higiene oral na redução ou prevenção da mucosite oral são conflitantes. Alguns estudos demonstraram que a higiene oral previne infecções em pacientes submetidos à terapia do câncer, com conseqüente redução da mucosite oral (BOROWSKI *et al.*, 1994; GRAHAM *et al.*, 1993).

Entretanto, outros dados revelam que a higiene oral não traz benefícios para prevenir a MO (KENNY *et al.*, 1990, MCGUIRE *et al.*, 1998). De fato, muitos pesquisadores defendem que a higiene oral é benéfica durante a terapia do câncer, mas o efeito sobre a mucosite oral necessita de novas investigações.

A descontaminação oral reduz a infecção na cavidade oral causada por patógenos oportunistas e secundariamente, diminui os riscos para infecção sistêmica provocada por patógenos oportunistas ou residentes na cavidade oral (YONEDA *et al.*, 2007). Dessa forma a prevenção das infecções com o uso de antibióticos, antivirais e antifúngicos está bem estabelecida (BARASCH *et al.*, 2006; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2006). O uso de anti-sépticos como a clorexidina no controle da mucosite oral é controverso, alguns autores defendem o efeito protetor da clorexidina na mucosite induzida por radioterapia (FERRETTI *et al.*, 1988; SAMARANAYAKE *et al.*, 1988), entretanto, outros dados mostraram que a clorexidina é pouco eficiente (DODD *et al.*, 1996; EPSTEIN *et al.*, 1992).

Agentes que reduzem a inflamação são utilizados, em algumas situações na tentativa de reduzir a mucosite oral (LALLA *et al.*, 2006). Os resultados do efeito protetor da prostaglandina E2 (dinoprostona), prostaglandina E1 (misoprostol) ou prednisona, na mucosite oral, não foram significativos (DUENAS-GONZALEZ *et al.*, 1996; LEBORGNE *et al.*, 1998). A benzidamina, antiinflamatório não esteróide que inibe a síntese de TNF- $\alpha$ , mostrou efeito benéfico na mucosite oral (EPSTEIN *et al.*, 2001; PETERSON; LEVEQUE, 2001).

Outras abordagens são investigadas com sucesso, como por exemplo, o uso da glutamina, laser terapia de baixa intensidade e crioterapia. O efeito protetor da glutamina pode ser explicado pela redução da produção de citocinas proinflamatórias (COEFFIER *et al.*, 2002; PETERSON; JONES; PETIT, 2007) e também por aumentar a síntese de componentes cicatrizantes como colágeno (BELLON *et al.*, 1987). Recentemente, um estudo realizado no nosso laboratório sugeriu que a glutamina e seu derivado alanil-glutamina aceleraram a recuperação da mucosite oral induzida por 5FU em hamsters, reduzindo a inflamação e promovendo reepitelização (LEITÃO *et al.*, 2008).

Em relação a laser terapia, vários resultados mostram que o laser de baixa intensidade reduz a severidade da MO, entretanto o mecanismo não está esclarecido (BARASCH *et al.*, 1995; BENSADOUN *et al.*, 1999; SCHUBERT *et al.*, 2007). Acredita-se que o laser reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias e/ou diminui os níveis das espécies reativas de oxigênio. A crioterapia, que consiste no uso do gelo, levando ao resfriamento da mucosa e, conseqüente vasoconstricção, é de grande valia para tratamentos com drogas anti-neoplásicas de meia-vida curta. Estudos demonstram que o uso de gelo, cinco minutos antes da aplicação de 5-FU em bolus, e mantido na boca por 30 minutos, reduz a mucosite oral em torno de 50% (CASCINU *et al.*, 1994; MAHOOD *et al.*, 1991; ROCKE *et al.*, 1993).

O sintoma primário da mucosite oral é a dor e o controle da dor é um componente crítico no manejo da mucosite oral. Muitos centros usam solução salina, gelo ou lidocaína a 2% para bochecho. A lidocaína pode ser associada com difenidramina para fornecer alívio a curto prazo (LALLA *et al.*, 2008). Em alguns casos, em pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, necessita-se do uso de analgésicos sistêmicos para o alívio satisfatório da dor, incluindo opióides como morfina. Outros agentes sem propriedades anestésicas estão disponíveis, como os compostos bioaderentes, onde o mais estudado é o sulcrafato. Os compostos bioaderentes formam uma camada protetora sobre a mucosa ulcerada, entretanto os resultados da eficácia são inconsistentes (DODD *et al.*, 2003; NOTTAGE *et al.*, 2003).

Outras abordagens preventivas e terapêuticas são descritas, entretanto muitas não apresentam resultados conclusivos, como o uso de antioxidantes (amifostina e N-acetilcisteína) e dos agentes que aumentam a secreção salivar como propantelina e pilocarpina. Estudos demonstraram que a propantelina foi capaz de reduzir a mucosite oral associada ao uso de etoposida (AHMED *et al.*, 1993), e à combinação de etoposida, ifosfamida e carboplatina (OBLON *et al.*, 1997). Da mesma forma, o uso de pilocarpina na prevenção da mucosite oral tem-se mostrado benéfico em alguns estudos (AWIDI *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 1993), enquanto, que em outros trabalhos, não foi constatado efeito (LOCKHART *et al.*, 2005; SCARANTINO *et al.*, 2006).

Conforme relatamos anteriormente, a redução da capacidade proliferativa das células epiteliais na mucosa oral desempenha um papel na patogênese da mucosite. Assim, vários fatores de crescimento são investigados para o manejo da mucosite, com o objetivo primário de aumentar a proliferação das células epiteliais. O fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) apresentou resultados benéficos em vários estudos clínicos, reduzindo a severidade e duração da mucosite oral relacionada ao uso de vários agentes quimioterápicos (CHI *et al.*, 1995; CRAWFORD; O'ROURKE, 1994; GABRILOVE *et al.*, 1998; IBRAHIM; MULHIM, 1997; ROSSO *et al.*, 1997), constituindo um importante agente terapêutico, juntamente com o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ 3) (SPIJKERVET; SONIS, 1998). Atualmente, o fator de crescimento dos queratinócitos humanos-1 (palifermina) mostrou eficácia na mucosite em pacientes com doenças hematológicas malignas e também representa uma terapia promissora (SPIELBERGER *et al.*, 2004).

## **1.2 Agentes antineoplásicos- 5-Fluorouracil**

A maioria dos agentes antineoplásicos, principalmente os descobertos nas primeiras duas décadas da quimioterapia do câncer (1950 a 1970), interagem com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético ou causando lesão irreparável do DNA. Nos últimos anos, a descoberta de novos agentes ocorreu a partir de produtos naturais e estendeu-se para novos campos de investigação. Os agentes quimioterápicos podem ser classificados como: agentes alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, hormônios e seus antagonistas e outros compostos relacionados (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A toxicidade dos agentes efetivos em lesar o DNA é maior durante a fase S ou de síntese do DNA do ciclo celular, enquanto, outros agentes, como os alcalóides da vinca e os taxanos, bloqueiam a formação do fuso mitótico funcional na fase M. Assim, as neoplasias humanas mais sensíveis ao tratamento quimioterápico são aquelas que exibem uma elevada porcentagem de células em processo de divisão. De forma semelhante, os tecidos normais que proliferam rapidamente, como medula óssea, folículos pilosos e epitélio do trato digestivo, estão sujeitos a lesão (KAUFMA; CHABNER, 2001).

Os antimetabólitos abrangem um grupo de fármacos que inibem a função do DNA e do RNA de diversas maneiras. O 5-fluorouracil (5-FU) é um dos representantes dessa classe, amplamente utilizado no tratamento de carcinomas metastáticos de cólon, carcinomas do trato gastrintestinal superior, de mama e adenocarcinomas de cabeça e pescoço (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; RUSTUM *et al.*, 1997). Esse agente é uma pirimidina halogenada que imita bioquimicamente a uracila, pois possui estrutura química semelhante a esta base nitrogenada, diferindo em um átomo de flúor na posição 5 (Figura 2).

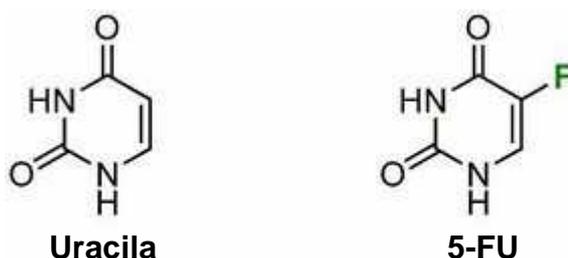


Figura 2. Estrutura química da molécula de uracila e 5-fluorouracil (5-FU). Adaptado Grem (2001).

O 5-fluorouracil requer conversão enzimática em nucleotídeos (ribosilação e fosforilação) para exercer atividade citotóxica. O monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), um dos metabólitos do 5-FU, interage com a enzima timidilato sintase (TS), e agindo como falso substrato, bloqueia a síntese de trifosfato de timidina (TTP), um constituinte necessário do DNA. O FdUMP juntamente com o co-fator folato formam um complexo ternário de ligação covalente com a TS. Enquanto o complexo fisiológico de TS-folato-dUMP progride para a síntese de timidilato através da transferência do grupo metileno e de dois átomos de hidrogênio do folato para o dUMP, essa reação é bloqueada no complexo inibido TS-FdUMP folato pela estabilidade da ligação de flúor-carbono no FdUMP, em conseqüência ocorre inibição persistente da enzima. A conseqüência é a inibição da síntese de DNA, e, conseqüentemente, do crescimento celular (McCARTHY *et al.* 1998).

O bloqueio da enzima timidilato sintase constitui o principal mecanismo de citotoxicidade do 5-fluorouracil. Adicionalmente, o 5-FU possui outros mecanismos, como a incorporação ao DNA e ao RNA. O trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) se incorpora ao DNA no lugar do TTP, alterando a estabilidade e o reparo (De

ANGELIS *et al.*, 2006; NOORDHUIS *et al.*, 2004). Outro intermediário do metabolismo do 5-FU, o trifosfato de 5-fluorouridina (FUTP), incorpora-se ao RNA, interferindo na síntese e nas funções do RNA (PINEDO; PETERS, 1988; WILKINSON *et al.*, 1975).

Os efeitos adversos do 5-FU variam de acordo com o protocolo de tratamento, dose, e via de administração, e são bem evidentes na medula óssea, e no trato gastrointestinal. Os primeiros sintomas adversos consistem em anorexia e náuseas, seguidos de mucosite e diarreia. Ocorrem ulcerações em toda a mucosa do trato gastrointestinal e vários autores reforçam a incidência de mucosite como efeito colateral do 5-FU (LACAVE *et al.*, 1991; LEVI *et al.*, 1994; MINSKY *et al.*, 1993; OHTSU *et al.*, 1991; PYRHONEN, *et al.*, 1995; ROSSO *et al.*, 1994).

Os principais efeitos tóxicos de esquemas com injeções intravenosas de 5-FU resultam na mielosupressão, principalmente leucopenia, seguida de trombocitopenia e anemia. Verifica-se também alopecia, dermatite, pigmentação aumentada, atrofia da pele e mucosite. Além disso, pode ocorrer a síndrome de mão-pé, caracterizada por eritema, descamação, dor e sensibilidade das palmas das mãos e plantas dos pés ao toque e raramente neurotoxicidade (PIRZADA; ALI; DAFER, 2000).

### **1.3 Modulação farmacológica- Estatinas**

As estatinas são um grupo de substâncias que inibem de forma competitiva a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-coA) redutase, com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese do colesterol (GRUNDY, 1988; SINENSKY *et al.*, 1990). Atualmente representam os agentes hipolipidêmicos mais usados, devido à eficácia em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo e a excelente tolerabilidade e segurança (MARON; FAZIO; LINTON, 2000).

O colesterol é sintetizado em uma variedade de tecidos, entretanto a maior produção ocorre no fígado, no intestino, no córtex adrenal e nos tecidos reprodutores (GLEW *et al.*, 1998). A biossíntese do colesterol no organismo é

realizada, inicialmente, pela associação de três moléculas de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) para formação de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A conversão seguinte de HMG-CoA em ácido mevalônico é catalisada pela enzima HMG-CoA redutase e representa a etapa mais importante de controle da síntese de colesterol no organismo (Figura 3) (VOET; VOET; PRATT, 2000).

O colesterol, sintetizado ou derivado da dieta, representa o principal esteróide humano e é componente de, praticamente, todas as membranas plasmáticas e intracelulares (RANJAN, 2009). O colesterol da dieta é transportado do intestino pelos quilomícrons. O fígado e os tecidos periféricos podem sintetizar esse esteróide ou obtê-lo a partir das lipoproteínas circulantes (VOET; VOET; PRATT, 2000).

A circulação do colesterol pelo corpo ocorre por meio de lipoproteínas. Os ésteres de colesterol são inicialmente empacotados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e, então, entram na circulação sanguínea. A VLDL, secretada pelo fígado é convertida em lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs) e, em seguida, LDLs (lipoproteínas de baixa densidade). O colesterol é transportado de volta ao fígado para a excreção pela lipoproteína de alta densidade (HDL). O fígado expressa um grande número de receptores de LDL e remove cerca de 75% da toda a LDL do plasma. Dessa forma, a remoção da LDL da circulação, mediada por receptores LDL, possui uma função importante na manutenção dos níveis de colesterol (VOET; VOET; PRATT, 2000).

As estatinas exercem seu efeito principal, graças a uma porção semelhante ao ácido mevalônico, competindo com a enzima HMG-CoA redutase. Ao reduzir a conversão da HMG-CoA em mevalonato, as estatinas inibem a etapa inicial e limitante na biossíntese do colesterol (Figura 3) (GRUNDY, 1988; SINENSKY *et al.*, 1990). Como resultado da inibição da síntese do colesterol hepático, observa-se aumento da expressão do gene do receptor de LDL, mediado pela ativação proteolítica das proteínas de ligação de elementos reguladores de esterol (SREBP) (BROWN; GOLDSTEIN, 1999).

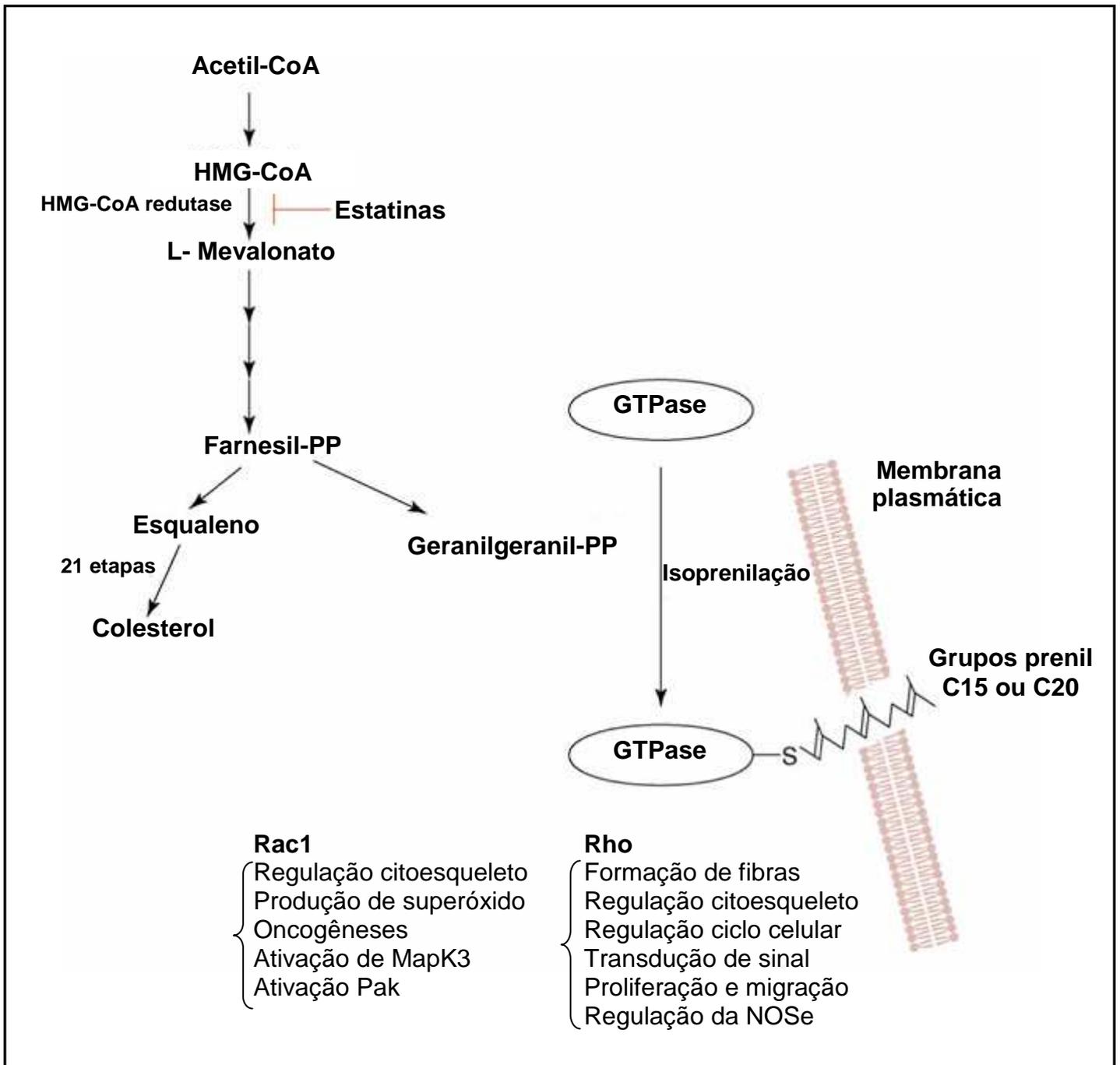


Figura 3. Biosíntese do colesterol e efeitos das estatinas.

As estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase, com conseqüente redução na síntese do colesterol e na isoprenilação de pequenas proteínas GTPase. A isoprenilação de proteínas GTPase modula várias funções celulares. NOSe, Óxido nítrico sintase endotelial; HMG-CoA, 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A; MapK3, proteína quinase ativada por mitógenos; Pak, quinase p21. Adaptado de Wang; Liu; Liao (2008).

Dessa forma, a diminuição de colesterol plasmático é acompanhada pela redução dos níveis de LDL. O aumento de atividade dos receptores de LDL hepático é um dos fatores mais importantes para regular os níveis de LDL plasmático. Por esta razão os inibidores de HMG-CoA redutase possuem dupla ação, diminuem a biossíntese de colesterol e causam aumento do número de receptores LDL hepático, com conseqüente remoção de IDL e LDL circulantes (MALHOTRA; GOA, 2001).

Atualmente, dados da literatura mostram que as estatinas não interferem apenas com o LDL-colesterol, também conduzem o aumento de HDL-colesterol e diminuem os níveis de triglicerídeos (BAKRI *et al.*, 2003; WIERZBICKI *et al.*, 2002). Esses estudos sugerem que quanto maior a atividade das estatinas para diminuir o LDL-colesterol, maior é o efeito sobre os níveis de triglicerídeos. De forma geral, as estatinas causam redução dos níveis de triglicerídeos, mas este efeito parece ser observado apenas em pacientes hipertrigliceridêmicos.

Adicionalmente, a inibição da enzima HMG-CoA redutase mediada por estatinas, inibe a síntese de compostos isoprenóides como farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP) (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Esses intermediários servem como importantes acessórios lipídicos para a modificação pós-translacional de proteínas intracelulares, como Ras, Rho, Rac e Rap (Figura 3) (VAN AELST; D'SOUZA-SCHOREY, 1997). Assim, é possível que além da redução do colesterol, a inibição das proteínas intracelulares dependentes dos isoprenóides promove alguns efeitos biológicos das estatinas, independentes da síntese do colesterol, conhecido como efeitos pleiotrópicos (KWAK *et al.*, 2000; NOBES; MARSH, 2000).

As estatinas foram inicialmente isoladas e identificadas como metabólitos de fungos. Em 1976 foi descoberto o primeiro inibidor da HMG-CoA redutase, a mevastatina, que representa a primeira estatina descrita, originalmente isolada como produto metabólico de culturas *Penicillium citrinium* (ENDO; KURODA; TANZAWA, 1976). Posteriormente a lovastatina foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* com estrutura semelhante à mevastatina (ALBERTS, 1988; ALBERTS *et al.*, 1980). Em 1987 a lovastatina foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico. A introdução de novos compostos ocorreu com a sinvastatina e a

pravastatina, consideradas estatinas semi-sintéticas modificadas a partir da lovastatina (HOFFMAN *et al.*, 1986). Fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina são totalmente sintéticas (MARON; FAZIO; LINTON, 2000).

No momento, seis estatinas são empregadas clinicamente: lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), sinvastatina (Zocor), e fluvastatina (Lescol), primeiro agente totalmente sintético, derivado de mevalonolactona produzido na forma racêmica. A nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, é representada por atorvastatina (Lipitor) e rosuvastatina (Crestor) (Figura 4) (JONES *et al.*, 2003; PASTERNAK *et al.*, 2002).

A lovastatina e a sinvastatina são pró-fármacos de lactona e necessitam de modificação enzimática no fígado para se tornarem ativas, na forma de hidroxiácidos. As lactonas são menos solúveis em água que as outras estatinas, diferença que parece ter pouca importância clínica. Em geral, as estatinas hidrossolúveis (pravastatina e rosuvastatina) possuem baixa penetração em células não hepáticas e maior seletividade para inibição da HMG-CoA redutase hepática. A pravastatina (ácido na forma ativa), a fluvastatina (sal sódico) e a atorvastatina e rosuvastatina (sais de cálcio) são todas administradas na forma ativa de anel aberto. Após uma dose oral, as concentrações plasmáticas das estatinas atingem um valor máximo em 1 a 4 h. As meias-vidas dos compostos originais são de 1 a 4 h, exceto para atorvastatina e rosuvastatina, que apresentam meias-vidas de cerca de 20 h. As meias-vidas mais longas podem contribuir para maior eficácia na redução do colesterol (SCHACHTER, 2005).

Na presente investigação, nós estudamos a atorvastatina, que desde a sua comercialização, em 1996, demonstrou a melhor avaliação risco-benefício. Comparada com outras estatinas, apresenta eficácia superior, com nível de segurança equivalente (BLACK; BAKKER-ARKEMA; NAWROCKI, 1998). Em 2002, a atorvastatina foi o fármaco mais vendido no mundo (GOOSEN *et al.*, 2007). Atualmente, outras estatinas concorrem por este mercado, como a rosuvastatina (AstraZeneca), aprovada em agosto de 2003 pelo FDA, e a pitavastatina, a mais nova estatina sintética, em estudos pela empresa japonesa Kowa Company (AHMAD; CHENG-LAI, 2010).

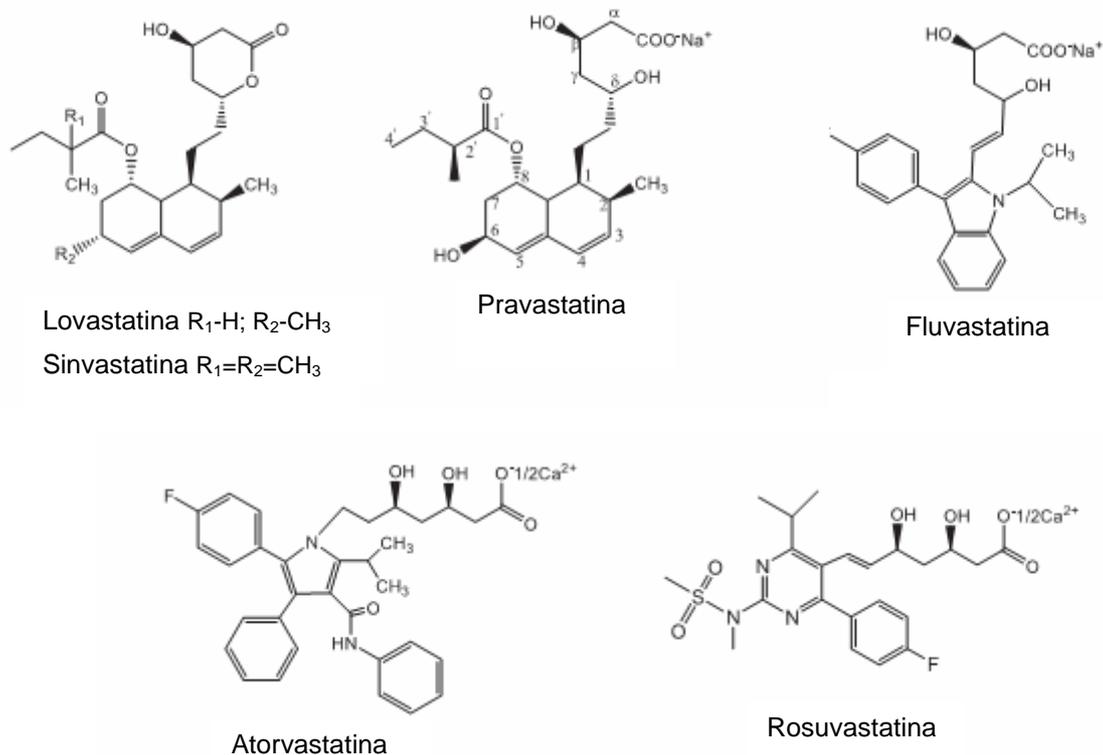


Figura 4. Estrutura química das estatinas disponíveis clinicamente. Adaptado de Mccarey; Sattar; Mcinnes (2005).

### 1.3.1 Efeitos pleiotrópicos das estatinas

Efeitos pleiotrópicos significam, especificamente, funções diferentes para os quais o agente foi desenvolvido, e são relacionados ou não com o mecanismo de ação, variando de indesejáveis ou no caso das estatinas, benéficos (DAVIGNON, 2004).

O mecanismo para explicar os efeitos pleiotrópicos das estatinas é independente da propriedade de regular os níveis de colesterol plasmáticos, mais especificamente, pode ser secundário a inibição dos isoprenóides. Os intermediários isoprenóides são sintetizados a partir do caminho do mevalonato e, servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular (GOLDSTEIN; BROWN, 1990).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas mais estudados incluem ação reguladora na função endotelial, diminuição da proliferação das células do músculo liso vascular (VSMC), aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e inflamação, diminuição da resposta trombogênica, e efeitos imunomodulatórios (LAUFS; LIAO, 1998; TAKEMOTO, LIAO, 2001; WANG; LIU; LIAO, 2008).

A influência das estatinas no endotélio é o efeito pleiotrópico mais descrito em pacientes com hipercolesterolemia e aterosclerose, através de caminhos dependentes e independentes do colesterol (LIU *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2005). Como o óxido nítrico é um importante mediador da função endotelial, as estatinas promovem “up regulation” da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) por vários mecanismos (Figura 5). O primeiro mecanismo descrito envolve a sinalização Rho/proteínas quinases serina treonina (ROCKs), com aumento da estabilidade do RNAm da NOSe, mediada através da inibição da isoprenilação da Rho (LAUFS; LIAO, 1998).

O segundo mecanismo envolve o caminho fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)/proteína quinase AKt que regula várias funções celulares como crescimento e proliferação. A ativação do caminho (PI3K)/AKt leva a fosforilação da NOSe e aumento da angiogênese (KUREISHI *et al.*, 2000). No terceiro mecanismo, as estatinas reduzem a quantidade de caveolina-1. A caveolina-1 é uma proteína de membrana que quando ligada a NOSe, inibe a produção de NO, de forma direta (PLENZ; HOFNAGEL; ROBENEK, 2004).

Estudos recentes mostraram que a expressão da NOSe e trombosmodulina, mediada pelas estatinas, é também dependente do fator pulmonar Kruppel (LKLF/KLF2), indicando um mecanismo transcricional para modular a função endotelial (SEN-BANERJEE *et al.*, 2005). Finalmente, as estatinas exercem efeitos benéficos no endotélio, pela mobilização das células progenitoras endoteliais (CPEs) (VASA *et al.*, 2001). A estimulação do caminho PI3K/Akt induz angiogênese, proliferação, migração e sobrevivência das células progenitoras endoteliais circulantes (DIMMELER *et al.*, 2001). Curiosamente, esse efeito é observado apenas com

baixas concentrações de estatinas, enquanto que altas concentrações promovem efeitos anti-angiogênicos (WEIS *et al.*, 2002).

As evidências de que as estatinas reduzem a mortalidade e a incidência de eventos coronarianos despertou o interesse para elucidar os mecanismos de ação das estatinas nas doenças cardiovasculares. De fato esses fármacos modulam o sistema imune e exercem efeitos antiinflamatórios na parede vascular, diminuindo o número de células inflamatórias na placa aterosclerótica (VAUGHAN; GOTTO; BASSON, 2000).

O efeito protetor das estatinas na aterosclerose é, em parte, mediado pela ação imunomoduladora, caracterizada por diminuir a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), da molécula de adesão vascular (VCAM-1) e da selectina E (RASMUSSEN *et al.*, 2001; REZAIE-MAJD *et al.*, 2003). Ademais, as estatinas atenuam a expressão de P selectinas e diminuem a adesão de leucócitos pelo aumento da produção de NO endotelial (SCALIA *et al.*, 2001). Curiosamente, esses efeitos independentes do colesterol foram ausentes em camundongos deficientes para a enzima NOSe, confirmando que a NOSe medeia alguns dos efeitos protetores das estatinas na parede vascular (STALKER; LEFER; SCALIA, 2001).

A aterosclerose é um processo inflamatório complexo, caracterizado por um balanço entre inflamação excessiva e acúmulo de lipídios. Os linfócitos T desempenham um importante papel na aterosclerose. A ativação de linfócitos T e o controle da resposta imune são mediados pelo complexo de histocompatibilidade maior de classe II (MHC-II) e CD40/CD40L (LIBBY, 2002). As estatinas inibem a expressão do MHC-II nas células endoteliais e nos monócitos (KWAK *et al.*, 2000), bem como inibem a expressão de receptores pro-inflamatórios CD40 e do ligante CD40L induzida por interferon gama (MULHAUPT *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2002).

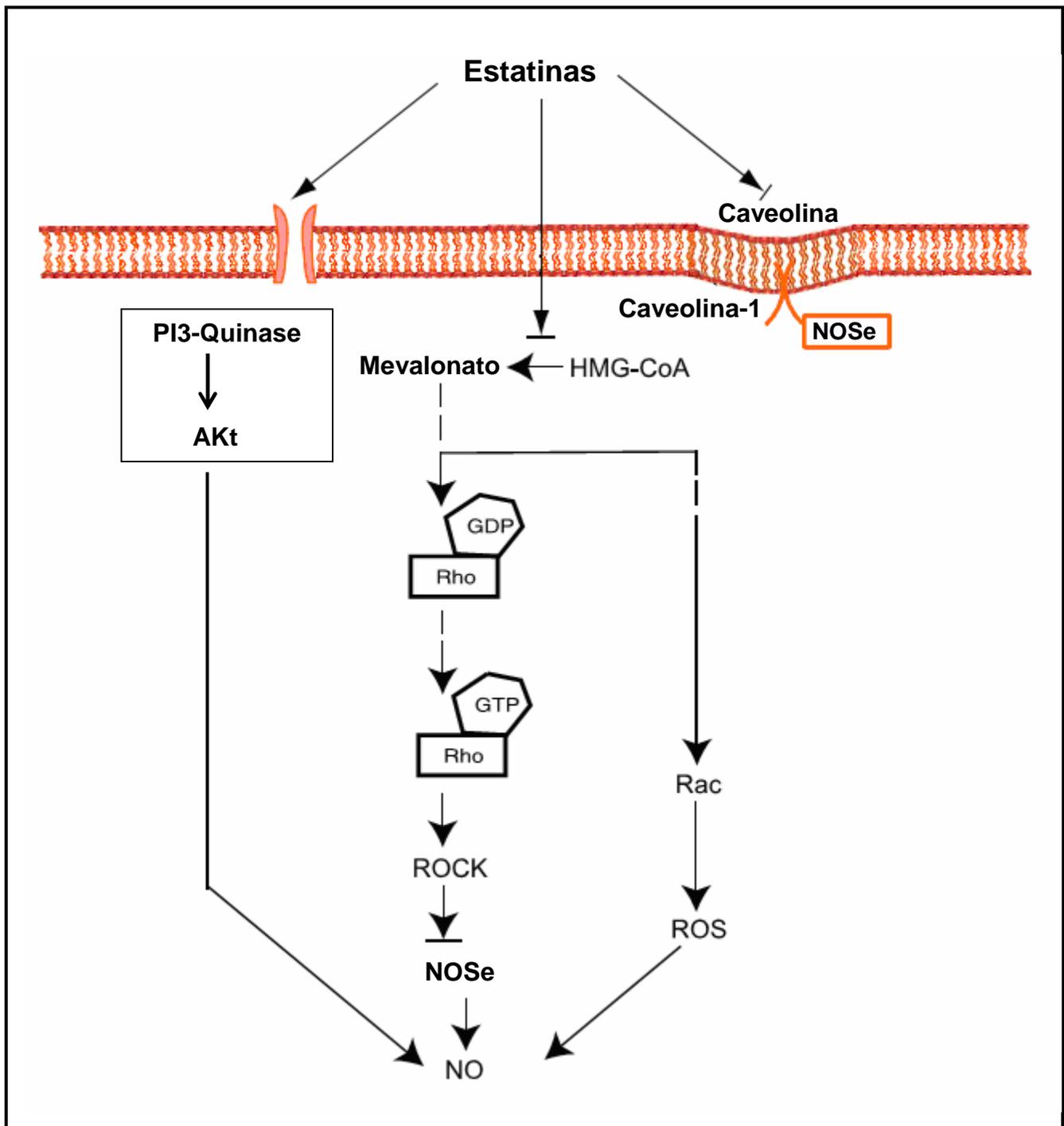


Figura 5. Regulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) mediada por estatinas. Estatinas modulam a expressão da NOSe por três mecanismos: (1) aumenta a estabilidade do RNAm da NOSe através da inibição da isoprenilação da Rho; (2) Aumenta a fosforilação da NOSe por um caminho dependente da PI3K; e (3) aumenta a atividade da NOSe mediada pela redução da quantidade de caveolina-1 disponível. GDP, guanosina difosfato; GTP, guanosina trifosfato; HMG-CoA, 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A; NO, óxido nítrico; PI3K, fosfatidilinositol-3 quinase; ROCK, rho quinases; ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Zhou; Liao (2010).

O sistema CD40/CD40 L é expresso nas células da lesão aterosclerótica e medeia a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), metaloproteínases e fator tecidual (SCHONBECK; LIBBY, 2001). Curiosamente, os inibidores da HMG-CoA redutase também suprimem a resposta inflamatória independente da inibição da HMG-CoA redutase e do caminho Rho/ROCK, por meio de ligação direta ao sítio regulatório do antígeno funcional leucocitário -1 (LFA-1), uma integrina  $\beta$ 2 expressa na superfície dos leucócitos que liga-se ao ICAM-1 e medeia a adesão de linfócitos (WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2004; WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2001).

O mecanismo molecular para explicar os efeitos anti-inflamatórios/imunomodulatórios e antiaterogênicos das estatinas não está completamente elucidado. Entretanto estudos sugerem uma relação entre o caminho da isoprenilação das pequenas proteínas ligadas ao GTP e os efeitos benéficos das estatinas (NOBES; MARSH, 2000; KWAK *et al.*, 2000). Outro mecanismo proposto relaciona-se com o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, as estatinas diminuem a atividade do NF- $\kappa$ B (EGIDO *et al.*, 1999; KWAK *et al.*, 2000; PALINSKI, 2000).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas também podem ser exercidos pela ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). Em macrófagos, as estatinas induzem a transcrição do PPAR- $\gamma$ , com conseqüente inibição da transcrição do TNF- $\alpha$  e da proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1 (MAP-1) induzida por lipopolissacarídeos (LPS) (YANO *et al.*, 2007). Esses dados são reforçados pela demonstração de que as estatinas promovem estabilização na placa aterosclerótica mediada por ativação do PPAR- $\gamma$  e a combinação de sinvastatina com agonistas do PPAR- $\gamma$  reduz a progressão da aterosclerose (CORTI *et al.*, 2004; SUGAMURA *et al.*, 2008).

Adicionalmente, as estatinas interferem com o sistema fibrinolítico no músculo liso vascular e nas células endoteliais (BOURCIER; LIBBY, 2000). Especificamente por aumentar a expressão do ativador de plasminogênio tecidual e inibir a expressão do PAI-1 (inibidor tipo 1 de ativador de plasminogênio tecidual). Assim, as estatinas promovem efeitos antitrombóticos e diminuem os riscos para doenças cardiovasculares (ESSING *et al.*, 1998; MUKAI *et al.*, 2007).

Outros efeitos pleiotrópicos investigados referem-se às ações das estatinas nas neoplasias e no tecido ósseo. Conforme relatamos anteriormente, a inibição da HMG-CoA redutase resulta em alteração na prenilação de pequenas proteínas G como Rho, que regula o ciclo celular e a sobrevivência das células (AZNAR; LACAL, 2001). Assim as estatinas promovem apoptose em várias células tumorais (FROMIGUE *et al.*, 2006; FROMIGUE; HAMIDOUCHE; MARIE, 2008; GRAAF *et al.*, 2004; HORIGUCHI *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2006). Além de afetar a sobrevivência das células, a inativação da Rho pode também inibir a migração e invasão das células tumorais humanas. Um possível mecanismo é que a inativação da proteína Rho diminui a expressão de metaloproteinases, MMP2 (gelatinase A) e MMP9 (gelatinase B), envolvidas na invasão e metástases de vários tipos de cânceres (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002). Estas MMPs regulam os processos de crescimento, migração e degradação da matrix extracelular (STERNLICHT; WERB, 2001).

A ação das estatinas na formação óssea foi inicialmente demonstrada pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP) (ANBINDER *et al.*, 2006; MUNDY *et al.*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000). Alguns autores acreditam que as estatinas, seletivamente direcionadas ao osso, apresentam efeitos benéficos no tratamento da osteoporose e de fraturas (MUNDY *et al.*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000). Algumas investigações sugerem que as estatinas melhoram a densidade óssea e reduz o número de fraturas (CHAN *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2000; EDWARDS; HART; SPECTOR, 2000; MUNDY *et al.*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000). Entretanto, outros estudos contradizem o efeito benéfico das estatinas no tecido ósseo (HSIA; MORSE; LEVIN, 2002; PEDERSEN; KJEKSHUS, 2000; REJNMARK *et al.*, 2002).

Em suma, a grande quantidade de estudos sobre os efeitos pleiotrópicos das estatinas é objeto de intenso interesse, principalmente porque o potencial terapêutico desses fármacos é muito variado, incluindo doenças cardiovasculares (doença coronariana, acidente vascular cerebral isquêmico, reperfusão de isquemia), doença de Alzheimer, osteoporose, esclerose múltipla (CHAN *et al.*, 2000; WOLOZIN *et al.*, 2000; YOUSSEF; STUVE; PATARROYO, 2002) e doenças inflamatórias (BLANCO-COLIO *et al.*, 2003). Entretanto há necessidade de contínua

vigilância porque mesmo as estatinas sendo consideradas relativamente seguras, são também potencialmente prejudiciais (BONETTI *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Reações adversas e interações medicamentosas das estatinas

A ocorrência de reações adversas de significância clínica associada com a terapia de estatinas é rara e apenas 1 ou 4,8% dos pacientes abandonam a terapia (THOMPSON; CLARKSON; KARAS, 2003). As reações adversas mais graves incluem sintomas músculos-esqueléticos, como miopatia e rabdomiólise (JONES *et al.*, 2003) e injúria hepática (GERSHOVIC; LYMAN, 2004). Todas as estatinas estão relacionadas com o efeito adverso de miopatia (JONES *et al.*, 2003; PASTERNAK *et al.*, 2002), que é definida como qualquer doença dos músculos herdada ou adquirida, com sintomas que incluem fraqueza muscular, principalmente nas extremidades. A dor muscular ou fraqueza pode evoluir para rabdomiólise, que é caracterizada por destruição muscular e mioglobínúria (THOMPSON; CLARKSON; KARAS, 2003).

Alguns fatores de riscos contribuem para a ocorrência de miopatia e incluem: idosos com mais de 80 anos, sexo feminino, doenças multisistêmicas, perioperatório, hipotireoidismo e a combinação de fibratos ou ácido nicotínico com estatinas (BALLANTYNE *et al.*, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004; HAMILTON-CRAIG, 2001). Os pacientes que fazem uso apenas de terapia com estatinas apresentam baixa incidência de miopatia, em torno de 0,1 a 0,2 % e rabdomiólise é excessivamente rara (THOMPSON *et al.*, 1997). No entanto, a incidência de miopatia aumenta para 1 ou 7%, para os pacientes que fazem uso de vários medicamentos ou apresentam algum dos fatores de riscos relacionados com o aparecimento dessa reação adversa (BALLANTYNE *et al.*, 2003; UCAR; MJORNDAL; DAHLQVIST, 2000). A incidência de alterações musculares aumenta quando as estatinas são co-administradas com medicamentos que elevam a sua concentração plasmática, como por exemplo, genfibrozil, niacina, eritromicina, itraconazol, ciclosporina e diltiazem (LEE; MADDIX, 2001).

Em 2001, a Bayer retirou a cerivastatina do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal, relacionados a dano severo da musculatura esquelética com alteração das células musculares, liberação de mioglobina e, freqüentemente, acompanhado de problemas renais. A maioria dos casos foi observada em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais associadas ao uso de genfibrosil, fármaco da classe dos fibratos empregados no tratamento das hipertrigliceridemias (GRIFFIN, 2001).

O mecanismo de miopatia associada com estatinas não está totalmente esclarecido. Entretanto, algumas teorias foram propostas para explicar o mecanismo fisiopatológico da lesão músculo-esquelética (PASTERNAK *et al.*, 2002; SINZINGER; WOLFRAM; PESKAR, 2002). Um mecanismo que explica os efeitos adversos das estatinas sobre o músculo envolve a interrupção da síntese de ubiquinona ou coenzima Q10 (CoQ10). A ubiquinona desempenha um papel na produção de energia mediada pela cadeia respiratória mitocondrial, que em parte, é responsável pela produção de energia dos neurônios e do músculo estriado (BACKES; HOWARD, 2003). Como as estatinas inibem a produção do mevalonato, um precursor da CoQ10, a síntese desse composto pode ser inibida (RUNDEK *et al.*, 2004). Outro mecanismo sugerido refere-se à inibição das pequenas proteínas G, como por exemplo a RhoA, que tem a função de controlar a apoptose celular. Dessa forma, a inibição de proteínas regulatórias da apoptose pode promover efeitos adversos no músculo (TOMLINSON; MANGIONE, 2005).

Com relação à injúria hepática, estudos iniciais em animais revelaram que altas doses de estatinas podem causar hepatotoxicidade, entretanto as doses usualmente utilizadas na terapêutica não estão associadas com lesão hepática significativa (HORSMANS; DESAGER; HARVENGT, 1990; MACDONALD *et al.*, 1998). Embora a toxicidade hepática esteja relacionada com o uso de estatinas, a ocorrência de lesões hepáticas irreversíveis, causando mortes ou a necessidade de transplante hepático, é extremamente rara (VUPPALANCHI; CHALASANI, 2006). Alguns estudos indicam que a elevação das transaminases hepáticas na população tratada com estatinas não é significativamente diferente, quando comparada com os pacientes tratados com placebo (COHEN; ANANIA; CHALASANI, 2006; VUPPALANCHI; CHALASANI, 2006). Outros resultados sugerem que a elevação

assintomática das transaminases é comum, mas não necessariamente indica dano hepático (BLACK; BAKKER-ARKEMA; NAWROCKI, 1998; JACOBSON, 2006).

A atorvastatina, selecionada para o presente estudo, é bem tolerada e a maioria dos efeitos adversos envolve o sistema gastrointestinal (MALINOWSKI, 1998). Os efeitos adversos mais comuns para esse medicamento (>2%) incluem constipação, flatulência, dispepsia, dor abdominal e cefaléia (ANDREJAK *et al.*, 2003). Comprometimento do músculo do diafragma (SULEM *et al.*, 2001), miosite (SINZINGER, 2002), tendinopatia (CHAZERAIN *et al.*, 2001), neuropatia periférica (ZIAJKA; WEHMEIER, 1998), oftalmoplegia externa e ataxia (NEGEVESKY *et al.*, 2000), alterações na pele/alopecia (SEGAL, 2002), dermatomiosite (NOËL; CEROTTINI; PANIZZON, 2001), dermografismo (ADCOCK; HORNSBY; JENKINS, 2001), necrólise epidermal tóxica (PFEIFFER; KAZENOFF; ROTHBER, 1998), urticária crônica (ANLIKER; WUTHRICH, 2002) e severa trombocitopenia (GONZALEZ-PONTE, 1998) constituem reações adversas mais raras, ocorre em menos de 2% dos pacientes tratados com atorvastatina.

As reações adversas mais sérias associadas com atorvastatina incluem alterações hepáticas (JIMENEZ-ALONSO *et al.*, 1999; NAKAD *et al.*, 1999) e pancreatite aguda (BELAICHE; LEY; SLAMA, 2000). A hepatotoxicidade é caracterizada com um padrão misto de lesão, geralmente ocorre vários meses após o início da terapia e incluem hepatite aguda (NAKAD *et al.*, 1999) e colestática (JIMENEZ-ALONSO *et al.*, 1999).

O caso de lesão colestática e hepatocelular, descrito na literatura, ocorreu semanas após o início da terapia com ATV e se resolveu dois meses após a descontinuação do medicamento. A histologia do fígado revelou inflamação porta com presença de eosinófilos e áreas com necrose (NAKAD *et al.*, 1999). Os poucos casos de hepatite aguda atribuídos a atorvastatina parecem está associados com fatores de riscos, como por exemplo, a hepatite aguda colestática ocorreu em mulheres jovens com doenças crônicas, como lúpus eritematoso sistêmico (JIMENEZ-ALONSO *et al.*, 1999).

Dois outros casos de hepatite colestática envolvem pacientes com mais de 70 anos (DE CASTRO *et al.*, 2006; GERSHOVIC; LYMAN, 2004). A elevação nos níveis de transaminases, três vezes superior ao limite normal, ocorre em 0,7 % dos pacientes em terapia com ATV (JIMENEZ-ALONSO *et al.*, 1999) e é dose dependente, com característica reversível após a suspensão do fármaco (BLACK; BAKKER-ARKEMA; NAWROCKI, 1998).

Com relação às interações medicamentosas, é importante mencionar que as estatinas inibem seletivamente a enzima HMG-CoA redutase e usualmente não mostram afinidade por outros sistemas enzimáticos ou receptores. Dessa forma, tudo leva a crer que o mecanismo molecular das interações medicamentosas com estatinas envolve um mecanismo farmacocinético. Ademais, todas as interações medicamentosas, com a exceção das idiossincráticas ou reações alérgicas, têm bases farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas (NIES; SPIELBERG, 1996).

A indução ou inibição das isoenzimas CYP450 é uma importante causa de interações medicamentosas (CORSINI *et al.*, 1999). A competição entre medicamentos pelo sistema enzimático é comum e pode representar um dispositivo para alterar as estatinas (LEE; MADDIX, 2001; OMAR; WILSON, 2002). A maioria das estatinas é extensivamente metabolizada pelo sistema microsomal de isoenzimas, citocromo P450 (CYP), com exceção da pravastatina que não é metabolizada em grau apreciável pelo sistema da CYP e é excretada de modo inalterado na urina (THUMMEL; WILKINSON, 1998).

A isoenzima CYP3A4 é responsável pelo metabolismo da lovastatina, sinvastatina e atorvastatina. Fluvastatina é metabolizada primariamente pela isoforma CYP2C9 com pequena participação das isoformas CYP3A4 e CYP2C8 (CORSINI *et al.*, 1999). A rosuvastatina não é intensivamente metabolizada, mas apresenta algumas interações com a enzima CYP2C9 (WHITE, 2002). Estas diferenças farmacocinéticas podem afetar o potencial das estatinas em promover interações com outros fármacos. Pravastatina e rosuvastatina têm menos tendência a causar interações medicamentosas (CORSINI *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2002).

Atorvastatina inibe o metabolismo de poucos substratos, como o etinilestradiol que se liga ao citocromo CYP3A4 30 vezes menos que a atorvastatina lactona (THUMMEL; WILKINSON, 1998). É interessante assinalar que a atorvastatina reduz os efeitos antiplaquetários do clopidogrel. O metabolismo desse antiagregante plaquetário é inibido pela atorvastatina *in vivo*, com conseqüente redução da conversão do clopidogrel para a forma farmacologicamente ativa. Essa interação é explicada porque o clopidogrel está em baixas concentrações e tem menos afinidade pela CYP3A4 que a atorvastatina lactona (LAU; WASKELL; WATKINS, 2003).

Outros fármacos que interferem com as estatinas são aqueles potentes inibidores da CYP3A4 e apresentam grande afinidade pela CYP3A4, incluindo itraconazol, ciclosporina, inibidores de protease, eritromicina, bloqueadores dos canais de cálcio. Essas interações aumentam a concentração de atorvastatina ácida e aumenta o risco de mialgia e rabdomiólise (HORSMANS, 1999). Entretanto, os indutores do citocromo P450 podem diminuir os níveis plasmáticos das estatinas. Dados sugerem que o antidiabético tiazolidinediona e a rifampicina diminuem a concentração plasmática da sinvastatina (KYRKLUND, 2000). A fenitoina, outro indutor da CYP3A4, pode diminuir a eficácia da atorvastatina e da sinvastatina (MURPHY; DOMINICZAK, 1999).

## 1.4 Justificativa

A mucosite oral é um efeito colateral debilitante e representa a maior complicação não hematológica associada com a toxicidade da quimioterapia e/ou radioterapia (BITRAN *et al.*, 1996; PATRONE *et al.*, 1995). A incidência é elevada e varia de 10% a 40% para os pacientes em uso de agentes quimioterápicos convencionais no tratamento de tumores sólidos (ELTING *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2006), 97% para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço que receberam radioterapia convencional (uma dose/dia, 5 dias/semana, durante 5-7 semanas), 100% para os pacientes que recebem radioterapia fracionada (duas ou mais doses/dia) e ocorre em 89% dos pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia antes de transplante de células hematopoiéticas (TROTTI *et al.*, 2003). A mucosite oral caracteriza-se pela presença de lesões ulcerativas e dolorosas, resultando em conseqüências importantes como o comprometimento na comunicação e alimentação do paciente, maior risco para infecções oportunistas, diminuição na qualidade de vida, limitando, ou nos casos mais severos, provocando a interrupção da terapia do câncer (LALLA; PETERSON, 2005; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008).

O tratamento da mucosite oral é de suporte e/ou essencialmente paliativo, não existe um protocolo de atendimento preventivo e eficaz. A terapêutica disponível envolve instruções que variam de higiene oral, suporte nutricional e principalmente direcionamento para remissão da dor e prevenção da infecção (SONIS *et al.*, 2004a). A falta de um protocolo de tratamento eficaz provavelmente é explicada pela fisiopatologia complexa, onde muitos mediadores estão envolvidos, havendo necessidade da compreensão de outros mecanismos. Entretanto, sabe-se que determinados mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são importantes na sua patogenia (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005; SCULLY *et al.*, 1990), assim como, está bem definido a ocorrência de estresse oxidativo no desenvolvimento dessa condição inflamatória (SONIS *et al.*, 2004).

O efeito das estatinas na mucosite oral induzida por quimioterápico não havia sido descrito na literatura, até a publicação dos resultados do presente trabalho (MEDEIROS *et al.*, 2010). Assim, nos propusemos a estudar o efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters, tendo em vista os inúmeros trabalhos publicados que ressaltam os efeitos pleiotrópicos antiinflamatórios e o potencial terapêutico desses agentes (AKTAS *et al.*, 2003; BARSANTE *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2000; LEUNG *et al.*, 2003; LIAO; LAUFS, 2005; MURPHY *et al.*, 2001; PAHAN *et al.*, 1997; ROMANO *et al.*, 2000; SANTODOMINGO- GARZÓN *et al.*, 2006; TAKEMOTO; LIAO, 2001; WAGNER *et al.*, 2002; WAGNER; SCHWABE; HECKER, 2002; WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2001; YOUSSEF, STUVE, PATARROYO, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito da atorvastatina no modelo experimental de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters *Golden Sirian*.

### **2.2 Objetivos específicos**

Investigar o efeito da modulação farmacológica com atorvastatina na lesão da mucosa oral induzida por 5-FU, através do estudo de vários parâmetros inflamatórios e oxidativos.

Analisar o efeito sistêmico da atorvastatina em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados hamstres machos *Golden sirian (Mesocricetus auratus)*, com massa corpórea entre 150 a 200 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 hamstres 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 (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC para uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado por este comitê (processo nº 016/07). Os hamstres 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)

#### **3.2 Drogas, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados**

- 5-Fluorouracil: ampola de 10 mL (25 mg/mL) – Fluoro-Uracil® (Roche, Rio de Janeiro, Brasil). O 5-Fluorouracil (5-FU) foi diluído em solução salina 0,9%;
- Atorvastatina: comprimidos de 10 e 40 mg (Pfizer, Inc., Guarulhos, SP, Brasil). A atorvastatina foi diluída em solução salina/etanol 5% (vol/vol) (LAUFS *et al.*, 2000);
- Álcool etílico PA (Reagen);
- Álcool etílico 5% (Reagen);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Tribromoetanol 2,5 % (Reagen)

- Formaldeído 40% (Reagen);
- Éter etílico (Merck)
- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merck);
- Xilol
- Solução salina 0,9 % (estéril e apirogênica)
- Solução de Turk
- Solução tamponada com fosfato (PBS)

### 3.2.1 Soluções para o ensaio da mieloperoxidase

- Tampão fosfato de potássio
- Tampão brometo de hexadecil trimetilamônio (HTAB)
- Peróxido de hidrogênio 1 %
- Solução de O-dianisidina

### 3.2.2 Reagentes para a dosagem de citocinas

Kit Duo Set R&D Systems, catálogo DY 999

### 3.2.3 Soluções para o ensaio da dosagem de nitrito/nitrato

- Solução de ácido fosfórico a 5%
- Solução de sulfanilamida 2% em  $H_3PO_4$  5%
- Solução de N-1naftil-etilenodiamino 0,1%-NEED

### 3.2.4 Soluções para o ensaio da dosagem de glutatona

- Solução de EDTA 0,02M
- Solução de ácido tricloracético 50% (TCA)
- Tampão TRIS 0,4M pH 8,9
- Solução de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01 M

### 3.2.5 Reagentes para o ensaio de imunohistoquímica

- Tampão citrato 0,1 M (pH 6,0)
- Complexo ABC (Kit Santa Cruz Biothechnology)
- Solução de peróxido de hidrogênio a 3%
- Solução PBS/BSA 5%
- Solução DAB/peróxido (Kit Santa Cruz Biothechnology)

### 3.2.6 Anticorpos

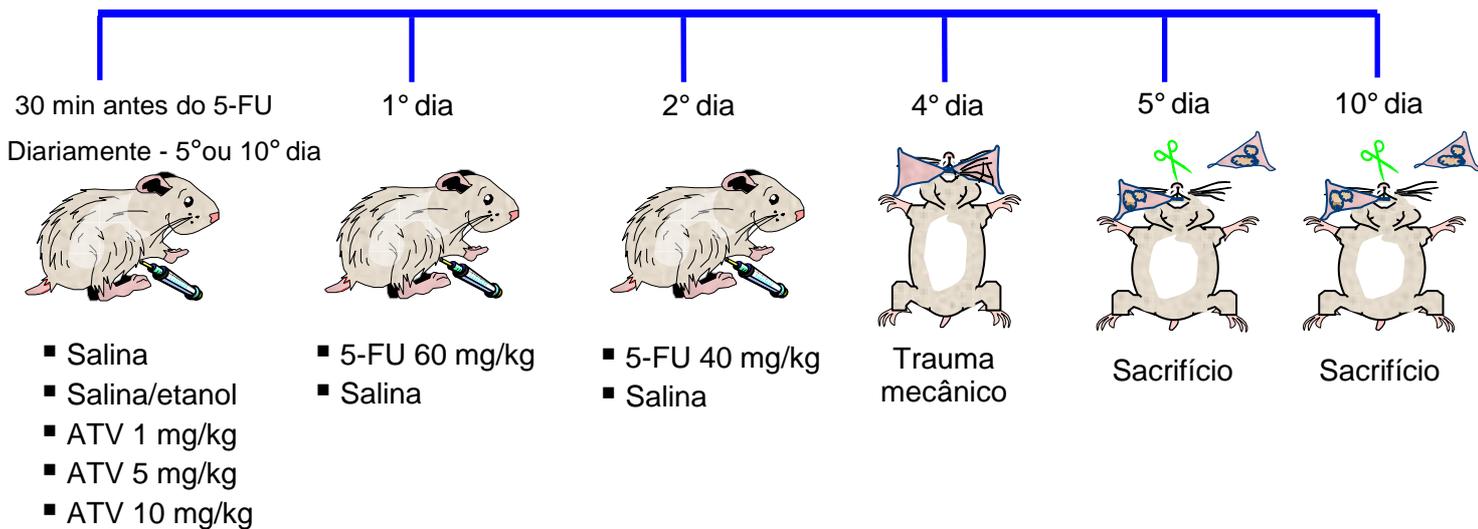
- Anticorpo primário de coelho anti-NOSi (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo primário de coelho anti-TNF- $\alpha$  (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo policlonal de coelho anti-p50 NF-kB (H-119: sc-7178 Santa Cruz Biothechnology), diluição 1:200.
- Anticorpo primário de coelho anti-NLS (sequência de localização nuclear) p50 NF-kB (sc-114 Santa Cruz Biothechnology), diluição 1:200.

## 3.3 Mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters

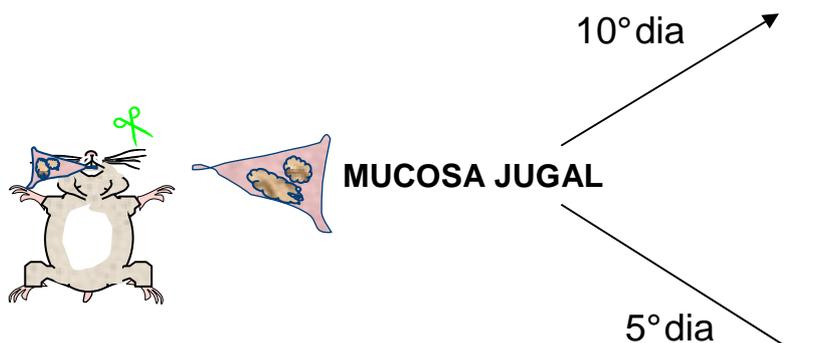
### 3.3.1 Modelo experimental

Utilizou-se o modelo de mucosite oral experimental, desenvolvido por Sonis e colaboradores (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 pela administração de 5-fluorouracil (5-FU) no 1º e 2º dia do experimento (60 e 40 mg/kg, i.p., respectivamente). No 4º dia, após anestesia com tribromoetanol 2,5% (250 mg/kg, i.p.), as mucosas jugais dos animais foram escoriadas mecanicamente, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, a fim de reproduzir os sinais clínicos da irritação crônica e como fator potenciador para a mucosite, ou seja, conferindo um trauma mecânico (TM).

As ranhuras foram distribuídas em número de três no sentido horizontal e cruzadas por mais três, em ambas as faces das mucosas (Figura 6). Os animais foram sacrificados, após anestesia com tribromoetanol 2,5% (250 mg/kg, i.p.), no 5º ou 10º dia do modelo experimental. Um estudo previamente realizado no LAFICA (LIMA *et al.*, 2005), demonstrou que a mucosite oral começa no 5º dia, sendo a inflamação máxima no 10º. Por isso escolhemos estes dois dias para sacrificar os animais.



**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA**



Análise macroscópica  
Histopatológico  
Dosagem de MPO  
Dosagem de nitrito  
Dosagem de glutatona  
Dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )

Análise macroscópica  
Histopatológico  
Dosagem de MPO  
Dosagem de nitrito  
Dosagem de glutatona  
Dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )  
Imunohistoquímica (TNF- $\alpha$ , iNOS, NF-kB-p50)  
Western Blot – NF-kB-p50

**AVALIAÇÃO SISTÊMICA**



5° dia



5° dia

Leucograma  
Dosagens bioquímicas (soro)  
Hemocultura

Histopatológico fígado  
Histopatológico rim  
Histopatológico coração  
Histopatológico pulmão

Figura 6: Protocolo experimental da avaliação farmacológica e sistêmica dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-fluorouracil nos dias 1 e 2. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potenciador para a mucosite, distribuídas em número de três no sentido horizontal e cruzadas por mais três, em ambas as faces das mucosas. Os animais foram sacrificados no 5º ou 10º dia do modelo experimental. As mucosas jugais foram fotografadas, removidas, divididas em partes iguais para posterior estudo da modulação farmacológica com atorvastatina. No 5º dia do modelo experimental, realizou-se estudo da avaliação sistêmica, a partir da coleta de sangue dos animais e análise histopatológica dos principais órgãos vitais.

### 3.3.2 Grupos experimentais

Foram utilizados cento e noventa e dois hamsters durante o decorrer desse estudo, sendo cento e dez nos experimentos para avaliar a modulação farmacológica da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil e oitenta e dois para o estudo dos efeitos da atorvastatina nas mudanças sistêmicas em hamsters submetidos à mucosite oral.

#### 3.3.2.1 Grupos controles

Os grupos controles foram constituídos, cada um deles, por, no mínimo, seis hamsters e foram distribuídos da seguinte forma:

► Animais não submetidos à mucosite oral experimental (**Grupo Normal**).

Esse grupo recebeu injeções de solução salina/etanol 5% (veículo utilizado para diluir a atorvastatina), administradas por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes de cada injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina (para substituir o 5-FU) e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do modelo experimental.

► Animais submetidos apenas as escoriações nas mucosas jugais (trauma mecânico) no 4º dia de experimento (**Grupo TM**).

Os hamsters foram submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal no 4º dia e receberam solução salina 0,9% (em substituição ao 5-FU), por via intraperitoneal (i.p.) no 1º e 2º dia do experimento. Os animais foram tratados com solução salina-etanol 5%, 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do experimento

► Animais submetidos à mucosite oral experimental, que receberam 5-FU e foram submetidos ao trauma mecânico nas mucosas jugais no 4º dia (**Grupo 5-FU/Salina ou 5-FU/salina-etanol 5%**).

Os animais receberam 5-FU (60 e 40 mg/kg; i.p.) no 1º e 2º dia do modelo experimental e foram submetidos ao trauma mecânico na mucosa jugal, no 4º dia. Receberam ainda, administração de solução salina 0,9%, por via intraperitoneal (i.p.), (grupo 5-FU/salina) ou, o mesmo veículo utilizado na diluição da atorvastatina, solução salina-etanol 5% (grupo 5-FU/Salina-etanol) 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do experimento.

► Animais não submetidos à mucosite oral que foram tratados com atorvastatina na dose de 5 mg/Kg (ATV 5) e receberam escoriações nas mucosas jugais (trauma mecânico) no 4º dia do experimento (**Grupo Salina/ATV 5**).

Os hamsters foram submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal no 4º dia e receberam solução salina 0,9% (em substituição ao 5-FU), por via intraperitoneal (i.p.) no 1º e 2º dia do experimento. Os animais foram tratados com atorvastatina na dose de 5 mg/Kg, 30 minutos antes de cada injeção de salina e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do experimento.

### 3.3.2.2 Grupos tratados com atorvastatina

Os animais, seis em cada grupo, foram divididos em três grupos experimentais:

► Animais submetidos à mucosite oral experimental, tratados com atorvastatina na dose de 1 mg/Kg (**Grupo 5-FU/ATV 1**)

Hamsters receberam 5-FU (60 e 40 mg/kg; i.p.) no 1º e 2º dia do modelo experimental e foram submetidos ao trauma mecânico na mucosa jugal, no 4º dia. Atorvastatina 1 mg/Kg foi administrada, por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do experimento.

► Animais submetidos à mucosite oral experimental, tratados com atorvastatina na dose de 5 mg/Kg (**Grupo 5-FU/ATV 5**)

Hamsters receberam 5-FU (60 e 40 mg/kg; i.p.) no 1º e 2º dia do modelo experimental e foram submetidos ao trauma mecânico na mucosa jugal, no 4º dia. Atorvastatina 5 mg/Kg foi administrada, por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 5º ou 10º dia do experimento.

► Animais submetidos à mucosite oral experimental, tratados com atorvastatina na dose de 10 mg/Kg (**Grupo 5-FU/ATV 10**)

Hamsters receberam 5-FU (60 e 40 mg/kg; i.p.) no 1º e 2º dia do modelo experimental e foram submetidos ao trauma mecânico na mucosa jugal, no 4º dia. Atorvastatina 10 mg/Kg foi administrada, por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 10º dia do experimento.

### **3.4 Parâmetros avaliados para o estudo da modulação farmacológica com atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

#### **3.4.1 Análise macroscópica das mucosas jugais**

Os animais foram sacrificados no 5º ou 10º dia do modelo experimental e suas mucosas jugais foram fotografadas para a análise macroscópica. 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:

- *Score 0*: mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação.
- *Score 1*: presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa

- *Score 2*: eritema severo, vasodilatação e erosão superficial
- *Score 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
- *Score 4*: formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da bolsa
- *Score 5*: virtualmente completa ulceração da mucosa da bolsa. Impossibilidade de exposição da mucosa.

#### 3.4.2 Análise histopatológica das mucosas jugais

A análise histopatológica das mucosas jugais foi realizada em cortes seriados de 4 µm de espessura, ao microscópio óptico (x 40). No 5º ou 10º dia do modelo experimental, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas. As mucosas jugais foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, e em seguida as amostras foram incluídas em parafina, seguindo-se coloração pela hematoxilina-eosina (H&E). A análise microscópica foi realizada, 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:

- *Score 0*: epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Score 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.

### 3.4.3 Dosagem da mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, é utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, cuja presença foi determinada pelo método colorimétrico, usando um leitor de placa. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas a partir das mucosas jugais dos hamsters, usando uma versão modificada do método descrito por Bradley e colaboradores (BRADLEY *et al.*, 1982). No 5º ou 10º dia do experimento, os animais foram sacrificados e suas mucosas foram removidas, pesadas e congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. Durante o ensaio, as amostras foram incubadas em solução de HTAB 0.5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por mL. Em seguida, foram homogeneizadas (politron-13000 rpm) e centrifugadas (1500g/15min./4°C), sob condições adequadas de refrigeração. Os sobrenadantes foram transferidos para *eppendorfs* e novamente centrifugados (10 minutos) para a melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7 µL do sobrenadante, em duplicata (placas de 96 wells), adicionou-se 200 µL da solução de leitura (5 mg de O-dianisidina; 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, 3 mL de NaPO<sub>4</sub> buffer; 27 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destilada). A absorbância foi medida a 460 nm em dois tempos diferentes ( $t_0=0$  min. e  $t_1= 1$  min.). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO).

#### 3.4.4 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ )

Após o sacrifício dos animais no 5º ou 10º dia do modelo experimental, as mucosas jugais foram coletadas para a dosagem de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O tecido coletado foi homogeneizado em tampão de citocinas como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A medida das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi realizada pela técnica do *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) usando o kit *Duo Set* (R&D systems). Inicialmente as placas de ELISA, com 96 poços, foram incubadas por 18 h a 4°C com 100  $\mu$ L de anticorpo de captura para TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ . Posteriormente realizou-se a lavagem das placas, durante três vezes, com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem (tween 20 a 0,05% - 50 $\mu$ l de tween / 100 mL de PBS) e o bloqueio com 100  $\mu$ L de albumina bovina 1 % (BSA), por poço. Após o bloqueio, 100  $\mu$ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas em duplicatas em várias diluições e incubadas por 24 h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubadas com anticorpo de detecção para TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ . Após o período de incubação de 2 h, a 4°C, as placas foram lavadas novamente, por três vezes, com tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 min com 100  $\mu$ L de estreptavidina diluída 1:200. Logo em seguida as placas foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente, no escuro, durante 20 minutos, com 100  $\mu$ L de solução para revelação (Kit Duo Set, R&D systems). A reação enzimática foi parada com a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M e a absorbância foi medida a 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### 3.4.5 Dosagem de Nitrito

A produção de óxido nítrico na mucosa jugal dos animais sacrificados no 5º ou 10º dia foi determinada pela quantificação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) com uso do método de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Inicialmente, 30 mg de tecido da mucosa jugal foram homogeneizados em 300  $\mu$ L de uma solução gelada de cloreto de sódio 0,9 % (solução salina) (homogenato a 10%). O homogenato obtido a partir das amostras de mucosa oral foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. O nível total de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> das amostras (0,04 mL) convertido em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pela incubação em um solução de 0,04 mL

de nitrato redutase, NADPH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água destilada “*overnight*”. Após plaquetamento de 80  $\mu\text{L}$  de cada amostra, em duplicata (placas de 96 poços), uma série de diluições da curva-padrão de referência de  $\text{NO}_2^-$  (640  $\mu\text{M}$ , 320  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  e 0,625  $\mu\text{M}$ ) foi preparada. A seguir, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, N-1-naftil-etilenodiamino 0,1%-NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é 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.

#### 3.4.6 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

A concentração de GSH na mucosa jugal dos hamsters foi avaliada pelo ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Os animais foram sacrificados no 5º ou 10º dia do experimento e as mucosas jugais foram coletadas para a realização do ensaio. As amostras foram trituradas em homogeneizador Politron Ultra-Turrax, utilizando-se 1 mL de EDTA 0,02M para cada 100 mg de tecido, sob condições adequadas de refrigeração. Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  do homogenato foram adicionadas a 320  $\mu\text{L}$  de água destilada e 80  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 50% (TCA) para a precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados (3000rpm/15minutos/4°C) e alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionadas a 800  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 20  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e agitados por 3 minutos no agitador de tubos. A absorbância foi determinada imediatamente após o acréscimo do DTNB, em 412 nm. A quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos nas mucosas jugais foi expressa como mg/g de tecido.

### 3.4.7 Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , NOSi, NF-kB- p50 e NF-kB- p50 NLS

A imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , NOSi, NF-kB- p50 e, NF-kB- p50 NLS foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais removidas e fixadas em formol 10% por 24 h para confecção de lâminas silanizadas apropriadas para imunohistoquímica. O ensaio imunohistoquímico foi realizado segundo o protocolo experimental abaixo:

- Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica.
- Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução de salina tamponada fosfato (PBS).
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% (15 minutos).
- Lavagem com solução de salina tamponada fosfato (PBS) (5 minutos)
- Incubação “overnight” (4°C) com anticorpo primário de rato anti-NOSi, anti-TNF- $\alpha$ , anti-NF-kB p50 ou anti-NF-kB p50 NLS diluído em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA).
- Lavagem com PBS e incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído em PBS-BSA, por 30 minutos.
- Lavagem com PBS e incubação com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos.

- Após lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer.
- Realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas.
- Os controles negativos foram processados simultaneamente, como descrito acima, e o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

#### 3.4.8 Avaliação da expressão de NF-kB- p50 por Western Blot

No 5º dia do modelo experimental, os animais foram sacrificados e as mucosas jugais coletadas para a realização do ensaio, de acordo com a metodologia descrita por Kim et al. (2009). As amostras foram submetidas à sonicação com solução de lise celular (Trinton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM), sendo transferidas posteriormente para tubos testes contendo inibidor de protease e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo ensaio de BCA – *bicinchoninic acid* (Pierce), em tubos eppendorf, com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 562nm). Padronizou-se a quantidade de proteína para 50µg, de acordo com uma curva padrão para proteína. Os lisados foram congelados a -70° C até a análise. Em seguida, foi feita a separação eletroforética (Bio Rad mini-gel) das amostras após desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS- Page), com o marcador de proteína (Invitrogen). O gel foi, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose *overnight* em aparelho de transferência 36v (Bio Rad mini-transfercell) a 4° C. No dia seguinte, a membrana de celulose foi bloqueada com leite desnatado por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário durante 1 hora e meia, diluição 1:500 em albumina bovina 5%. Após lavagens com tampão contendo TRIS, glicina, Tween 20 e água destilada, foi feita incubação com anticorpo secundário, diluído 1:500 em albumina bovina 5%, durante 1 hora e meia, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana de nitrocelulose pela técnica de quimioluminescência (ECL), em filme de raio-X (Kodak X-Omat), em sala escura. As

bandas foram analisadas e quantificadas por densitometria pela razão de expressão da proteína de interesse no gel pela expressão da proteína controle. A quantificação das bandas foi determinada com o auxílio de um programa de computador Image J. Os dados foram expressos como intensidade da banda de NF-kB- p50/ intensidade da banda de  $\beta$ -actina.

### **3.5 Parâmetros sistêmicos avaliados para o estudo da atorvastatina em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

#### **3.5.1 Avaliação da sobrevivência**

Diariamente, registrou-se a mortalidade dos animais para avaliar a taxa de sobrevivência dos hamsters submetidos à mucosite oral.

#### **3.5.2 Análise histopatológica do fígado, pulmão, coração e rim**

No 5º dia do modelo experimental, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados. As amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, e em seguida foram incluídas em parafina. As análises histopatológicas do fígado, pulmão, coração e rim foram realizadas em cortes de 4  $\mu$ m de espessura, corados pela hematoxilina-eosina (H&E) e analisados ao microscópio óptico (x 40).

#### **3.5.3 Leucograma**

Os hamsters foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (250 mg/Kg, i.p.) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, no 5º dia do experimento. Para determinação da contagem total de leucócitos, 20  $\mu$ L de sangue foram diluídos em 380  $\mu$ L de solução de Turk. Para a contagem diferencial, contagem de 100 células, utilizou-se um esfregaço de boa qualidade corado pelo panótico rápido. A contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada com o uso do microscópio óptico (100x; Nikon) (SOUZA; FERREIRA, 1985). Os resultados foram expressos como número de células/mL.

### 3.5.4 Parâmetros Bioquímicos

Os hamsters foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, no 5º dia do experimento. Em seguida, o sangue total, sem anticoagulante, foi centrifugado a 2500 rpm, durante 15 minutos e obteve-se o soro. Amostras de soro foram usadas para a realização das dosagens bioquímicas das enzimas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), bem como para a dosagem de uréia e creatinina. Para a determinação das dosagens bioquímicas utilizou-se kits padrões da LABTEST® e a leitura em espectrofotômetro.

### 3.5.5 Bacteremia

Após anestesia dos animais, o sangue foi coletado por punção cardíaca no 5º dia do experimento, em condições estéreis. 10 µL de sangue foram diluídos 10 vezes no meio de enriquecimento de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubado em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 e 48 h, a densidade de turvação do meio, que indicava crescimento bacteriano, foi analisada. Os resultados foram expressos como negativo (-), sem crescimento bacteriano ou como positivo (++) . Os microorganismos que cresceram no meio de enriquecimento foram semeados para isolamento e posterior identificação nos meios de cultura agar sangue de carneiro 5%, Agar MacConkey e no meio agar manitol salgado. A identificação dos microorganismos presentes foi realizada pela coloração de Gram e testes bioquímicos para produção de DNAase, catalase, coagulase, motilidade, utilização de açúcares e outros métodos indicados (MURRAY *et al.*, 1995).

## 3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como Média ± erro padrão (Média ± epm) ou mediana, acompanhada de valores extremos, de acordo com o parâmetro avaliado. Para comparações entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (ANONA) e teste de Tukey, para comparar médias, e teste de Kruskal-Wallis e Dunn's, para medianas. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Modulação farmacológica na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

#### 4.1.1 Efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU – Análise Macroscópica

Para investigar o efeito antiinflamatório da atorvastatina na lesão induzida por 5-FU, grupos de animais foram sacrificados no 5º ou 10º dia do experimento, após receberem 5-FU (60 e 40 mg/Kg, no 1º e 2º dia, respectivamente) e serem submetidos ao trauma mecânico (TM), no 4º dia. A análise macroscópica da mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, no 5º dia do experimento, mostrou hiperemia, eritema acentuado, hemorragia e úlceras (Figura 7E), com escore 3, variação (2-3). Estas alterações foram significantes ( $P < 0,05$ ), em relação aos animais normais (N) ou aos hamsters submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) (Tabela 2). No 10º dia, as lesões foram caracterizadas por hiperemia, eritema acentuado, hemorragia, úlceras e a evidência de abscessos na mucosa jugal, o escore foi 4, com variação (3-4) para os animais com MO que receberam salina e de (3-5) para os hamsters com MO tratados com salina/etanol 5%. Portanto, o pico da lesão ocorreu no 10º dia, com a evidência de abscessos na mucosa jugal (Figura 8E, Tabela 3). Os hamsters tratados com atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg, i.p.), durante 5 dias, apresentaram melhora no dano provocado por 5-FU, evidenciada pela redução da hiperemia, presença de discreto eritema e pequenas lacerações na mucosa jugal como resultado do trauma mecânico realizado no 4º dia, tendo escore 1 com variação (1-2). (Figura 7, Tabela 2). A atorvastatina preveniu, de forma significativa, os danos à mucosa oral quando comparado com os grupos submetidos a MO que receberam salina ou salina/etanol 5%. No 10º dia, o tratamento dos animais com atorvastatina 1 mg/Kg também reduziu o tamanho e a severidade da lesão induzida por 5-FU (Figura 8G), recebendo escore 2, variação (1-3) (Tabela 3).

#### 4.1.2 Efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU – Análise Microscópica

O histopatológico da mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU mostrou significante alterações ( $P < 0,05$ ) no 5° e 10° do experimento, em relação aos animais normais ou aos hamsters submetidos apenas ao trauma mecânico (TM). No 5°, observou-se moderado edema, infiltrado de células inflamatórias com prevalência de neutrófilos, áreas hemorrágicas, vasodilatação, ulceração discreta ou eventual e ausência de abscessos, recebendo escore 2 (Tabela 2; Figura 7F). No 10° dia, correspondendo a mucosite máxima, o histopatológico revelou edema, acentuado infiltrado de células inflamatórias com prevalência de neutrófilos, áreas hemorrágicas, vasodilatação, úlceras extensas e abscessos, recebendo escore 3 (Tabela 3, Figura 8F), sendo significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) da mucosa oral de hamsters normais não submetidos à mucosite oral (Tabela 3; Figura 8B) e ao grupo TM que apresentaram apenas discreto edema e infiltrado de células inflamatórias, recebendo escore 1 (Tabela 3; Figura 8D). O tratamento com ATV 1 ou 5 mg/kg, durante 5 dias, reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) o infiltrado de células inflamatórias, o edema, a hemorragia e preveniu a formação de úlceras induzida por 5-FU, resultando em escore 1 (1-1) (Tabela 2; Figura 7). Adicionalmente, no 10° dia, ATV 1 mg/kg reduziu de forma significante as alterações histopatológicas observadas na mucosite oral (Tabela 3), quando comparado com os animais submetidos a mucosite oral e tratados com salina ou salina/etanol. Evidenciou-se prevenção no infiltrado de células inflamatórias, no edema, nas áreas hemorrágicas e na formação de úlceras e abscessos, recebendo baixos escores 1(0-3) (Tabela 3). A Figura 8H ilustra o efeito protetor do tratamento com ATV 1 mg/kg, quando comparado com os animais submetidos a mucosite oral que receberam salina/etanol 5% (Figura 8F).

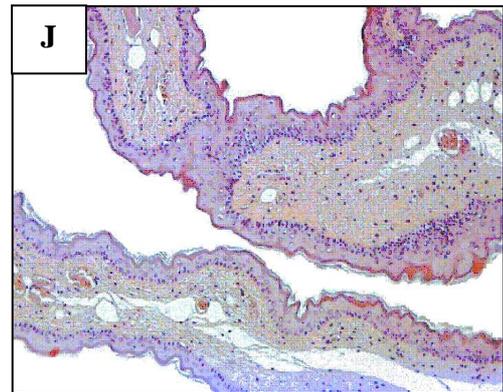
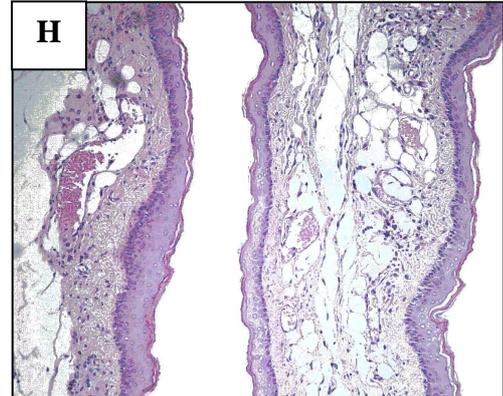
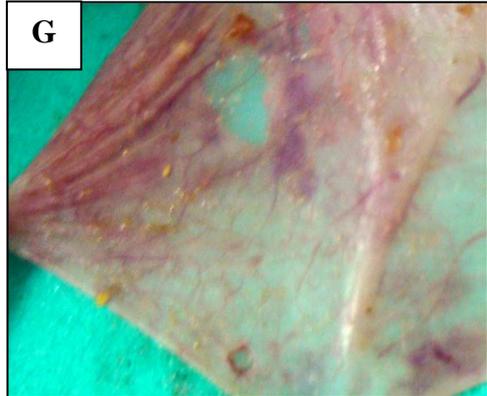
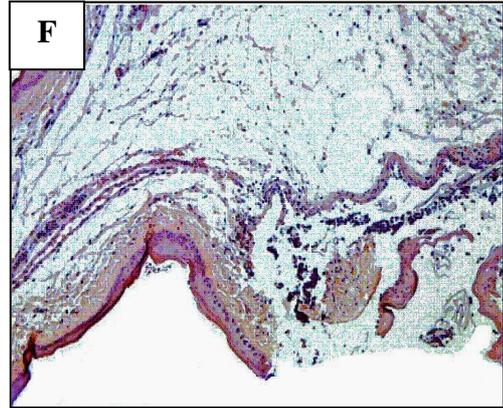
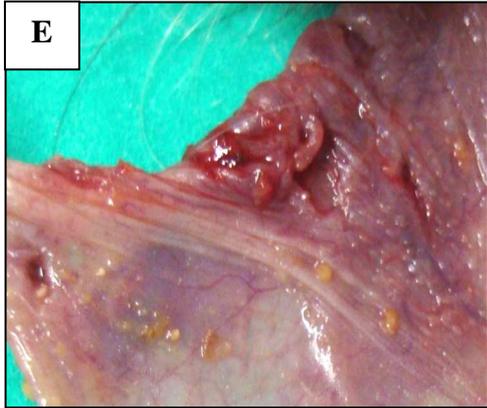
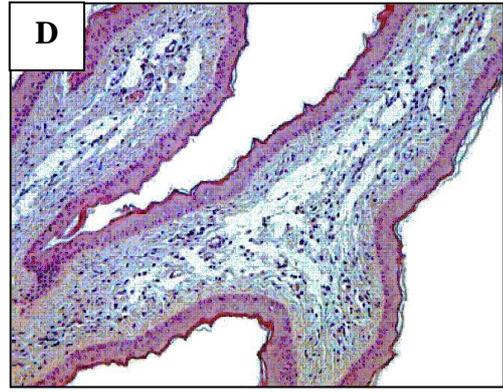
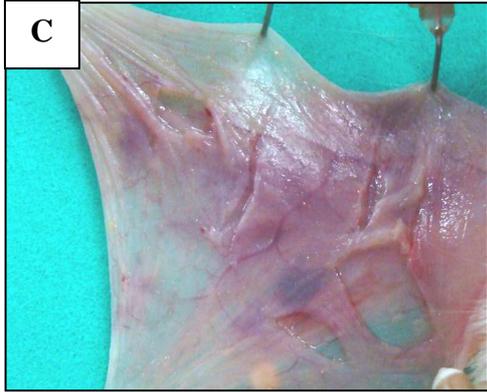
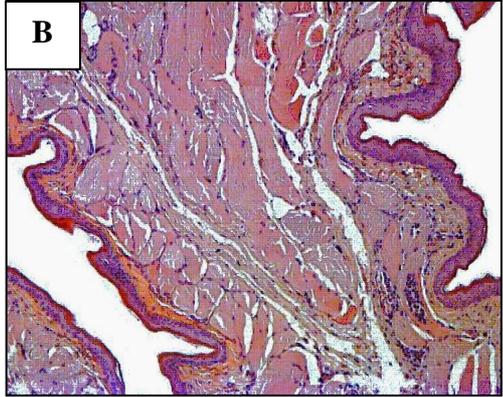
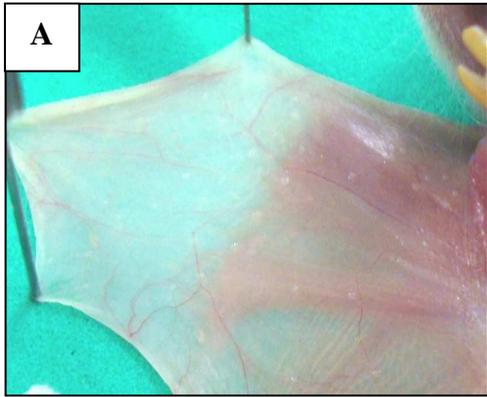


Figure 7: Aspecto Macroscópico (esquerda) e Microscópico (direita) da mucosa oral de hamsters normais (A e B) ou mucosa oral de hamsters submetidos apenas ao trauma mecânico (C and D) ou mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina/etanol 5 % (E and F) ou administração i.p. de atorvastatina 1 mg/Kg (G and H) ou atorvastatina 5 mg/Kg (I and J). A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU seguido de trauma mecânico nas mucosas jugais. Os animais receberam atorvastatina (1 ou 5 mg/kg; i.p.), ou salina/etanol 5 %, 30 minutos antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, durante 5 dias. No 5º dia do experimento, os hamsters foram sacrificados e as mucosas jugais devidamente fotografados e removidas para coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E) (x40).

Tabela 2: Análise macroscópica e microscópica da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral e tratados com atorvastatina durante 5 dias

Grupos Experimentais	Normal	TM	5-FU	5-FU	5-FU		Salina
			Salina	Sal/etanol	ATV		ATV
					1	5	5
Análise Macroscópica	0 (0-0)	1 (1-1)	3 (2-3) *	3 (2-3)*	1(1-2)**	1(1-2)**	1 (1-2)
Análise Microscópica	0 (0-0)	1 (1-1)	2 (1-2) *	2 (2-2)*	1(1-1)**	1(1-1)**	1 (0-1)

A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg) ou salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e do trauma mecânico e diariamente por 5 dias. Os dados representam mediana e variação dos escores atribuídos a pelo menos 6 hamsters, considerando os seguintes parâmetros: vasodilatação; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; edema e úlceras, para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia e úlceras para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle normal \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa em relação aos animais com mucosite oral e que receberam salina ou salina/etanol 5% (Kruskal-Wallis and Dunn-tests).

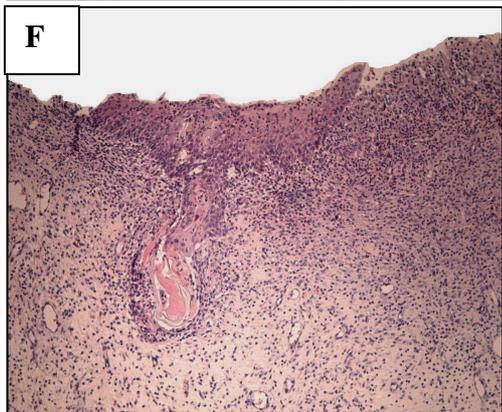
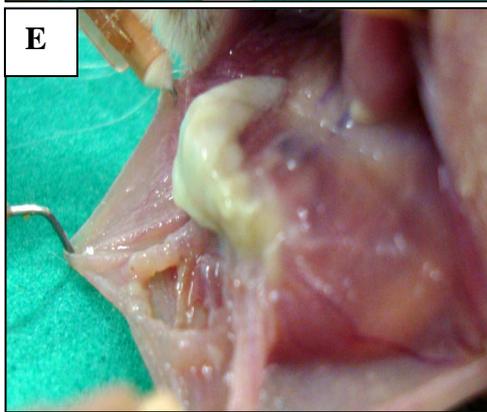
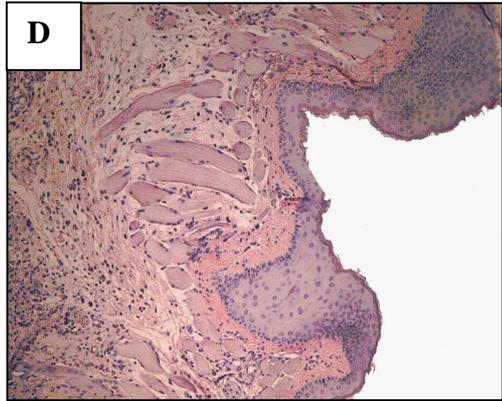
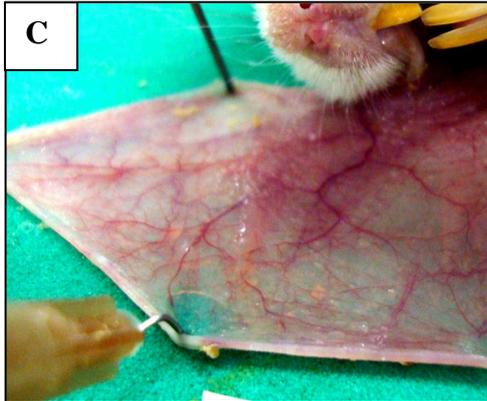
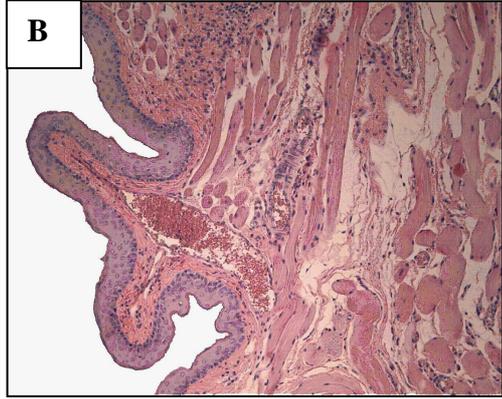
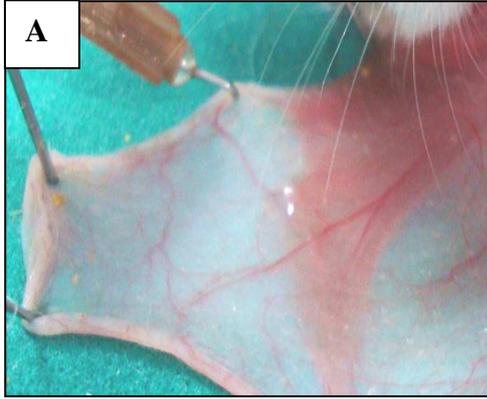


Figura 8: Análise Macroscópica (esquerda) e Microscópica (direita) da mucosa jugal de hamsters normais (A e B) ou mucosa jugal de animais submetidos apenas ao trauma mecânico (C e D) ou mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral e que receberam salina/etanol 5% (E e F) ou atorvastatina 1mg/Kg (G e H). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Os animais foram pré-tratados, por via intraperitoneal, com ATV ou salina/etanol 5%, 30 min antes do 5-FU e do TM, diariamente, por 10 dias. No 10º dia, as mucosas foram fotografadas e em seguida removidas, fixadas em formol a 10% e processadas para coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E) (x40).

Tabela 3: Análise macroscópica e microscópica da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral e tratados com atorvastatina durante 10 dias

Grupos Experimentais	Normal	TM	5-FU	5-FU	5-FU
			Salina	Sal/etanol	ATV 1
Análise Macroscópica	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (3-4)*	4 (3-5)*	2 (1-3)**
Análise Microscópica	0 (0-0)	1 (1-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)*	1 (0-3)**

A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg) ou salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU ou do trauma mecânico e diariamente durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação dos escores atribuídos a pelo menos 6 hamsters, considerando os seguintes parâmetros: vasodilatação; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; edema e úlceras, para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle normal \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatística significativa em relação aos animais com mucosite oral e que receberam salina ou salina/etanol 5% (Kruskal-Wallis and Dunn-tests).

#### 4.1.3 Efeito da atorvastatina sobre a atividade da mieloperoxidase na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A atividade da mieloperoxidase foi determinada na mucosa jugal dos hamsters como um indicador da infiltração de neutrófilos. A atividade da enzima mieloperoxidase na mucosa oral dos animais submetidos ao TM e dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (5-FU/salina ou 5-FU/salina/etanol 5%) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) em comparação com o grupo normal (N), no 5º dia do experimento. ATV 1 mg/kg ou 5 mg/kg, administrada durante 5 dias, reduziu de forma significativa ( $P < 0,05$ ) o aumento da atividade da enzima MPO induzida por 5-FU e TM. Hamsters não submetidos a MO que receberam atorvastatina 5 mg/kg (grupo salina/ATV 5) não apresentaram alterações na atividade da MPO quando comparados com o grupo controle normal (N) (Figura 9A). No 10º dia, a atividade da MPO na mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite induzida por 5-FU (grupos 5-FU/salina ou 5-FU/salina/etanol 5%) também aumentou de forma significativa ( $P < 0,05$ ) em comparação com o grupo normal (N) (Figura 9B) e o tratamento dos hamsters com atorvastatina 1 mg/kg reduziu significativamente o aumento da atividade da enzima MPO induzida por 5-FU (Figura 9B).

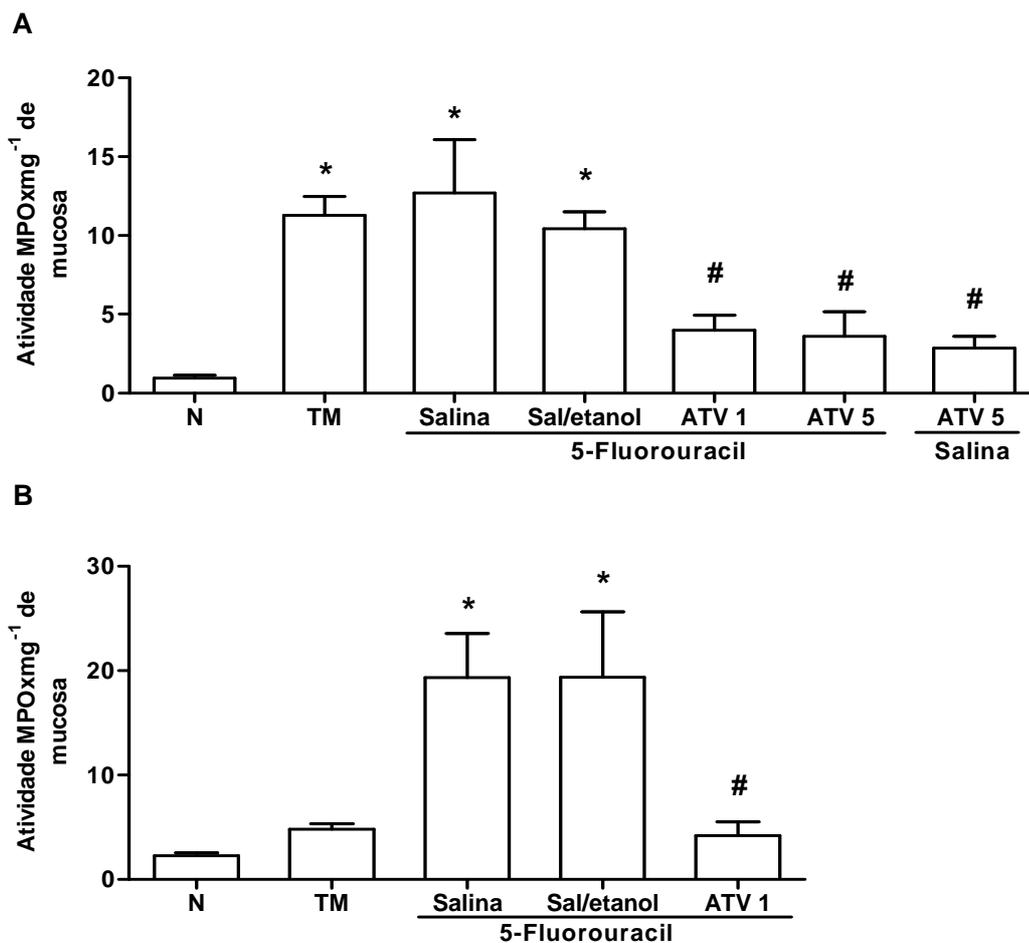


Figura 9: Atorvastatina reduziu a atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B). Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV 5). Os grupos experimentais foram hamsters que receberam injeção i.p. de 5-fluorouracil, seguido de trauma mecânico e foram tratados com salina (5-FU/salina), salina/etanol 5% (5-FU-salina/etanol), atorvastatina 1 mg/Kg (5-FU/ATV 1) ou 5 mg/Kg (5-FU/ATV 5), 30 minutos antes do 5-FU. As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO x mg<sup>-1</sup> na mucosa jugal. \*p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). #p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (ANOVA; Tukey).

#### 4.1.4 Efeito da atorvastatina sobre a dosagem de citocinas IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

Os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  na mucosa jugal de hamsters, no quinto dia do modelo experimental, comparado com o grupo normal (Tabela 4), o que não foi observado para os níveis de IL-1  $\beta$ . O tratamento com ATV 1 ou 5 mg/Kg, durante 5 dias, diminuiu significativamente a concentração de TNF- $\alpha$  induzida por 5-FU e TM ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Os hamsters que receberam apenas ATV 5 mg/Kg (grupo ATV5/salina) não tiveram alterações nos níveis de TNF- $\alpha$ , comparado com o grupo controle normal (Tabela 4). No 10° dia da MO, 5-FU aumentou, de forma significativa, ( $p < 0,05$ ) os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . ATV 1 mg/Kg, administrado durante 10 dias, bloqueou significativamente este aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  na mucosa jugal dos animais (Tabela 5).

Tabela 4. Níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pg/mL) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral, durante 5 dias

Citocinas	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
Normal	1051.0 $\pm$ 52.48	288 $\pm$ 32.02
TM	1029.0 $\pm$ 96.36	166.3 $\pm$ 31.14
5-FU/salina	2662.0 $\pm$ 135.0*	241.3 $\pm$ 56.53
5-FU/salina-etanol	2613.0 $\pm$ 115.7*	236.1 $\pm$ 38.61
5-FU/ATV1	1226.0 $\pm$ 56.12 <sup>#</sup>	105.0 $\pm$ 10.79
5- FU/ATV5	1025.0 $\pm$ 72.05 <sup>#</sup>	226.0 $\pm$ 46.49
Salina/ATV5	1087.0 $\pm$ 75.93 <sup>#</sup>	183.8 $\pm$ 25.61

A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (Salina/ATV5). Os números na tabela representam Média  $\pm$  EPM da concentração em pg/mL. \*p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). <sup>#</sup>p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Tabela 5. Níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pg/mL) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral, durante 10 dias

Citocinas	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
Normal	96.83 $\pm$ 22.44	213.8 $\pm$ 30.92
TM	172.2 $\pm$ 48.85	289.7 $\pm$ 11.30
5-FU/salina	417.4 $\pm$ 76.74*	435.4 $\pm$ 40.50*
5-FU/salina-etanol	404.0 $\pm$ 77.32*	405.0 $\pm$ 50.24*
5-FU/ATV1	177.6 $\pm$ 33.13 <sup>#</sup>	206.8 $\pm$ 18.39 <sup>#</sup>

A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM). Os números na tabela representam Média  $\pm$  EPM da concentração em pg/mL. \*p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). <sup>#</sup>p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

#### 4.1.5 Efeito da atorvastatina sobre os níveis de nitrito na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

Os níveis de nitrito na mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU durante 5 ou 10 dias aumentaram de forma significativa ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo normal (N) ou ao grupo de animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) (Figuras 10A e 10B, respectivamente). A administração de ATV 1 ou 5 mg/kg, durante 5 dias, reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) os níveis de nitrito em comparação com o grupo de animais com MO que receberam salina ou salina/etanol 5% (Figura 10A). Nos animais tratados com ATV 1 mg/kg, durante 10 dias, os níveis de nitrito também foram reduzidos de forma significativa, quando comparado com os grupos 5-FU/salina ou 5-FU/salina-etanol 5% (Figura 10B).

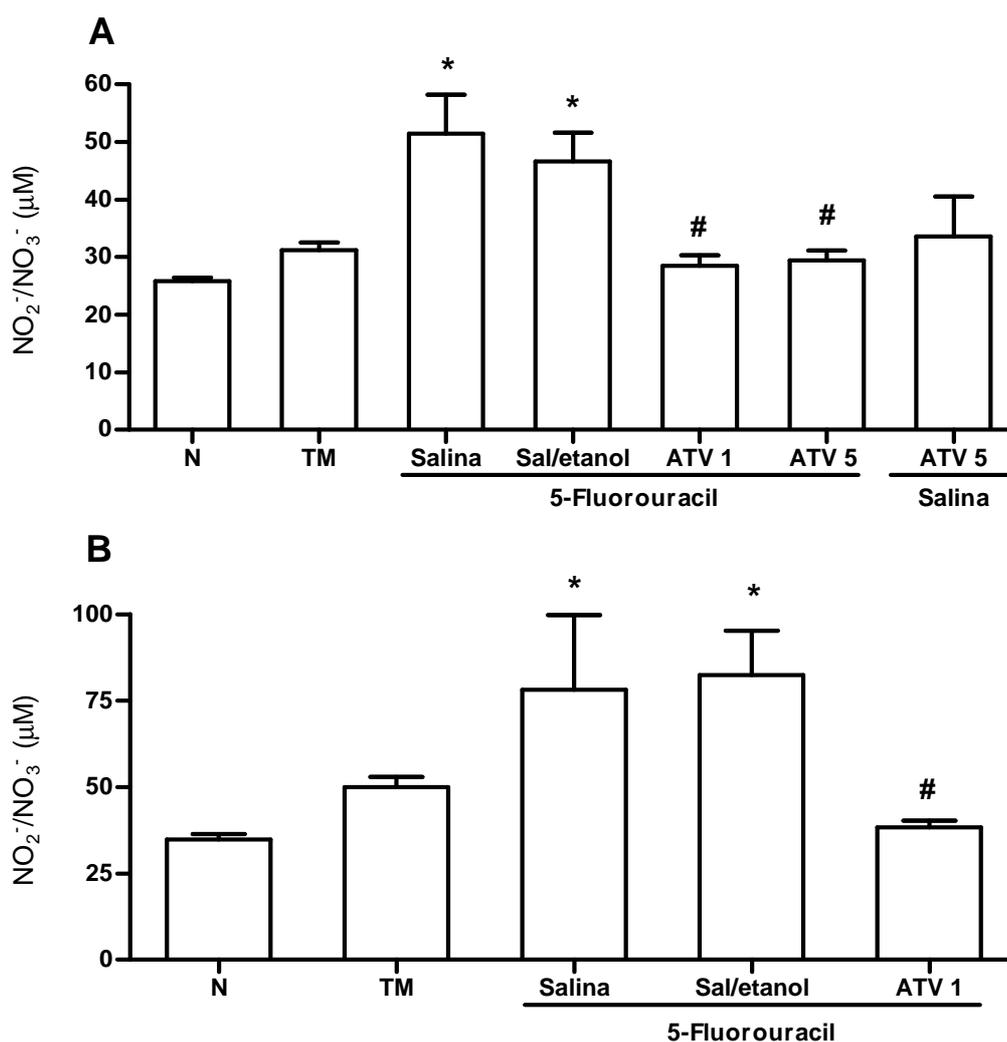


Figura 10. Quantificação dos níveis de nitrito na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias (A) ou 10 dias (B). Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (ATV5/salina). As barras representam Média ± EPM dos níveis de nitrito (μM). \*p<0,05 representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (N). #p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

#### 4.1.6 Efeito da atorvastatina sobre os níveis de glutathiona na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

Os estoques de glutathiona (NP-SH) na mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e dos hamsters submetidos apenas ao TM foram significativamente diminuídos ( $p < 0,05$ ), no 5º e 10º dia do experimento, quando comparados ao grupo controle normal (N) (Figura 11A e 11B, respectivamente). A administração de ATV 1 mg/Kg, durante 10 dias, preveniu a queda dos níveis de glutathiona induzida pelo TM e pela MO experimental (Figura 11B). Entretanto a administração de ATV, durante 5 dias, não foi capaz de prevenir a queda nos estoques de glutathiona provocada pelo TM e pela MO (Figura 11A).

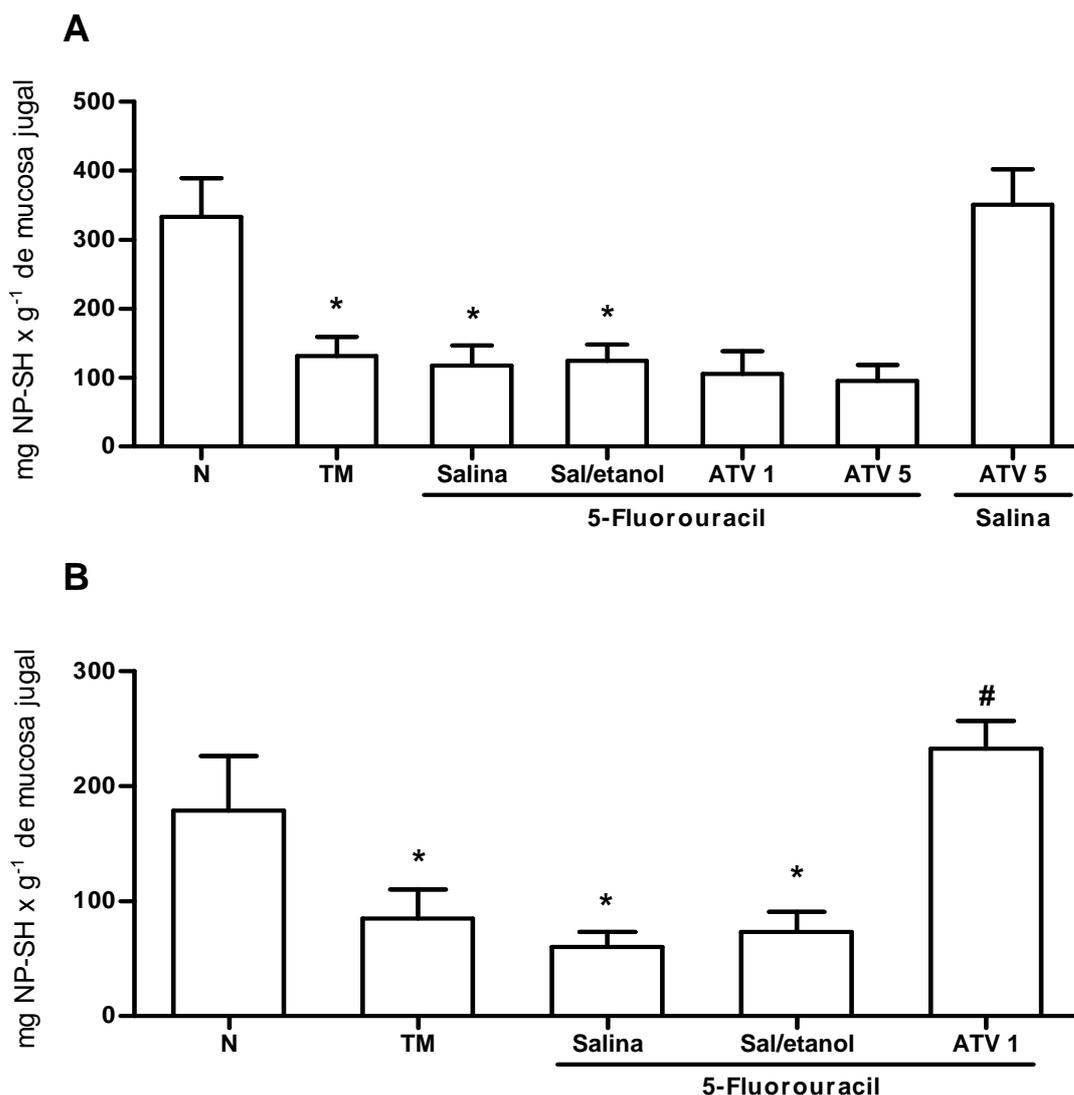


Figura 11. Quantificação dos estoques de glutaciona (NP-SH) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral durante 5 dias (A) ou 10 dias (B). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias (A) ou 10 dias (B). Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (Salina/ATV5). As barras representam Média  $\pm$  EPM dos estoques de glutaciona (mg/g de mucosa jugal). \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

#### 4.1.7 Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

Observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para a citocina TNF- $\alpha$  nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral experimental e tratados com salina ou salina/etanol 5% (Figura 12E ou 12F), em relação à marcação observada na mucosa dos animais normais, não submetidos à mucosite oral (Figura 12B) ou aos animais submetidos ao TM (Figura 12C) ou animais que receberam apenas ATV 5 mg/Kg (Figura 12D). O tratamento com atorvastatina, durante 5 dias, na dose de 1 mg/kg (Figura 12G) ou na dose de 5 mg/Kg (Figura 12H), reduziu, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , comparado ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu salina ou salina-etanol 5%. O controle negativo (Figura 12A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para TNF- $\alpha$ .

#### 4.1.8 Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para NOSi na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A marcação imunohistoquímica foi acentuada para a enzima NOSi nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral experimental e tratados com salina ou salina/etanol 5% (Figura 13E ou 13F), em relação à marcação observada na mucosa de um animal normal, não submetido à mucosite oral (Figura 13B) ou aos animais submetidos ao TM (Figura 13C) ou animais que receberam apenas ATV 5 mg/Kg (Figura 13D). O tratamento com atorvastatina, durante 5 dias, na dose de 1 mg/kg (Figura 13G) ou na dose de 5 mg/Kg (Figura 13H), reduziu consideravelmente a marcação imunohistoquímica para NOSi, comparado ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu salina ou salina-etanol 5%. O controle negativo (Figura 13A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NOSi.

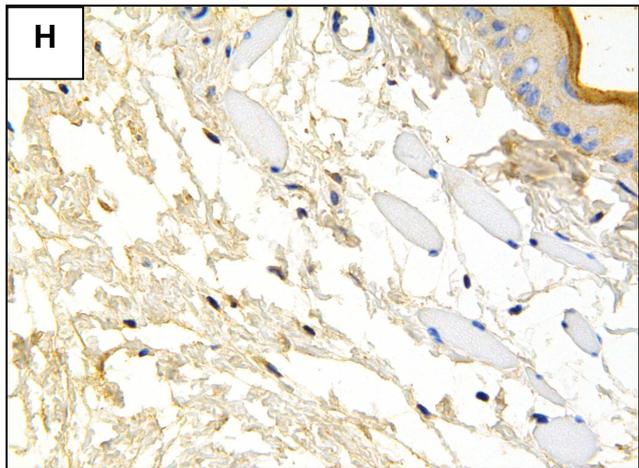
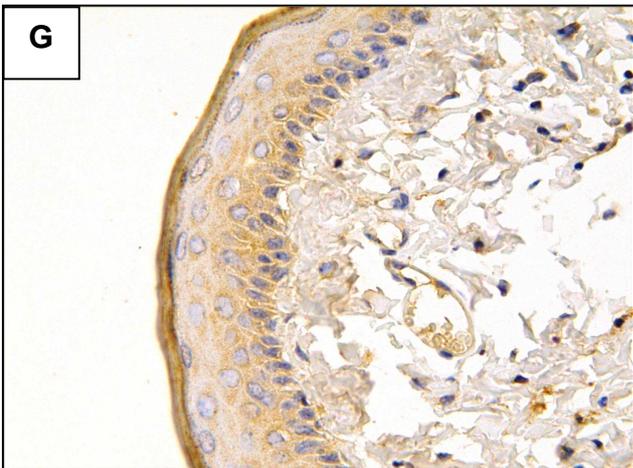
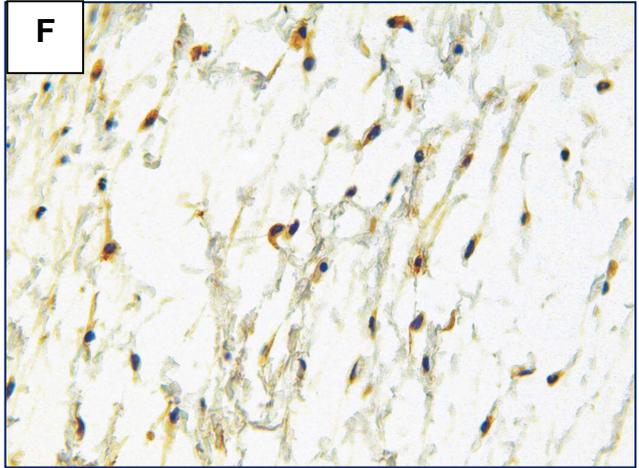
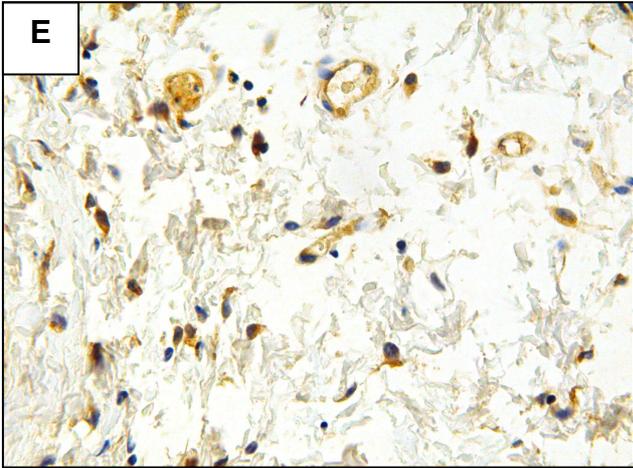
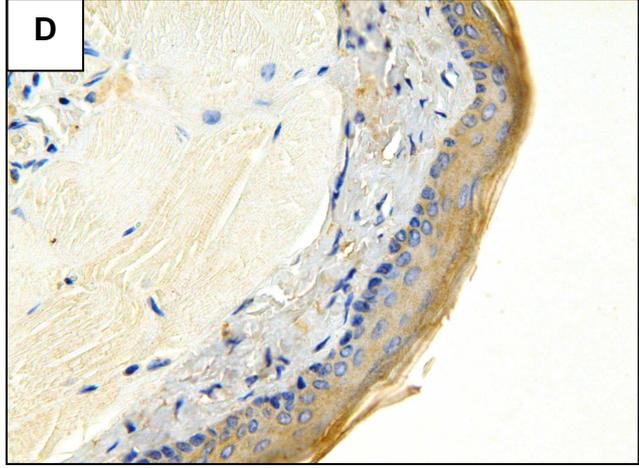
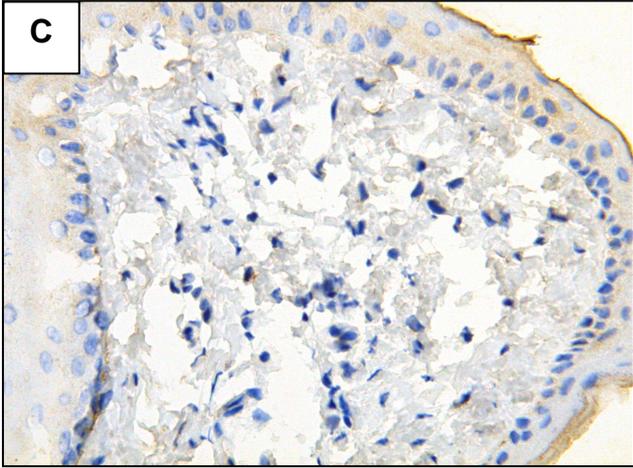
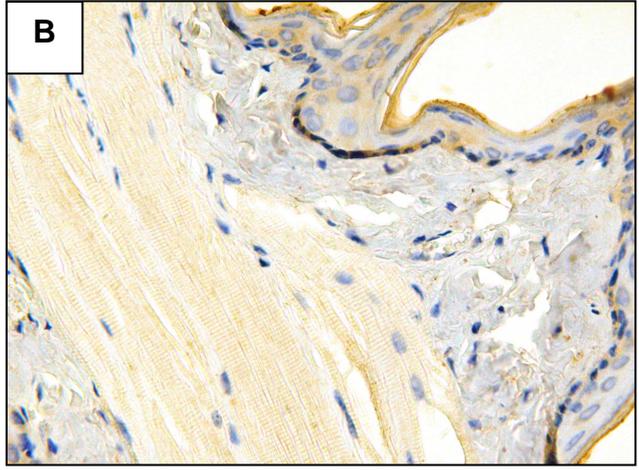
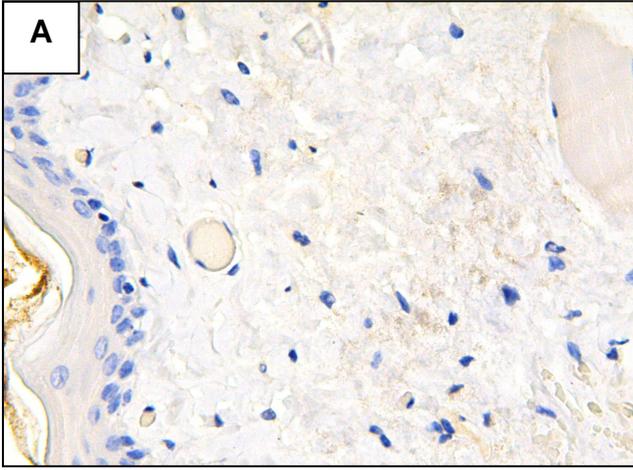


Figura 12: Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  de uma mucosa jugal de hamsters normais (B) ou mucosa oral de hamsters submetidos apenas ao trauma mecânico (C) ou mucosa oral de animais que receberam apenas ATV 5 mg/Kg (D) ou mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (E) ou salina/etanol 5 % (F) ou administração i.p. de atorvastatina 1 mg/Kg (G) ou atorvastatina 5 mg/Kg (H). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV5). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  (aumento de 400x). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para TNF- $\alpha$ .

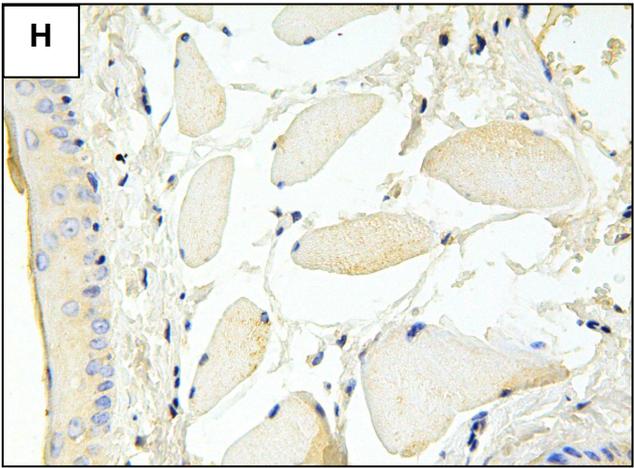
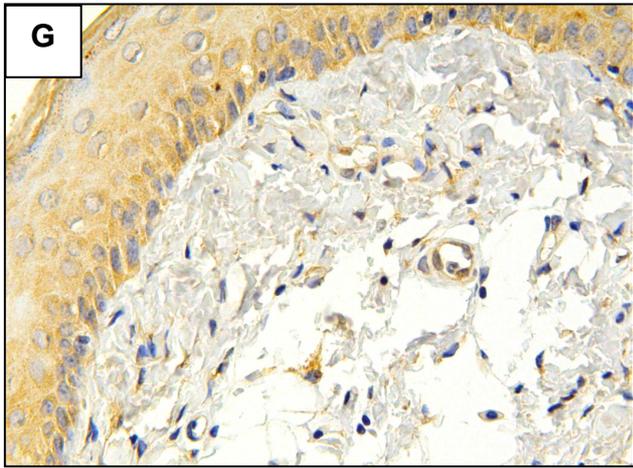
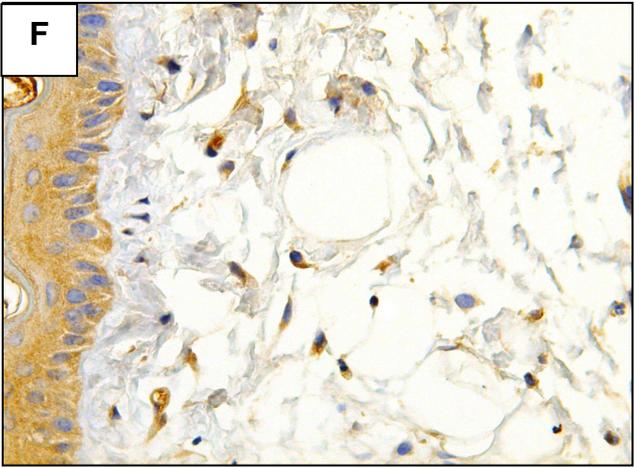
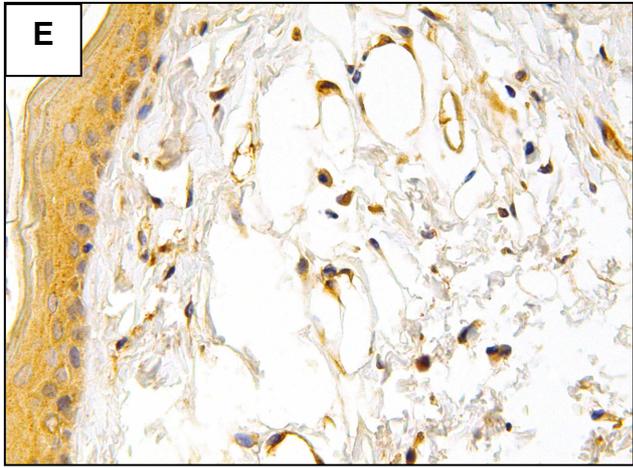
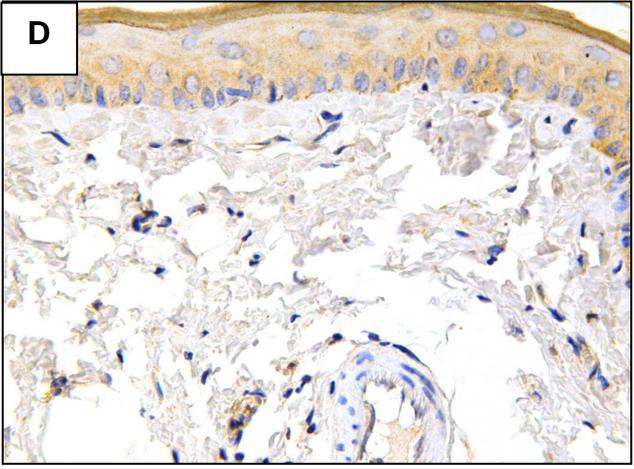
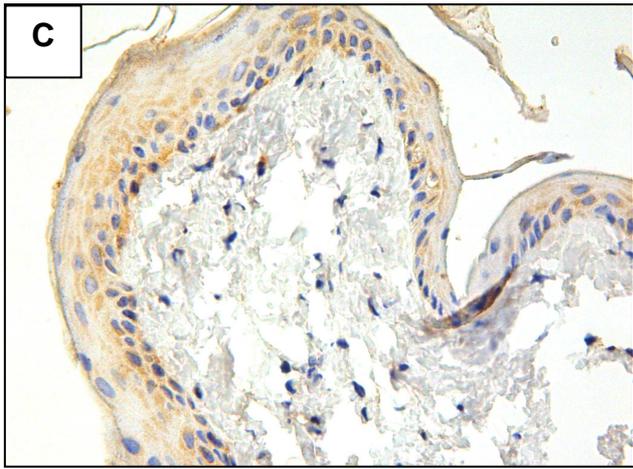
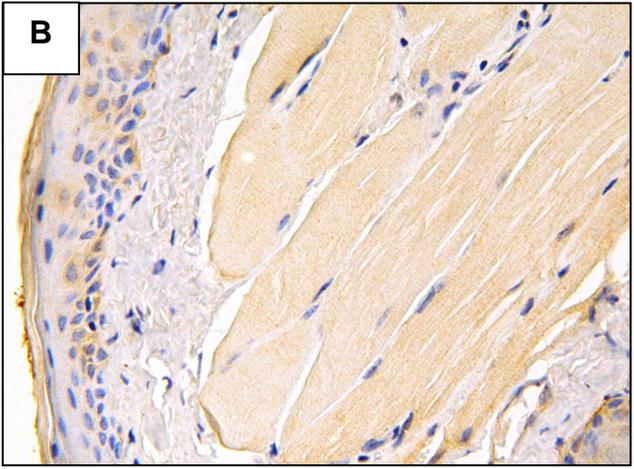
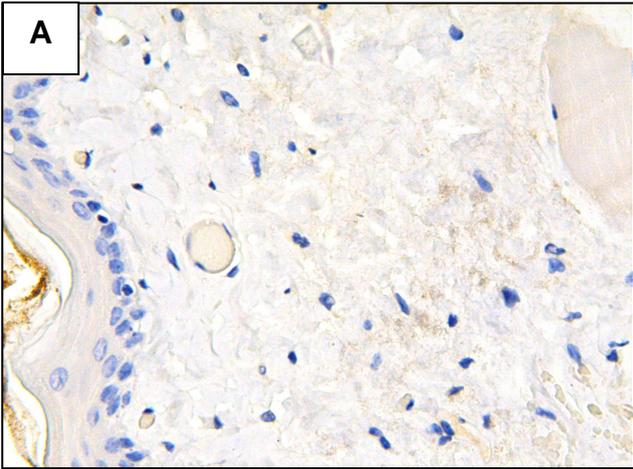


Figura 13: Fotomicrografias de imunohistoquímica para NOSi de uma mucosa jugal de hamsters normais (B) ou mucosa oral de hamsters submetidos apenas ao trauma mecânico (C) ou mucosa oral de animais que receberam apenas ATV 5 mg/Kg (D) ou mucosa oral de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina (E) ou salina/etanol 5 % (F) ou administração i.p. de atorvastatina 1 mg/Kg (G) ou atorvastatina 5 mg/Kg (H). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV5). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para NOSi (aumento de 400x). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NOSi.

#### 4.1.9 Efeito da atorvastatina na marcação imunohistoquímica para NF-kB-p50 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A marcação imunohistoquímica para o NF-kB-p50 foi acentuada nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental (Figura 14), comparado aos animais normais. O tratamento dos hamsters com atorvastatina, durante 5 dias, na dose de 1 mg/kg ou 5 mg/Kg reduziu a marcação imunohistoquímica para NF-kB-p50 nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal, quando comparado aos grupos 5-FU/salina ou 5-FU/salina-etanol (Figura 14E e 14F). O controle negativo (14A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NF-kB-p50.

Nós investigamos a expressão do NF-kB-p50 NLS (sequência de localização nuclear). O anticorpo anti-NF-kB-p50 NLS reconhece um epítipo de sobreposição da seqüência de localização nuclear da subunidade p50 do heterodímero NF-kB. Este epítipo é mascarado pela ligação do I $\kappa$ B e, portanto o anticorpo NF-kB-p50 NLS se liga a forma do NF-kB-p50 ativado, livre do I $\kappa$ B.

A marcação imunohistoquímica para o NF-kB-p50 NLS foi acentuada nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental (Figura 15), comparado aos animais normais. No 5° dia do experimento, os grupos com MO e tratados com ATV 1 ou 5 mg/Kg tiveram uma menor marcação para o anticorpo NF-kB-p50 NLS, comparado aos animais normais (Figura 15). O controle negativo (15A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NF-kB-p50 NLS.

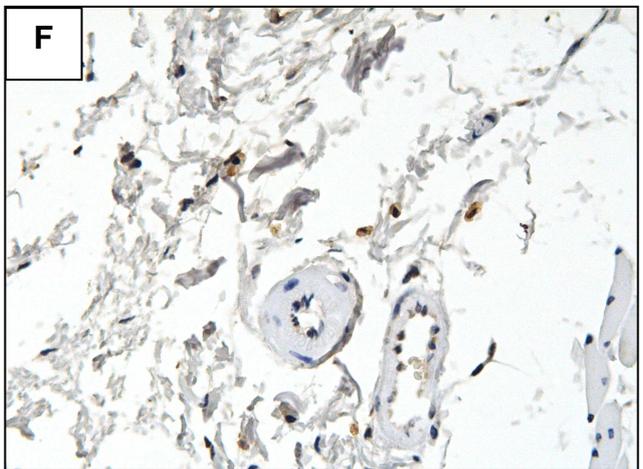
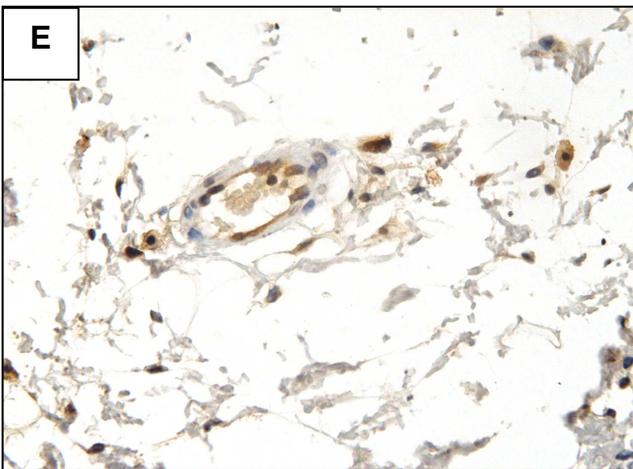
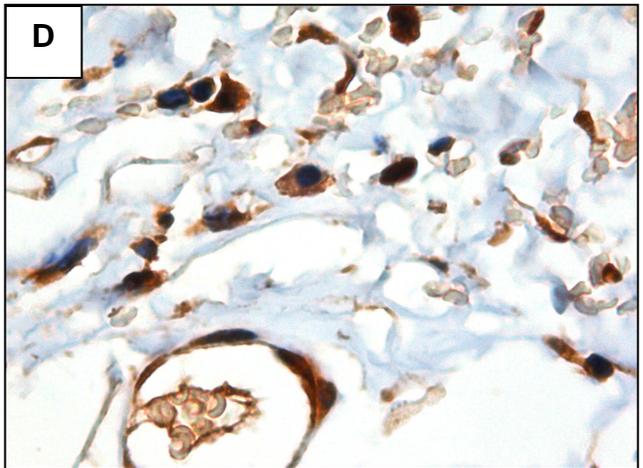
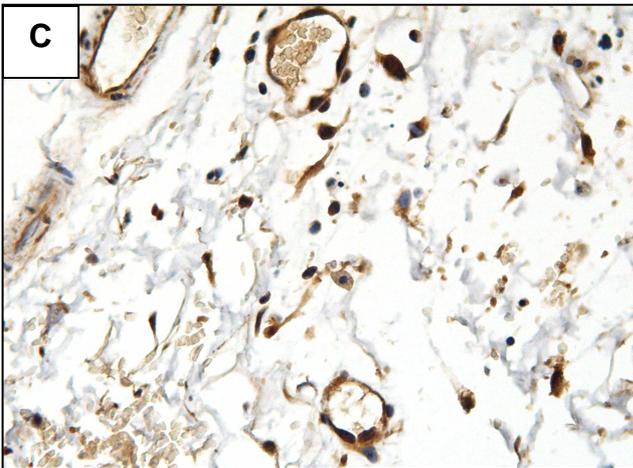
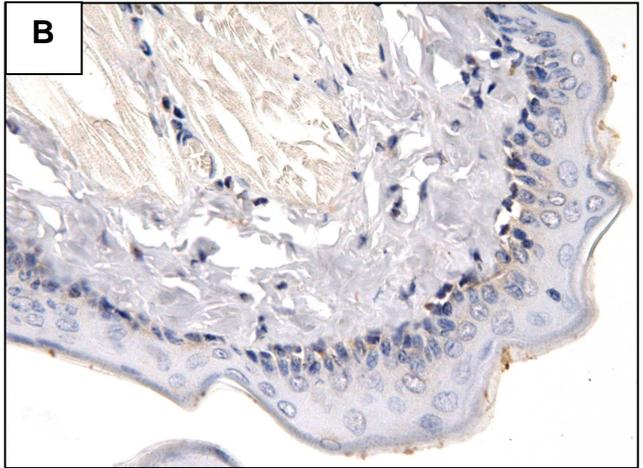
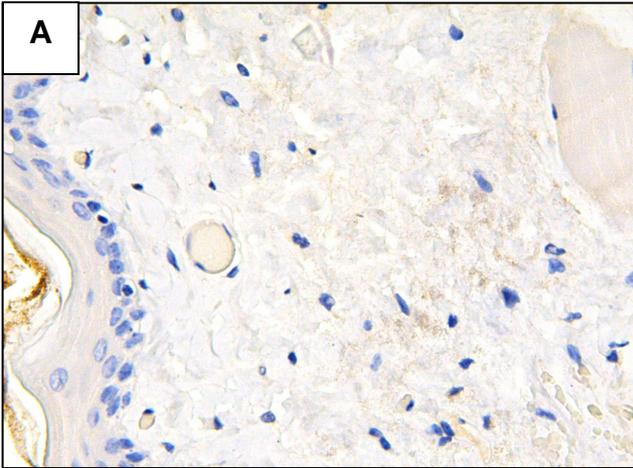


Figura 14: Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF-kB-p50 de uma mucosa jugal de hamsters normais (B) ou mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina/etanol 5 % (400x) (C) ou salina/etanol 5 % (1000x) (D) ou administração i.p. de atorvastatina 1 mg/Kg (400x) (E) ou atorvastatina 5 mg/Kg (400x) (F). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para NF-kB-p50. O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NF-kB-p50.

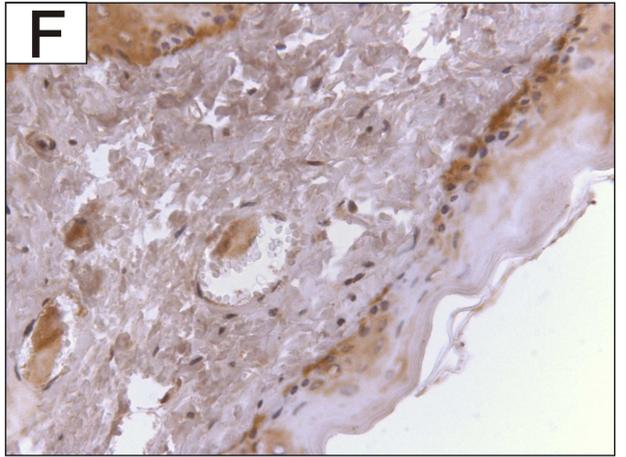
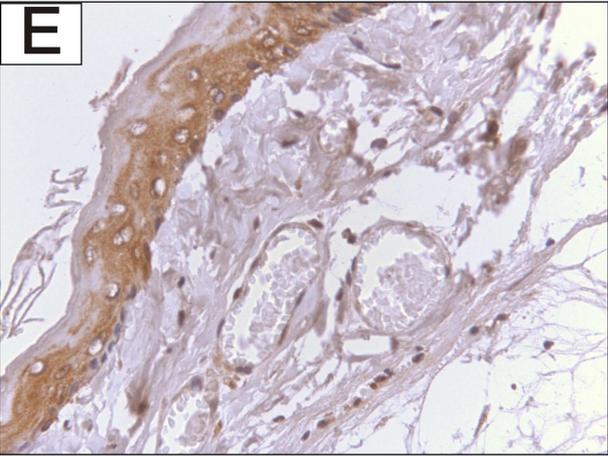
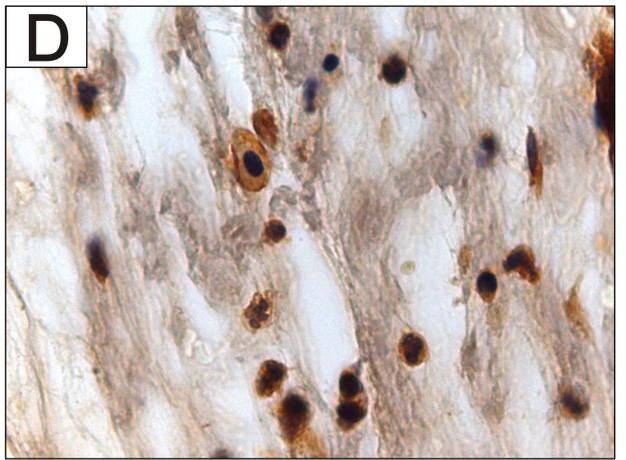
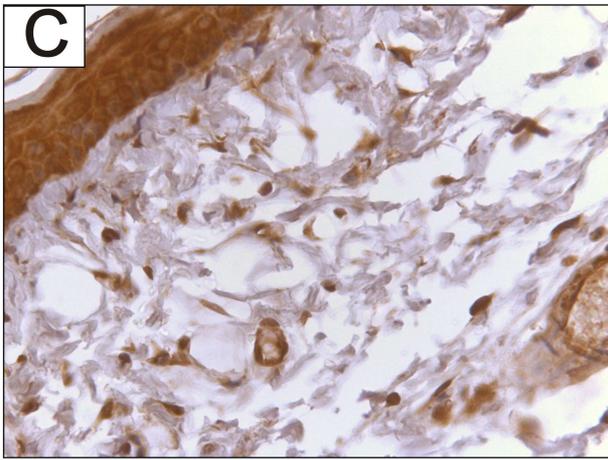
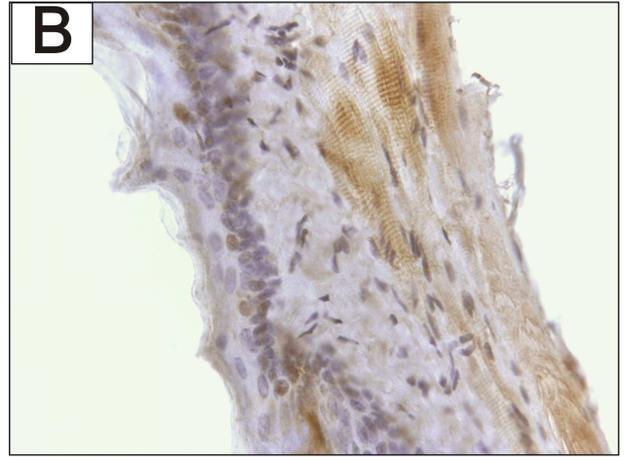
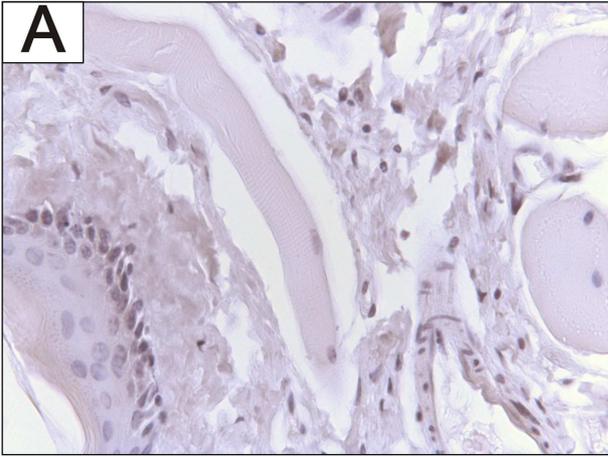


Figura 15: Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF-kB-p50 NLS de uma mucosa jugal de hamsters normais (B) ou mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam salina/etanol 5 % (400x) (C) ou salina/etanol 5 % (1000x) (D) ou administração i.p. de atorvastatina 1 mg/Kg (E) ou atorvastatina 5 mg/Kg (F). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg, ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e as amostras de mucosa jugal foram processadas para a técnica de imunohistoquímica para NF-kB-p50 NLS. O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para NF-kB-p50 NLS.

#### 4.1.10 Efeito da atorvastatina na expressão do NF-kB-p50 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental - Western Blot

O aumento da expressão do NF-kB-p50 foi claramente detectada no homogenato da mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU, pelo método de Western Blot (Figura 16 A e B). Os animais com MO e tratados com ATV 1 ou 5 mg/kg tiveram redução, de forma significativa, na expressão do NF-kB-p50, quando comparado com o grupo 5-FU (Figura 16 A e B).

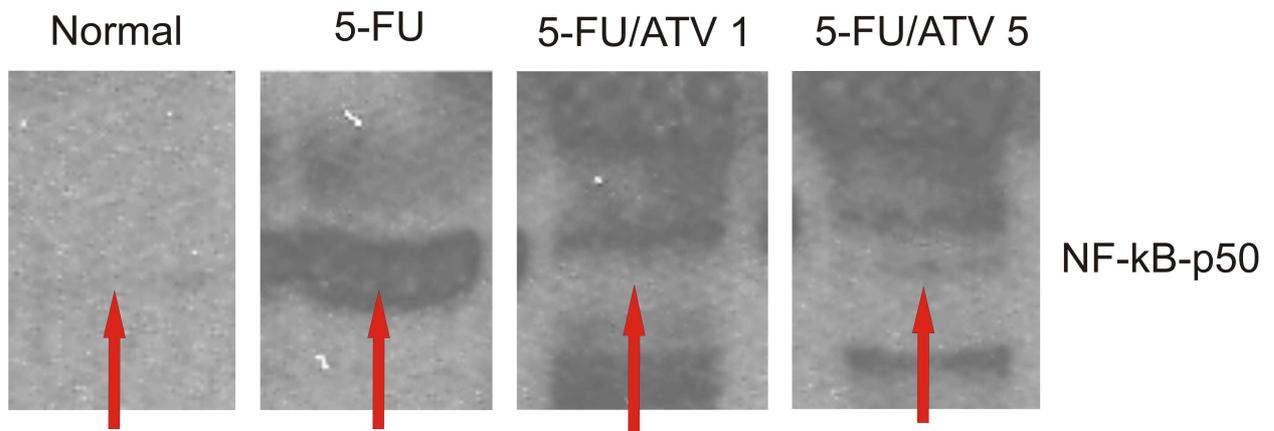
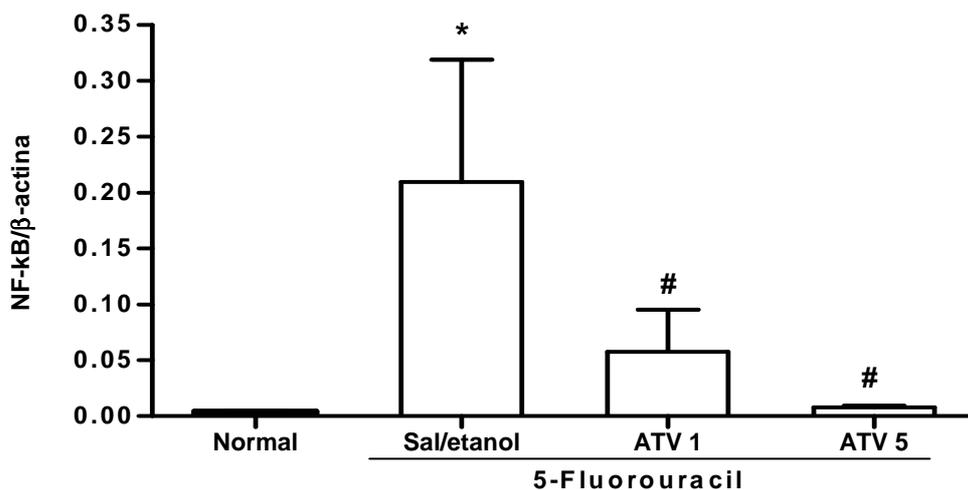
**A****B**

Figura 16. Efeito da atorvastatina na expressão do NF-kB-p50 (MW ~50kDa) na mucosa jugal de hamsters. A expressão do NF-kB-p50 foi detectada no homogenato da mucosa oral de hamsters, quatro animais por grupo, submetido à mucosite oral induzida por 5-FU. (A), representa bandas de Western Blot do NF-kB-p50. (B), representa a média± EPM da intensidade da banda NF-kB-p50 pela intensidade da banda de β actina. A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

## **4.2 Efeito da atorvastatina nos parâmetros sistêmicas em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

### 4.2.1 Efeito da atorvastatina na taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral

No início da investigação nós examinamos a taxa de sobrevivência dos animais submetidos à mucosite oral, durante os 10 dias do modelo experimental. Os animais normais ou submetidos apenas ao trauma mecânico (TM) tiveram 100 % de sobrevivência. Entretanto o grupo que recebeu salina ou salina/etanol 5 % (i.p.) e foi submetido à mucosite oral teve taxa de mortalidade de 40 %. A mucosite oral foi induzida por meio da administração de 5-FU no primeiro e segundo dia do experimento, seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Os animais com mucosite oral e tratados com atorvastatina 1 mg/Kg i.p mostraram 60 % de mortalidade e os grupos tratados com ATV 5 mg/Kg (5-FU/ATV5) ou 10 mg/Kg (5-FU/ATV10) tiveram taxa de mortalidade de 100 %. Entretanto, todos os animais tratados com atorvastatina 5 mg/Kg, i.p. e não submetidos a mucosite oral (salina/ATV5) sobreviveram durante os 10 dias do experimento. Estes resultados sugerem que altas doses de atorvastatina (5 mg/kg or 10 mg/kg), administradas junto com 5-FU, diminuem de forma significativa ( $P < 0,05$ ) a taxa de sobrevivência dos hamsters quando comparados aos animais com MO experimental tratados com salina ou salina/etanol 5%.

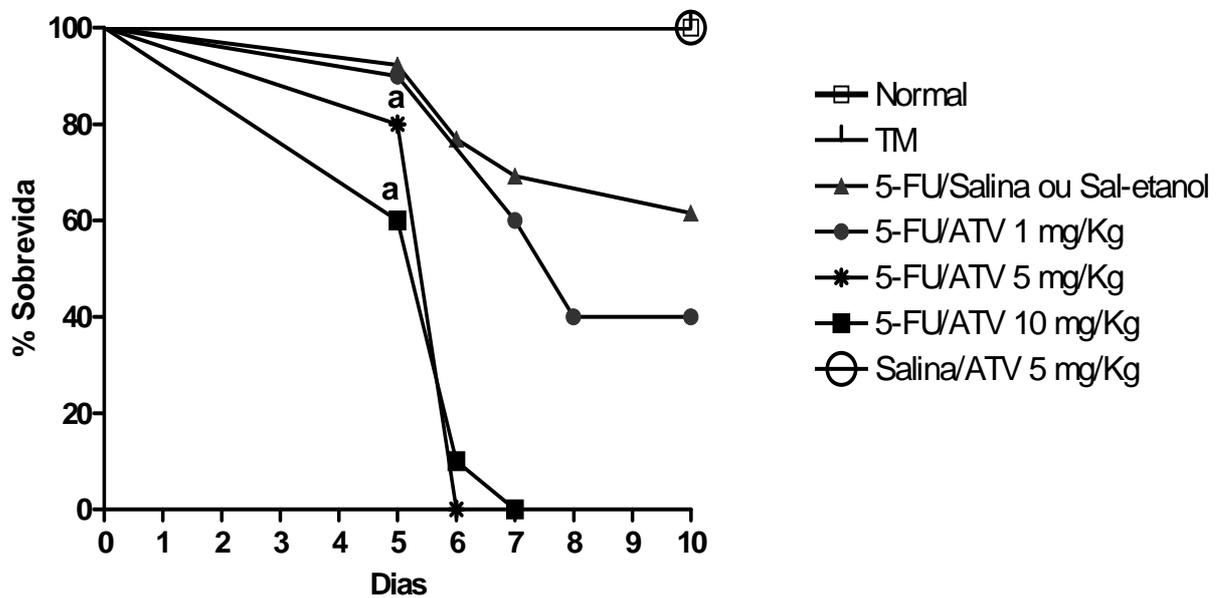


Figura 17: O pré-tratamento de hamsters com atorvastatina (ATV 5 e 10 mg/Kg) reduziu a taxa de sobrevivência dos animais com mucosite oral. A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. A taxa de sobrevivência foi determinada diariamente até o 10º dia do modelo experimental. Os animais foram pré-tratados por 10 dias consecutivos com ATV (1, 5 ou 10 mg/Kg, i.p.) ou salina ou salina/etanol 5 % uma vez ao dia. As doses de ATV foram administradas 30 minutos antes da injeção de 5-FU ou salina e diariamente durante 10 dias. Os dados são expressos como taxa de sobrevivência (%). ATV nas doses de 5 e 10 mg/Kg diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5 fluorouracil. (a,  $p < 0,05$ ; Kaphan Meier log rank test).

#### 4.2.2 Efeito da atorvastatina na análise histopatológica do fígado, rim, coração e pulmão dos hamsters submetidos à mucosite oral

Os animais submetidos à mucosite oral e tratados com atorvastatina 5 mg/Kg (Figura 18D, E e F), durante cinco dias, apresentaram injúria hepática em comparação ao grupo de animais normais (Figura 18-A), 5-FU/salina-etanol 5% (Figura 18-B) ou salina/ATV5 (Figura 18-C). As alterações hepáticas, observadas no grupo de hamsters 5-FU/ATV 5, foram caracterizadas por vacuolização (Figura 18-D, setas pretas), áreas de necrose focal (ponta de seta) e infiltrado de células inflamatórias (setas amarelas) (Figura 18-E e F). A análise histopatológica do rim, coração e pulmão não apresentaram alterações.

#### 4.2.3 Efeito da atorvastatina nas dosagens bioquímicas de hamsters submetidos à mucosite oral

Os animais com mucosite oral que receberam atorvastatina 5 mg/Kg (grupo 5-FU/ATV 5 mg/Kg), durante 5 dias, apresentaram aumento nos níveis séricos de transaminases hepáticas, aspartato amino transferase (AST) e alanino amino transferase (ALT), em comparação com o grupo 5-FU/salina ou 5-FU/salina-etanol 5% (Figura 19A e B, respectivamente). Entretanto, os animais não submetidos à mucosite oral e tratados com ATV 5 mg/Kg (salina/ATV5) não tiveram aumento sérico das transaminases. Outras dosagens bioquímicas, especificamente uréia e creatinina não apresentaram alterações significantes entre os grupos (Tabela 6).

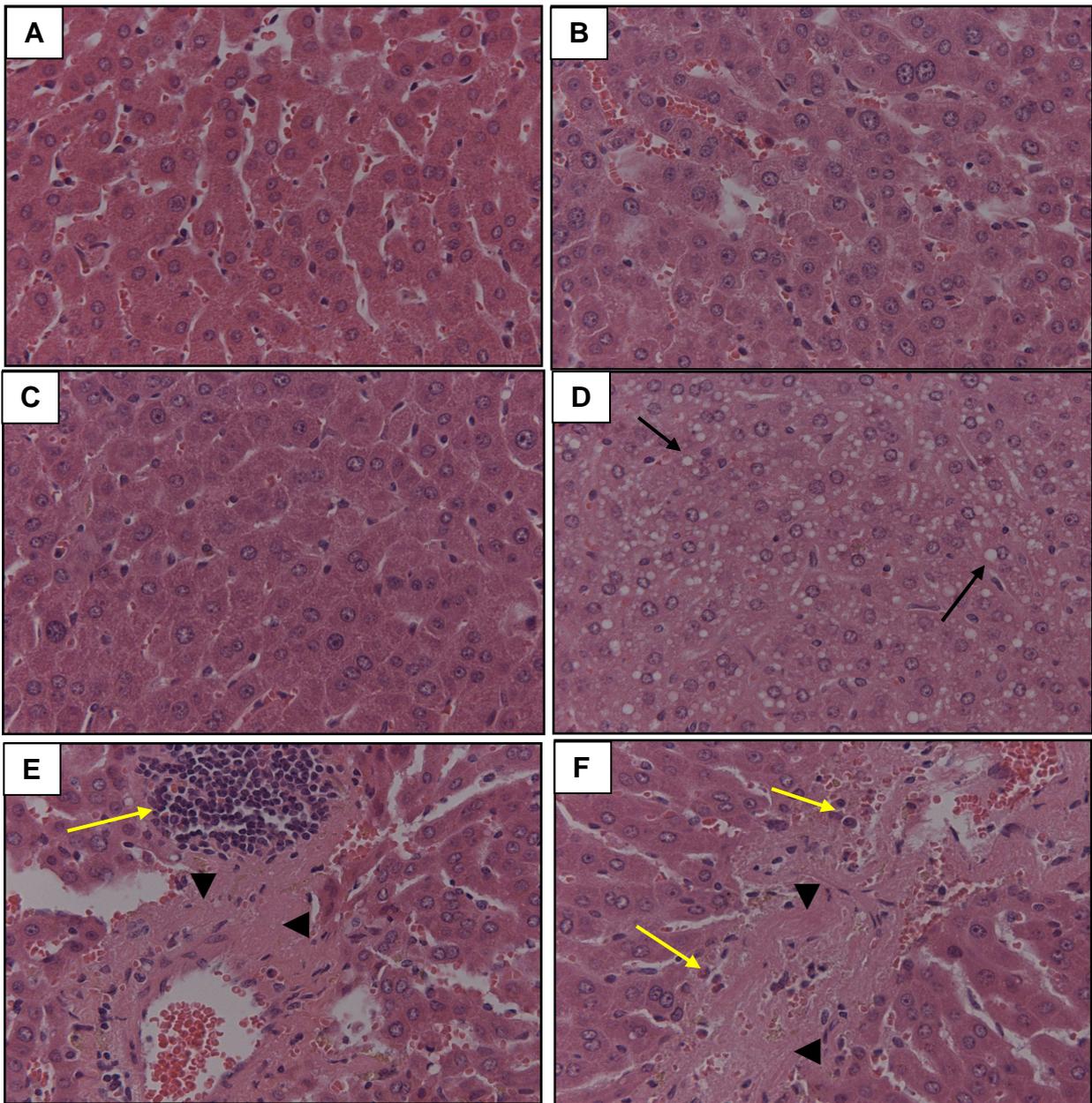


Figura 18. Efeito da atorvastatina (ATV 5mg/Kg) no histopatológico do fígado de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, durante 5 dias. Aspecto do fígado de hamsters normais (A), fígado de animais submetidos à mucosite oral que receberam salina/etanol 5% (B), fígado de animais submetidos ao trauma mecânico, que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (C), fígado de animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU e que receberam atorvastatina 5 mg/Kg, apresentam vacuolização (setas pretas) (D), áreas de necrose (ponta de seta) e infiltrado de células inflamatórias (setas amarelas) (E) e (F). As amostras foram processadas e coradas com Hematoxilina & Eosina (x40).

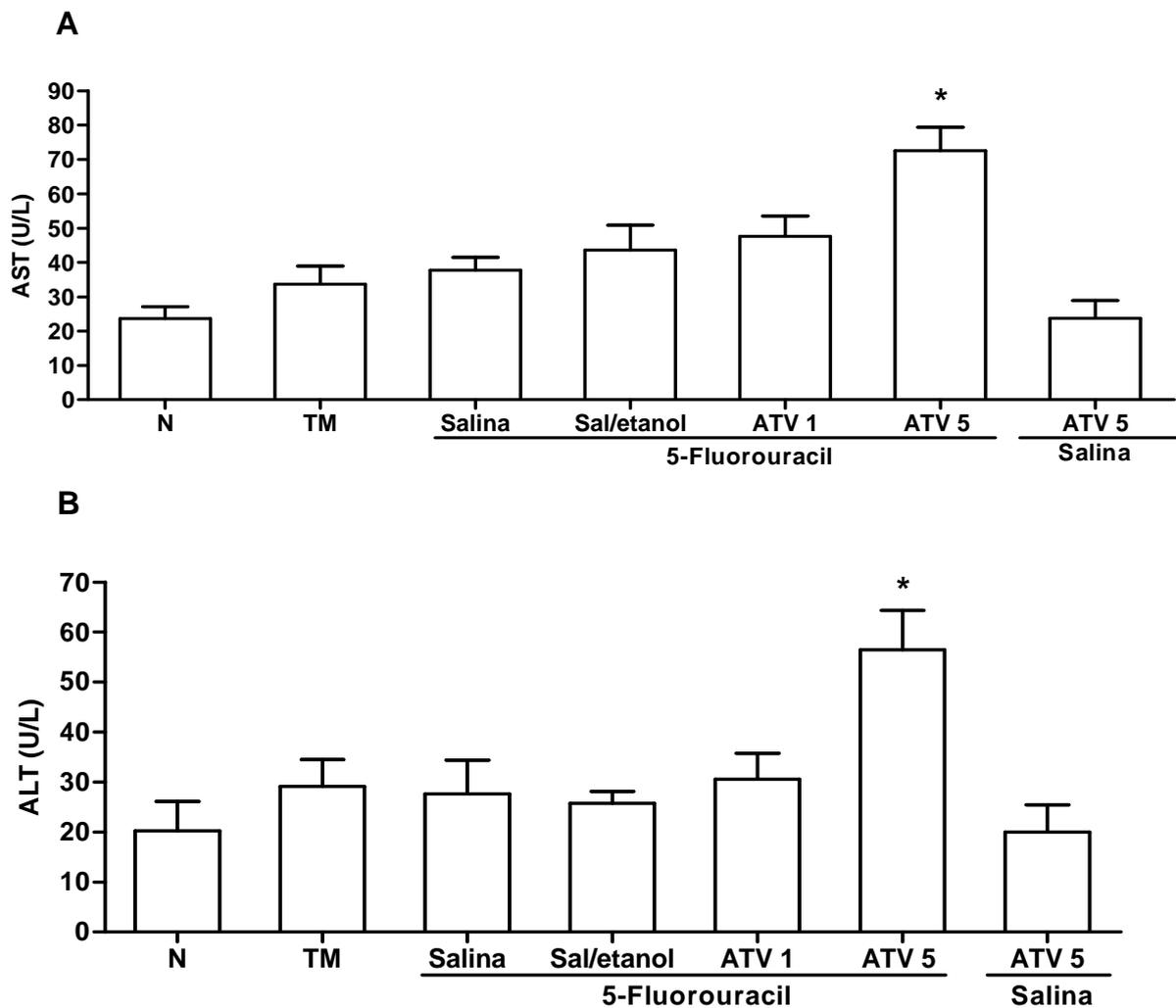


Figura 19: Atorvastatina 5 mg/Kg aumentou os níveis séricos das enzimas aspartato amino transferase (AST) (A) e alanina amino transferase (ALT) (B) em animais com mucosite oral induzida por 5-FU. A mucosite oral foi induzida em hamsters pela injeção de 5-fluorouracil (5-FU), seguido de trauma mecânico na mucosa jugal. Animais receberam, via i.p., injeção de atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg) ou salina ou salina/etanol 5%, 30 minutos antes do 5-FU e diariamente por 5 dias. Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV 5). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. As barras representam Média  $\pm$  EPM da concentração de AST (A) ou ALT (B). \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey.

Tabela 6. Efeito da atorvastatina na função renal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU

Grupos Experimentais	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Normal	39,20±4,044	0,03833±0,02386
TM	38,27±2,283	0,0175±0,01436
5-FU (salina)	61,54±11,38	0,04667±0,02963
5-FU (Sal/etanol)	41,17±5,356	0,0475±0,02323
5-FU/ATV 1	49,16±7,351	0,0860±0,03043
5-FU/ATV 5	39,55±6,775	0,0750±0,03122
Salina/ATV 5	50,91± 7,341	0,0400± 0,03082

Os dados representam a Média ± EPM de seis animais por grupo, ( $p > 0,05$ ) os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey.

#### 4.2.4 Efeito da atorvastatina no leucograma de hamsters submetidos à mucosite oral

Os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5 fluorouracil e tratados com salina, salina/etanol 5% ou atorvastatina 1 mg/Kg apresentaram leucopenia com neutropenia e linfopenia, em comparação com o grupo normal. Curiosamente atorvastatina na dose de 5mg/Kg amplificou a leucopenia, neutropenia e linfopenia dos hamsters submetidos à mucosite oral ( $p < 0,05$ ), em comparação com o grupo de animais com MO tratados com salina (5-FU/salina) ou salina-etanol (5-FU/sal-etanol) (Figura 20; Figura 21A e B). O grupo de animais salina/ATV 5 mgKg não tiveram alterações no número de leucócitos, quando comparados com o grupo controle normal (N).

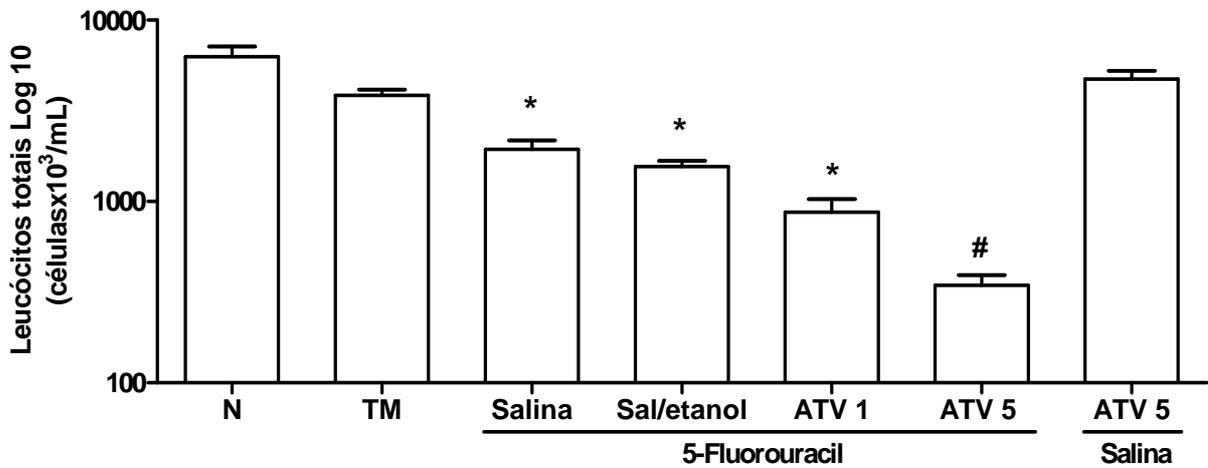


Figura 20: Atorvastatina na dose de 5mg/Kg amplificou a leucopenia de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e TM. Hamsters receberam salina, salina/etanol 5% ou atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg). Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV 5). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. As barras representam Média  $\pm$  EPM de leucócitos totais  $\times 10^3$ /mL de no mínimo seis animais por grupo. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey.

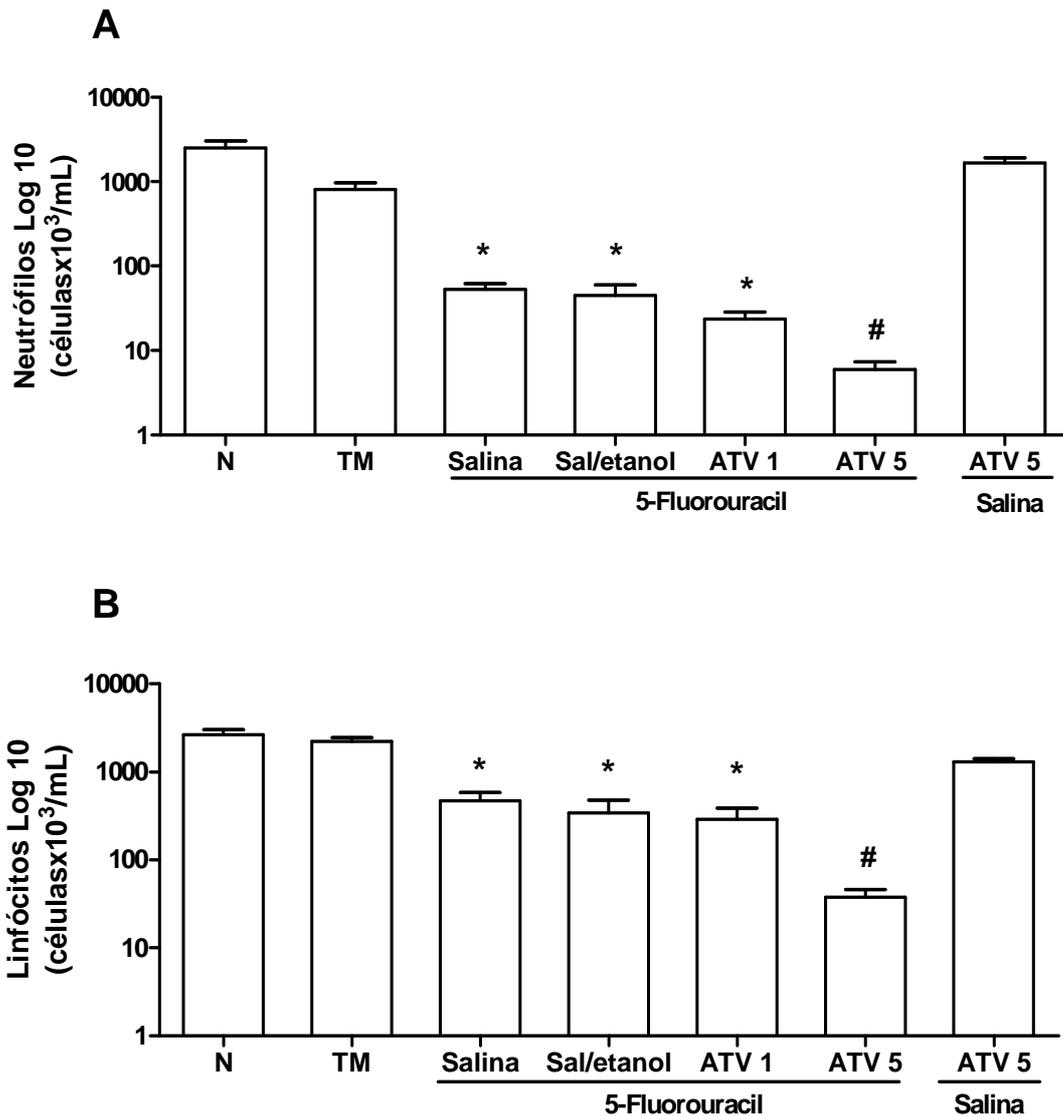


Figura 21: Atorvastatina na dose de 5mg/Kg amplificou a neutropenia e linfopenia de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. Hamsters receberam salina, salina/etanol 5% ou atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg). Os grupos controles consistiam em animais normais (N), animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), e animais submetidos ao trauma mecânico que receberam atorvastatina 5 mg/Kg e salina (salina/ATV 5). No 5º dia do experimento, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. As barras representam Média  $\pm$  EPM de neutrófilos (A), linfócitos (B)  $\times 10^3$ /mL de no mínimo seis animais por grupo. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais normais (N). # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais submetidos à mucosite experimental que receberam salina ou salina/etanol 5%. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey.

#### 4.2.5 Efeito da atorvastatina na bacteremia de hamsters submetidos à mucosite oral

A tabela 7 mostra a análise da presença bacteriana no sangue dos animais de diferentes grupos, no quinto dia do modelo experimental. Os animais normais não exibiram bacteremia (-). O grupo trauma mecânico (TM) e salina/ATV 5 mg/Kg (salina/ATV 5) exibiram bacteremia leve (+), em poucos animais, causada por bactéria Gram positiva (*Staphylococcus* coagulase negativo), em 40 % (2/5) e 50% (3/6) dos hamsters, respectivamente. Os hamsters com mucosite oral tratados com salina ou salina/etanol 5% ou atorvastatina (1 ou 5 mg/Kg) apresentaram maior grau de bacteremia (++), onde a proporção do número de hamsters com bacteremia/total de animais variou de 80% (4/5), 83,3% (5/6), 85,7% (6/7) e 100 % (5/5), respectivamente. A bactéria detectada no sangue dos animais com mucosite oral que receberam salina ou salina/etanol ou ATV1 foi principalmente *Staphylococcus* coagulase negativo na percentagem de 80% (4/5), 67% (4/6) e 57% (4/7), respectivamente. Curiosamente, os animais com mucosite oral tratados com atorvastatina 5 mg/Kg não apresentaram infecção por bactérias Gram positivas, exibiram 100 % (5/5) de bacteremia por bacilos Gram negativos (*Escherichia coli* ou *Klebsiella* sp. ou *Citrobacter* sp. ou *Arizona* sp.) e apresentaram maior taxa de mortalidade.

Tabela 7. Bacteremia no soro de hamsters submetidos a MO induzida por 5-FU durante cinco dias e identificação do microorganismo

Grupos Experimentais	Nº de animais com bacteremia/total (Grau de turvação)	Microorganismos				
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Citrobacter sp.</i>	<i>Arizona sp.</i>	<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative
Normal	0/6 (-)	-	-	-	-	-
TM	2/5 (+)	-	-	-	-	+ (2)
5-FU/salina	4/5(++)	-	-	-	-	+ (4)
5-FU/Sal-etanol)	5/6(++)	+ (1)	-	-	-	+ (4)
5-FU/ATV 1	6/7 (++)	-	+ (2)	-	-	+ (4)
5-FU/ATV 5	5/5 (++)	+ (1)	+ (2)	+ (1)	+ (1)	-
Salina/ATV 5	3/6 (+)	-	-	-	-	+ (3)

A bacteremia foi analisada pelo grau de crescimento bacteriano no meio de cultura BHI pela densidade de turvação do meio de cultura, variando de negativo (-) a positivo (+, ++). O microorganismo identificado foi expresso como negativo (-) ou positivo (+) para *Escherichia coli* ou *Klebsiella sp.* ou *Citrobacter sp.* ou *Arizona sp.* ou *Staphylococcus coagulase negativa*. O numeral na coluna microorganismos indica o número de animais com resultado positivo/número de animais no grupo teste.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU apresentaram no 5º dia do modelo experimental hiperemia, eritema acentuado, hemorragia e úlceras. Estas alterações foram confirmadas pela análise histopatológica, a qual constatou edema moderado, vasodilatação, infiltrado de células inflamatórias, áreas hemorrágicas, eventual ou discreta ulceração e ausência de abscessos. No 10º dia, correspondendo ao pico da mucosite, as alterações macroscópicas foram caracterizadas por hiperemia, eritema acentuado, hemorragia, úlceras e a evidência de abscessos, que também foram confirmadas pela análise histopatológica, onde se observou edema, acentuado infiltrado de células inflamatórias com prevalência de neutrófilos, áreas hemorrágicas, vasodilatação, úlceras extensas e abscessos.

Esses dados são corroborados por estudos realizados no nosso laboratório que demonstraram previamente que o tratamento de hamsters com 5-fluorouracil seguido por trauma mecânico na mucosa jugal causa lesão, começando no 5º dia, com pico no 10º dia, quando eritema, hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras extensas e abscessos são observados. Os sinais de lesão diminuem entre os dias 12 e 16 do modelo experimental (LEITÃO *et al.*, 2007; LEITÃO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2005).

A mucosite oral é caracterizada por intensa reação inflamatória, causada pela injúria direta de agentes quimioterápicos ou radiação às células basais do epitélio e tecido subjacente, com conseqüente apoptose das células epiteliais basais. Além do dano direto às células, ocorre geração de espécies reativas de oxigênio que também causam alterações significativas ao epitélio. As espécies reativas de oxigênio ativam segundos mensageiros que estimulam fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que regula a expressão de múltiplos genes imunes e inflamatórios. Dessa forma, a ativação do NF- $\kappa$ B resulta na liberação de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias como, interleucina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que em conjunto amplificam os danos à mucosa oral (HALL *et al.*, 1995; SONIS *et al.*, 2000).

A investigação do efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-FU teve como base vários trabalhos na literatura que demonstraram que as estatinas apresentam um expressivo potencial terapêutico em diferentes modelos experimentais de inflamação (AKTAS *et al.*, 2003; BARSANTE *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2000; LEUNG *et al.*, 2003; LIAO; LAUFS, 2005; MURPHY *et al.*, 2001; PAHAN *et al.*, 1997; ROMANO *et al.*, 2000; SANTODOMINGO-GARZÓN *et al.*, 2006; TAKEMOTO; LIAO, 2001; WAGNER *et al.*, 2002; WAGNER; SCHWABE; HECKER, 2002; WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2001; YOUSSEF, STUVE, PATARROYO, 2002). Entretanto o papel da atorvastatina na mucosite oral experimental não havia sido escrito na literatura até a publicação do nosso trabalho (MEDEIROS *et al.*, 2010).

O efeito protetor da atorvastatina na mucosite oral, observado no presente estudo, é demonstrado inicialmente pela redução da lesão macroscópica e microscópica induzida por 5-fluorouracil no 5<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia da mucosite oral e está associado à redução na infiltração de neutrófilos na mucosa oral, detectada pela análise histopatológica e pela atividade de mieloperoxidase. A mieloperoxidase é uma enzima microbicida e representa 2 a 5% do total de proteínas celulares presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo amplamente utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado (BOS; WEVER; ROOS, 1978; BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Estudos anteriores demonstraram que as estatinas diminuem a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e do fator de ativação de leucócitos (LFA-1), além de inibir a interação ente ICAM-1–LFA-1, resultando em inibição da ativação de neutrófilos (WEITZ-SCHMIDT *et al.*, 2001). O tratamento de pacientes pós-infarto com ATV também reduz a expressão de moléculas de adesão, ICAM e selectina E, envolvidas na migração de neutrófilos (BALDASSARRE *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi demonstrado que ATV reduz a migração transendotelial dos neutrófilos mediada pelo fator quimiotático formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), por reduzir a ativação Rho nos neutrófilos, mediada por (fMLP). Em um modelo de artrite induzida por adjuvante, ATV (1-10 mg) diminui o influxo de neutrófilos e a concentração de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL5 and CCL2) (BARSANTE *et al.*, 2005).

Na presente investigação, mostrou-se que os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  aumentados no

tecido da mucosa jugal no 5º do modelo experimental, o que não foi evidenciado para os níveis de IL1- $\beta$ . No 10º dia, evidenciou-se aumento nos níveis de ambas as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  na mucosa jugal dos hamsters com MO. Esses dados são confirmados por estudos clínicos que sugerem a participação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na fisiopatologia da mucosite oral induzida por radioterapia (EPSTEIN *et al.*, 1986; EPSTEIN *et al.*, 1989; EPSTEIN *et al.*, 2001).

Demonstramos que ATV 1 ou 5 mg/Kg reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  no 5º dia do modelo experimental e ATV 1 mg/Kg diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no 10º dia da MO induzida por 5-FU. Vale ressaltar ainda, que no presente trabalho, o tratamento com ATV 1 ou 5 mg/Kg, durante 5 dias, reduziu consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  na mucosa jugal de hamsters. De forma similar aos nossos dados, outros autores mostraram que atorvastatina diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BARSANTE *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2000; SOLHEIM *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2009). Estudo realizado no nosso laboratório demonstrou que agentes capazes de inibir a síntese de citocinas, como pentoxifilina e talidomida, possuem efeito protetor na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters (LIMA *et al.*, 2005). De fato, o efeito protetor da atorvastatina na mucosite oral, evidenciado no presente trabalho, pode ser explicado, em parte, pela capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Levando em consideração que a liberação de citocinas pró-inflamatórias são largamente dependentes do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (WU, 2005), decidimos avaliar a participação do NF- $\kappa$ B na mucosite oral induzida por 5-FU. O NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) é o fator de transcrição eucariótico mais estudado pelo importante envolvimento com vias de transdução de sinal, papel na hematopoiese, imunidade inata e adaptativa, bem como participa de processos neuro-degenerativos (HAYDEN; GHOSH, 2004). De fato o NF- $\kappa$ B não é uma proteína simples, mas uma família de dímeros protéicos, que se ligam a uma seqüência comum conhecida como sítio KB (KARIN; LIN, 2002). Em mamíferos, cinco membros foram identificados e constituem o p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), c-Rel, and Rel-B. O p50/p65 e seus homodímeros correspondentes são amplamente expressos na maioria das células (KARIN; LIN, 2002).

Duas vias regulam a atividade dessas proteínas: a via NF-kB canônica, que normalmente é ativada em resposta a infecções virais, microbianas ou em resposta a exposição de citocinas pró-inflamatórias e a via alternativa que é ativada por alguns membros da família do fator de necrose tumoral (KARIN; LIN, 2002). O NF-kB-p65 é um membro da via canônica, enquanto o NF-kB-p50 e Ikk $\alpha$  fazem parte da via alternativa. O NF-kB tem um papel fundamental na regulação da expressão de numerosos genes envolvidos nas respostas imunes ou inflamatórias (BOWIE; O'NEIL, 2000; SHA, 1998). No citoplasma ele pode está ligado ao inibidor IKappa B (I $\kappa$ B), sendo necessário um estímulo adequado para fosforilar o I $\kappa$ B, e liberar o NF-kB. Uma vez no núcleo, o NF-kB regula diversos genes, incluindo citocinas pró-inflamatórias e NOSi (LIOU, 2002).

Considerando o exposto, nossos dados demonstraram um aumento da expressão do fator de transcrição NF-kB-p50 na mucosa jugal dos hamsters com MO determinada por Western Blot, e evidenciamos uma maior marcação por imunohistoquímica. Observamos também uma maior imunomarcação para o NF-kB p-50 NLS na mucosa jugal de hamsters com mucosite oral induzida por 5-FU. Esses resultados podem indicar que o NF-kB p50 contribui para a síntese de mediadores inflamatórios produzidos na mucosite oral, através da via alternativa do NF-kB. Esses dados estão de acordo com evidências que confirmam a participação do NF-kB na sinalização e amplificação da mucosite oral (REDDING, 2005; SONIS, 2002; SONIS *et al.*, 2002; SONIS, 2004b).

A maioria dos agentes anti-neoplásicos promovem toxicidade nas células normais da mucosa do trato gastrointestinal, especificamente na cavidade oral, pela ativação do NF-kB com conseqüente apoptose das células normais (ARLT *et al.*, 2001; DONEPUDI *et al.*, 2001; KATO *et al.*, 2000; WELDON *et al.*, 2001). Entretanto, o 5-fluorouracil, quimioterápico utilizado no presente estudo, suprime o NF-kB nas células tumorais da glândula salivar humana e nas células do tecido normal mediada pelo aumento da expressão do I $\kappa$ B- $\alpha$  (AOTA *et al.*, 2000). Além disso, esses autores sugerem que o 5-FU induz apoptose como uma conseqüência da supressão do NF-kB, que leva a inativação de proteínas anti-apoptóticas (TRAF-2 e c-IAP). O resultado do trabalho de Aota *et al.* (2000) parece ser conflitante com o nosso achado de aumento da expressão do NF-kB na mucosa jugal dos animais

submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU. Embora o 5-fluorouracil promova supressão do NF-kB, para mediar o dano inicial no tecido normal, as respostas subseqüentes ao dano celular resultam em aumento da expressão do NF-kB. A apoptose das células epiteliais induzida por 5-FU promove outras respostas biológicas complexas que contribuem para o aumento da expressão do NF-kB mediado por espécies reativas de oxigênio e outros mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  (REDDING, 2005; SONIS, 2004b).

Nossos resultados mostraram que atorvastatina 1 ou 5 mg/Kg reduziu consideravelmente o aumento da expressão do NF-kB-p50, por western blot e a imunomarcação do NF-kB-p50 e NF-kB-p50 NLS na mucosa jugal dos hamsters com MO induzida por 5-FU. Esses achados estão de acordo com trabalhos descritos previamente, onde os autores sugerem que as estatinas diminuem a ativação do NF-kB, especificamente por diminuir a fosforilação e a degradação do inibidor do NF-kB, IKappa B, por um caminho dependente da síntese do mevalonato (HILGENDORFF *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2005; PLANAVILA; LAGUNA; VAZQUEZ-CARRERA, 2005; PRASAD *et al.*, 2005).

Prosseguindo no estudo, dados da literatura revelam que as citocinas pró-inflamatórias são conhecidas por estimular a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) em vários tipos de células (MONCADA *et al.*, 1991), com conseqüente produção de óxido nítrico. A participação do óxido nítrico no desenvolvimento da mucosite oral foi descrita anteriormente em trabalho realizado no nosso laboratório, no qual o tratamento com inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (1400 W e aminoguanidina) melhorou a mucosite oral induzida por 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2007). No presente trabalho, observou-se aumento dos níveis de nitrito e maior marcação imunohistoquímica para NOSi na mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral por 5-FU, o que sugere aumento da síntese de óxido nítrico no tecido.

Este gás possui um efeito dual, existem evidências do envolvimento do NO em funções benéficas e também prejudiciais. Os efeitos benéficos podem incluir a atividade antimicrobiana e a modulação imunitária (ALLAKER *et al.*, 2001; KRÖNCKE *et al.*, 1997). Por outro lado, os efeitos prejudiciais incluem uma ação

citotóxica para os tecidos do hospedeiro adjacentes, resultando em lesão tecidual em várias patologias inflamatórias (BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1996; DICKSON *et al.*, 1999; FANG, 1997; FORD *et al.*, 1997; HUTCHESON *et al.*, 1990; KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994; LAPPIN *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2004, 2005; LOHINAI *et al.*, 2001; MIDDLETON *et al.*, 1993; PARKINSON *et al.*, 1997; PETROS *et al.*, 1991; PETROS; BENNETT; VALLANCE, 1994; ROCHA *et al.*, 2002; SINGER *et al.*, 1996; SORRELLS *et al.*, 1996; SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; STEFANOVIC-RACIC *et al.*, 1993; TEPPERMAN *et al.*, 1993; UNNO *et al.*, 1997).

O presente estudo demonstrou que ATV 1 ou 5 mg/kg claramente diminuiu os níveis de nitrito e reduziu a imunomarcação para NOSi na mucosa jugal dos hamsters submetidos a MO, o que resulta em uma proteção do tecido. Vários dados da literatura sugerem que a atorvastatina interfere com a produção de óxido nítrico, especificamente por regular a expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzida ou constitutiva. Atorvastatina inibe a expressão da enzima NOSi induzida por citocinas no endotélio da aorta de ratos, entretanto este efeito não foi observado no músculo liso (WAGNER; SCHWABE; HECKER, 2002). Estes autores ainda sugerem que a atorvastatina atenua a translocação nuclear do fator de transcrição NF-kB e do fator transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT-1), fornecendo, dessa forma, o mecanismo molecular para explicar o efeito inibitório na expressão endotelial da NOSi. Portanto a inibição da ativação do NF-kB encontrado no nosso trabalho pode ser uma explicação para a diminuição da expressão da NOSi na mucosite oral induzida por 5-FU mostrado aqui. Outros autores demonstraram que as estatinas diminuem a expressão endotelial da NOSi no rim de ratos transgênicos que expressam renina e angiotensina humana (PARK *et al.*, 2000) e no endotélio de coelhos com hipercolesterolemia (ALFON *et al.*, 1999).

De forma contrária, outros estudos sugerem que as estatinas aumentam a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida por IL-1  $\beta$  nas células do músculo liso da aorta de ratos (MUNIYAPPA *et al.*, 2000) e em miócitos cardíacos (IKEDA *et al.*, 2001), mediada pela inibição da proteína G, especificamente da família Rho. Em suma, a participação das estatinas na expressão da NOSi é bastante complexa. Conforme descrito anteriormente, alguns trabalhos mostram a inibição da expressão (ALFON *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2000; WAGNER;

SCHWABE; HECKER, 2002), outros sugerem aumento da expressão da NOSi (FINDER *et al.*, 1997; HAUSDING *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001; KOLYADA; FEDTSOV; MADIAS, 2001; MUNIYAPPA *et al.*, 2000).

Uma explicação razoável para esta controvérsia pode está relacionada aos diferentes estímulos inflamatórios para induzir a expressão da NOSi e também os diferentes tipos de células utilizados nas condições experimentais. As estatinas também interferem com a expressão da NOSe por meio de três mecanismos bem estabelecidos: primeiro, por prolongar o tempo de meia-vida do RNAm da NOSe (LAUFS; LIAO, 1998), segundo por reduzir a proteína de membrana caveolin-1, responsável por inibir a NOSe (PLENZ *et al.*, 2004) e terceiro por promover a ativação da via fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/proteína cinase Akt que aumenta a atividade da NOSe (SIMONCINI *et al.*, 2000).

O fato de a atorvastatina ter diminuído os níveis de nitrito na mucosa jugal dos animais com mucosite oral parece não corroborar com a importância da produção local de NO pelos neutrófilos para a atividade microbicida destas células, principalmente na fase ulcerativa da mucosite oral, onde ocorre proliferação de microorganismos, principalmente bactérias (SONIS, 2004b). Entretanto, a diminuição dos níveis de nitrito, nos grupos com MO e tratados com ATV, demonstrado no presente estudo, é relevante, pois o NO participa da patogenia da MO (LEITÃO *et al.*, 2007; SONIS *et al.*, 2002). O que nos leva a crer que o efeito protetor da ATV na mucosite oral pode ser explicado também pela diminuição do NO.

Adicionalmente, nós demonstramos que os estoques de glutathiona na mucosa jugal dos hamsters submetidos a MO por 5-FU estão diminuídos quando comparados com os animais normais, o que aumenta a injúria celular. Corroborando com nossos dados, a diminuição dos estoques de glutathiona na MO induzida por 5-FU foi previamente constatada em um estudo realizado no nosso laboratório (LEITÃO *et al.*, 2008). Na presente investigação, atorvastatina 1 mg/kg restaurou os níveis de glutathiona no décimo dia do modelo experimental, o que sugere uma diminuição no estresse oxidativo e um efeito protetor na injúria tecidual, uma vez que a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio constituem uma das etapas iniciais para o desenvolvimento da mucosite oral

(SONIS, 2004). O estresse oxidativo é definido como uma mudança no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro componente, com conseqüente dano as macromoléculas biológicas e disfunção celular (SUYS *et al.*, 2007).

Ademais, glutathiona (GSH) é um tripeptídeo contendo tiol, que desempenha um papel central na defesa contra danos oxidativos e em vias de sinalização. Após a oxidação, GSH é transformado em glutathiona dissulfeto (GSSG). As concentrações de GSH e GSSG são indicadores de funcionalidade celular e estresse oxidativo (BALLATORI *et al.*, 2009). Este antioxidante intracelular está envolvido em várias funções biológicas, incluindo remoção de radicais livres, detoxificação de xenobióticos e carcinógenos, reações redox, biossíntese de DNA e proteínas (JOHNSON *et al.*, 2003). Assim, nossos resultados sugerem que a administração de ATV restaurando os níveis de glutathiona, protege o dano e regula a proliferação celular após exposição ao 5-fluorouracil, responsável por gerar quantidades tóxicas de radicais livres.

De forma similar aos nossos resultados, outros estudos confirmaram os efeitos antioxidantes das estatinas. Lovastatina e simvastatina previniram o estresse oxidativo na lesão aterosclerótica (PUTTANANJIAH *et al.*, 2010). Atorvastatina demonstrou efeito antioxidante nos pacientes com aterosclerose, evidenciado por redução nos níveis de malonaldeído (MDA) e aumento na atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e superóxido desmutase (LI *et al.*, 2010). O efeito antioxidante da atorvastatina também foi evidenciado em um modelo experimental em ratos, com dieta rica em colesterol (YASIM *et al.*, 2010). As estatinas também diminuem o estresse oxidativo envolvido nos mecanismos de arritmias cardíacas (BLOOM *et al.*, 2010).

Dando continuidade ao nosso estudo, nós demonstramos que animais com MO induzida por 5-FU apresentaram maior taxa de mortalidade quando comparados com os hamsters normais, este resultado é consistente com dados da literatura que sugerem que a mucosite oral é extremamente debilitante e causa dificuldades alimentares com perda ponderal para o paciente com mucosite oral (ELTING *et al.*, 2007), bem como para os animais submetidos a MO experimental (LIMA *et al.*, 2005).

Embora a atorvastatina, no presente estudo, tenha considerável efeito protetor na mucosite oral, curiosamente, nós observamos que altas doses de ATV (5 e 10 mg/Kg) reduz a taxa de sobrevida dos animais com mucosite oral, depois do quinto dia do modelo experimental, comparados com o grupo 5-FU. Esse dado sugere uma interação negativa entre 5-fluorouracil e atorvastatina. As doses de atorvastatina (5 e 10 mg/Kg) descritas no presente estudo são proporcionalmente maiores que as utilizadas na prática clínica, cerca de 4 e 9 vezes maiores, em mg/Kg de massa corpórea, respectivamente. Uma vez que a dose máxima de atorvastatina recomendada na prática clínica é 80 mg/dia (WATERS, 2005; ARCA, 2007). Esta dose corresponde a pouco mais de 1 mg/Kg, dose que teve efeito positivo no nosso estudo, com o mínimo de efeitos colaterais.

As doses de atorvastatina, utilizadas na nossa investigação, estão de acordo com outros estudos experimentais que sugerem evidências dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (ANDERSON *et al.*, 1995; ESSIG *et al.*, 1998; LAUFS *et al.*, 1997; LAUFS *et al.*, 2000; TORRENS *et al.*, 2009). Entretanto, doses proporcionalmente maiores que as utilizadas na prática clínica representam um dos problemas mais comuns nos modelos experimentais com animais, o que limita, em parte, a combinação de dados clínicos com dados experimentais (BLANCO-COLIO *et al.*, 2003).

Para esclarecer a hipótese de interação negativa entre 5-FU e ATV, nós fizemos uma avaliação sistêmica dos animais no 5º dia da MO, com análise histopatológica dos principais órgãos (fígado, rim, coração e pulmão), determinação do leucograma e parâmetros bioquímicos. Escolhemos as doses de atorvastatina 1 e 5 mg/Kg e não realizamos estudo dos parâmetros sistêmicos com a dose de 10 mg/Kg, uma vez que estes animais apresentaram mortalidade semelhante aos hamsters do grupo 5-FU/ATV 5.

Nossos resultados revelaram que os animais tratados apenas com ATV 5 mg/Kg sem MO (grupo salina/ATV 5) não apresentaram mudanças nos níveis séricos das transaminases hepáticas, aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), bem como não existiam evidências histopatológicas de alterações hepáticas. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que

mostraram uma baixa incidência de elevação das transaminases hepáticas e rara progressão para insuficiência hepática durante a terapia com estatinas (COHEN *et al.*, 2006; NAKAD *et al.*, 1999; RIDRUEJO; MANDO, 2002; TOLMAN, 2002; VUPPALANCHI *et al.*, 2006; WATERS, 2005).

Outros dados sugerem que o consumo de estatinas se relaciona com elevação moderada nos níveis das transaminases hepáticas que geralmente é autolimitada e reversível, após a descontinuação do tratamento (DAVIDSON, 2001). A origem desta alteração, na maioria das vezes, deve-se a um aumento nos valores do colesterol, bem como as causas hepáticas, como infecção, fígado com gordura e alcoolismo (BRUGUERA *et al.*, 2005).

Embora alguns autores atribuam à atorvastatina um maior envolvimento com a hepatotoxicidade (ABOURJAILY; ALSHEIKH-ALI; KARAS, 2003), na literatura existe um escasso número de efeitos adversos hepáticos relatados. Existem evidências de que o consumo de atorvastatina está associado com elevação assintomática das transaminases (BLACK; BAKKER-ARKEMA; NAWROCKI, 1998), quadros de hepatite colestática (WIERZBICKI; CROOK, 1999), hepatite aguda (NAKAD *et al.*, 1999), insuficiência hepática fulminante (PERGER *et al.*, 2003) e hepatite imunológica (PELLI; SETTI, 2004). Em uma investigação com mais de 4000 pacientes tratados com atorvastatina, apenas um paciente desenvolveu icterícia colestática (BLACK; BAKKER-ARKEMA; NAWROCKI, 1998).

Curiosamente, na presente investigação, a combinação de atorvastatina (5 mg/kg) com o 5-FU resultou em aumento nos níveis das transaminases hepáticas AST e ALT, no quinto dia do experimento. Este dado foi associado a alterações hepáticas, como vacuolização, necrose focal e infiltrado inflamatório, evidenciadas por histopatológico. Ademais, nós acreditamos que a intensidade da lesão hepática, analisada isoladamente, não é responsável pelo aumento da mortalidade dos hamsters. Nós não investigamos o mecanismo pelo qual a associação 5-FU+ATV promoveu lesão hepática, entretanto especulamos se o dano hepático não seria mediado por toxicidade direta no fígado. Uma vez que atorvastatina é metabolizada pelo citocromo P 450 (CORSINI *et al.*, 1999) e o 5-FU é inativado por redução do

anel de pirimidina pela ação da enzima diidropirimidina desidrogenase encontrada no fígado e em outros tecidos (GREM, 2001).

Em relação aos aspectos sistêmicos, nós observamos que a contagem de leucócitos no quinto dia da mucosite oral revelou amplificação da leucopenia, neutropenia e linfopenia em animais tratados com ATV 5 mg/kg e submetidos a MO induzida por 5-FU. Leucopenia é o evento esperado em pacientes tratados com a maioria dos agentes quimioterápicos e é consistente com um estudo realizado no nosso laboratório que mostrou leucopenia em animais submetidos à mucosite oral experimental (LIMA *et al.*, 2005). Embora leucopenia não seja descrita como uma reação adversa usual das estatinas, quando utilizadas isoladamente, várias estatinas exibiram previamente efeitos antiproliferativos nas células tumorais, mediada por ação regulatória no ciclo celular (CHAN; OZA; SIU, 2003; DEMIERRE *et al.*, 2005; KEYOMARSI *et al.*, 1991;).

O mecanismo exato dos efeitos das estatinas no crescimento e proliferação das células não está completamente esclarecido. Acredita-se que as estatinas têm grandes efeitos sobre as células porque inibem a formação de compostos isoprenóides, farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato, essenciais para a isoprenilação de proteínas G de baixo peso molecular, Ras, Rho e Rab. Estas proteínas são essenciais para a transdução de sinal, proliferação, apoptose e diferenciação das células (NEWMAN; MAGEE, 1993).

Juntamente com a lesão hepática, nós especulamos se a amplificação da leucopenia, mediada por atorvastatina, explica a alta mortalidade do grupo de animais com MO e tratados com ATV 5 mg/Kg. Sabe-se que pacientes com neutropenia e mucosite oral possuem um risco relativamente maior de desenvolver infecção do que os indivíduos sem mucosite (ETING *et al.*, 2003). Outros dados mostraram que a infecção é uma das maiores causas de mortalidade em pacientes com MO e tratados com agente quimioterápico e que o risco de infecção aumenta com a severidade e duração da neutropenia (NAIDU *et al.*, 2004).

Com o intuito de investigar se a diminuição da sobrevivência dos animais estava relacionada a infecção bacteriana secundária a leucopenia, nós realizamos

cultura microbiológica do sangue dos animais no quinto dia do experimento. Os grupos TM e salina/ATV 5 exibiram bacteremia em poucos animais e não foi associado com mortes, todos os hamsters sobreviveram durante os 10 dias do experimento. Nós especulamos que o estresse da anestesia e o trauma mecânico podem resultar na translocação da microflora da mucosa jugal para a circulação sistêmica dos animais, com conseqüente bacteremia por bactéria Gram positiva. Os hamsters com mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com salina ou salina/etanol ou ATV 1 (5-FU/ATV 1) exibiram bacteremia, mas com predominância de bactéria gram positiva (*staphylococcus* coagulase negativo) e embora leucopênicos, foram capazes de sobreviver.

Por outro lado, os animais 5-FU/ATV 5 tiveram bacteremia por bactéria Gram negativa. A bacteremia pode ter contribuído para a elevada taxa de mortalidade neste grupo. Nós especulamos que a incapacidade dos animais para resolver a infecção sistêmica se associa à severa leucopenia e mais especificamente a neutropenia, que foi amplificada após a associação do tratamento do 5-FU com ATV 5. Neutropenia e deficiências dos neutrófilos estão relacionadas com infecções bacterianas. Os grânulos dos neutrófilos contêm uma grande diversidade de proteínas que têm atividade antimicrobiana direta (KLEBANOFF, 2005; NAUSEEF, 2007).

O fato de os animais 5-FU/ATV 5 terem bacteremia é uma aparente contradição com a demonstração prévia de que o tratamento de pacientes com atorvastatina reduziu a mortalidade causada por sepse (ALMONG, 2003; MCGROWN; BROOKES, 2007), bem como, para o fato de que atorvastatina melhorou a sobrevivência de camundongos submetidos à sepse experimental (MERX *et al.*, 2004). Uma possível explicação consiste no fato de que atorvastatina controla a inflamação na sepse em pacientes que estão inicialmente imunocompetentes (KRUGER *et al.*, 2006). Em conclusão, o tratamento com ATV mostrou uma ação protetora importante na MO induzida por 5-FU. Entretanto a associação de 5-FU com altas doses de ATV merece atenção, em relação à hepatotoxicidade e leucopenia. A possibilidade de utilizar atorvastatina no tratamento da mucosite oral em humanos merece mais investigações.

## 6. CONCLUSÕES

- A atorvastatina preveniu a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil, evidenciada por análise macroscópica e microscópica da mucosa jugal dos hamsters, bem como pela melhora de vários parâmetros inflamatórios e oxidantes.
- A associação de 5-fluorouracil e atorvastatina em altas doses (5 e 10 mg/Kg) aumentou a taxa de mortalidade dos animais, causando alterações hepáticas, amplificação do leucograma e bacteremia.

## REFERÊNCIAS

- ABOURJAILY, H. M.; ALSHEIKH-ALI, A. A.; KARAS, R. H. Comparison of the frequency of adverse events in patients treated with atorvastatin or simvastatin. **Am J Cardiol.**, v.91, p.999-1002, 2003.
- ADCOCK, B. B.; HORNSBY, L. B.; JENKINS, K. Dermographism: an adverse effect of atorvastatin. **J Am Board Fam Pract.**, v.14, p.148-151, 2001.
- AHMAD, H.; CHENG-LAI, A.; Pitavastatin: a new HMG-CoA reductase inhibitor for the treatment of hypercholesterolemia. **Cardiol Rev.**, v.18, n.5, p.264-7, 2010.
- AHMED, T.; ENGELKING, C.; SZALYGA, J.; HELSON, L.; COOMBE, N.; COOK, P.; CORBI, D.; PUCCIO, C.; CHUN, H.; MITTELMAN, A. Propantheline prevention of mucositis from etoposide. **Bone Marrow Transplant.**, v. 12, n.2, p. 131-132, 1993.
- AKTAS, O., WAICZIES, S., SMORODCHENKO, A., DORR, J., SEEGER, B., PROZOROVSKI, T., SALLACH, S., ENDRES, M., BROCKE, S., NITSCH, R., ZIPP, F. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. **J. Exp. Med.**, v.97, p.725-733, 2003.
- ALBERTS, A. W.; CHEN, J.; KURON, G.; HUNT, V. ; HUFF, J. ; HOFFMAN, C. *et al.* Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.77, p.3957-3961, 1980
- ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **Am J Cardiol.**, v. 62, p.10J -15J, 1988.
- ALFON, J.; GUASCH, J.F.; BERROZPE, M.; BADIMON, L. Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Atherosclerosis**, v.145, p.325-331, 1999.
- ALLAKER, R. P.; MENDEZ, L. S. S.; HARDIE, J. M.; BENJAMIN, N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. **Oral Microbiol Immunol.**, v.16, p.253-256, 2001.
- ALMOG, Y. Statins, Inflammation and Sepsis. **Chest**, v.124, p.740-743, 2003.
- ALVAREZ, E.; FEY, E. G.; VALAX, P.; YIM, Z.; PETERSON, J. D.; MESRI, M. *et al.* Preclinical Characterization of CG53135 (FGF-20) in Radiation and Concomitant Chemotherapy/Radiation-induced Oral Mucositis. **Clinical Cancer Research**, v.9, n.9, p.3454-3461, 2003.
- ANBINDER, A. L.; JUNQUEIRA, J. C.; MANCINI, M. N. G.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R. F.; CARVALHO, Y. R. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. **Braz Dent J.**, v.17, p.267-73, 2006.

ANDERSON, T. J.; MEREDITH, I. T.; YEUNG, A.C. et al. The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.488-493, 1995.

ANDREJAK, M.; GRAS, V.; MASSY, Z. A.; CARON, J. Adverse effects of statins. **Therapie.**, v.58, p.77-83, 2003.

ANLIKER, M. D.; WUTHRICH, B. Chronic urticaria to atorvastatin. **Allergy**, v.57, p.366, 2002.

AOTA, K.; AZUMA, M.; YAMASHITA, T.; TAMATANI, T.; MOTEGI, K.; ISHIMARU, N. et al. 5-fluorouracil induces apoptosis through the suppression of NF-kB activity in human salivary gland cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.273, p.1168-1174, 2000.

ARCA, M. Atorvastatin: A Safety and Tolerability Profile. **Drugs**, v.67, p.63-69, 2007.

ARLT, A.; VORNDAMM, J.; BREITENBROICH, M.; FOLSCH, U. R.; KALTHOFF, H.; SCHMIDT, W. E. et al. Inhibition of NF-kB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. **Oncogene**, v.20, p.859-868, 2001.

AWIDI, A.; HOMSI, U.; KAKAIL, R.I.; MUBARAK, A.; HASSAN, A.; KELTA, M.; MARTINEZ, P.; SULAITI, S.; AL-QADY, A.; JAMHOURY, A.; DANIEL, M.; CHARLES, C.; AMBROSE, A.; EL-ALOOSY, A. S. Double-blind, placebo-controlled cross-over study of oral pilocarpine for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patients with cancer. **Eur J Cancer.**, v.37, n.16, p.2010-2014, 2001.

AZNAR, S.; LACAL, J. C. Rho signals to cell growth and apoptosis. **Cancer Lett.**, v.165, p.1-10, 2001.

BACKES, J. M.; HOWARD, P. A. Association of HMG-CoA reductase inhibitors with neuropathy. **Ann Pharmacother.**, v.37, p.274-8, 2003.

BAKRI, R.; WANG, J.; WIERZBICKI, A. S.; GOLDSMITH, D. Cerivastatin monotherapy-induced muscle weakness, rhabdomyolysis and acute renal failure. **Int J Cardiol.**, v.91, p.107-109, 2003.

BALDASSARRE, D.; PORTA, B.; CAMERA, M.; AMATO, M.; ARQUATI, M.; BRUSONI, B. et al. Study Group. Markers of inflammation, thrombosis and endothelial activation correlate with carotid IMT regression in stable coronary disease after atorvastatin treatment. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v.19, p.481-90, 2009.

BALLANTYNE, C. M.; CORSINI, A.; DAVIDSON, M. H. et al. Risk for myopathy with statin therapy in High-Risk Patients. **Arch Int Med.**, v.163, p.553-63, 2003.

BALLATORI, N.; KRANCE, S.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem.**, v.390, n.3, p.191-214, 2009.

BAMBA, S.; ANDOH, A.; YASUI, H.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. **J Gastroenterol.**, v.38, p.548-54, 2003.

BARASCH, A.; ELAD, S.; ALTMAN, A.; DAMATO, K.; EPSTEIN, J. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis. **Support Care Cancer**, v.14, p.528-532, 2006.

BARASCH, A.; PETERSON, D. E. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol.**, v.39, n.2, p.91-100, 2003.

BARASCH, A.; PETERSON, D. E.; TANZER, J. M, *et al.* Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **Cancer**, v.76, n.12, p.2550-2556, 1995.

BARSANTE, M. M.; ROFFE, E.; YOKORO, C. M.; TAFUR, W. L.; SOUZA, D. G.; PINHO, V. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol.**, v. 516, p.282-289, 2005.

BELAICHE, G.; LEY, G.; SLAMA, J. L. Acute pancreatitis associated with atorvastatin therapy. **Gastroenterol Clin Biol.**, v.24, p.471-472, 2000.

BELLON, G.; MONBOISSE, J. C. ; RANDOUX, A. ; BOREL, J. P. Effects of preformed proline and proline amino acid precursors (including glutamine) on collagen synthesis in human fibroblast cultures. **Biochim Biophys Acta.**, v.930, n.1, p.39-47, 1987.

BENSADOUN, R. J. ; FRANQUIN, J. C. ; CIAIS, G. *et al.* Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation- induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. **Support Care Cancer.**, v.7,n.4 p.244-252, 1999.

BITRAN, J. D. ; SAMUELS, B. ; KLEIN, L. *et al.* Tandem high-dose chemotherapy supported by hematopoietic progenitor cells yields prolonged survival in stage IV breast cancer. **Bone Marrow Transplant.**, v.17, p.157-162, 1996.

BLACK, D. M.; BAKKER-ARKEMA, R. G.; NAWROCKI, J. W. An overview of the clinical safety profile of Atorvastatin (Lipitor), a new HMG-CoA reductase inhibitor. **Arch Intern Med.**, v.158, p.577-84, 1998.

BLANCO-COLIO, L. M.; TUNON, J.; MARTIN-VENTURA, J. L.; EGIDO, J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. **Kidney International**, v. 63, p.12-23, 2003.

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.**, v.25, p.1269-1278, 2000.

BLOOM, H. L.; SHUKRULLAH, I.; VELEDAR, E.; GUTMANN, R.; LONDON, B.; DUDLEY, J. R. S. C. Statins Decrease Oxidative Stress and ICD Therapies. **Cardiology Research and Practice**, v. 2010, p.1-7, 2010.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; NAPOLI, C.; LERMAN, A. Statin effects beyond lipid lowering: are they clinically relevant? **Eur. Heart. J.**, v.24, p.225-248, 2003.

BOROWSKI, B.; BENHAMOU, E.; PICO, J.; LAPLANCHE, A.; MARGAINAUD, J. P.; HAYAT, M. Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomized controlled trial comparing two protocols of dental care. **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v.30B, p.93-7, 1994.

BOS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochim Biophys Acta**, v.525, p.37-44, 1978.

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**, v. 342, n.8867, p.338-40, 1993.

BOURCIER, T.; LIBBY P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, p.556-562, 2000.

BOWIE, A. G.; O'NEILL, L. A. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **J Immunol.**, v. 165, p.7180-7188, 2000.

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

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.96, p.11041-11048, 1999.

BRUGUERA, M.; BARRERA, J. M.; CORRADI, F.; MAS, A. Hipertransaminasemia superior a 400 U/l en adultos atendidos en un hospital terciario. Estudio prospectivo de su etiología. **Gastroenterol Hepatol.**, v.28, p.15-9, 2005.

CASCINU, S.; FEDELI, A.; FEDELI, S.L.; CATALANO, G. Oral cooling (cryotherapy), an effective treatment for the prevention of 5-fluorouracil-induced stomatitis. **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v. 30, p. 234-236, 1994.

CHAN, C. W. H.; CHANG, A. M.; MOLASSIOTIS, A.; LEE, I. Y. M. ; LEE, G. C. T. Oral complications in Chinese cancer patients undergoing chemotherapy. **Support Care Cancer**, v.11, p.48-55, 2003.

CHAN, K. A.; ANDRADE, S. E. ; BOLES, M. ; BUIST, D. S. ; CHASE, G. A. ; DONAHUE, J. G. *et al.* Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. **Lancet**, v.355, p.2185-8, 2000.

CHAN, K. K.; OZA, A. M.; SIU, L. L. The statins as anticancer agents. **Clin Cancer Res.**, v. 9, p.10-9, 2003.

CHAZERAIN, P.; HAYEM, G.; HAMZA, S.; BEST, C.; ZIZA, J. M. Four cases of tendinopathy in patients on statin therapy. **J Bone Spine**, v.68, p.430-433, 2001.

CHEN, J. C.; CHEN, H. M.; SHYR, M. H.; FAN, L. L.; CHI, T. Y.; CHI, C. P. *et al.* Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J Formos Med Assoc.**, v.99, p.213-218, 2000.

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.**, v. 224, n.3, p.703-708, 1996.

CHI, K. H.; CHEN, C. H.; CHAN, W. K.; CHOW, K. C.; CHEN, S. Y.; YEN, S. H.; CHAO, J. Y.; CHANG, C. Y.; CHEN, K. Y. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on oral mucositis in head and neck cancer patients after cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy. **J Clin Oncol.**, v.13, n.10, p.2620-2628, 1995.

CHMURA, S. J.; NODZENSKI, E.; BECKETT, M. A.; KUFEL, D. W.; QUINTANS, J.; WEICHSELBAUM, R. R. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v.57, p.1270-5, 1997.

CHUNG, Y. S.; LEE, M. D.; LEE, S. K.; KIM, H. M.; FITZPATRICK, L. A. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.85, p.1137-42, 2000.

COEFFIER, M.; MARION, R.; LEPLINGARD, A.; LEREBOURS, E.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P. Glutamine decreases interleukin-8 and interleukin-6 but not nitric oxide and prostaglandins e(2) production by human gut in-vitro. **Cytokine**, v.18, n.2, p.92-97, 2002.

COHEN, D. E.; ANANIA, F. A.; CHALASANI, N. National Lipid Association Statin Safety Task Force Liver Expert Panel. An assessment of statin safety by hepatologists. **American Journal of Cardiology**, v.97, n.8A, p.77C-81C, 2006.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R. *et al.* New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol Ther.**, v.84, p.413-428, 1999.

CORTI, R.; OSENDE, J. I.; FALLON, J. T.; FUSTER, V.; MIZSEI, G.; JNEID, H. *et al.* The selective peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonist has an additive effect on plaque regression in combination with simvastatin in experimental atherosclerosis: In vivo study by high-resolution magnetic resonance imaging. **J Am Coll Cardiol.**, v.43, p.464-473, 2004.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v.295, p.2387-2392, 2002.

CRAWFORD, J.; O'ROURKE, M. A. Vinorelbine (Navelbine)/carboplatin combination therapy: dose intensification with granulocyte colony-stimulating factor. **Semin Oncol.**, v.21, p.73-78, 1994.

CULY, C.; SPENCER C. Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. **Drugs**, v.61, p.641-684, 2001.

DAVIDSON, M. H. Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors. **Drugs**, v.61, p.197-206, 2001.

DAVIGNON, J. Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. **Circulation**, v.109, p.III-39-III-43, 2004.

DE ANGELIS, P. M.; SVENDSRUD, D. H.; KRAVIK, K. L.; STOKKE T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. **Molecular Cancer**, v.5, n.20, p.1-25, 2006.

DE CASTRO, M. L; HERMO, J. A.; BAZ, A, LUACES, C.; PEREZ, R.; CLOFENT J. Acute cholestatic hepatitis after atorvastatin reintroduction. **Gastroenterologia y Hepatologia**, v.29, n.1, p.21-4, 2006.

DELHASE, M.; KARIN, M. The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v.64, p.491-503, 1999.

DEMIERRE, M. F.; HIGGINS, P. D.; GRUBER, S. B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S. M. Statins and cancer prevention. **Nat Rev Cancer.**, v. 5, p.930-42, 2005.

DENHAM, J. W.; HAUER-JENSEN, M. The radiotherapeutic injury-a complex 'wound'. **Radiother Oncol.**, v.63, p.129-145, 2002.

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.**, v. 277, p. 1281-1287, 1999.

DIMMELER, S.; AICHER, A. ; VASA, M. ; MILDNER-RIHM, C. ; ADLER, K. ; TIEMANN, M. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. **J Clin Invest.**, v.108, p.391-397, 2001.

DODD, M. J.; LARSON, P. J.; DIBBLE, S. L.; MIASKOWSKI, C.; GREENSPAN, D.; MACPHAIL, C. *et al.* Randomized clinical trial of chlorhexidine versus placebo for prevention of oral mucositis in patients receiving chemotherapy. **Oncol Nurs Forum.**, v.23, p.921-7, 1996.

DODD, M. J.; MIASKOWSKI, C.; GREENSPAN, D. *et al.* Radiation-induced mucositis: a randomized clinical trial of micronized sucralfate versus salt & soda mouthwashes. **Cancer Invest.**, v.21, n.1, p.21-33, 2003.

DONEPUDI, M.; RAYCHAUDHURI, P.; BLUESTONE, J. A.; MOKYR, M. B. Mechanism of melphalan-induced B7-1 gene expression in P815 tumor cells. **J Immunol.**, v.166, p.6491-6499, 2001.

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.**, v.9, p. 409-413, 1992.

DUENAS-GONZALEZ, A.; SOBREVILLA-CALVO, P.; FRIAS-MENDIVIL, M.; GALLARDO-RINCON, D.; LARA-MEDINA, F.; AGUILAR-PONCE, L. *et al.* Misoprostol prophylaxis for high-dose chemotherapy-induced mucositis: a randomized double-blind study. **Bone Marrow Transplant.**,v.17, p.809-12, 1996.

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

EDWARDS, C. J.; HART, D. J.; SPECTOR, T. D. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. **Lancet**, v.355, p.2218-9, 2000.

EGIDO, J.; HERNANDEZ-PRESA, M. A, TUNON, J. *et al.* Transcription factor kB (NF-kB) and cardiovascular disease. **Cardiovasc Risk Factors**, v.9, p.159-168, 1999.

ELTING, L. S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S. B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E. B. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v.98, p.1531, 2003.

ELTING, L. S.; COOKSLEY, C. D.; CHAMBERS, M. S.; GARDEN, A. S. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.68, n.4, p.1110-20, 2007.

ENDO, A.; KURODA, M.; TANZAWA K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. **FEBS Lett.**, v.72, p.323-6, 1976.

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**, v.89, n.11, p.2258-65, 2000.

EPSTEIN, J. B.; SILVERMAN, S. J. R.; PAGGIARINO, D. A.; CROCKETT, S.; SCHUBERT, M. M.; SENZER, N. M.; LOCKHART, P. B.; GALLAGHER, N. 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**, v.92, n.4, p.875-885, 2001.

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.**, v. 62, n.2, p.145-148, 1986.

EPSTEIN, J. B.; STEVENSON-MOORE, P.; JACKSON, S.; MOHAMED, J. H.; SPINELLI, J. J. Prevention of oral mucositis in radiation therapy: a controlled study with benzydamine hydrochloride rinse. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.16, n.6, p. 1571-1575, 1989.

EPSTEIN, J. B.; WONG, F.L. The efficacy of sucralfate suspension in the prevention of oral mucositis due to radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.28, n.3, p.693-698, 1994.

EPSTEIN, J. B.; VICKERS, L.; SPINELLI, J.; REECE, D. Efficacy of chlorhexidine and nystatin rinses in prevention of oral complications in leukemia and bone marrow transplantation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.73, p.692-9, 1992.

ESSIG, M.; NGUYEN, G.; PRIE, D.; ESCOUBET, B.; SRAER, J. D.; FRIEDLANDER, G. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase the fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and rho proteins. **Circ. Res.**, v.83, p.683-690, 1998.

FANG, F.C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest.**, v.99, n.12, p.2818-2825, 1997.

FELD, R. The role of surveillance cultures in patients likely to develop chemotherapy-induced mucositis. **Support Care Cancer.**, v.5, n.5, p. 371-375, 1997.

FERRETTI, G. A.; ASH, R. C.; BROWN, A. T.; PARR, M. D.; ROMOND, E. H.; LILLICH, T. T. Control of oral mucositis and candidiasis in marrow transplantation: a prospective, double-blind trial of chlorhexidine digluconate oral rinse. **Bone Marrow Transplant.**, v.3, n.5, p.483-93, 1988.

FERRO, D.; PARROTTO, S.; BASILI, S.; ALESSANDRI, C.; VIOLI, F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.**, v.36, p.427-431, 2000.

FINDER, J. D.; LITZ, J. L.; BLASKOVICH, M. A. *et al.* Inhibition of protein geranylgeranylation causes a superinduction of nitric-oxide synthase-2 by interleukin-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem.**, v.272, p.13484-8, 1997.

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.**, v. 32, n. 2, p. 275-282, 1997.

FROMIGUE, O.; HAMIDOUCHE, Z.; MARIE, P. J. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 Cascade by Atorvastatin Reduces Osteosarcoma Cell Invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.45, p.30549-30556,2008.

FROMIGUÉ, O.; HAY, E. ; MODROWSKI, D. ; BOUVET, S. ; JACQUEL, A. ; AUBERGER, P. ; MARIE, P. J. RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. **Cell Death Differ.**, v.13, p.1845-1856, 2006.

GABRILOVE, J. L.; JAKUBOWSKI, A.; SCHER, H.; STERNBERG, C.; WONG, G.; GROUS, J.; YAGODA, A.; FAIN, K.; MOORE, M.A.; CLARKSON, B. *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. **N Engl J Med.**, v. 318, n.22, p.1414-1422, 1998.

GATE, L.; PAUL, J.; BA, G. N.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother.**, v.53, p.169-180, 1999.

GERSHOVIC, O. E; LYMAN, A. E. Liver function test abnormalities and pruritus in a patient treated with atorvastatin: case report and review of literature. **Pharmacotherapy**, v.24, n.1, p.150-4, 2004.

GLEW, R. H. **Metabolismo de lipídeos II**: vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: Devlin TM, coordenador. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 4a ed. São Paulo: Edgard Blücher, p.328-67, 1998.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v.343, p.425 -430, 1990.

GONZALEZ-PONTE, M. L.; GONZALEZ-RUIZ, M.; DUVOS, E.; GUTIERREZ-INIGUEZ, M. A.; OLALLA, J. I.; CONDE E. Atorvastatin-induced severe thrombocytopenia. **Lancet**, v.352, p.1284, 1998.

GOOSEN, T. C.; BAUMAN, J. N.; DAVIS, J. A; YU, C.; HURST, S. I.; WILLIAMS, J. A, LOI, C. M. Atorvastatin Glucuronidation Is Minimally and Nonselectively Inhibited by the Fibrates Gemfibrozil, Fenofibrate, and Fenofibric Acid. **Drug Metabolism And Disposition**, v.35, p.1315-1324, 2007.

GRAAF, M. R.; RICHEL, D. J.; VAN NOORDEN, C. J.; GUCHELAAR, H. J. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. **Cancer Treat Rev.**, v.30, p.609-641, 2004

GRAHAM, K.; PECORARO, D.; VENTURA, M.; MEYER C. Reducing the incidence of stomatitis using a quality assessment and improvement approach. **Cancer Nurs.**, v.16, p.117-22, 1993.

GREM, J. L. 5-fluoropyrimidines. *In*: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy**: principles and practice. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 8, p. 185-264, 2001.

GRIFFIN, J. P. The withdrawal of Baycol (cerivastatin). **Adverse Drug React Toxicol Rev.**, v.20, n.4, p.177-80, 2001.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; BAIREY-MERZ, C. N. *et al.* Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **Circulation**, v.11, p.227-239, 2004.

GRUNDY, S. M.; HMGCoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. **N. Engl. J. Med.**, v.319, p.24-33, 1988.

HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; STUART, R.K. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol.**, v.23, n.12, p.1256-1260, 1995.

HAMILTON-CRAIG, I. Statin-associated myopathy. **Med J Aust.**, v.175, p.486-489, 2001.

HAUSDING, M.; WITTECK, A.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F.; VON EICHELSTREIBER, C.; FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Inhibition of small G proteins of the Rho family by statins or Clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. **Br J Pharmacol.**, v.131, p.553-561, 2000.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes & Development**, v.18, p.2195-2224, 2004.

HERRSTEDT, J. Prevention and management of mucositis in patients with cancer. **Int J Antimicrob Agents.**, v.16, p.161-3, 2000.

HILGENDORFF, A.; MUTH, H.; PARVIZ, B.; STAUBITZ, A.; HABERBOSCH, W.; TILLMANN, H. *et al.* Statins differ in their ability to block NF-Kappa B activation in human blood monocytes. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v.41, p.397-401, 2003.

HOFFMAN, W. F.; ALBERTS, A. W.; ANDERSON, P. S.; CHEN, J. S.; SMITH, R. L.; WILLARD, A. K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4.1 side chain ester derivatives of mevinoxin. **J Med Chem.**, v.29, p.849-52, 1986.

HORIGUCHI, A.; SUMITOMO, M.; ASAKUMA, J.; ASANO, T.; HAYAKAWA, M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor, fluvastatin, as a novel agent for prophylaxis of renal cancer metastasis. **Clin Cancer Res.**, v.10, p.8648-8655, 2004.

HORSMANS, Y.; DESAGER, J. P.; HARVENGT, C. Biochemical changes and morphological alterations of the liver in guinea-pigs after administration of simvastatin (HMG CoA reductase-inhibitor). **Pharmacology & Toxicology**, v.67, n.4, p.336-9, 1990.

HORSMANS, Y. Differential metabolism of statins: importance in drug-drug interactions. **Eur Heart J Supplements.**, v.1, p.T7-T12, 1999.

HSIA, J.; MORSE, M.; LEVIN, V. Effect of simvastatin on bone markers in osteopenic women: a placebo-controlled, dose-ranging trial. **BMC Musculoskeletal Disord.**, v3, p.1471-2474, 2002.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem.**, v.29, n.11, p.1349-1353, 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.**, v.101, n.4, p. 815-820, 1990.

HUXFORD, T.; HUANG, D. B.; MALEK, S.; GHOSH, G. The crystal structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B complex reveals mechanisms of NF- $\kappa$ B Inactivation. **Cell**, v.95, p.759-770, 1998.

IBRAHIM, E. M.; AL-MULHIM, F. A. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced oral mucositis in non-neutropenic cancer patients. **Med Oncol.**, v.14, n.1, p. 47-51, 1997.

IKEDA, U.; SHIMPO, M.; IKEDA, M.; MINOTA, S.; SHIMADA, K. Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.38, p.69-77, 2001.

JACOBSON, T. A. Statin safety: lessons from new drug applications for marketed statins. **American ournal of Cardiology**, v, 97, p.44C-51C, 2006.

JANSMAN, F. G.; SLEIJFER, D. T.; DE GRAAF, J. C; COENEN, J. L.; BROUWERS, J. R. Management of chemotherapy-induced adverse effects in the treatment of colorectal cancer. **Drug Saf.**, v.24, p.353-67, 2001.

JIMENEZ-ALONSO, J.; OSORIO, J. M.; GUTIERREZ-CABELLO, F.; LOPEZ, O.; LEON, L.; MEDIAVILL, G. J. D. Atorvastatin-induced cholestatic hepatitis in a young woman with systemic lupus erythematosus. Grupo Lupus Virgen de las Nieves. **Arch Intern Med.**, v.159, p.1811-1812, 1999.

JOHNSON, A. T.; KAUFMANN, Y. C.; LUO, S.; TODOROVA, V.; KLIMBERG, V. S. Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. **J Surg Res.**, v.111, p.222-228, 2003.

JOHNSON, J. T.; FERRETTI, G. A.; NETHERY, W. J.; VALDEZ, I. H.; FOX, P. C.; NG, D.; MUSCOPLAT, C. C.; GALLAGHER, S. C. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **N Engl J Med.**, v. 329, n.6, p. 390-395, 1993.

JONES, J. A.; AVRITSCHER, E. B.; COOKSLEY, C. D.; MICHELET, M.; BEKELE, B. N.; ELTING, L. S. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Support Care Cancer.**, v.14, n.6, p.505-515, 2006.

JONES, P. H.; DAVIDSON, M. H.; STEIN, E. A. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR\* Trial). **Am J Cardiol.**, v.92, p.152-160, 2003.

KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat Immunol.**, v.3, p.221-227, 2002.

KATO, T.; DUFFEY, D. C.; ONDREY, F. G.; DONG, G.; CHEN, Z.; COOK, J. A. *et al.* Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kB. **Head and Neck**, v.22, p.748-759, 2000.

KAUFMAN, D.C.; CHABNER, B.A. Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. *In*: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy: principles and practice**. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. cap. 1, p. 1-16, 2001.

KENNY, S. Effect of two oral care protocols on the incidence of stomatitis in hematology patients. **Cancer Nurs.**, v.13, p.345-53, 1990.

KEYOMARSI, K.; SANDOVAL, L.; BAND, V.; PARDEE, A. B. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. **Cancer Res.**, v.51, p.3602-9, 1991.

KIM, J. H; PARK, Y. M.; SHIN, J. S.; PARK, S. J.; CHOI, J. H.; JUNG, H. J.; PARK, H.J.; LEE, K.T. Fraxinellone Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Expression by Negatively Regulating Nuclear Factor-kappa B in RAW 264.7 Macrophages Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.32, n.6, p.1062-1068, 2009.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: Friend and foe. **J Leukoc Biol.**, v.77, p.598-625, 2005.

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

KOLYADA, A. Y.; FEDTSOV, A.; MADIAS, N. E. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase inhibitors Upregulate Inducible NO Synthase Expression and Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. **Hypertension**, v.38, p.1024-1029, 2001.

KOSTLER, W. J.; HEJNA, M. ; WENZEL, C. *et al.* Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA Cancer J Clin.**, v. 51, p. 290-315, 2001.

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

KRUGER, P. ; FITZSIMMONS, K.; COOK, D. ; JONES, M. ; NIMMO, G. *et al.* Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. **Intensive Care Med.**, v.32, p.75-79, 2006.

KUREISHI, Y.; LUO, Z.; SHIOJIMA, I.; BIALIK, A.; FULTON, D.; LEFER, D. J. *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and

promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med.**, v.6, p.1004-1010, 2000.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nat Med.**, v.6, p.1399-1402, 2000.

KYRKLUND, C.; BACKMAN, J. T.; KIVISTO, K. T. *et al.* Rifampin greatly reduces plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. **Clin Pharmacol Ther.**, v.68, p.592-597, 2000.

LACAVE, A.J.; BARON, F.J.; ANTON, L.M.; ESTRADA, E.; DE SANDE, L.M.; PALACIO, I.; ESTEBAN, E.; GRACIA, J.M.; BUESA, J.M.; FERNANDEZ, O.A. *et al.* Combination chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil 5-day infusion in the therapy of advanced gastric cancer: a phase II trial. **Ann Oncol.**, v. 2, n. 10, p. 751-754, 1991.

LALLA, R. V.; PETERSON, D. E. Oral mucositis. **Dent Clin North Am.**, v.49, n.1, p.167-184, 2005.

LALLA, R. V.; SCHUBERT, M. M.; BENSADOUN, R. J.; KEEFE, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. **Support Care Cancer.**, v.4, n.6, p.558-565, 2006.

LALLA, R. V.; SONIS, S. T.; PETERSON, D. E. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. **Dent Clin North Am.**, v.52, n.1, p.1-17, 2008.

LAPPIN, D.F.; KJELDSEN, M.; SANDER, L.; KINANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J Periodontal Res.**, v. 35, n. 6, p. 369-373, 2000.

LAU, W. C.; WASKELL, L. A.; WATKINS, P. B.; NEER, C. J. Atorvastatin Reduces the Ability of Clopidogrel to Inhibit Platelet Aggregation- A New Drug-Drug Interaction. **Circulation.**, v.107, p.32-37, 2003.

LAUFS, U.; FATA, V. L.; LIAO, J. K. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.50, p.31725-31729, 1997.

LAUFS, U.; GERTZ, K.; HUANG, P.; NICKENIG, G.; BOHM, M.; DIRNAGL, U. *et al.* Atorvastatin Up regulates Type III Nitric Oxide Synthase in Thrombocytes, Decreases Platelet Activation, and Protects from Cerebral Ischemia in Normocholesterolemic Mice. **Stroke**, v.31, p.2442-2449, 2000.

LAUFS, U.; LIAO, J. K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.24266-24271, 1998.

LEBORGNE, J. H.; LEBORGNE, F.; ZUBIZARRETA, E.; ORTEGA, B.; MEZZERA, J. Corticosteroids and radiation mucositis in head and neck cancer: a double-blind placebo-controlled randomized trial. **Radiother Oncol.**, v.47, p.145-8, 1998.

LEE, A. J.; MADDIX, D. S. Rhabdomyolysis secondary to a drug interaction between simvastatin and clarithromycin. **Ann Pharmacother.**, v.35, p.26-31, 2001.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; ORIA, 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.**, v. 59, n. 5, p.603-12, 2007.

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

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R.A.; CHAVES, H.V.; ROCHA, F.A.C.; LIMA, V.; BRITO, G.A.C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v.76, n.6, p. 956–963, 2005.

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

LEUNG, B. P.; SATTAR, N.; CRILLY, A.; PRACH, M.; MCCAREY, D. W.; PAYNE, H.; MADHOK, R.; CAMPBELL, C.; GRACIE, J.A.; LIEW, F. Y.; MCINNES, L. B. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. **J. Immunol.**, v.170, p.1524-1530, 2003.

LEVI, F.A.; ZIDANI, R.; VANNETZEL, J. M.; PERPOINT, B.; FOCAN, C.; FAGGIUOLO, R.; CHOLLET, P.; GARUFI, C.; ITZHAKI, M.; DOGLIOTTI, L. *et al.* Chronomodulated versus fixed-infusion-rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: a randomized multi-institutional trial. **J Natl Cancer Inst.**,v. 86, n. 21, p.1608-1617, 1994.

LI, J.; SUN, Y. M.; WANG, L. F.; LI, Z. Q.; PAN, W.; CAO, H. Y. Comparison of Effects of Simvastatin Versus Atorvastatin on Oxidative Stress in Patients With Coronary Heart Disease. **Clin. Cardiol.**, v.33,n. 4, p.222-227, 2010.

LI, Y. C.; PARK, M. J.; YE, S. K.; KIM, C. W.; KIM, Y. N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. **Am J Pathol.**, v.168, p.1107-1118, 2006.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p. 89-118, 2005.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature.**, v.420, p.868-874, 2002.

LIMA, V.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, F.Q.; REBOUÇAS, C.G.; FALCÃO, B.A.A.; AUGUSTO, R.F.; SOUZA, M. L. P.; LEITÃO, B.T.; RIBEIRO R.A. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term

experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210-217, 2005.

LIN, R.; LIU, J.; PENG, N.; YANG, G.; GAN, W. Lovastatin reduces nuclear factor Kappa B activation induced by C-reactive protein in human vascular endothelial cells. **Biol Pharm Bull.**, v.28, p.1630-1634, 2005.

LIOU, H. C. Regulation of the Immune System by NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology.**, v. 35, n. 6, p.537-546, 2002.

LIU, P. Y.; LIU, Y. W.; LIN, L. J.; CHEN, J. H. ; LIAO, J. K. Evidence for statin pleiotropy in humans: Differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. **Circulation.**, v.119, p.131-138, 2009.

LOCKHART, P.B.; BRENNAN, M.T.; KENT, M.L.; PACKMAN, C.H.; NORTON, H.J.; FOX, P.C.; FRENETTE, G. Randomized controlled trial of pilocarpine hydrochloride for the moderation of oral mucositis during autologous blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 35, n. 7, p. 713-720, 2005.

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; VIRAG, L.; SZEKELY, A.D.; HASKO, G.; SZABO, C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. **J Dent Res.**, v. 80, n. 2, p. 470-475, 2001.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Rev Cancer.**, v.3, p.330-8, 2003.

LOWENSTEIN, C.; ALLEN, GWALKER A, ROSE N, SNYDER S, HERSKOWITZ A. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. **Circulation.**, v.88, p.IG-IH, 1993.

MACDONALD, J. S.; GERSON, R. J.; KORNBRUST, D. J.; KLOSS, M. W.; PRAHALADA, S.; BERRY, P. H. *et al.* Preclinical evaluation of lovastatin. **American Journal of Cardiology.**, v.62, n.15, p.16J-27J, 1998.

MALHOTRA, H. S.; GOA, K. L.; Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. **Drugs.**, v.61, n.12, p.1835-81, 2001.

MCCARTHY, G. M.; AWDE, J. D. ; GHANDI, H. *et al.* Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. **Oral Oncol.**, v.34, p.484-90, 1998.

MCCARTHY, G.M.; SKILLINGS, J.R. Orofacial complications of chemotherapy for breast cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 74, n. 2, p.172-178, 1992.

MCGUIRE, D.; OWEN, D.; PETERSON, D. Nursing interventions for acute oral pain and mucositis. **Oncol Nurs Forum.**, v.25, p.341, 1998.

MADDENS, S.; CHARRUYER, A.; PLO I.; DUBREUIL P.; BERGER S.; SALLES B.; LAURENT G.; JAFFREZOU J. P. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide

pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood.**, v. 100, p.1294-1301, 2002.

MAHOOD, D. J.; DOSE, A. M.; LOPRINZI, C. L.; VEEDER, M. H.; ATHMANN, L. M.; THERNEAU, T. M.; SORENSEN, J. M.; GAINEY, D. K.; MAILLIARD, J. A.; GUSA, N. L. *et al.* Inhibition of fluorouracil-induced stomatitis by oral cryotherapy. **J Clin Oncol.**, v. 9, p. 449-452, 1991.

MALINOWSKI, J. M. Atorvastatin: a hydroxymethyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. **Am J Health Syst Pharm.**, v.55, p.2253-2267, 1998.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation.**, v.101, p.207-13, 2000.

MCCAREY, D. W.; SATTAR, N.; MCINNES, L. B. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? **Arthritis Res Ther.**, v.7, p.55-61, 2005.

MCGOWN, C. C.; BROOKES, Z. L. S. Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. **British Journal of Anaesthesia.**, v.98, p.163-75, 2007.

MEDEIROS, C. A. C. X.; LEITÃO, R. F. C.; MACEDO, R. N.; BARBOZA, D. R. M. M.; GOMES, A. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology.**, v.66, p. 1-16, 2010.

MERX, M. W.; LIEHN, E. A.; JANSSENS, U.; LÜTTICKEN, R.; SCHRADER, J.; HANRATH, P. *et al.* HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. **Circulation.**, v. 109, p.2560-2565, 2004.

MIDDLETON, S. J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J. O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, v. 341, n. 8843, p. 465-466, 1993.

MINSKY, B. D.; COHEN, A. M.; KEMENY, N.; ENKER, W. E.; KELSEN, D. P.; SCHWARTZ, G.; SALTZ, L.; DOUGHERTY, J.; FRANKEL, J.; WISEBERG, J. Pre-operative combined 5-FU, low dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 25, n. 5, p. 821-827, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIBBS, J. R.; HIGGS, A. E. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v.43, p.109, 1991.

MUKAI, Y. ; WANG, C. Y. ; RIKITAKE, Y. ; LIAO, J. K *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt negatively regulates plasminogen activator inhibitor type 1 expression in vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.292, p.H1937-H1942, 2007.

MULHAUPT, F.; MATTER, C. M.; KWAK, B. R.; PELLI, G.; VEILLARD, N. R. ; BURGER, F. *et al.* Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. **Cardiovasc Res.**, v.59, p.755-766, 2003.

MUNDY, G.; GARRET, R.; HARRIS, S.; CHAN, J. ; CHEN, D. ; ROSSINI, G. *et al.* Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science.**, v.286, p.1946-9, 1999.

MUNIYAPPA, R.; XU, R.; RAM, J. L.; SOWERS, J. R. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.278,p. H1762 –H1768, 2000.

MURPHY, M. J.; DOMINICZAK, M. H. Efficacy of statin therapy: possible effect of phenytoin. **Postgrad Med J.**, v.75, p.359–360, 1999.

MURPHY, R. T.; FOLEY J. B.; MULVIHILL, N.; CREAN, P.; WALSH, M. J. Impact of preexisting statin use on adhesion molecule expression in patients presenting with acute coronary syndromes. **Am. J. Cardiol.**, v.87, p.446-448, 2001.

MURRAY, R. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; VOLKERS, R. H. **Manual of clinical microbiology.** American Society Microbiology: Washington, p 65-77, 1995.

NAIDU, M. U. R. ; RAMANA, G. V. ; RANI, P. U.; MOHAN, I. K.; SUMAN, A.; ROY, P. Chemotherapy-induced and or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. Review article, **Neoplasia**, v.6, p.423-431, 2004.

NAKAD, A.; BATAILLE, L.; HAMOIR, V.; SEMPOUX, C.; HORSMANS, Y. Atorvastatin- induced acute hepatitis with absence of cross-toxicity with simvastatin. **Lancet**, v. 353, p.1763-1764, 1999.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. **Immunol Rev.**, v. 219, p.88-102, 2007.

NEGEVESKY, G. J.; KOLSKY, M. P.; LAURENO, R.; YAU, T. H. Reversible atorvastatin-associated external ophtalmoplegia, anti-acetylcholine receptor antibodies, and ataxia. **Arch Ophthalmol.**, v.118, p.427-428, 2000.

NEWMAN, C. M.; MAGEE, A. I. Post-translational processing of ras superfamily of small GTP-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1155, p.79-96, 1993.

NICOLATOU-GALITIS, O.; VELEGRAKI, A.; SOTIROPOULOU-LONTOU, A. *et al.* Effect of fluconazole antifungal prophylaxis on oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy. **Support Care Cancer**, v.14, n.1, p.44-51, 2006.

NIES, A. S.; SPIELBERG, S. P. Principles of therapeutics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. Goodman and Gilman's **the pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill; p. 43-62, 1996.

NOBES, C.; MARSH, M. Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? **Curr. Biol.**, v.10, p.R739–R741, 2000.

NOËL, B.; CEROTTINI, J.P.; PANIZZON, R.G. Atorvastatin-induced dermatomyositis. **Am J Med.**, v.110, p.670, 2001.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v.15, p.1025-1032, 2004.

NOTTAGE, M.; MCLACHLAN, S. A.; BRITAIN, M. A. *et al.* Sucralfate mouthwash for prevention and treatment of 5-fluorouracil-induced mucositis: a randomized, placebo-controlled trial. **Support Care Cancer**, v.11, n.1, p.41-47, 2003.

OBLON, D.J.; PAUL, S.R.; OBLON, M.B.; MALIK, S. Proprantheline protects the oral mucosa after high-dose ifosfamide, carboplatin, etoposide and autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 20, n. 11, p. 961-963, 1997.

OHTSU, A.; YOSHIDA, S.; SAITO, D.; SHIMADA, Y.; MIYAMOTO, K.; FUJII, T.; YOSHINO, M.; YOSHIMORI, M. An early phase II study of 5-fluorouracil combined with cisplatin as a second line chemotherapy against metastatic gastric cancer. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 21, n. 2, p. 120-124, 1991.

OMAR, M. A; WILSON, J. P. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. **Ann Pharmacother.**, v.36, p.288–295, 2002.

PAHAN, K.; SHEIKH, F. G.; NAMBOODIRI, A. M.; SINGH, I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.100, n.11, p.2671-2679, 1997.

PALINSKI, W. Immunomodulation: A new role for statins? **Nat Med.**, v.12, p.1311-1312, 2000.

PARIS, F.; FUKS, Z. ; KANG, A. *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science**, v.293, p.293-297, 2001.

PARK, J. W.; SIEKMEIER, R. ; MERZ, M. *et al.* Pharmacokinetics of pravastatin in heart-transplant patients taking cyclosporin A. **Int J Clin Pharmacol Therapeut.**, v.40, p.439–450, 2002.

PARK, J.K.; MULLER, D.N.; MERVAALA, E.M.; DECHEND, R.; FIEBELER, A.; SCHMIDT, F.; BIERINGER, M.; SCHAFER, O.; LINDSCHAU, C.; SCHNEIDER, W.; GANTEN, D.; LUFT, F.C.; HALLER, H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. **Kidney Int.**, v.58, p.1420-1430, 2000.

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

PARULEKAR, W.; MACKENZIE, R.; BJARNASON, G.; JORDAN, R. C. K. Scoring oral mucositis. **Oral Oncol.**, v.34, p.63-71, 1998.

PASTERNAK, R. C.; SMITH, S. C.; Jr BAIREY-MERZ, C. N, *et al.* ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. **Circulation.**, v.106, p.1024-1028, 2002.

PATRONE, F.; BALLESTRERO, A.; FERRANDO, F. *et al.* Four-step high-dose sequential chemotherapy with double hematopoietic progenitor-cell rescue for metastatic breast cancer. **J Clin Oncol.**, v.13, p.840-846, 1995.

PEDERSEN, T. R.; KJEKSHUS, J. Statin drugs and the risk of fracture. **J Am Med Assoc.**, v.284, p.1921-2, 2000.

PELLI, N.; SETTI, M. Atorvastatin as a trigger of autoimmune hepatitis. **J Hepatol.**, v.40, p.716, 2004.

PERGER, L.; KOHLER, M.; FATTINGER, K.; FLURY, R.; MEJER, P. J.; PAULI-MAGNUS, C. Fatal liver failure with atorvastatin. **J Hepatol.**, v.39, p.1096-7, 2003.

PETERSON, D. E.; JONES, J. B ; PETIT, R. G 2nd. Randomized, placebo-controlled trial of Saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. **Cancer**, v.109, n.2, p.322-331, 2007.

PETROS, A.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet**, 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.**, v. 28, n. 1, p. 34-39, 1994.

PETTERSON, 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**, v. 92, n. 4, p. 875-885, 2001.

PFEIFFER, C. M.; KAZENOFF, S.; ROTHBERG, H. D. Toxic epidermal necrolysis from atorvastatin. **JAMA**, v.279, p.1613-1614, 1998.

PINEDO, H. M.; PETERS, G. F. J. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J. Clin. Oncol.**, v. 6, p.1653-1664, 1988.

PIRZADA, N. A.; ALI, I. I.; DAFER, R. M. Fluorouracil-induced neurotoxicity. **Ann Pharmacother.**, v. 34, n. 1, p. 35-38, 2000.

PLANAVILA, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ-CARRERA, M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. **Biochim Biophys Acta.**, v.1687, p.76-83, 2005.

PLENZ, G. A.; HOFNAGEL, O.; ROBENEK, H. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. **Circulation.**, v.109, p.e7-e8, 2004.

PRASAD, R.; GIRI, S.; NATH, N.; SINGH, I.; SINGH, A. K. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. **J Neurochem.**, v.94, p.204-214, 2005.

PUTTANANJIAH, M. K.; DHALE, M. A.; GAONKAR, V.; KENI, S. Statins: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reductase Inhibitors Demonstrate Anti-Atherosclerotic Character due to Their Antioxidant Capacity. **Appl Biochem Biotechnol.**, 2010.

PYRHONEN, S.; KUITUNEN, T.; NYANDOTO, P.; KOURI, M. Randomised comparison of fluorouracil, epidoxorubicin and methotrexate (FEMTX) plus supportive care with supportive care alone in patients with non-resectable gastric cancer. **Br J Cancer.**, v. 71, n. 3, p. 587-591, 1995.

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

RANJAN, N. Management of hyperlipidemias: An update. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v.75, p.452-62, 2009.

RANKIN, K. V.; JONES, D. J.; REDDING, S. W. **Oral health in cancer therapy.** 2nd ed. Texas. Cancer Council, p. 43-52, 2004.

RASMUSSEN, L. M.; HANSEN, P. R.; NABIPOUR, M. T.; OLESEN, P.; KRISTIANSEN, M. T.; LEDET, T. Diverse effects of inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase on the expression of VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells. **Biochem J.**, v.360, p.363-370, 2001.

REDDING, S. W. Cancer Therapy-Related Oral Mucositis. **Journal of Dental Education.**, v. 69, n.8, p.919-29, 2005.

REJNMARK, L.; BUUS, N. H.; VESTEGAARD, P.; ANDREASEN, F.; LARSEN, M. L.; MOSEKILDE, L. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: a cross-sectional study. **Eur J Clin Invest.**, v.32, p.581-9, 2002.

REZAIIE-MAJD, A.; PRAGER, G. W.; BUCEK, R. A.; SCHERNTHANER, G. H.; MACA, T.; KRESS, H. G. et al. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.23, p.397-403, 2003.

RIDRUEJO, E.; MANDO, O. G. Acute cholestatic hepatitis after reinitiating treatment with atorvastatin. **J Hepatol.**, v.37, p.165-166, 2002.

ROBINSON, J. G.; SMITH, B.; MAHESHWARI, N.; SCHROTT, H. Pleiotropic effects of statins: Benefit beyond cholesterol reduction? A meta regression analysis. **J Am Coll Cardiol.**, v.46, p.1855-1862, 2005.

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

ROCKE L.K.; LOPRINZI C.L.; LEE J.K.; KUNSELMAN S.J.; IVERSON R.K.; FINCK G.; LIFSEY D.; GLAW K.C.; STEVENS B.A.; HATFIELD A.K., *et al.* A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis. **Cancer**, v. 72, p. 2234–2238, 1993.

ROMANO, M.; DIOMEDE, L.; SIRONI, M.; MASSIMILIANO, L.; SOTTOCORNO, M.; POLENTARUTTI, N.; GUGLIELMOTTI, A.; ALBANI, D.; BRUNO, A.; FRUSCELLA, P.; SALMONA, M.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. Inhibition of monocyte chemotactic protein 1 synthesis by statins. **Lab. Invest.**, v.80, n.7, p.1095-1100, 2000.

ROSSO, M.; BLASI, G.; GHERLONE, E.; ROSSO, R. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on prevention of mucositis in head and neck cancer patients treated with chemo-radiotherapy. **J Chemother.**, v. 9, n. 55, p. 38238-5, 1997.

ROSSO, R.; MAZZEI, T.; SOBRERO, A.; MINI, E.; CARTEI, G.; CONTE, P.; LABIANCA, R.; CARTEI, F.; FALCONE, A.; PANCERA, G. *et al.* Phase II trial of 5-fluorouracil and the natural I isomer of folinic acid in the treatment of advanced colorectal carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 30A, n. 3, p. 338-343, 1994.

RUNDEK, T.; NAINI, A. ; SACCO, R. *et al.* Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke. **Arch Neurol.**, v.61, p.889-892, 2004.

RUSTUM, Y. M.; HARSTRICK, A.; CAO, S.; VANHOEFER, U.; YIN, M. B.; WILKE, H.; SEEBER, S. Thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy: Direct and indirect inhibitors. **J Clin Oncol.**, v.15, p.389-400, 1997.

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

SAMARANAYAKE, L. P.; ROBERTSON, A. G.; MACFARLANE, T. W.; HUNTER, I. P. ; MACFARLANE, G. ; SOUTAR, D. S. *et al.* The effect of chlorhexidine and benzydamine mouthwashes on mucositis induced by therapeutic irradiation. **Clin Radiol.**, v.39, p.291-4, 1988.

SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; CUNHA, T. M.; VERRI, Jr, W. A.; VALÉRIO, D. A. R.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **Br. J. Pharmacol.**, v.149, n.1, p 14-22, 2006.

SCALIA, R.; GOOSZEN, M. E.; JONES, S. P.; HOFFMEYER, M.; RIMMER, D. M.; TROCHA, S. D. *et al.* Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v.103, p.2598-2603, 2001.

SCARANTINO, C.; LEVEQUE, F.; SWANN, R. S.; WHITE, R.; SCHULSINGER, A.; HODSON, D. I.; MEREDITH, R.; FOOTE, R.; BRACHMAN, D.; LEE, N. Effect of pilocarpine during radiation therapy: results of RTOG 97-09, a phase III randomized study in head and neck cancer patients. **J Support Oncol.**, v. 4, n. 5, p. 252-258, 2006.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol.**, v.19, n.1, p.117-25, 2005.

SCHONBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling and plaque instability. **Circ Res.**, v.89, p.1092-1103, 2001.

SCHUBERT, M. M.; EDUARDO, F. P.; GUTHRIE, K. A. *et al.* A phase III randomized double blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Support Care Cancer**, v.15, n.10, p.1145-54, 2007.

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

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

SEGAL, A. Alopecia associated with atorvastatin. **Am J Med.**, v.113, p.171, 2002.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v.46, p.705-16, 1986.

SEN-BANERJEE, S.; MIR, S.; LIN, Z.; HAMIK, A.; ATKINS, G. B.; DAS, H. *et al.* Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. **Circulation**, v.112, p.720-726, 2005.

SHA WC. Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. **J Exp Med.**, v.187, p.143-146, 1998.

SIMONCINI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; BRAZIL, D. P.; LEY, K.; CHIN, W. W.; LIAO, J. K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v.407, p.538-541, 2000.

SINENSKY, M.; BECK, L. A.; LEONARD, S.; EVANS, R. Differential inhibitory effects of lovastatin on protein isoprenylation and sterol synthesis. **J Biol Chem.**, v.265, p.19937-19941, 1990.

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**, v. 111, n. 4, p.871-885, 1996.

SINZINGER, H. Statin-induced myositis migrans. **Wien Klin Wochenschr**, v.114, p. 943-944, 2002.

SINZINGER, H.; WOLFRAM, R.; PESKAR, B. A. Muscular side effects of statins. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.40, p.163-171, 2002.

SOLHEIM, S.; SELJEFLOT, I.; ARNESEN, H.; ERITSLAND, J.; EIKVAR, L. Reduced levels of TNF alpha in hypercholesterolemic individuals after treatment with pravastatin for 8 weeks. **Atherosclerosis**, v. 157, p. 411-415, 2001.

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

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

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

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

SONIS, S. T.; 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 Oncology**, v.40, p.170-6, 2004-b.

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MANSON, L. *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**, 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.**, v.35, n.1, p.93–102, 2002

SONIS, S. T. The biologic role of nuclear factor-kB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.13, p.300-9, 2002.

SONIS, S. T. The Pathobiology of Mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.277-84, 2004-b.

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.**, v.69, n.4, 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.**, v.131, n.11, p.1155-1163, 1996.

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

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v.17, p.97–103, 1985.

SPIELBERGER, R.; STIFF, P.; BENSINGER, W. *et al.* Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. **N Engl J Med.**, v.351, n.25, p.2590-2598, 2004.

SPIJKERVET, F. K.; SONIS, S. T. New frontiers in the management of chemotherapy-induced mucositis. **Curr Opin Oncol.**, v.10, n.1, p.23-27, 1998.

STALKER, T. J.; LEFER, A. M.; SCALIA, R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: The role of mevalonic acid. **Br J Pharmacol.**, v.133, p.406-412, 2001.

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

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p.463–516, 2001.

SUGAMURA, K.; SUGIYAMA, S.; MATSUZAWA, Y.; NOZAKI, T.; HORIBATA, Y.; OGAWA, H. Benefit of adding pioglitazone to successful statin therapy in nondiabetic patients with coronary artery disease. **Circ J.**, v.72, p.1193-1197, 2008.

SUGIYAMA, M.; KODAMA, T.; KONISHI, K.; ABE, K.; ASAMI, S.; OIKAWA, S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.271, p.688-92, 2000.

SULEM, P.; BAGHERI, H.; FAIXO, Y.; MONTASTRUC, J. L. Atorvastatin induced diaphragmatic muscle impairment. **Ann Pharmacother.**, v.35, p.1292-1293, 2001.

SUN, Y. M.; TIAN, Y.; LI, X.; LIU, Y. Y.; WANG, L. F.; LI, J. *et al.* Effect of atorvastatin on expression of IL-10 and TNF-alpha mRNA in myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.382, p.336-40, 2009.

SUYS, B.; DE BEECK, L. O.; ROOMAN, R. *et al.* Impact of oxidative stress on the endothelial dysfunction of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: protection by superoxide dismutase? **Pediatr Res.**, v.62, p.456–461, 2007.

TAKEMOTO, M.; LIAO, J. K. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, P.1712-1719, 2001.

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

THOMPSON, P. D.; CLARKSON, P.; KARAS, R. H. Statin-associated myopathy. **JAMA**, v.289, n.13, p.1681-90, 2003.

THOMPSON, P. D. ; ZMUDA, J. M. ; DOMALIK, L. J. *et al.* Lovastatin increases exercise-induced skeletal muscle injury. **Metabolism.**, v.46, p.1206–1210, 1997.

THUMMEL, K. E. WILKINSON, G. R. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.38, p.389-430, 1998.

TOLMAN, K. G. The liver and lovastatin. **American Journal of Cardiology**, v.89, n.12, p.1374-80, 2002

TOMLINSON, S. S.; MANGIONE K. K. Potential adverse effects of statins on muscle. **Physical Therapy**, v.85, n.5, p. 459-465, 2005.

TORRENS, C.; KELSALL, C. J.; HOPKINS, L. A.; ANTHONY, F. W.; CURZEN, N. P.; HANSON, M. A. Atorvastatin Restores Endothelial Function in Offspring of Protein-Restricted Rats in a Cholesterol-Independent Manner. **Hypertension**, v. 53, p.661-667, 2009.

TREISTER, N.; SONIS, S. Mucositis: biology and management. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.15, n.2, p.123-129, 2007.

TROTTI, A.; BELLM, L. A.; EPSTEIN, J. B. *et al.* Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother Oncol.**, v.66, n.3, p.253-262, 2003.

TSALIC, M.; BAR-SELA, G.; BENY, A. *et al.* Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. **Am J Clin Oncol.**, v.26, p.103-6, 2003.

TURHAL, N. S.; ERDAL, S.; KARACAY, S. Efficacy of treatment to relieve mucositis-induced discomfort. **Support Care Cancer**, v.8, p.55-8, 2000.

UCAR, M.; MJORNDAL, T.; DAHLQVIST, R. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. **Drug Saf.**, v.22, p.441–457, 2000.

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**, v.113, n.4, p. 1246-1257, 1997.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev.**, v.11, p.2295-2322, 1997.

VASA, M.; FICHTLSCHERER, S.; ADLER, K.; AICHER, A.; MARTIN, H.; ZEIHNER, A. M. *et al.* Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation**, v.103, p.2885-2890, 2001.

VAUGHAN, C. J.; GOTTO, A. M, Jr BASSON, C. T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol.**, v.35, p.1-10, 2000.

VERA-LLONCH, M.; OSTER, G.; FORD, C. M.; LU, J.; SONIS, S. Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. **Support Care Cancer**, v.15, n.5, p.491-6, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Metabolismo dos lipídeos**. In: Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed, p.563-610, 2000.

VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Statins for hyperlipidemia in patients with chronic liver disease: are they safe? **Clinical Gastroenterology & Hepatology**, v.4, n.7, p.838-9, 2006.

WAGNER, A. H.; GEBAUER, M.; GÜLDENZOPH, B.; HECKER, M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.22, p.1784-1789, 2002

WAGNER, A. H.; KÖHLER, T.; RÜCKSCHLOSS, U.; JUST, I.; HECKER, M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, p.61-69, 2000.

WAGNER, A. H.; SCHWABE, O.; HECKER, M. Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ. **British Journal of Pharmacology**, v.136, p.143-149, 2002.

WANG, C. Y.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med.**, v.14, n.1, p.37-44, 2008.

WATERS, D. D. Safety of high-dose atorvastatin therapy. **Am J Cardiol.**, v.96, n.5, p.69-75, 2005.

WEIS, M.; HEESCHEN, C.; GLASSFORD, A. J.; COOKE, J. P. Statins have biphasic effects on angiogenesis. **Circulation**, v.105, p.739-745, 2002.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; BRINKMANN, V.; KAMATA, T.; KALLEN, J.; BRUNS, C. *et al.* Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin. **Nature Medicine**, v. 7, p.687-692, 2001.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; DAWSON, J.; KALLEN, J. Improved lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) inhibition by statin derivatives: Molecular basis determined by x-ray analysis and monitoring of LFA-1 conformational changes in vitro and ex vivo. **J Biol Chem.**, v.279, p.46764-46771, 2004.

WELDON, C. B.; BURROW, M. E.; ROLFE, K. W.; CLAYTON, J. L, JAFFE, B. M.; BECKMAN, B. S. NF-kB-mediated chemoresistance in breast cancer cells. **Surgery**, v.130, p.143-150, 2001.

WHITE, C. M. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. **J Clin Pharmacol.**, v.42, p.963-970, 2002.

WIERZBICKI, A. S.; CROOK, M. A. Cholestatic liver dysfunction. **Lancet**, v.354, p.954, 1999.

WIERZBICKI, A. S.; MIKHAILIDIS, D. P.; WRAY, R.; SCHACHTER, M.; CRAMB, R.; SIMPSON, W. B.; BYRNE, C. B. Statin-fibrate combination therapy for hyperlipidaemia:a review. **Curr Med Res Opin.**, v.19, p.155-168, 2002.

WILKINSON, D. S.; TLSTY, T. D.; HANAS, R. J. The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. **Cancer Res.**, v. 35, p. 3014-3020, 1975.

WINGARD, J. R.; MERZ, W. G.; RINALDI, M. G.; JOHNSON, T. R.; KARP, J. E.; SARAL, R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N Engl J Med.**, v. 325, 18, p. 1274-1277, 1991.

WOLOZIN, B.; KELLMAN, W.; RUOSSEAU, P.; CELESIA, G. G.; SIEGEL, G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Arch. Neurol.**, v.57, p.1439-1443, 2000.

WU, K. K. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids**, v.72, p.89-93, 2005.

YANO, M.; MATSUMURA, T. ; SENOKUCHI, T. ; ISHII, N.; MURATA, Y.; TAKETA, K. *et al.* Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Circ Res.**, v.100, p.1442-1451, 2007.

YASIM, A.; OZBAG, D.; KILINC, M.; CIRALIK, H.; TORU, H.; GÜMÜŞALAN, Y. Effect of atorvastatin and ezetimibe treatment on serum lipid profile and oxidative state in rats fed with a high-cholesterol diet. **Am J Med Sci.**, v.339, n.5, p.448-52, 2010.

YONEDA, S.; IMAI, S.; HANADA, N. *et al.* Effects of oral care on development of oral mucositis and microorganisms in patients with esophageal cancer. **Jpn J Infect Dis.**, v.60, n.1, p.23–28, 2007.

YOUSSEF, S.; STUVE, O.; PATARROYO, J. C. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverse paralysis in central nervous system autoimmune disease. **Nature**, v.420, p.78-84, 2002.

ZIAJKA, P. E.; WEHMEIER, T. Peripheral neuropathy and lipid lowering therapy. **South Med J.**, v.91, p.667-668, 1998.

ZHOU, Q.; LIAO, J. K. Pleiotropic Effects of Statins – Basic Research and Clinical Perspectives- **Circulation Journal**, v.74, p. 818-826, 2010.

## **ANEXOS**

## Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis

C. A. C. X. Medeiros · R. F. C. Leitão · R. N. Macedo ·  
D. R. M. M. Barboza · A. S. Gomes · N. A. P. Nogueira ·  
N. M. N. Alencar · R. A. Ribeiro · G. A. C. Brito

Received: 4 April 2010 / Accepted: 11 July 2010  
© Springer-Verlag 2010

### Abstract

**Purpose** Oral mucositis (OM) is a frequent side effect in patients with cancer. We investigate the effect of atorvastatin (ATV), a cholesterol-lowering drug, on OM induced by 5-fluorouracil (5-FU) in hamsters.

**Methods** OM was induced by the i.p. administration of 5-FU, with excoriations of the cheek pouch mucosa. The animals were pretreated with i.p. ATV 1, 5 or 10 mg/kg or vehicle (saline and 5% (vol/vol) ethanol) 30 min before 5-FU injection and daily for 5 or 10 days. Samples of cheek pouches and main organs were removed for histopathological analysis, determination of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , nitrite, non-protein sulfhydryl group (NP-SH) levels, myeloperoxidase (MPO) assay and immunohistochemistry for induced nitric oxide synthase (iNOS). Blood was collected for a leukogram analysis of biochemical parameters and analysis of bacteremia.

**Results** ATV at doses of 1 and 5 mg/kg reduced mucosal damage and inflammation, as well as the levels of cytokines, nitrite and myeloperoxidase activity on the 5th and 10th day of OM and immunostaining for iNOS on the 5th day of OM. ATV at 1 mg/kg increased cheek pouch NP-SH when compared to 5-FU groups on the 10th day of OM. The association between ATV 5 mg/kg and 5-FU decreased the survival rate, amplified the leukopenia of animals, increased transaminase serum levels and caused liver lesions. We also detected the presence of Gram-negative bacillus in the blood of 100% of the animals treated with ATV 5 mg/kg + 5-FU.

**Conclusions** Atorvastatin prevented mucosal damage and inflammation associated with 5-FU-induced OM, but the association of a higher dose of ATV with 5-FU induced hepatotoxicity and amplified leukopenia.

**Keywords** Oral mucositis · 5-Fluorouracil · Atorvastatin · Statin

C. A. C. X. Medeiros  
Department of Biomedical Sciences,  
State University of Rio Grande do Norte,  
Mossoró, Brazil

R. F. C. Leitão · G. A. C. Brito (✉)  
Department of Morphology, Faculty of Medicine,  
Federal University of Ceará, Rua Delmiro de Farias,  
sn, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil  
e-mail: gerlybrito@hotmail.com

C. A. C. X. Medeiros · R. N. Macedo · D. R. M. M. Barboza ·  
A. S. Gomes · N. M. N. Alencar · R. A. Ribeiro  
Department of Physiology and Pharmacology,  
Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

N. A. P. Nogueira  
Department of Clinical and Toxicological Analysis,  
Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

### Abbreviations

5-FU	5-fluorouracil
ATV	Atorvastatin
HMG-CoA	3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A
NP-SH	Non-protein sulfhydryl groups
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha

### Introduction

Oral mucositis (OM) is a frequent dose-limiting side effect of radiotherapy (RT) and chemotherapy in patients with cancer [1, 2]. The incidence of OM varies from 10% to 40% of patients receiving conventional chemotherapy for

solid tumors [3], 97% of head and neck cancer patients receiving conventional fractionated RT (one dose/day, 5 days/week for 5–7 weeks), 100% of patients receiving altered fractionation RT (two or more doses/day) and 89% of patients undergoing high-dose chemotherapy prior to hematopoietic stem cell transplantation [4]. OM is characterized by erythematous, erosive and ulcerative lesions in the oral cavity. The ulcerative lesions are typically painful and affect nutritional intake and quality of life, leading to difficulty in eating and communication and representing a significant risk factor for systemic infection [5]. Patients with mucositis and neutropenia have a relative risk of septicemia that is greater than four times that of individuals without mucositis [6]. In addition, mucositis presence can have other consequences like the interruption of cancer treatment, a limitation in the dose [7], and an increase in therapeutic costs and hospital stays [8]. Various strategies to prevent ulcerative mucositis in radiotherapy and chemotherapy in patients with cancer have been evaluated, but none have demonstrated strong efficacy.

Mechanisms involved in the pathogenesis of mucositis are much more complex than direct damage to the epithelium alone [9]. Sonis et al. [10] demonstrated that in oral mucosa, following exposure to radiation, primary damage to endothelial cells occurred well before any detectable changes were apparent in the epithelium. Based on these data, five continuous overlapping phases have been proposed to describe the pathogenesis of mucositis as follows. First is the initiation phase, which results in direct tissue damage to mucosal components as a result of the production of reactive oxygen species. Second is the upregulation and message generation phase, during which the activation of transcription factors occurs, in particular nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), and consequently upregulation of genes that have an effect on mucosal integrity by inducing clonogenic cell death, apoptosis and tissue injury, and production of pro-inflammatory cytokines occur. Third is signal amplification, which occurs as a consequence of the pro-inflammatory cytokines acting via positive feedback mechanisms causing further activation of NF- $\kappa$ B and subsequent increased production of cytokines and other pro-inflammatory mediators, such as cyclooxygenase-2 (COX-2). This increased production leads to the activation of matrix metalloproteinases, the production of which elicits further tissue damage. Fourth, the ulcerative phase develops, in which, clinically, there is a breach of the epithelium accompanied by bacterial colonization. Bacterial products can stimulate further amplification of cytokine production leading to further potentiation of tissue injury. And fifth, the healing phase occurs, following cessation of the cancer treatment. This phase results in the restoration of normal mucosal appearance at the clinical level [10, 11].

Statins, which are 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, have emerged as the most important class of lipid-lowering agents. Through inhibition of HMG-CoA reductase, they restrict the rate-limiting step of cholesterol synthesis, resulting in upregulation of low-density lipoprotein (LDL) receptors on the cell membrane and reduction in atherogenic LDL consequences [12]. Several clinical trials have demonstrated that the beneficial effects of statins on cardiovascular disorders go beyond their effects on cholesterol level [13, 14]. Some of the cholesterol-independent or “pleiotropic” beneficial effects of statins include improvement in endothelial function by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) upregulation [15], decrease in vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation [16] and macrophage proliferation [17], reduction in platelet activity [18], stabilization of atherosclerotic plaques [19], antioxidant properties [20], and anti-inflammatory and immunomodulatory effects [21, 22]. Many of these pleiotropic effects are mediated by blocking the synthesis of isoprenoid intermediates, via inhibition of the L-mevalonic pathway, with accumulation of inactive small GTP-binding proteins in the cytoplasm (such as Rho, Ras, Rac, Rap and Ral) [23].

The anti-inflammatory effect of statins is well described in atherosclerotic lesions [24]. The anti-inflammatory mechanism of statins may involve inhibition of adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and E-selectin, and cytokines such as interleukin-6 and -8, which are involved in the recruitment of inflammatory cells. In addition, statins can suppress the inflammatory response by binding directly to a novel regulatory site of the  $\beta_2$  integrin, leukocyte function antigen-1. This regulatory site serves as a major counter receptor for ICAM-1 on leukocytes [25]. Taking into account the anti-inflammatory properties of statins, we investigated the effect of ATV on OM induced by 5-FU. We show that ATV reduced damage and inflammation induced by 5-FU in the oral mucosa of hamsters. We also demonstrate that the association of a higher dose of ATV with 5-FU induced hepatotoxicity and amplified leukopenia.

## Methods

### Animals

Ninety-six male adult Golden hamsters weighing 140–200 g from the Federal University of Ceará were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum*. Surgical procedures and animal treatments were conducted in accordance with the Guidelines for Institutional Animal Care and were approved by our local ethics committee for experimental animal use.

## Drugs

ATV (Atorvastatina, Pfizer, Inc., Guarulhos, SP, Brasil; prescription formulation) was dissolved in saline and 5% (vol/vol) ethanol (pH 7.6) [26]. The 5-FU (Fluoro-Uracil; Roche, Rio de Janeiro, Brazil) was reconstituted in 0.9% NaCl.

## Induction of experimental oral mucositis

Oral mucositis was induced by two intraperitoneal (i.p.) administrations of 5-FU on the first and second days of the experiment (60 and 40 mg/kg, respectively), according to an experimental oral mucositis model previously described [27]. On day 4, under anesthesia with 2.5% tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.), the cheek pouch mucosa was irritated by superficial scratching to potentiate oral mucositis. This was performed by dragging the tip of an 18-gauge needle, twice in a linear manner, across the everted cheek pouch. The animals were killed on the 5th or 10th day after the initial injection of 5-FU, under anesthesia with 2.5% tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.). There were at least 6 animals in each experimental group.

## Experimental groups

Hamster groups subjected to OM were treated i.p. with ATV 1, 5 or 10 mg/kg (ATV 1/5-FU, ATV 5/5-FU, ATV 10/5-FU), 30 min before the injections of 5-FU and daily until they were killed on the 5th or 10th day after receiving the first injection of 5-FU. Control groups consisted of normal animals (Normal), animals subjected to OM that received saline (5-FU/saline) or saline and 5% (vol/vol) ethanol (5-FU/sal-ethanol), a group that received only mechanical trauma (MT) of cheek pouches on the fourth day and animals subjected to MT that received ATV 5 mg/kg and saline (ATV 5/saline).

## ATV effects

Initially, we investigated the effect of ATV on oral mucositis induced by 5-FU on the 10th day. The administration of ATV 5 or 10 mg/kg intraperitoneal significantly increased the mortality rates of hamsters submitted to OM on the 10th day of experiment. Therefore, to evaluate the effect of ATV on 5-FU-induced OM on the 10th day, the dose of 1 mg/kg was selected. ATV (1 mg/Kg), saline or saline and 5% ethanol were administered intraperitoneally (i.p.), 30 min before each injection of 5-FU and daily until they were killed, on day 10. In another set of experiments, ATV 1 or 5 mg/kg, saline or saline and 5% ethanol were administered intraperitoneally (i.p.), 30 min before each injection of 5-FU and daily until they were killed, on day 5. The protocol

for induction of oral mucositis was performed as described in the preceding section. On 5th and 10th day, the animals were anesthetized with 2.5% tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and the cheek pouch was everted and photographed before killing the animal. Samples of cheek pouches were removed from six animals per group for histopathological analysis, determination of cytokines and nitrite and non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) levels and myeloperoxidase (MPO) activity. In order to investigate a possible systemic repercussion, blood or tissue samples were collected, and leukogram, analysis of biochemical parameters, investigation of bacteremia in the serum and liver, kidney, heart and lung histopathology were performed on the 5th day.

## Macroscopic analysis of cheek pouch

Photographs were used for scoring lesions. For macroscopic analysis, inflammatory aspects such as erythema, erosion, vasodilatation, epithelial ulcerations and abscesses were evaluated in a single-blind fashion and graded as follows. Score 0: completely healthy cheek pouch with erosion or vasodilatation absent. Score 1: presence of erythema, but no evidence of erosion in the cheek pouch. Score 2: severe erythema, vasodilatation and surface erosion. Score 3: formation of ulcers in one or more faces of the mucosa, but not affecting more than 25% of the surface area of the cheek pouch; severe erythema and vasodilatation. Score 4: Cumulative formation of ulcers of about 50% of the surface area of the cheek pouch. Score 5: virtually complete ulceration of the cheek pouch mucosa. In this case, the fibrosis makes oral mucosa exposure difficult.

## Histopathological analysis of cheek pouch

The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 5  $\mu$ m thickness were obtained for hematoxylin–eosin staining (H&E) and examined by light microscopy ( $\times 40$ ). The parameters of inflammatory cell infiltration, vasodilatation, presence of hemorrhagic areas, edema, ulcerations and abscesses were determined in a single-blind fashion and graded as follows. Score 0: normal epithelium and connective tissue without vasodilatation; absence of or discreet cellular infiltration; absence of hemorrhagic areas, ulcerations or abscesses. Score 1: discreet vasodilatation, re-epithelization areas; discreet inflammatory infiltration with mononuclear prevalence; absence of hemorrhagic areas, edema, ulcerations or abscesses. Score 2: moderate vasodilatation, areas of hydropic epithelial degeneration, inflammatory infiltration with neutrophil prevalence, presence of hemorrhagic areas, edema and eventual ulcerations, and absence of abscesses. Score 3: severe vasodilatation, inflammatory infiltration with neutrophil prevalence, presence

of hemorrhagic areas, edema and extensive ulceration, and abscesses.

#### Myeloperoxidase assay

The extent of neutrophil accumulation in the cheek pouch samples was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity. In brief, the animals were killed on the 5th or 10th day after the initial injection of 5-FU, and cheek pouch samples were harvested and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until required for assay. After homogenization and centrifugation (2000g, 20 min), MPO activity in these samples was determined by a colorimetric method described previously [28]. The results were reported as units of MPO per mg of tissue.

#### Quantification of TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ by ELISA

Cheek pouch samples were also harvested from animals of all groups on the fifth or tenth day after the initial injection of 5-FU for the measurement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . The concentrations of these cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously [29]. The results were expressed as pg/ml of TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ .

#### Determination of nitrite levels

The production of NO was determined indirectly by measuring the nitrite levels based on the Griess reaction [30]. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of cheek pouch tissue homogenate was incubated with 100  $\mu\text{l}$  of the Griess reagent (1% sulfanilamide in 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride/1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /distilled water, 1:1:1:1) at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 560 nm in a microplate reader, and nitrite concentration was determined from a standard nitrite curve generated using  $\text{NaNO}_2$ .

#### Non-protein sulfhydryl groups' (NP-SH) levels

The NP-SH levels were measured following the protocol previously described [31]. One hundred milligrams of cheek pouch tissue was homogenized in 1 ml of 0.02 M EDTA. Aliquots of 400  $\mu\text{l}$  of homogenate were added to 320  $\mu\text{l}$  of distilled water and 80  $\mu\text{l}$  of 50% trichloroacetic acid (TCA) for precipitation of proteins. The tubes were centrifuged (3,000 rpm/15 min/ $4^{\circ}\text{C}$ ), and 400  $\mu\text{l}$  of supernatant was added to 800  $\mu\text{l}$  of 0.4 M Tris, pH 8.9, and 20  $\mu\text{l}$  of DTNB and agitated for 3 min, immediately before the reading. The absorbance was measured at 412 nm. The results were expressed as mg/g of mucosa.

#### Immunohistochemical reaction for induced nitric oxide synthase

Immunohistochemistry for iNOS, on day 5 of MO, was performed using the streptavidin–biotin–peroxidase method [32] in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (4  $\mu\text{m}$  thick), mounted on poly-L-lysine-coated microscope slides. The sections were deparaffinized and rehydrated through xylene and graded alcohols. After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked (15 min) with 3% (v/v) hydrogen peroxide and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Sections were incubated overnight ( $4^{\circ}\text{C}$ ) with primary rabbit anti-iNOS antibody diluted 1:100 in PBS plus bovine serum albumin (PBS-BSA). The slides were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit, diluted 1:400 in PBS-BSA. After washing, the slides were incubated with avidin–biotin–horseradish peroxidase conjugate (Strep ABC complex by Vectastain® ABC Reagent and peroxidase substrate solution) for 30 min, according to the Vectastain protocol. iNOS was visualized with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Negative control sections were processed simultaneously as described above but with the first antibody being replaced by PBS-BSA 5%. None of the negative controls showed iNOS immunoreactivity. Slides were counterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene and coverslipped.

#### Leukogram

Animals were anesthetized with 2.5% tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.), and a sample of blood was collected from heart puncture on day 5. For leukogram determination, 20  $\mu\text{l}$  of blood was added to 380  $\mu\text{l}$  of solution of Turk, and total and differential counts of leukocytes were carried out by standard manual procedures using light microscopy [33]. The results are expressed as the number of cells per milliliter (ml).

#### Biochemical parameters

Blood of the animals was collected from heart puncture, and biochemical analyses were performed in serum samples obtained after centrifugation of total blood without anticoagulants, at 2,500 rpm for 15 min. Standardized diagnostic kits by LABTEST® spectrophotometer were used in spectrophotometrical determination of the alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST), creatinine, urea parameters.

#### Analysis of liver, lung, heart and kidney

For histopathological analysis, the specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated and embedded

in paraffin. Sections of 5 µm thickness were obtained for hematoxylin–eosin staining (H&E) and examined by light microscopy (40× magnification).

### Bacteremia

Blood was collected from heart puncture on day 5 under sterile conditions. Ten microliters of blood was diluted tenfold in brain–heart infusion medium. The bacterial growth was analyzed after 24–48 h at 37°C by visual analysis of the turbidity of the culture medium. A turbid medium indicates bacteremia (+), and a non-turbid medium suggests absence of bacterial in the blood (–). Organisms that grew on brain–heart infusion medium were streaked for isolation on 5% sheep blood agar plates, MacConkey agar plates and mannitol–salt–agar plates. Organisms that grew were identified by standard methods, including Gram stain morphology, DNase, catalase, coagulase, motility, sugar metabolism and other tests as indicated [34].

### Statistical analysis

Data were described as either mean ± SEM or median, as appropriate. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to compare means, and Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests to compare medians;  $P < 0.05$  was considered as indicating significant differences.

## Results

### Effect of atorvastatin on oral mucositis

Our group have previously demonstrated that the treatment of hamsters with 5-fluorouracil followed by mechanical

trauma of the cheek pouch causes lesion starting by day 5 with peak at day 10, when erythema, hyperemia, hemorrhagic areas, and extensive ulcers and abscesses were detected. These signs of lesion diminished between days 12 and 16. All these aspects were confirmed by histopathological analysis, revealing on day 10 severe vascular ingurgitation and dilatation, accentuated inflammatory infiltration with neutrophil prevalence, hemorrhagic areas, edema and extensive ulceration and abscess [35].

To investigate the effect of atorvastatin (ATV) on lesions induced by 5-FU, groups of animals were killed on the 5th or 10th day after receiving the first injection of 5-FU or saline. The i.p. administration of 5-FU, followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch of the hamsters, caused significant macroscopic lesions on day 5 and day 10 ( $P < 0.05$ ), represented by accentuated erythema, hemorrhage, vasodilation and ulcers when compared to normal animals (N) or to animals subjected to MT only (Table 1). The lesion peak occurred by day 10, with the presence of abscesses (Fig. 1e). On day 5, the treatment of the animals with ATV 1 or 5 mg/kg (Table 1) significantly prevented the 5-FU-induced oral damage, presenting only a discrete erythema and a small laceration as a result of the mechanical trauma done on the 4th day. On day 10, treatment of the animals with ATV 1 mg/kg significantly reduced the size and severity of the lesions induced by 5-FU ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Figure 1g illustrates the protective effect of treatment with ATV 1 mg/kg compared to animals subjected to OM that received saline and 5% ethanol (Fig. 1e).

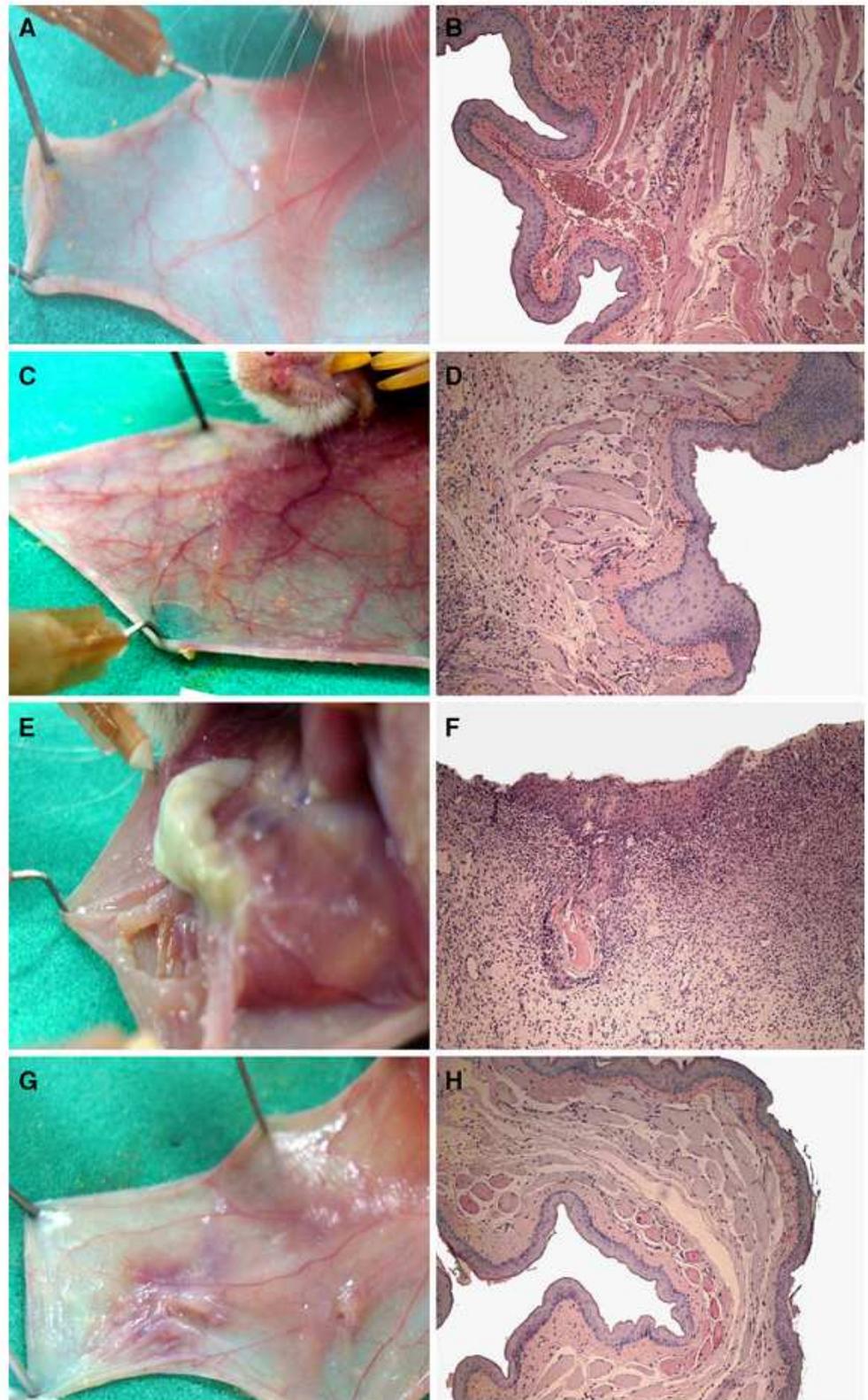
The histopathology of the cheek pouches of animals subjected to 5-FU-induced OM showed significant alterations ( $P < 0.05$ ) on day 5 and day 10 in relation to that observed in normal animals (Table 1) or in animals that received MT only. On day 5, there was moderate edema, inflammatory cell infiltration with neutrophil prevalence, hemorrhagic

**Table 1** Macroscopic and microscopic analysis of hamster cheek pouches subjected to experimental oral mucositis

Analysis	Macroscopic (5 days)	Microscopic (5 days)	Macroscopic (10 days)	Microscopic (10 days)
Normal	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
MT	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)
5-FU/saline	3 (2–3)*	2 (1–2)*	4 (3–4)*	3 (2–3)*
5-FU/sal-ethanol	3 (2–3)*	2 (2–2)*	4 (3–5)*	3 (2–3)*
ATV1/5-FU	1 (1–2)**	1 (1–1)**	2 (1–3)**	1 (0–3)**
ATV5/5-FU	1 (1–2)**	1 (1–1)**	–	–
ATV5/saline	1 (1–2)	1 (0–1)	–	–

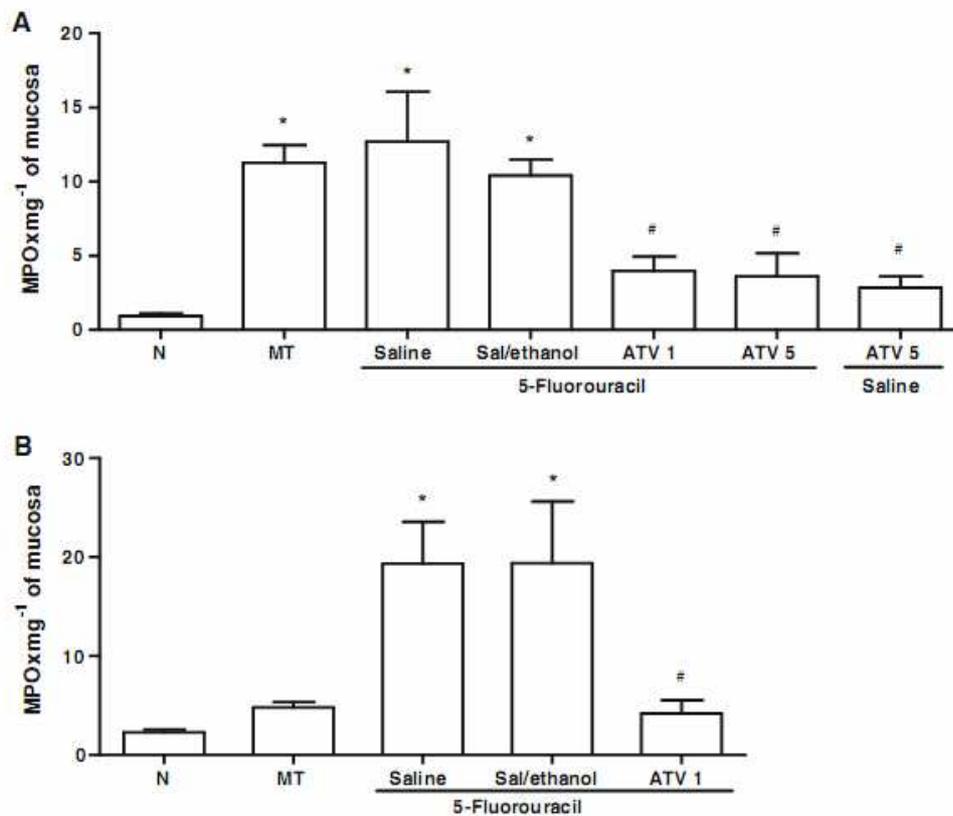
Oral mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. Animals received i.p. injection of atorvastatin (ATV; 1 or 5 mg/kg), saline or saline/ethanol 30 min before 5-FU and daily for 5 days (5 days) or 10 days (10 days). Control groups consisted of normal animals (N), animals subjected to MT only and animals subjected to MT that received ATV 5 mg/kg (ATV 5/saline) and saline. Data represent the median values (and range) of macroscopic or microscopic scores in six animals per group. \*  $P < 0.05$  compared to normal animals, \*\*  $P < 0.05$  compared to animals submitted to 5-FU-induced oral mucositis, receiving saline or saline/ethanol. Data were analyzed using Kruskal–Wallis and Dunn's tests

**Fig. 1** Macroscopic (*left*) and microscopic (*right*) aspects of normal hamster cheek pouches (**a** and **b**), cheek pouches of hamsters subjected to mechanical trauma (**c** and **d**), cheek pouches of animals subjected to 5-FU-induced oral mucositis that received saline/ethanol (**e** and **f**) or cheek pouches of animals subjected to 5-FU-induced oral mucositis that received atorvastatin (1 mg/kg) (**g** and **h**) (H&E;  $\times 40$  magnification). Oral mucositis was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. Animals received i.p. injection of saline/ethanol or ATV 1 mg/kg, 30 min before 5-FU, daily for 10 days



areas, vasodilatation, eventual or discrete ulceration, and the absence of abscesses. On day 10, corresponding to maximal mucositis, the histopathology revealed edema, accentuated inflammatory cell infiltration with neutrophil prevalence, hemorrhagic areas, vasodilatation, extensive ulcers and abscesses (Table 1; Fig. 1f) when compared to normal cheek pouches of hamsters not subjected to OM

(Table 1; Fig. 1b) and to the MT group that presented only discrete edema and inflammatory cell infiltration (Fig. 1d; Table 1). On day 5, the treatment with ATV 1 or 5 mg/kg (Table 1) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced inflammatory cell infiltration, edema and hemorrhage and prevented the formation of ulceration. Additionally, on day 10, ATV 1 mg/kg significantly reduced the histological



**Fig. 2** Atorvastatin (ATV) reduced myeloperoxidase (MPO) activity in the cheek pouches of hamsters subjected to oral mucositis for 5 days (**a**) or 10 days (**b**). Control groups consisted of normal animals (N), animals subjected to mechanical trauma (MT) only and animals subjected to MT that received atorvastatin 5 mg/kg (ATV 5) and saline. The experimental groups consisted of animals treated with intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma and then received i.p. injection of saline, sal/ethanol, atorvastatin 1 mg/kg

(ATV 1) or 5 mg/kg (ATV 5) 30 min before 5-FU or saline. Bars represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of MPO units  $\times$  mg<sup>-1</sup> of cheek pouch. \* $P < 0.05$  represents statistical differences compared to normal hamsters; # $P < 0.05$  represents statistical differences compared to hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis and injected with saline/ethanol or saline. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test

alterations observed in experimental OM, when compared to saline/ethanol treated animals. This was indicated by the prevention of 5-FU-induced inflammatory cell infiltration, edema hemorrhage and formation of ulcerations or abscesses, resulting in low lesion scores (Table 1). Fig. 1h illustrates the protective effect of treatment with ATV 1 mg/kg, compared to animals subjected to OM that received saline and 5% ethanol (5-FU/sal-ethanol) (Fig. 1f).

#### Myeloperoxidase activity

The MPO activity was measured in the cheek pouch as an indicator of neutrophil infiltration. The MPO activity of the cheek pouch tissue of animals subjected to MT and of animals subjected to 5-FU-induced experimental OM (5-FU/saline or 5-FU/sal-ethanol) was significantly increased ( $P < 0.05$ ) in comparison with the normal group (N) on the fifth day of OM. ATV at 1 mg/kg or 5 mg/kg significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced increase in MPO activity. ATV at 5 mg/kg alone did not change the MPO

activity compared to normal control (Fig. 2a). On the tenth day of OM, the MPO activity of the cheek pouch tissue of animals subjected to 5-FU-induced experimental OM (5-FU/saline or 5-FU/sal-ethanol) was significantly increased ( $P < 0.05$ ) in comparison with the normal group (N), and ATV 1 mg/kg significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced increase in MPO activity (Fig. 2b).

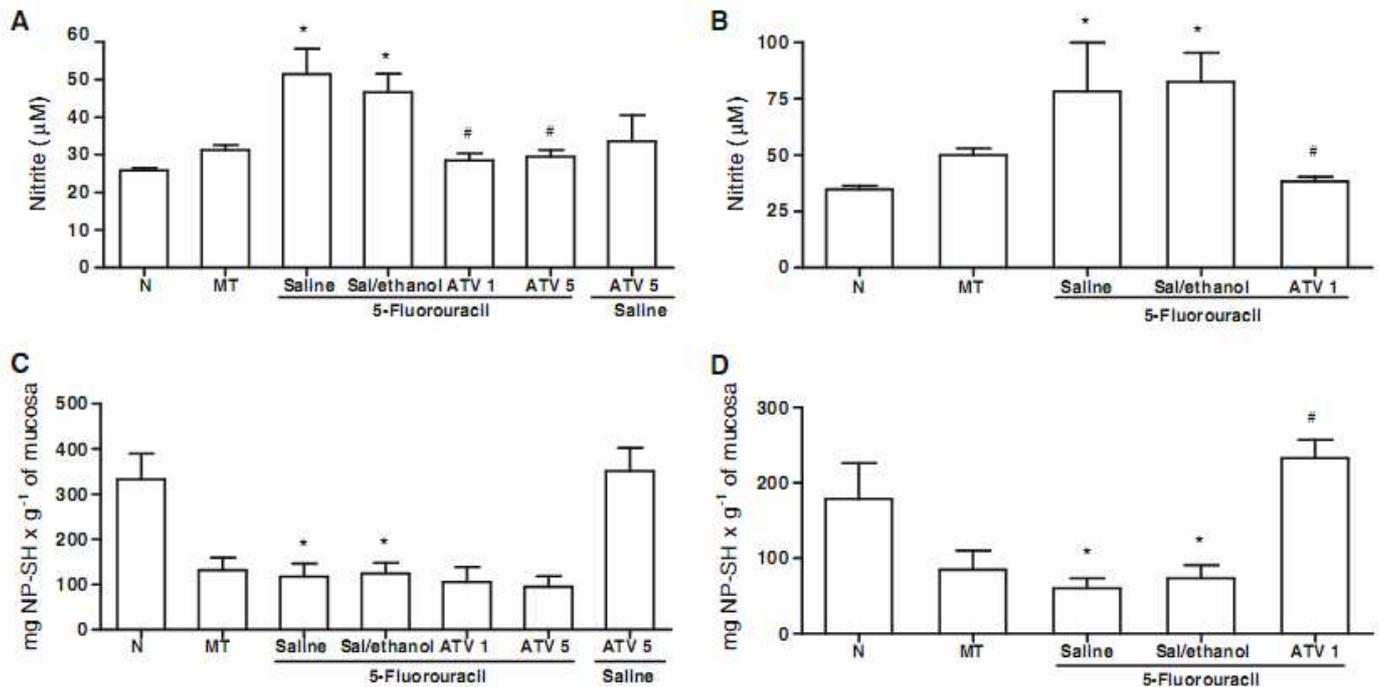
#### Cheek pouch tissue cytokine levels

5-FU significantly ( $P < 0.05$ ) increased the cheek pouch tissue level of TNF- $\alpha$ , but not IL-1 $\beta$ , on day 5. ATV at 1 mg/kg or 5 mg/kg significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced increase in TNF- $\alpha$ . ATV at 5 mg/kg alone did not change the TNF- $\alpha$  level compared to normal control (Table 2). On the tenth day of OM, 5-FU significantly ( $P < 0.05$ ) increased the cheek pouch tissue level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . ATV at 1 mg/kg significantly blocked ( $P < 0.05$ ) this elevation in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the cheek pouch (Table 2).

**Table 2** TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels (pg/ml) in the cheek pouches of hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis

Cytokines	TNF- $\alpha$ (5 days)	IL-1 $\beta$ (5 days)	TNF- $\alpha$ (10 days)	IL-1 $\beta$ (10 days)
Normal	1051.0 $\pm$ 52.48	288 $\pm$ 32.02	96.83 $\pm$ 22.44	213.8 $\pm$ 30.92
MT	1029.0 $\pm$ 96.36	166.3 $\pm$ 31.14	172.2 $\pm$ 48.85	289.7 $\pm$ 11.30
5-FU/saline	2662.0 $\pm$ 135.0*	241.3 $\pm$ 56.53	417.4 $\pm$ 76.74*	435.4 $\pm$ 40.50*
5-FU/sal-ethanol	2613.0 $\pm$ 115.7*	236.1 $\pm$ 38.61	404.0 $\pm$ 77.32*	405.0 $\pm$ 50.24*
ATV1/5FU	1226.0 $\pm$ 56.12 <sup>#</sup>	105.0 $\pm$ 10.79	177.6 $\pm$ 33.13 <sup>#</sup>	206.8 $\pm$ 18.39 <sup>#</sup>
ATV5/5-FU	1025.0 $\pm$ 72.05 <sup>#</sup>	226.0 $\pm$ 46.49	-	-
ATV5/Saline	1087.0 $\pm$ 75.93 <sup>#</sup>	183.8 $\pm$ 25.61	-	-

Oral mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. Animals received i.p. injection of atorvastatin (ATV; 1 or 5 mg/kg), saline or saline/ethanol, 30 min before 5-FU and daily for 5 days (5 days) or 10 days (10 days). Control groups consisted of normal animals (N), animals subjected to MT only and animals subjected to MT that received ATV 5 mg/kg (ATV 5/saline) and saline. The data represent the median values  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level in six animals per group. \*  $P < 0.05$  represents statistical differences compared to normal hamsters, <sup>#</sup>  $P < 0.05$  represents statistical differences compared to hamsters submitted to 5-FU-induced oral mucositis and injected with saline or saline/ethanol. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test



**Fig. 3** Quantification of nitrite levels in cheek pouches of hamsters submitted to oral mucositis for 5 days (a) or 10 days (b) and quantification of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in cheek pouches of hamsters submitted to oral mucositis for 5 days (c) or 10 days (d). Oral mucositis was induced in hamsters by the intraperitoneal (i.p.) injection of 5-fluorouracil (5-FU) followed by mechanical trauma (MT). Animals received i.p. injection of atorvastatin (1 or 5 mg/kg), saline or saline-ethanol, 30 min before 5-FU and daily for 5 days (5 days) or 10 days (10 days). Control groups consisted of normal animals (N),

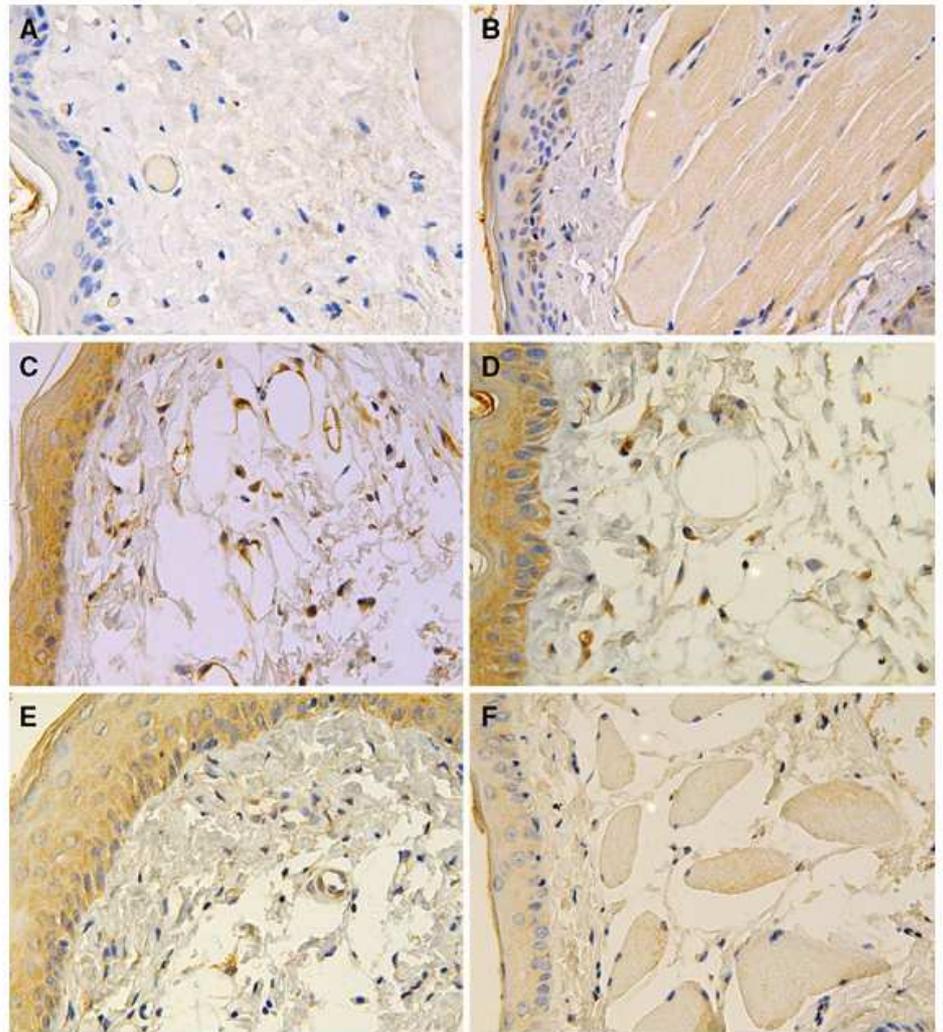
animals subjected to mechanical trauma (MT) only and animals subjected to MT that received atorvastatin 5 mg/kg and saline (ATV 5/saline). Data represent the median values  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of nitrite levels or non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in six animals per group. \*  $P < 0.05$  represents statistical differences compared to normal hamsters; <sup>#</sup>  $P < 0.05$  represents statistical differences compared to hamsters submitted to 5-FU-induced oral mucositis and injected with saline or saline-ethanol. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test

#### Cheek pouch tissue nitrite and non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) levels

The nitrite levels in the cheek pouch tissue of animals subjected to 5 or 10 days of 5-FU-induced experimental OM were significantly increased ( $P < 0.05$ ) in comparison with

the normal group (N) or with the group of animals subjected to MT (MT) (Fig. 3a, b, respectively). The administration of ATV (1 mg/kg or 5 mg/kg) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced increase in nitrite levels (Fig. 3a). ATV at 1 mg/kg also reduced the 5-FU-induced increase in nitrite levels on the tenth day of OM, restoring this parameter to

**Fig. 4** Representative photomicrographies of iNOS immunohistochemistry in the cheek pouches of hamsters subjected to 5-fluorouracil (5-FU)-induced oral mucositis for 5 days. The cheek pouch tissue of hamster submitted to 5-FU-induced oral mucositis, receiving saline (c) or saline/ethanol (d) presented intense immunostaining for iNOS in the inflammatory cells when compared to the cheek pouch of normal hamster (b). The treatment with atorvastatin 1 mg/kg (e) or 5 mg/kg (f) considerably reduced the immunostaining in the conjunctive tissue. Negative control represents a sample of the cheek pouch where the first antibody was replaced by PBS-BSA 5% and no immunostaining was detected (a). Magnification  $\times 400$



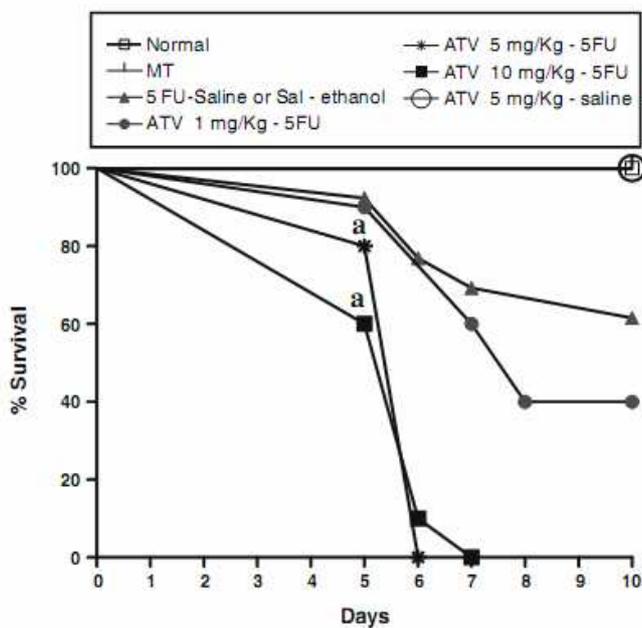
normal levels (Fig. 3b). The levels of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in the cheek pouch tissue of animals subjected to 5-FU-induced OM and MT were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) at 5 and 10 days when compared to the normal control group (N) (Fig. 3c, d). The administration of ATV 1 mg/kg significantly ( $P < 0.05$ ) reversed the effects of experimental OM on stores of NP-SH levels in the mucosa on the 10th day (Fig. 3d).

#### Immunohistochemical reaction for induced nitric oxide synthase

The cheek pouches of hamsters submitted to oral mucositis for 5 days and treated with saline or saline/ethanol showed marked immunostaining for iNOS on inflamed conjunctive tissue (Fig. 4c, d) compared with the cheek pouches of the normal control group (Fig. 4b). Atorvastatin 1 and 5 mg/Kg caused considerable reduction in the iNOS immunostaining in the cheek pouches tissue when compared with the group of animals subjected to experimental mucositis that received saline or saline/ethanol (Fig. 4e, f).

#### Effect of ATV on the survival rates of hamsters subjected to OM

The control group, consisting of animals not subjected to OM (normal) and animals that received only mechanical trauma (MT), showed 100% survival during 10 days of investigation. The groups subjected to OM and treated with saline or saline and 5% (vol/vol) ethanol (5-FU/saline and 5-FU/sal-ethanol) showed 40% mortality. The animals with OM and treated i.p. with ATV 1 mg/kg (ATV 1/5-FU) showed 60 % mortality over 10 days. The groups with OM and treated i.p. with ATV 5 mg/kg or 10 mg/kg (ATV 5/5-FU or ATV 10/5-FU) exhibited 100% mortality on the 10th day. However, all animals not subjected to OM that received MT of cheek pouches or those treated with ATV 5 mg/kg (ATV 5/saline) survived throughout the 10 days of the experiment (Fig. 5). These findings indicate that high doses (5 mg/kg or 10 mg/kg) of ATV in addition to 5-FU significantly decreased ( $P < 0.05$ ) the survival rate of hamsters when compared to animals undergoing experimental OM treated with saline or saline/ethanol.



**Fig. 5** Pretreatment with atorvastatin (ATV) 5 mg/kg reduced survival rates of the hamsters submitted to 5-FU-induced oral mucositis. Oral mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. The survival rates of hamsters were determined daily up to 10 days. The hamsters were pretreated for 10 consecutive days with ATV (1, 5 or 10 mg/kg i.p.), saline or saline/ethanol 5% once a day. The doses of ATV were administered 30 min before i.p. injection of 5-FU or saline. The results are expressed as % survival. (a,  $P < 0.05$ ; Kaplan-Meier log rank test)

#### Effects of ATV on liver, kidney, heart and lung histopathology

Liver histology of hamsters subjected to 5 days of 5-FU-induced experimental OM and treated with ATV 5 mg/kg (ATV5/5-FU) presented vacuolization (Fig. 6d), focal necrosis and inflammatory cell infiltration (Fig. 6e, f) in comparison with normal (N) (Fig. 6a), 5-FU/sal-ethanol (Fig. 6b) or ATV 5/saline groups (Fig. 6c). The kidney, heart and lung presented normal histology.

#### Effects of ATV on systemic changes: biochemical analyses and leukogram

To explain the high mortality of animals with OM that were treated with ATV (5 and 10 mg/kg) for 10 days, biochemical analyses and a leukogram were performed on the 5th day of the experiment. Figure 7 shows that the levels of hepatic enzymes, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), of animals subjected to 5 days of 5-FU-induced experimental OM and treated with ATV 5 mg/kg (ATV5/5-FU), were significantly increased ( $P < 0.05$ ) in comparison with the 5-FU/saline or 5-FU/sal-ethanol groups. However, the animals treated with ATV

5 mg/kg that did not receive 5-FU (ATV 5/saline) had no increase in serum transaminases. Other biochemical values, specifically creatinine and urea, did not differ between groups (Table 3). Animals subjected to 5 days of 5-FU-induced experimental OM and treated with ATV 5 mg/kg presented significant intensification of leukopenia, neutropenia and lymphopenia ( $P < 0.05$ ) in comparison with the 5-FU/saline or 5-FU/sal-ethanol groups. ATV 5 mg/kg alone did not change the leukocyte number compared to normal control (N) (Fig. 8).

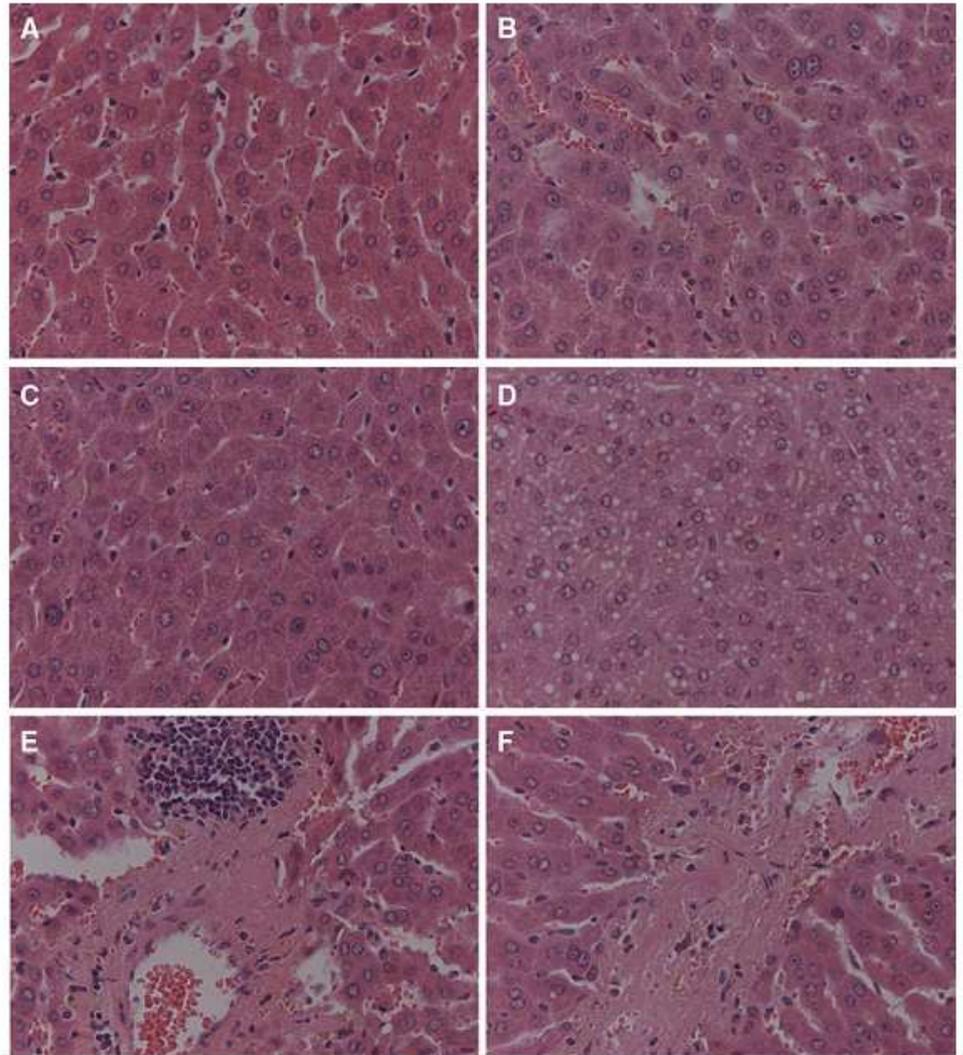
#### Effects of ATV on systemic changes: Bacteremia

Table 4 shows the bacterial infection in the blood of animals in the various experimental groups on the 5th day of the experiment. The normal animals did not exhibit bacteremia (-). In the MT and ATV 5/saline groups, there was bacteremia (+) in a few animals, 40% (2/5) and 50% (3/6), respectively, caused by Gram-positive bacteria (*Staphylococcus coagulase negative*). The 5-FU/saline, 5-FU/sal-ethanol, ATV 1/5-FU and ATV 5/5-FU hamsters exhibited bacteremia (+) in 80% (4/5), 83.3% (5/6), 85.7% (6/7) and 100% (5/5) of animals, respectively. The infection of 5-FU/saline, 5-FU/sal-ethanol and ATV1/5-FU groups was caused primarily by Gram-positive bacteria (*Staphylococcus coagulase negative*) in 80% (4/5), 67% (4/6) and 57% (4/7) of animals, respectively. Curiously, the animals with OM and treated with ATV 5 mg/kg were not infected by Gram-positive bacteria but showed 100% (5/5) infection by Gram-negative bacilli (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. or *Arizona* sp.) compared with 28.5% (2/7) of ATV 1 mg/kg and 16.6% (1/6) of 5-FU-saline group (Table 4).

#### Discussion and conclusions

In the present study, we demonstrated that atorvastatin (ATV) significantly reduced the macroscopic and microscopic lesions induced by 5-FU in the oral mucosa of hamsters. The macroscopic protective effects were associated with reduced production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and decreased neutrophil infiltration evidenced by histopathological analysis and MPO activity. In addition, ATV also reduced oxidative stress and induced an increase in non-protein sulfhydryl groups. This effect of ATV is consistent with previous reports showing that ATV has anti-inflammatory and immunomodulatory action that is distinct from its cholesterol-reducing action [25, 36–38]. OM is characterized by an intense inflammatory reaction caused by effects of chemotherapeutic agents on the mucosa lamina propria cells, which results in activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B [39, 40]. The activation of NF- $\kappa$ B leads to transcription

**Fig. 6** Effect of atorvastatin (ATV; 5 mg/kg) on liver histology of hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis for 5 days. Aspects of normal hamster liver (a), liver of animals subjected to oral mucositis that received saline/ethanol (b), liver of hamsters subjected to MT that received ATV 5 mg/kg (ATV 5/saline) (c) and liver of animals subjected to 5-FU-induced oral mucositis that received ATV 5 mg/kg (ATV 5/5-FU) (d), (e), (f). Samples of liver were processed for hematoxylin and eosin staining ( $\times 40$  magnification)

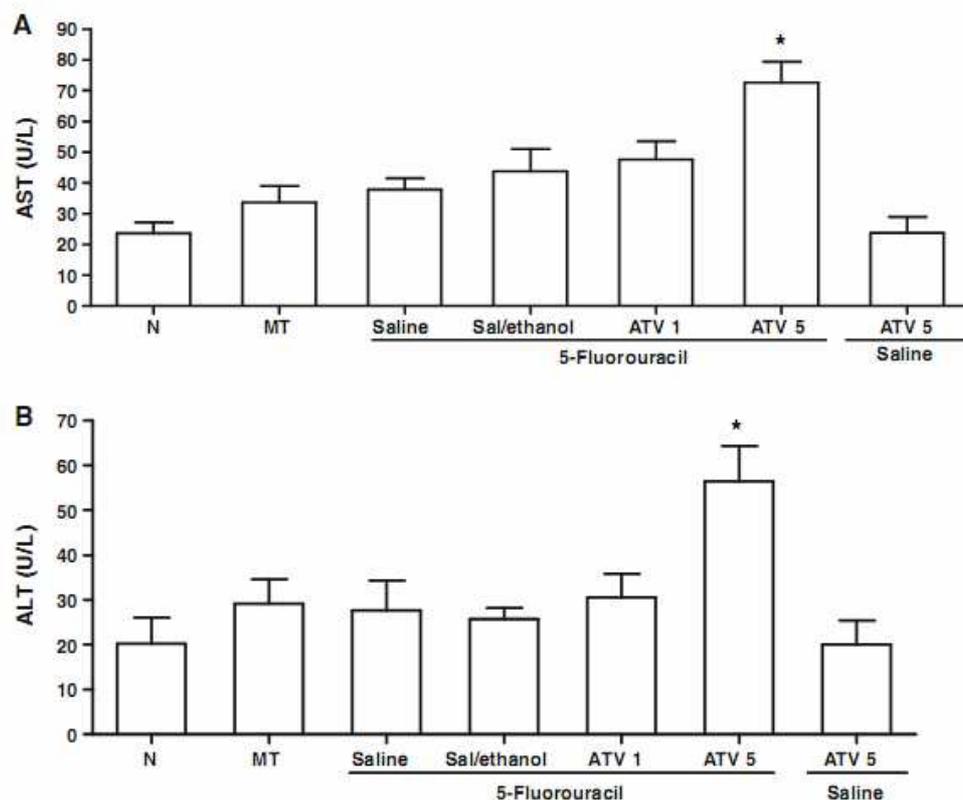


of genes involved in the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [39, 40], and agents known to attenuate the expression of cytokines have demonstrated efficacy in the prevention of experimental mucositis [10, 35].

In this investigation, we demonstrated that ATV (1 or 5 mg/kg) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the 5-FU-induced increase in TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  levels. In agreement with our data, various articles have shown that ATV decreases TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  production [41, 42]. These data are supported by the finding that the release of pro-inflammatory cytokines is largely dependent on the NF- $\kappa$ B transcription pathway [43], and other authors suggest that statins diminish the activity of NF- $\kappa$ B [44, 45]. Thus, the protective effect of ATV found in OM could be related to its capacity to inhibit cytokine production. Cytokines have been shown to stimulate the expression of the inducible NOS synthase isoform (iNOS) with consequent production of nitric oxide (NO). In this study, we demonstrated that 5-FU-induced OM presented marked expression of iNOS and increased nitrite level in the cheek pouch, suggesting increased synthesis of

NO in the tissue. This gas appears to play a beneficial and detrimental role. Beneficial effects may include antimicrobial activity and immune modulation [46, 47]. On the other hand, detrimental effects may include a cytotoxic action toward the adjacent host tissues, resulting in tissue lesions [48–52]. It has been extensively demonstrated that iNOS-derived NO mediates pathogenesis of experimental and human inflammatory diseases, including OM [27]. Accordingly, the present study demonstrated that ATV clearly decreased the nitrite level and reduced the iNOS immunostaining in the cheek pouch, and this could result in tissue protection.

According to the literature, statins downregulate the expression of ICAM-1 and LFA-1, and through binding to LFA-1, they interfere with ICAM-1–LFA-1 interaction resulting in statin-induced inhibition of neutrophil activity [25]. Treatment of post-infarction patients with ATV also reduced soluble ICAM and E-selectin, adhesion molecules involved in neutrophil migration [53]. In addition, ATV significantly reduced neutrophil transendothelial migration toward the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phe-



**Fig. 7** Atorvastatin 5 mg/kg (ATV 5) increased aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) serum levels in animals with oral mucositis after 5 days. Oral mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. Animals received saline, saline–ethanol 5% or ATV (1 or 5 mg/kg i.p.) 30 min before 5-FU injection daily for 5 days. Control groups consisted of normal animals (N), animals subjected to mechanical trauma (MT) only and animals

subjected to MT that received atorvastatin 5 mg/kg and saline (ATV 5/saline). Blood was collected by heart puncture when the hamsters were killed on day 5. Bars represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of AST (a), and ALT (b). \* $P < 0.05$  represents statistical differences compared to hamsters submitted to 5-FU-induced oral mucositis and injected with saline or saline/ethanol. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test

nylanine (fMLP), by reducing fMLP-induced Rho activity in neutrophils. In a rat model of adjuvant-induced arthritis, ATV (1–10 mg) decreased neutrophil influx and concentrations of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and the chemokines CCL5 and CCL2 [41]. These data point to an important inhibitory effect of statins on neutrophil migration. Although neutrophils are essential components of host defense, they are also associated with tissue destruction. In 5-FU-induced OM, MPO activity is increased [27, 54], indicating a crucial role for neutrophils in this condition. Therefore, the inhibitory effect of ATV on neutrophil migration is probably related to the protective effect of ATV on 5-FU-induced oral mucosal damage.

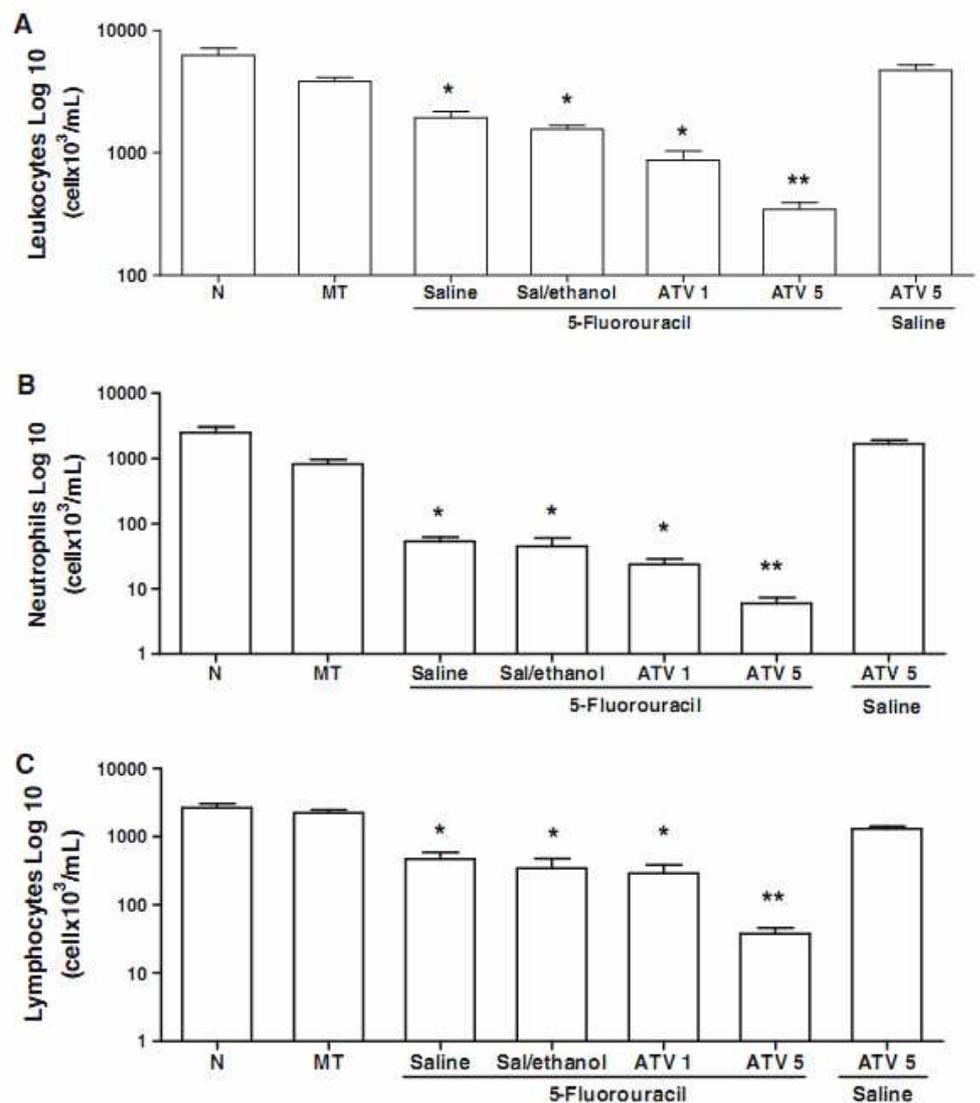
In addition, we also demonstrated that the cheek pouch tissue glutathione stores of the animals subjected to 5-FU-induced experimental OM were significantly decreased when compared to normal animals. These data are consistent with a previous study [54]. In the present study, ATV 1 mg/kg restored glutathione levels on the 10th day, which might be related to a decrease in oxidative stress. Glutathione, the major intracellular antioxidant, is involved in several

fundamental biological functions, including free radical scavenging, detoxification of xenobiotics and carcinogens, redox reactions, and biosynthesis of DNA and proteins [55] and is essential to normal cell function and replication [56]. In addition, glutathione has an inhibitory effect on a number of cytokines [57, 58]. Thus, our results suggest that ATV administration restored glutathione levels, thereby enhancing cell protection and regulating cell proliferation after exposure to 5-FU that generates toxic quantities of free radicals.

Although ATV has considerably improved local 5-FU-induced OM, the higher doses of ATV (5 mg/kg and 10 mg/kg), proportionally higher than those used in clinical practice, reduced the survival rate of animals with OM after the fifth day, suggesting a negative drug interaction between 5-FU and ATV. To clarify this hypothesis, we performed systemic evaluation of main organ histology, leukocytes and biochemical parameters.

Our results revealed that the animals treated with ATV 5 mg/kg alone showed no changes in serum levels of transaminases. This result is consistent with studies that show a low incidence of increased transaminases and exceedingly

**Fig. 8** Atorvastatin 5 mg/kg (ATV 5) amplified the leukopenia, neutropenia and lymphopenia in oral mucositis for 5 days. Oral mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal (i.p.) injection of 5-FU followed by mechanical trauma (MT) of the cheek pouch. Animals received saline, saline-ethanol 5% or ATV (1 or 5 mg/Kg i.p.) 30 min before the injections of 5-FU and daily until they were killed. Control groups consisted of normal animals (N), animals subjected to mechanical trauma (MT) only and animals not subjected to MT that received atorvastatin 5 mg/kg (ATV 5/saline) and saline. Blood was collected by heart puncture when the hamsters were killed on day 5. Bars represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of total leukocytes (a), neutrophils (b) and lymphocytes (c)  $\times 10^3/\text{ml}$  of at least 5 animals. \* $P < 0.05$  represents statistical differences compared to normal hamsters; \*\* $P < 0.05$  represents statistical differences compared to hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis and injected with saline or saline/ethanol. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test



**Table 3** Urea and creatinine levels (mg/dl) in the cheek pouches of hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis for 5 days

Experimental groups	Urea	Creatinine
Normal	39.20 $\pm$ 4.044	0.03833 $\pm$ 0.02386
MT	38.27 $\pm$ 2.283	0.0175 $\pm$ 0.01436
5-FU/saline	61.54 $\pm$ 11.38	0.04667 $\pm$ 0.02963
5-FU/sal-ethanol	41.17 $\pm$ 5.356	0.0475 $\pm$ 0.02323
ATV1/5-FU	49.16 $\pm$ 7.351	0.0860 $\pm$ 0.03043
ATV 5/5-FU	39.55 $\pm$ 6.775	0.0750 $\pm$ 0.03122
ATV 5/saline	50.91 $\pm$ 7.341	0.0400 $\pm$ 0.03082

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of six animals.  $P > 0.05$  ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test

rare progression to liver failure during statin therapy [59–61]. The combination of the highest dose (5 mg/kg) of ATV with 5-FU resulted in increased levels of AST and ALT on the fifth day of the experiment associated with vacuolization, focal necrosis and inflammatory cell infiltration

seen in liver histopathology. However, the intensity of the liver lesion is not likely to be responsible for increased mortality.

The leukocyte count in the fifth day revealed amplification of leukopenia, neutropenia and lymphopenia in animals treated with ATV 5 mg/kg and subjected to 5-FU-induced OM. Leukopenia is a well-known event in patients treated with most chemotherapeutic agents and is consistent with our previous study that shows leukopenia in animals subjected to experimental OM [35]. Various statins have been previously shown to exhibit antiproliferative effects on tumor cells via regulatory effects on cell cycle [62–64], but leukopenia is not a usual side effect of statins alone. Together with liver lesion, we speculate if -the amplification of 5-FU-induced leukopenia by ATV 5 mg/kg is causing high mortality of the animal group subjected to OM and treated with ATV 5 mg/kg. Reports from the literature show that infection is one of the major causes of morbidity in patients with OM and treated with a chemotherapeutic agent. The risk of infection increases with the severity and duration of neutropenia [65], and patients with mucositis and neutropenia have a relative

**Table 4** Bacteria in the serum of hamsters subjected to 5-FU-induced oral mucositis for 5 days and identification of microorganisms

Experimental groups	No. with bacteremia/total	Microorganism				
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Arizona</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative
Normal	0/6 (–)	–	–	–	–	–
MT	2/5 (+)	–	–	–	–	+ (2)
5-FU/saline	4/5 (+)	–	–	–	–	+ (4)
5-FU/sal-ethanol	5/6 (+)	+ (1)	–	–	–	+ (4)
ATV1/5-FU	6/7 (+)	–	+ (2)	–	–	+ (4)
ATV5/5-FU	5/5 (+)	+ (1)	+ (2)	+ (1)	+ (1)	–
ATV5/saline	3/6 (+)	–	–	–	–	+ (3)

Bacteremia was determined, varying from none (–) to positive (+). The identification of microorganisms is expressed as negative (–) and positive (+) for *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Arizona* sp. or *Staphylococcus* coagulase negative. The numbers in the microorganism column indicate the number of animals with positive results/number of animals in the tested group

risk of septicemia that is greater than four times that of individuals without mucositis [6].

To investigate whether the animals had bacteremia, microbiological cultures of the blood of animals were performed on the fifth day of experiment. The bacteremia was detected in groups MT and ATV 5/saline in a few animals and was not associated with deaths; all hamsters survived throughout the 10 days of the experiment. We speculated that the stress of anesthesia and mechanical trauma may result in the translocation of microflora of the jugal mucosa to systemic circulation of animals and result in bacteremia by Gram-positive bacteria. The hamsters treated with 5-FU-saline or saline/ethanol and ATV 1-FU exhibited bacteremia but with a predominance of Gram-positive bacteria (*staphylococcus* coagulase negative), and although leukopenic, were able to survive. However, the ATV 5-FU animals developed a systemic infection by Gram-negative bacteria. The bacteremia may have contributed to the high mortality rate in this group. We speculate if the inability of animals to resolve the infection may be due to severe leukopenia and more specifically neutropenia, which was amplified after the association treatment of 5-FU with ATV 5. This fact is an apparent contradiction with the demonstration that treatment with ATV reduces the mortality of patients with severe sepsis [66, 67] and improves survival of mice subjected to experimental sepsis [68]. A possible explanation is that ATV controls inflammation during sepsis in patients that are initially immunocompetent [69] or in experimental models of sepsis in which ATV does not potentiate the leukopenia [68].

In conclusion, treatment with ATV showed an important protective action in OM. However, the association of 5-FU with high doses of ATV deserves attention regarding hepatotoxicity and leucopenia. The possibility of using ATV in the treatment of human oral mucositis merits further investigation.

**Acknowledgments** The authors thank Maria Silvandira França Pinheiro, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil. This work was supported by the Brazilian Agency for Scientific and Technological Development (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

**Conflict of interest** The authors state no conflict of interest.

## References

- Clarke J, Butler R, Howarth G, Read L, Register G (2002) Exposure of oral mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy induced mucositis in the hamster. *Oral Oncol* 38:478–485
- Sonis ST, Fey EG (2002) Oral complications of cancer therapy. *Oncology* 16:680–686
- Jones JA, Avritscher EB, Cooksley CD, Michelet M, Bekele BN, Elting LS (2006) Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. *Support Care Cancer* 14:505–515
- Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK et al (2003) Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 66:253–262
- Sonis S, Clark J (1991) Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. *Oncology* 5:6–10
- Elting LS, Rubenstein EB, Rolston KVI, Bodey GP (1997) Outcomes of bacteremia in patients with cancer and neutropenia: observations from two decades of epidemiological and clinical trials. *Clin Infect Dis* 25:247–259
- Scully C, Sonis S, Diz PD (2006) Oral mucositis. *Oral Dis* 12:229–241
- Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC (2001) Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. *CA Cancer Journal Clin* 51:290–315
- Treister N, Sonis S (2007) Mucositis: biology and management. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 15:123–129
- Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Manson L et al (2000) Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol* 36:373–381

11. Sonis ST (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4:277–284
12. Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D (2007) Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacologic Reports* 25:483–499
13. Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH (2007) Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality: an overview of randomized trials [review]. *JAMA* 278:313–321
14. Pedersen TR (1999) Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy after AMI [review]. *Am Heart J* 138:177–182
15. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Up regulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129–1135
16. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274:21926–21931
17. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y et al (2001) An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 103:276–283
18. Huhle G, Abletshausen C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL (1999) Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res* 95:229–234
19. Rosenson RS, Brown AS (2002) Statin use in acute coronary syndromes: cellular mechanisms and clinical evidence. *Curr Opin Lipidol* 13:625–630
20. Stoll LL, McCormick ML, Denning GM, Weintraub NL (2004) Antioxidant effects of statins. *Drugs Today* 40:975–990
21. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S et al (1998) Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 98:839–844
22. Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F (2005) Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med* 15:202–206
23. Endres M, Laufs U (2004) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35:0001–0004
24. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawa S et al (2000) Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) in primary endothelial cells. *Life Sci* 67:863–876
25. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C et al (2001) Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin. *Nat Med* 7:687–692
26. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U et al (2000) Atorvastatin up regulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442–2449
27. Leitão RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EAL, Macedo FDB, Silva LR, Oriá RB et al (2007) Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-Fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol* 59:603–612
28. Souza MH, Troncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB (2003) Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res* 36:1383–1390
29. Bayer EA, Wilchek M (1980) The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Meth Biochem Anal* 26:1–45
30. Chen JC, Chen HM, Shyr MH, Fan LL, Chi TY, Chi CP et al (2000) Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. *J Formos Med Assoc* 99:213–218
31. Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205
32. Hsu SM, Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11):1349–1353
33. Souza GEP, Ferreira SH (1985) Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions* 17:97–103
34. Murray RR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (1995) Manual of clinical microbiology. American Society Microbiology, Washington, pp 65–77
35. Lima V, Brito GAC, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BAA, Augusto RF et al (2005) Effects of the tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci* 113:210–217
36. Wagner AH, Gebauer M, Gülden-zoph B, Hecker M (2002) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1784–1789
37. Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U et al (2002) Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 106:2888–2893
38. Sadeghi MM, Tiglio A, Sadigh K, O'Donnell L, Collinge M, Pardi R et al (2001) Inhibition of interferon-gamma mediated microvascular endothelial cell major histocompatibility complex class II gene activation by HMG-CoA reductase inhibitors. *Transplantation* 71:1262–1268
39. Sonis ST, Lindquist L, Van Vugt A, Stewart AA, Stam K, Qu GY et al (1994) Prevention of chemotherapy induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta-3. *Cancer Res* 54:1135–1138
40. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M et al (2004) Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100:1995–2025
41. Barsante MM, Roffe E, Yokoro CM, Tafuri WL, Souza DG, Pinho V et al (2005) Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 516:282–289
42. Sun YM, Tian Y, Li X, Liu YY, Wang LF, Li J et al (2009) Effect of atorvastatin on expression of IL-10 and TNF- $\alpha$  mRNA in myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 382:336–340
43. Wu KK (2005) Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72:89–93
44. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrea M (2005) Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-Kappa B activation. *Biochim Biophys Acta* 1687:76–83
45. Prasad R, Giri S, Nath N, Singh I, Singh AK (2005) Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B) nuclear factor-Kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J Neurochem* 94:204–214
46. Kröncke K, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric Oxide: Biol Chem* 2:107–120
47. Allaker RP, Mendez LSS, Hardie JM, Benjamin N (2001) Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 16:253–256

48. Estrada C, Gomez C, Martin C, Moncada S, Gonzalez C (1992) Nitric oxide mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  cytotoxicity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186:475–482
49. Ralston SH, Todd D, Helfrich MH, Benjamin N, Grabowski P (1994) Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* 135:330–336
50. Laurent M, Lepoivre M, Tenu J (1996) Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 314:109–113
51. Lohinai ZM, Szabó C (1998) Role of nitric oxide physiology and pathophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit* 4:1089–1095
52. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM (2001) Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 7:2–10
53. Baldassarre D, Porta B, Camera M, Amato M, Brusoni B et al (2009) Study group. Markers of inflammation, thrombosis and endothelial activation correlate with carotid IMT regression in stable coronary disease after atorvastatin treatment. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:481–490
54. Leitão RFC, Ribeiro RA, Lira MAS, Silva LR, Bellaguarda EAL, Macedo FDB et al (2008) Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:215–222
55. Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS (2003) Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF- $\beta_1$ . *J Surg Res* 111:222–228
56. Denno R, Rounds JD, Faris R, Holejko LB, Wilmore DW (1996) Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. *J Surg Res* 61:35–38
57. Karmali RA (1984) Growth inhibition and prostaglandin metabolism in the R3230AC mammary adenocarcinoma by reduced glutathione. *Cancer Biochem Biophys* 7:147–154
58. Buckley BJ, Kent RS, Whorton AR (1991) Regulation of endothelial cell prostaglandin synthesis by glutathione. *J Biol Chem* 266:16659–16666
59. Waters DD (2005) Safety of high-dose atorvastatin therapy. *Am J Cardiol* 96:69F–75F
60. Nakad A, Bataille L, Hamoir V, Sempoux C, Horsmans Y (1999) Atorvastatin-induced acute hepatitis with absence of cross-toxicity with simvastatin. *Lancet* 353:1763–1764
61. Ridruejo E, Mando OG (2002) Acute cholestatic hepatitis after re-initiating treatment with atorvastatin. *J Hepatol* 37:165–166
62. Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB (1991) Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res* 51:3602–3609
63. Chan KK, Oza AM, Siu LL (2003) The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 9:10–19
64. Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM (2005) Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5:930–942
65. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P (2004) Chemotherapy-induced and or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. Review article. *Neoplasia* 6:423–431
66. McGown CC, Brookes ZLS (2007) Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *Br J Anaesth* 98:163–175
67. Almog Y (2003) Statins, Inflammation and Sepsis. *Chest* 124:740–743
68. Merx MW, Liehn EA, Janssens U, Lütticken R, Schrader J, Hanrath P et al (2004) HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. *Circulation* 109:2560–2565
69. Kruger P, Fitzsimmons K, Cook D, Jones M, Nimmo G et al (2006) Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Med* 32:75–79