



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**TIAGO SANTOS MENDES**

**VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA: UM ALVO TERAPÊUTICO NO  
CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR  
5-FLUOROURACIL.**

**FORTALEZA - CE**

**2019**

TIAGO SANTOS MENDES

**VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA: UM ALVO TERAPÊUTICO NO  
CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR  
5-FLUOROURACIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima.

FORTALEZA - CE

2019

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

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

---

- M1v MENDES, TIAGO SANTOS.  
VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA: UM ALVO TERAPÊUTICO NO CURSO DA  
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR 5-FLUOROURACIL / TIAGO  
SANTOS MENDES. – 2019.  
110 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. PEDRO MARCOS GOMES SOARES.  
Coorientação: Prof. Dr. RICARDO DE FREITAS LIMA.
1. Mucosite intestinal. . 2. Alterações inflamatórias. . 3. Alterações morfofuncionais.. I. Título.  
CDD 611|
-

TIAGO SANTOS MENDES

**VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA: UM ALVO TERAPÊUTICO NO  
CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR  
5-FLUOROURACIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em: 08/03/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

  
PEDRO MARCOS GOMES SOARES  
Orientador

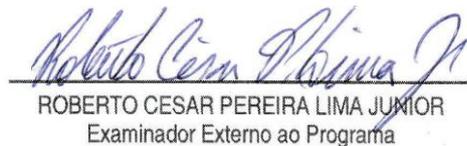
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA  
Examinador Externo à Instituição

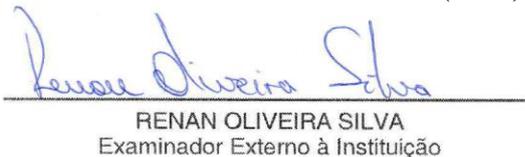
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

  
CARLOS EDUARDO DA SILVA MONTEIRO  
Examinador Externo à Instituição

Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
ROBERTO CESAR PEREIRA LIMA JUNIOR  
Examinador Externo ao Programa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
RENAN OLIVEIRA SILVA  
Examinador Externo à Instituição

Centro Universitário UNINTA

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus Avós,  
minha amada Mãe Maria do Socorro Bastos dos  
Santos, minha rocha e fortaleza!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ter me dado nesse momento muita saúde e paciência para poder enfrentar tal caminhada.

A minha mãe, Socorrinha, que simplesmente é a melhor mãe do mundo, sem a presença dela na minha vida constantemente, jamais teria alcançado os objetivos da minha vida até hoje, apesar de ainda estar em processo construtivo de formação, mas caráter, força, coragem e determinação, foram ensinados e repassados por ela, por isso me resta somente agradecer e dizer que a amo bem muito!

A toda minha família, tios, tias e primos, em especial aos meus avós Vilmar e Eunice, sempre importantes para mim.

Ao CNPq e a FUNCAP, pelo apoio financeiro na execução do projeto e com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, por todo acolhimento, paciência, dedicação, ensinamentos, colaboração ao longo desse trabalho e a quem me inspiro para continuar seguindo nessa árdua caminhada acadêmica.

Ao meu co-orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo de Freitas Lima, que me ensinou muito e que apesar da pouca paciência tem a qualidade de lecionar claramente.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus grandes amigos e parceiros do Laboratório de estudos da fisiofarmacologia do trato gastrintestinal - LEFFAG, Marcos Aurélio, Kaira, Cecília, Samara, Priscilla, Álvaro, Fábio, Renan, Lucas, Thiago, Fabrícia, Patrícia, Johnatan, Carlos, Humberto, Pedro Almir, Athayde, Barbara, Deysen, Ronaldo Farias e Rudy, por todo compromisso para comigo, dedicação e colaboração ao longo desse estudo.

Agradecimento especial ao amigo/irmão que Fortaleza e o LEFFAG me deram de presente, Marcos Aurélio, por todo compromisso, atenção, ensinamentos, conselhos, apoios em momentos difíceis, cooperação, raivas, zoações que geraram raiva e claro por sua contribuição para com meus experimentos.

Aos alunos de iniciação científica e amigos, do LEFFAG, Pedro Almir, Juan, Lorena, Sarah, Renata e Paulo, pela cooperação na realização dos meus experimentos.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

*"Uma mente que se abre a uma ideia nova,  
jamais retorna ao seu tamanho original"*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Analisou-se a via colinérgica anti-inflamatória no processo inflamatório na patogênese das alterações morfofuncionais causadas por 5-Fluorouracil (5-FU). Utilizou camundongos machos *Swiss* pesando de 25-30g, vindos do biotério central da universidade Federal do Ceará, sob o protocolo 74/2014, receberam dose única de 5-FU (450mg/kg-i.p.) e foram tratados com neostigmina (NEO-80µg/kg-i.p.) ou piridostigmina (PIRO-2mg/kg-i.p.), durante 3 dias iniciando 1 dia antes da indução com 5-FU, foram divididos em 6 grupos: controle salina (S), mucosite intestinal (5FU), salina + piridostigmina (P), salina + neostigmina (N), 5FU+P e 5FU+N. O sacrifício por deslocamento cervical seguiu 3 dias (3d) e 15 dias (15d) após a administração (fase inflamatória e pós inflamatória, respectivamente) foi obtido 1cm do segmento ileal para análise histopatológica e morfométrica, avaliação da mieloperoxidase (MPO), glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA), dosagem de IL-1β, atividade da acetilcolinesterase (AChE), imunohistoquímica para receptores M3, imunofluorescência para Hu C/D – ChAT, parâmetros funcionais de esvaziamento gástrico (E.G), transito intestinal (T.I) e dos parâmetros contráteis mediante eletroestimulação com curva de voltagem (10 a 80v) e curva de frequência (1 a 32Hz). Para análise estatística foi considerado  $p < 0,05$ , onde os dados foram expressos por mediana para análises histopatológica e morfométrica e média  $\pm$  erro padrão da média. Nos resultados da Histopatologia observamos o seguinte: (S: 0 (0-1); 5FU 3d: 2 (2-3)\*; P: 0 (0-1); N: 0 (0-1); 5FU+P: 2 (2-3); 5FU+N: 1 (1-2); 5FU 15d: 1 (0-1); 5FU+P: 1 (0-1); 5FU+N: 1 (0-1). Na MPO (S:  $3,24 \pm 0,31$ ; 5FU:  $17,92 \pm 2,01^*$ ; P:  $3,37 \pm 0,69$ ; N:  $4,18 \pm 0,18$ ; 5FU+P:  $16,48 \pm 3,06^*$ ; 5FU+N:  $4,98 \pm 0,93^{\#}$  UMPO/mg tecido), mostrou diferença por aumento da atividade enzimática no grupo 5-FU em comparação ao grupo S. Nos resultados da IL1β: (S:  $179,88 \pm 15,5$ ; 5FU:  $648,4 \pm 51,6^*$ ; N:  $45,38 \pm 9,3$ ; 5FU+N:  $201,18 \pm 28,3^*$  nM/µg de proteína/min.). Nos resultados do GSH (S:  $199,9 \pm 8,71$ ; 5FU:  $120,9 \pm 6,77$ ; P:  $107,5 \pm 9,38$ ; N:  $203,1 \pm 4,9$ ; 5FU+P:  $124,7 \pm 8,35$ ; 5FU+N:  $118,8 \pm 7,93^{\#}$  NP-GSH µg/100mg de tecido); nos resultados da atividade da AChE (S:  $971,3 \pm 210,9$ ; 5FU:  $376,4 \pm 70,98$ ; P:  $593,5 \pm 100,9$ ; N:  $597,385 \pm 97,3$ ; FU+P:  $297,5 \pm 80,58$ ; 5FU+N:  $839,43 \pm 100,93^{\#}$  nM/µg de proteína/min.), nos resultados do MDA obtivemos: (S:  $12,5 \pm 1,31$ ; 5FU:  $29,12 \pm 2,8^*$ ; P:  $11,3 \pm 1,69$ ; N:  $13,48 \pm 0,18$ ; 5FU+P:  $11,48 \pm 0,06^{\#}$ ; 5FU+N:  $11,58 \pm 1,43^{\#}$  nMol/g tecido). Nos resultados da imunohistoquímica M3: (S:  $41,87 \pm 6,41$ ; 5FU 3d:  $78,93 \pm 4,57^*$ ; 5FU 15d:  $76,24 \pm 5,53^*$  receptor M3/mm<sup>2</sup>) e na imunofluorescência nos neurônios do plexo mioentérico imunorreativos para HU C/D e neurônios colinérgicos imunorreativos para ChAT encontramos uma relação significativa no grupo 5FU: (S:  $66,6 \pm 2,1$ ; 5FU 3d:  $80,3 \pm 3,7^*\%$ ). Na contratilidade foi observado uma hipercontratilidade no íleo dos animais do grupo 5FU testado com eletroestimulação e farmacologicamente com Acetilcolina e carbacol. No 15º dia após o tratamento com 5-FU as alterações encontradas nas análises inflamatórias foram restabelecidas. Porém, um significativo retardo no esvaziamento gástrico e no trânsito gastrointestinal permanece. Podemos sugerir com esses resultados que as alterações na motilidade gastrointestinal constatadas por este estudo e descritas na literatura são por diminuição da atividade da AChE no período inflamatório e persistente no período pós-inflamatório, com isso a via colinérgica anti-inflamatória tem potencial para alvo terapêutico sem alterações significantes dos parâmetros inflamatórios.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal. Alterações inflamatórias. Alterações morfofuncionais.

## ABSTRACT

The interrelation between the enteric nervous system and the inflammatory process in the pathogenesis of morphofunctional changes caused by 5-Fluorouracil (5-FU) was analyzed. Male Swiss mice weighing 25-30g from the Federal Center of Ceará under protocol 74/2014 received a single dose of 5-FU (450mg / kg-ip) and were treated with neostigmine (NEO-80µg (kg<sup>-1</sup>), or pyridostigmine (PIRO-2mg / kg-ip) for 3 days starting 1 day before induction with 5-FU were divided into 6 groups: saline control (S), intestinal mucositis (5FU), saline + pyridostigmine (P), saline + neostigmine (N), 5FU + P and 5FU + N. The cervical displacement sacrifice followed 3 days (3d) and 15 days (15d) after administration (inflammatory and postinflammatory phases, respectively), 1cm of the ileal segment was obtained for histopathological and morphometric analysis, myeloperoxidase (MPO), glutathione GSH), malondialdehyde (MDA), IL-1β dosage, acetylcholinesterase activity (AChE), immunohistochemistry for M3 receptors, immunofluorescence for Hu C / D-ChAT, functional parameters of gastric emptying (EG), intestinal transit of the contractile parameters by electrostimulation with voltage curve (10 to 80v) and frequency curve (1 to 32Hz). For statistical analysis it was considered  $p < 0.05$ , where data were expressed as median for histopathological and morphometric analyzes and mean  $\pm$  standard error of the mean. In the results of Histopathology we observed the following: (S: 0 (0-1); 5FU 3d: 2 (2-3) \*; P: 0 (0-1); N: 0 (0-1); 5FU + P (2-1), 5FU + N: 1 (1-2), 5FU 15d: 1 (0-1), 5FU + P: 1 (0-1), 5FU + N: 1 (0-1). In MPO (S:  $3.24 \pm 0.31$ , 5FU:  $17.92 \pm 2.01$  \*, P:  $3.37 \pm 0.69$ , N:  $4.18 \pm 0.18$ , 5FU + P:  $16.48 \pm 3.06$  \*, 5FU + N:  $4.98 \pm 0.93$  # UMPO / mg tissue), showed difference by increased enzymatic activity in the 5-FU group compared to the S group. (S:  $179.88 \pm 15.5$ ; 5FU:  $648.4 \pm 51.6$  \*; N:  $45.38 \pm 9.3$ ; 5FU + N:  $201.18 \pm 28.3$  \* nM / µg protein / min). In the results of GSH (S:  $199.9 \pm 8.71$ , 5FU:  $120.9 \pm 6.77$ , P:  $107.5 \pm 9.38$ , N:  $203.1 \pm 4.9$ , 5FU  $376.4 \pm 70.98$ , P:  $593.5 \pm 100.9$ , N:  $597.385 \pm 97.3$ , FU+P:  $297.5 \pm 80.58$ , 5FU+N:  $839.43 \pm 100.93$  5FU+N:  $118.8 \pm 7.93$  # NP-GSH µg), the results of AChE activity (S:  $971.3 \pm 210.9$ ; 5FU:  $376.4 \pm 70.98$ ; P:  $593.5 \pm 100.9$ ; N:  $597.385 \pm 97.3$ ; FU+P:  $297.5 \pm 80.58$ ; 5FU+N:  $839.43 \pm 100.93$  # nM/µg de proteína/min.). In the MDA results, we obtained: (S:  $12.5 \pm 1.31$ ; 5FU:  $29.12 \pm 2.8$ \*; P:  $11.3 \pm 1.69$ ; N:  $13.48 \pm 0.18$ , 5FU+P:  $11.48 \pm 0.06\%$ ; 5FU + N:  $11.58 \pm 1.43$  # nMol/g tissue). In the results of the immunohistochemistry M3: (S:  $41.87 \pm 6.41$ ; 5FU 3d:  $78.93 \pm 4.57$ \*; 5FU 15d:  $76.24 \pm 5.53$ \* M3 receptor / mm<sup>2</sup>) and immunofluorescence in neurons immunoreactive myenteric plexus for HU C/D and cholinergic immunoreactive neurons for ChAT we found a significant relation in the 5FU group: (S:  $66.6 \pm 2.1$ ; 5FU 3d:  $80.3 \pm 3.7$ \*%). In contractility, hypercontractility was observed in the ileum of the animals of the 5FU group, tested with electrostimulation and pharmacologically with Acetylcholine and carbachol. On the 15th day after treatment with 5-FU the alterations found in the inflammatory analyzes were reestablished. However, a significant delay in gastric emptying and gastrointestinal transit remains. We can suggest from these results that the alterations in gastrointestinal motility observed by this study and described in the literature are by a decrease in AChE activity in the inflammatory and persistent period in the postinflammatory period, with that the cholinergic anti-inflammatory pathway has potential for therapeutic target without significant changes in inflammatory parameters.

**Keywords:** Intestinal mucositis. Inflammatory changes. Morphofunctional changes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estruturas químicas do 5-FU, Uracila e Timina. Ordenadas da esquerda para direita .....	21
Figura 2	– Metabolismo hepático do 5-FU .....	22
Figura 3	– Mecanismo de ação do 5-FU sobre a enzima timidilato sintase .....	23
Figura 4	– Fisiopatologia da mucosite oral .....	25
Figura 5	– Aumento do $[Ca^{+2}]_i$ na célula muscular lisa intestinal .....	28
Figura 6	– Mecanismos bioquímicos da contração do músculo liso .....	29
Figura 7	– Circuito neural do intestino .....	33
Figura 8	– Interações do epitélio intestinal .....	38
Figura 9	– Indução da mucosite intestinal .....	41
Figura 10	– Desenho do protocolo de estimulação elétrica .....	45
Figura 11	– Modelo de avaliação da resposta contrátil .....	46
Figura 12	– Representação esquemática do centro geométrico da refeição teste .....	48
Figura 13	– Fotomicrografias do segmento ileal .....	52
Figura 14	– Análise histológica e morfométrica ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	53
Figura 15	– Análise dos parâmetros bioquímicos no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	54
Figura 16	– Análise da atividade do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	56
Figura 17	– Análise da Contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	57
Figura 18	– Análise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	58
Figura 19	– Análise da atividade da atividade da acetilcolinesterase no íleo e no plasma	

	de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	59
Figura 20	– Analise das curvas de contração farmacológica por acetilcolina e carbacol de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	60
Figura 21	– Analise da imunohistoquímica para receptor M3 de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	61
Figura 22	– Fotografias das imunofluorescências do plexo mioentérico duplamente marcados para HuC/D e ChAT de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	63
Figura 23	– Densidade dos neurônios imunorreativos a Hu C/D e a ChAT de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	64
Figura 24	– Analise histológica e morfométrica ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	65
Figura 25	– Analise dos parâmetros bioquímicos no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	66
Figura 26	– Analise da atividade do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	68
Figura 27	– Analise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	70
Figura 28	– Analise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	72
Figura 29	– Analise dos parâmetros bioquímicos no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	74
Figura 30	– Esquema hipotético do estudo .....	88

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Catalogação dos neurônios do plexo mioentérico (íleo) de camundongos ... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU –	5-Fluorouracil.
5-HT –	5-Hidroxitriptamina
ACh –	Acetilcolina
AH –	Pós – Hiperpolarização
ATP –	Adenosina Trifosfato
CAM –	Calmodulina
CCE –	Entrada de cálcio capacitiva
CEUA –	Comitê de Ética em Uso dos Animais
CONCEA –	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
COX-2 –	Ciclooxygenase-2
CTP-11 –	Cloridrato de Irinotecano
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP –	Desoxinucleotídeo Trifosfato
DHFU –	Dihidrofluorouracil
DPD –	Diidropiridina-desidrogenase
dUMP –	Deoxiuridina Monofosfato
dUTP –	Deoxiuridina Trifosfato
dUTPase –	Deoxiuridina Trifosfatase
Dtmp –	Deoxitimidina Monofosfato
EROs –	Espécies Reativas de Oxigênio
EPM –	Erro Padrão da Média
FdUMP –	5-Fluoro-2'-deoxiuridina-5'-Monofosfato
FdUTP –	5-Fluoro-2'-deoxiuridina-5'-Trifosfato
FUTP –	5-Fluoro-uridina-5'-Trifosfato
gKCa –	Condutância de Potássio Ativada pelo Cálcio
GSH –	Glutationa reduzida
Gq –	Proteína G quinase
Hz –	Hertz
ICC –	Célula Intersticial de Cajal
I <sub>H</sub> –	Corrente de Hiperpolarização
IL - 1 –	Interleucina 1

IL- 4 –	Interleucina – 4
IL-11 –	Interleucina – 11
IL-13 –	Interleucina – 13
I.p. –	Intraperitoneal
IPANs –	Neurônios Aferentes Intrínsecos Primários
KCl –	Cloreto de Potássio
Kg –	Quilogramas
Kit –	Tirosina quinase
LPS –	Lipopolissacarídeo
MDA –	Malondialdeído
mg –	Miligramas
MHC –	Complexo Maior de Histocompatibilidade
ml –	Mililitros
MLCK	Miosina-Cinase de Cadeia Leve
MPO –	Mieloperoxidase
ms –	Milissegundos
MTX –	Metotrexato
Nav –	Canais de Sódio Voltagem-Dependentes
NADH –	Nicotinamida Adenina de Nucleotídeo
NANC –	Não-Adrenérgicos Não-Colinérgicos
NO –	Óxido nítrico
PACAP –	Peptídeo Pituitário Ativador da Adenilato Ciclase
PAF –	Fator de Agregação Plaquetária
pH –	Potencial hidrogênico
PKC –	Proteína quinase C
PLC –	Fosfolipase C
RNA –	Ácido Ribonucléico
REB –	Ritmo Elétrico Basal
RET –	Reorganizados Durante a Transfecção
s –	Segundos
S –	Sináptico
SNC –	Sistema Nervoso Central
SNE –	Sistema Nervoso Entérico

SP –	Substância P
STAT 6 –	Fator de transcrição 6
Th2 –	Células T Helper 2
TNBS –	Ácido 2,4,6 – trinitrobenzenoasulfônico
TNF- $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral alfa
TS –	Timidilato Sintase
TTX –	Tetrodotoxina
UDG –	Uracil – DNA Glicosilase
UFC –	Universidade Federal do Ceará
VIP –	Peptídeo Intestinal Vasoativo
VF –	Vermelho de Fenol
NaOH –	Hidróxido de sódio
NP-SH –	Grupo sulfidrílico não-protéico

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
®	–	Marca Registrada
G	–	Gramma
H	–	Hora
kg	–	Kilograma
Log	–	Logaritmo
M	–	Molar
mg	–	Miligrama
min	–	Minuto
ml	–	Mililitro
mm <sup>3</sup>	–	Milímetro cúbico
mmol	–	Milimolar
nm	–	Nanômetro
nmol	–	Nanomolar
pg	–	Picograma
α	–	Alfa
β	–	Beta
γ	–	Gama
μl	–	Micro litro
cm	–	Centímetros
Δg	–	Varição de grama.
μm	–	Micrometro.
μM	–	Micromolar.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
<b>2.1</b>	<b>Câncer e tratamento</b> .....	20
<b>2.1.1</b>	<i>Quimioterapia</i> .....	20
<b>2.2</b>	<b>5-Fluorouracil</b> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Mucosite intestinal por 5-FU</b> .....	24
<b>2.4</b>	<b>Contração do músculo liso</b> .....	27
<b>2.5</b>	<b>Alterações funcionais</b> .....	29
<b>2.6</b>	<b>Sistema Nervoso Entérico</b> .....	32
<b>2.7</b>	<b>Via colinérgica e via anti-inflamatória colinérgica</b> .....	35
<b>2.7.1</b>	<i>Sistema colinérgico</i> .....	35
<b>2.7.2</b>	<i>Via colinérgica anti-inflamatória</i> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	39
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1</b>	<b>Animais</b> .....	40
<b>4.1.1</b>	<i>Grupos experimentais</i> .....	40
<b>4.2</b>	<b>Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos</b> .....	41
<b>4.3</b>	<b>Histologia e morfometria</b> .....	42
<b>4.4</b>	<b>Ensaio da mieloperoxidase</b> .....	43
<b>4.5</b>	<b>Determinação da glutatona</b> .....	43
<b>4.6</b>	<b>Dosagem de malondialdeído</b> .....	44
<b>4.7</b>	<b>Medidas de contratilidade</b> .....	44
<b>4.8</b>	<b>Modelo de estimulação elétrica</b> .....	45
<b>4.9</b>	<b>Esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal</b> .....	47
<b>4.10</b>	<b>Atividade da acetilcolinesterase</b> .....	49
<b>4.11</b>	<b>Dosagem de citocinas</b> .....	49
<b>4.12</b>	<b>Imunohistoquímica</b> .....	49
<b>4.13</b>	<b>Imunofluorescência</b> .....	50
<b>4.14</b>	<b>Análise estatística</b> .....	51

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Confirmação da mucosite intestinal pelos parâmetros inflamatórios</b> .....	<b>52</b>
<b>5.1.1</b>	<i>Fotomicrografias do segmento ileal</i> .....	<b>52</b>
<b>5.1.2</b>	<i>Análise histológica e morfométrica</i> .....	<b>53</b>
<b>5.1.3</b>	<i>Análise dos parâmetros bioquímicos</i> .....	<b>54</b>
<b>5.2</b>	<b>Confirmação da mucosite intestinal por avaliação funcional</b> .....	<b>55</b>
<b>5.2.1</b>	<i>Análise do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal</i> .....	<b>55</b>
<b>5.2.2</b>	<i>Estudo da contratilidade por eletroestimulação – curva de voltagem</i> .....	<b>57</b>
<b>5.2.3</b>	<i>Estudo da contratilidade por eletroestimulação – curva de frequência</i> .....	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>Estudo do sistema colinérgico</b> .....	<b>59</b>
<b>5.3.1</b>	<i>Atividade da acetilcolinesterase</i> .....	<b>59</b>
<b>5.3.2</b>	<i>Curvas de acetilcolina e carbacol</i> .....	<b>60</b>
<b>5.3.3</b>	<i>Imunohistoquímica para receptor M3</i> .....	<b>61</b>
<b>5.3.4</b>	<i>Análise da morfometria, através da técnica de imunofluorescência, dos neurônios imuno-reativos ao receptor ChAT</i> .....	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>Estudo da participação da via colinérgica anti-inflamatória</b> .....	<b>65</b>
<b>5.4.1</b>	<i>Parâmetros histológicos e morfométricos</i> .....	<b>65</b>
<b>5.4.2</b>	<i>Parâmetros bioquímicos</i> .....	<b>66</b>
<b>5.4.3</b>	<i>Estudo do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal</i> .....	<b>67</b>
<b>5.4.4</b>	<i>Estudo da contratilidade por eletroestimulação – 3 dias</i> .....	<b>69</b>
<b>5.4.5</b>	<i>Estudo da contratilidade por eletroestimulação – 15 dias</i> .....	<b>71</b>
<b>5.4.6</b>	<i>Parâmetros bioquímicos – uso de antagonistas do receptor nicotínico <math>\alpha 7</math></i> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>
	<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO CEUA</b> .....	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal possui relevância mundial por se tratar da terceira neoplasia mais frequente nos homens e da segunda mais frequente nas mulheres. Sua incidência é superior a 1,3 milhão casos novos por ano, podendo levar a óbito (GASPARINI, et al., 2018). No Brasil, em 2017, estimaram-se novos casos em 36.360 pessoas (INCA, 2018). Dentre as causas deste tipo de câncer podem estar associados a fatores hereditários, ambientais, alimentares e outros fatores, como a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn (GASPARINI, et al., 2018).

Segundo Forones (2010), o quimioterápico mais utilizado para o tratamento do câncer colorretal é o 5-Fluorouracil (5-FU), usado em associação com outros quimioterápicos. As reações adversas mais destacadas são: a leucopenia, mucosite, estomatite, náusea, diarreia, vômito.

Mucosite é um termo clínico que descreve uma síndrome caracterizada por: ulceração da mucosa de todo o trato digestivo e sintomas pertinentes (SONIS, 1993). Tem sido descrito incidência de mucosite, em aproximadamente 40%, associada ao uso dos agentes quimioterápicos (CABALLERO et al., 1985; BISHOP et al., 1986; ROTH et al., 1991), além de ser bastante comum em pacientes submetidos à radioterapia abdominal (ALTMANN, 1974). A mucosite como entidade patológica limita muitas vezes o tratamento, cerca de 8.325 pessoas sofrem com os efeitos colaterais do tratamento do câncer no Brasil, segundo DATASUS (2017). Além de seus eventos inflamatórios no curso da mucosite, também resultam em alterações na fisiologia gastrointestinal como, alterações de permeabilidade, contração e trânsito intestinal (LIMA, 2016; LIMA, 2018).

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

A destruição celular gastrointestinal observada na mucosite, por uso de quimioterápicos, é resultado de hipoproliferação celular (TRIER, 1962; ALTMAN et al., 1974), com atrofia das vilosidades, aprofundamento das criptas que resulta de disfunção absorptiva, alteração na secreção de eletrólitos, principalmente Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, que pode resultar em diarreia (KEEFE et al., 1997; CARNEIRO-FILHO et al., 2004).

Assim, a mucosite intestinal resulta de eventos inflamatórios, que levam as alterações de permeabilidade e trânsito intestinal e de alterações na motilidade intestinal tanto na fase inflamatória, como na fase pós-inflamatória (SOARES et al., 2008; LIMA, 2016; LIMA, 2017).

Inúmeros trabalhos verificaram alterações na neurotransmissão entérica, purinérgica (DE MAN et al., 2003) durante experimento de inflamação crônica (VENKOVA et al., 2000; BALEBA et al., 2001 e 2002) e aguda do intestino (JACOBSON et al., 1997), bem como a relação sistema nervoso autônomo (SNA) com a resolução do processo inflamatório no trato gastrointestinal. (PAVLOV E TRACEY, 2005; GHIA et al., 2009). Fato é que o entendimento da inter-relação entre o sistema nervoso entérico, sistema autonômico e o processo inflamatório na patogênese das alterações morfofuncionais e motilidade gastrointestinal induzida por 5-FU, ainda é uma lacuna da literatura. Assim, a possibilidade de elucidar esta inter-relação pode culminar em novas abordagens terapêuticas, como a estimulação da via colinérgica anti-inflamatória, para a mucosite intestinal causada por antineoplásicos.

A Alteração do sistema nervoso entérico, via colinérgica, em alguns casos, está correlacionada ao agravamento de algumas patologias. Na clínica, disfunção autonômica, um termo usado para indicar uma diminuição relativa ou absoluta da atividade vagal ou o aumento da atividade simpática, está associada ao risco de arritmias letais pós-infarto e risco aumentado de morte por causas cardíacas (SCHWARTZ et al. 1992; LA ROVERE et al., 1998; LA ROVERE et al., 2001) e mais recentemente com agravamento de doenças inflamatórias intestinais (PAVLOV E TRACEY, 2005; GHIA et al., 2009).

Nossa hipótese é que o 5-FU gere mudança sináptica do sistema nervoso entérico e que uma redução da atividade colinérgica poderia agravar ainda mais este remodelamento, por disfunção colinérgica, enquanto um aumento da função colinérgica poderia minimiza as alterações morfofuncionais do trato gastrointestinal, por ativação da via anti-inflamatória colinérgica. Dentro dessa plasticidade colinérgica, em revisão sistemática de Pavlov e Tracey (2005), resumiram estudos sobre a via anti-inflamatória colinérgica, e sua regulação periférica e central. Os autores discutiram também sobre as potenciais implicações terapêuticas da via anti-inflamatória colinérgica modulada por células do sistema imune, principalmente macrófagos, tomando como base para possível alvo de tratamento de doenças inflamatórias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer e tratamento

O câncer vem se convertendo nas últimas décadas em problema de saúde pública mundial. Pode-se atribuir o aumento do número de casos à urbanização, ao incremento na expectativa de vida e, também, ao melhor diagnóstico (LOPES et al., 2002; ROSENFELD et al., 2001 apud VERDE, 2007). A busca por formas de tratamento antineoplásico mais efetivas e menos agressivas tem aumentado. Os tratamentos disponíveis atualmente incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e, mais recentemente, imunoterapia, com resultados promissores (VERDE, 2007). Os fármacos antineoplásicos constituem o tratamento de numerosas neoplasias malignas de forma isolada ou em conjunto com a radioterapia e/ou o tratamento cirúrgico (LIMA, 2004).

#### 2.1.1 Quimioterapia

A quimioterapia, tratamento antineoplásico sistêmico, é classificada de três maneiras principais: neoadjuvante, terapêutica e adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante caracteriza-se pelo uso de quimioterapia como tratamento inicial de pacientes que serão submetidos a tratamento cirúrgico e/ou radioterápico. A terapêutica ocorre quando a abordagem única é a submissão do paciente à quimioterapia. Já a adjuvante é utilizada após o tumor primário ter sido controlado por terapia cirúrgica ou radioterapia (ANELLI, 2002; GIMENEZ, 2003; CHU; De VITA, 2001 apud VERDE, 2007).

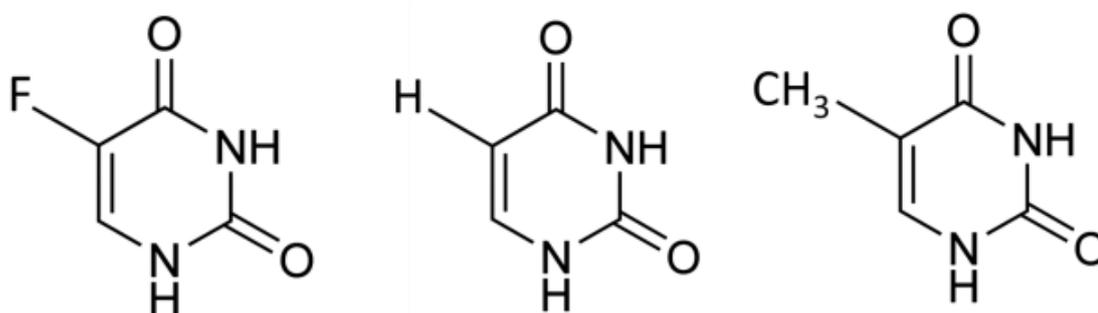
O tratamento objetiva a erradicação de células tumorais viáveis, com mínima lesão aos tecidos do hospedeiro. As drogas antineoplásicas induzem a morte ou comprometem as células tumorais susceptíveis, bloqueando vias metabólicas ou bioquímicas sensíveis às drogas (LIMA, 2004).

Percebe-se que cada quimioterápico tem perfil de toxicidade distinto e os efeitos colaterais têm relação direta com a droga utilizada e o estado clínico do indivíduo (LIMA, 2004; VERDE, 2007). Neste sentido, o 5-FU é um dos quimioterápicos que causa importantes efeitos colaterais (McCARTHY et al., 1998; LEITÃO et al., 2007). Mielotoxicidade, cistite, toxicidade pulmonar, cardiotoxicidade e mucosite são os efeitos adversos mais encontrados após o uso deste agente (LIMA, 2004; BOWEN et al., 2006; VERDE, 2007).

## 2.2 5-Fluorouracil

O 5-FU é uma pirimidina fluorada, preparada a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor, mais estável, na posição cinco da molécula de uracil (Figura 1). O sítio de substituição no anel pirimidina foi selecionado para inibir a conversão do nucleotídeo uracil em timidina (PINEDO; PETERS, 1988).

Figura 1. Estruturas químicas do 5-FU, uracila e timina. Ordenadas da esquerda para a direita.

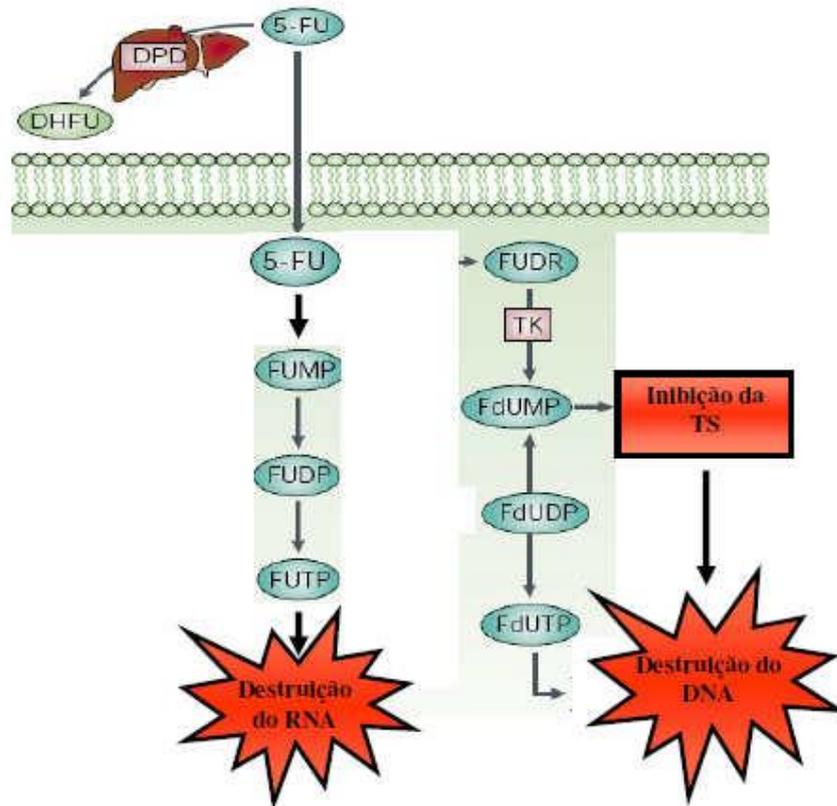


Fonte. Adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003).

Logo, o 5-FU é um agente quimioterápico antimetabólito pertencente ao subgrupo dos fármacos análogos da pirimidina, desenvolvido na década de 50 do século passado, tem a função de inibir moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954). Atua inibindo a atividade da enzima timidilato sintetase, reduzindo a produção do nucleotídeo timina; ou sendo incorporado ao DNA e/ou RNA das células, impossibilitando seu funcionamento normal e induzindo apoptose (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003; SAVVA-BORDALO et al., 2010).

A citotoxicidade desta droga é atribuída a três diferentes mecanismos (Figura 2): 1. incorporação de fluoro trifosfato (FUTP) no RNA; 2. incorporação de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA genômico, 3. inibição da enzima timidilato sintetase (TS) relacionado à síntese de nucleotídeos (Figura 2) (GREM, 1997; LONGLEY et al., 2004; NOORDHUIS et al., 2004; HARRIS et al., 2005).

Figura 2. Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.

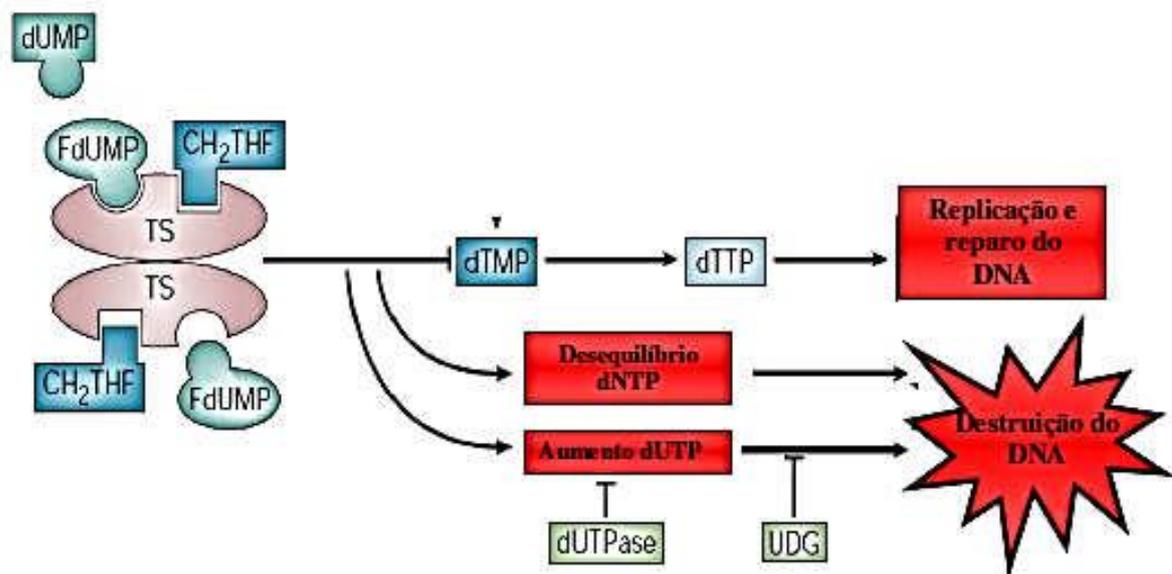


Fonte. Adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003).

5-FU – 5-Fluorouracil; DPD – diidropirimidina desidrogenase; DHFU – dihidrofluorouracil; FUMP – monofosfato de fluorouridina; FUDP – difosfato de fluorouridina; FUTP – trifosfato de fluorouridina; FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS – timidilato sintetase; TK – timidina cinase; FUDR - fluorodeoxiuridina.

Acredita-se que o principal mecanismo de citotoxicidade do 5-Fluorouracil seja a inibição da enzima timidilato sintetase, uma vez que, esta é responsável pela conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-metileno tetra-hidrofolato (CH<sub>2</sub>THF) como um doador de grupos metil, no entanto, na presença do metabólito ativo do 5-FU que é o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), este por sua vez, liga-se ao sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS/CH<sub>2</sub>THF. Esse complexo é capaz de bloquear o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo, inibindo a síntese de dTMP. Isso resulta em um desequilíbrio nas concentrações de deoxinucleotídeos (dNTP) e também um aumento dos níveis de deoxiuridina trifosfato (dUTP), ambos podem causar destruição do DNA. A extensão ao dano do DNA causado pela dUTP é dependente dos níveis das enzimas pirofosfato dUTPase e uracil-DNA glicosilase (UDG) (Figura 3) (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003).

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



Fonte. Adaptado de Longley, Harkin e Johnston, (2003).

A enzima timidilatosintase (TS) junto ao cofator CH<sub>2</sub>THF (5,10-metilenotetrahidrofolato) converte dUMP a dTMP que por sua vez gera dTTP (trifosfato de deoxitimidina), componente essencial da molécula de DNA. Esquema representativo da ação inibitória do metabólito ativo de 5-FU, FdUMP. FdUMP se liga ao sítio ativo da enzima formando um complexo estável com ela e seu cofator, bloqueando a ligação do composto dUMP e a síntese de dTMP e dTTP, impedindo a síntese e/ou o reparo da molécula de DNA

O 5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o ovário, cabeça, pescoço, câncer de mama e o de coloretal, sendo de maior impacto nesse último tipo (NOORDHUIS et al., 2004). Porém, a ação desse quimioterápico não se limita somente às células neoplásicas. Os efeitos colaterais são mais observados nas células com alto índice mitótico, como os tecidos de rápida proliferação (KIM et al., 2006). Por exemplo, na medula óssea resulta em granulocitopenia, trombocitopenia, no trato gastrintestinal resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, entre outros (KOENIG; PATEL, 1970). Outros efeitos como alopecia, dermatite, cardiotoxicidade e mais raramente, neurotoxicidade também são efeitos tóxicos observados na utilização do 5-FU (PIRZADA; ALI; DAFER, 2000). Também são relatadas alterações na microflora intestinal, que podem contribuir para a ocorrência da diarreia (SAVVA-BORDALO et al., 2010).

Aproximadamente 40% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam mucosite, podendo chegar a 100% com o uso de altas doses. Isso contribui para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia

proposta e refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (SONIS, 2004; BOWEN et al., 2006; STRINGER et al., 2009; VLIET et al., 2010). Devido a esses fatores, torna-se importante a busca por alternativas terapêuticas que visem diminuir ou amenizar os efeitos colaterais como a mucosite intestinal resultante do tratamento quimioterápico com 5-FU.

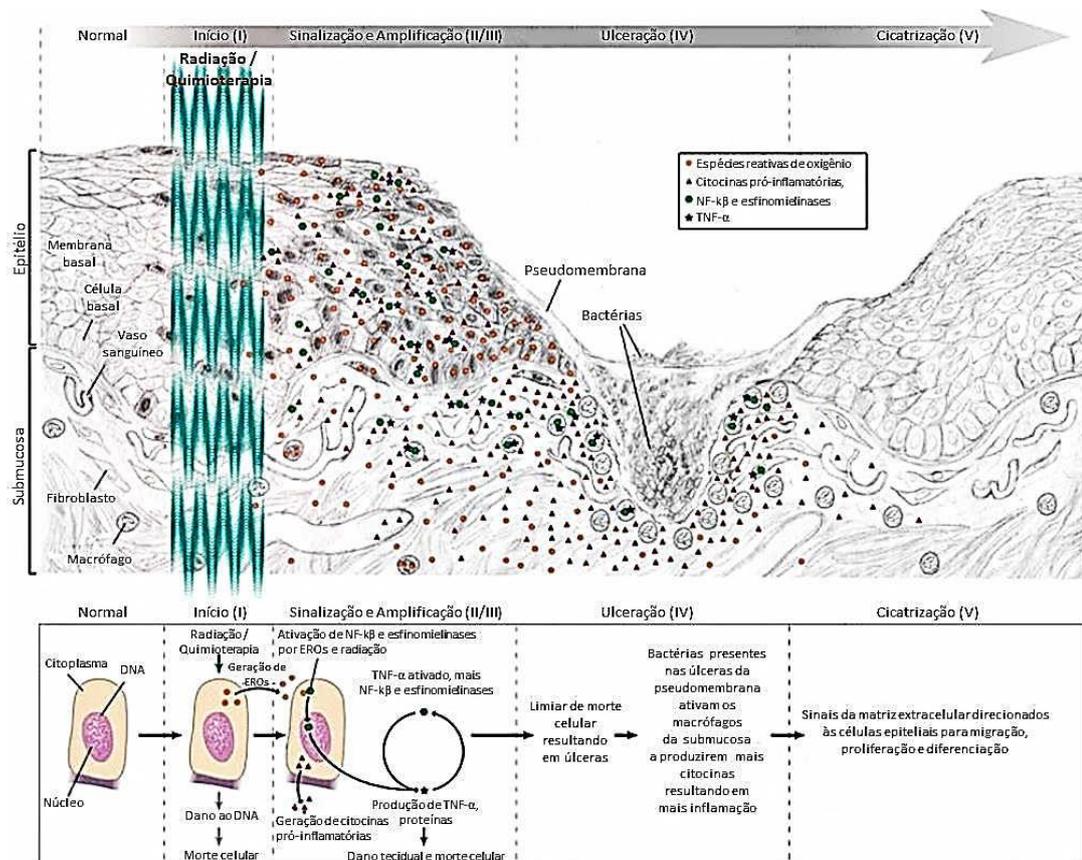
### **2.3 Mucosite intestinal por 5-FU**

As manifestações da mucosite gastrintestinal são dor abdominal e diarreia. O trato gastrintestinal é vulnerável por causa da alta proliferação e frequência na renovação celular (PARRILI et al., 1989; PLEDGER et al., 1988). Sonis, 2009, caracterizou 4 fases fisiopatológicas da mucosite (figura 4): uma fase inflamatória/vascular, uma fase epitelial, uma fase bacteriológica/ulcerativa e uma fase de resolução. Cada fase é independente e é consequência de uma série de ações mediadas por citocinas, fatores de crescimento, sobre o efeito direto do quimioterápico no epitélio, sobre a flora bacteriana, além de depender do “status” da medula óssea do paciente (PICO et al., 1998).

O exato mecanismo biológico da mucosite intestinal ainda não está totalmente esclarecido (GIBSON; KEEFE, 2006). Sonis (2004) propôs um modelo de cinco fases para descrever o desenvolvimento da mucosite oral, embora, não se possa garantir que essas fases sejam as mesmas para mucosite intestinal, ou que a totalidade dos eventos fisiopatológicos esteja presente em todos os casos de mucosite, sabe-se que os eventos inflamatórios envolvidos, assim como a recuperação da mucosa, ocorrem mais rapidamente no epitélio intestinal do que no oral (SONIS et al., 2004).

A descrição do modelo em fases proposto por Sonis foi uma forma didática para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos no desenvolvimento da mucosite (Figura 4), entretanto, é importante reconhecer que essa caracterização artificial pode não refletir amplamente os efeitos em processo, uma vez que existe uma dinâmica fluida para o mesmo, bem como uma variabilidade individual (SONIS, 2004).

Figura 4. Fisiopatologia da mucosite oral.



Fonte. Adaptado de Sonis (2009).

A fisiopatologia da mucosite como um processo de cinco estágios: iniciação; primeira resposta ao dano (mensagem e sinalização); amplificação; ulceração e cicatrização.

Na primeira fase há liberação de citocinas interleucina 1 (IL-1) do epitélio e dos tecidos conectivos devido ao efeito de quimioterápicos (SONIS, 1998). Citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 podem iniciar uma resposta inflamatória que resulta em aumento da vascularização subepitelial (PICO et al., 1998). A segunda fase, ou fase epitelial é caracterizada pela redução da renovação epitelial que resulta em atrofia. A fase ulcerativa é a mais sintomática e complexa, dentre as 4 fases, ocorre falha na barreira da mucosa, juntamente com neutropenia, que pode levar o paciente ao risco de infecção. E por último observa-se a fase de resolução da mucosite, com proliferação e diferenciação celular, retorno normal das células sanguíneas periféricas e controle da flora bacteriana (PICO et al., 1998). Já era conhecida a importância da IL-1 $\beta$  na modulação da função neuromuscular durante inflamação gastrointestinal (COLLINS, 1996). Posteriormente, constou-se um aumento da contratilidade do intestino de camundongos infectados por *Schistosoma* na fase de resolução (MOREELS et al., 2001).

A mucosite intestinal por 5-FU em modelos experimentais já foi associada ao acúmulo de infiltrado neutrofílico tecidual (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013). A presença de polimorfonucleares também implica na ocorrência de diarreia, pois, conforme mostrado por Madara et al (1993), estes, podem produzir adenosina monofosfato cíclico (cAMP) que se convertido em adenosina, ativa a secreção eletrogênica de cloreto e o transporte passivo de água para o lúmen intestinal. Com isso, é possível elucidar, parcialmente, a ocorrência da diarreia secretória em processos inflamatórios intestinais (SOARES et al., 2013). Logo, o processo inflamatório estabelecido trará grande impacto sobre as células epiteliais intestinais e sobre células especializadas do intestino, como as células produtoras de muco e as células enteroendócrinas (NASH; STAFFORD; MADARA, 1987; PARSONS et al.,1987), podendo causar um prejuízo na função de barreira, uma vez que, sua ação sobre as *tight junctions* - junções apertadas e justas entre as membranas laterais das células - pode promover um aumento da permeabilidade, dificultando a absorção (NUSRAT et al., 1997; SEIDLER et al., 2006).

Por fim, a fase de cicatrização acontece de forma espontânea, ao término do tratamento. A proliferação celular é estimulada por novos mensageiros da matriz extracelular que migram para a superfície ulcerada, estimulando a diferenciação no tipo especializado de epitélio da mucosa. Desta forma, a úlcera é recoberta pelo epitélio e o tecido começa a formar as camadas, possibilitando a regeneração da arquitetura normal da mucosa. Ocorre, ainda, restabelecimento da microbiota intestinal (SONIS, 2004).

Além disso, a fase de ulceração representa um grande risco de infecção ao paciente, uma vez que bactérias colonizam a superfície ulcerada e liberam substâncias tóxicas na parede celular que irão penetrar o tecido adjacente e estimular diretamente macrófagos infiltrantes que liberam mais citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para uma maior resposta inflamatória, que acarretará em um maior dano tecidual (VILLA; SONIS, 2015).

Assim, a presença de infiltrado polimorfonuclear também é característica dessa fase (SONIS et al., 2004), não só por ativação de células inflamatórias por produtos da parede celular dos microrganismos, como também pela maior expressão de moléculas de adesão pela ativação de NF- $\kappa$ B e os produtos das reações das EROs, que culminam em uma maior atração de neutrófilos circulantes, estimulando a produção de oxidantes por essas células (VAN YE; ROZA, PIEPER, 1993).

Além das alterações inflamatórias, Soares et al. (2008) demonstraram que durante a mucosite intestinal por 5-FU ocorre uma alteração no padrão contrátil do intestino,

caracterizado pela hiper-reatividade do músculo intestinal a agonistas como o carbacol, revelando uma alteração funcional do intestino, presente tanto na fase inflamatória como na pós-inflamatória.

Logo, há uma complexidade biológica inerente ao modelo de mucosite, a compreensão dos mecanismos envolvidos em tal fenômeno é necessária para que se possa propor novas abordagens clínicas, sugerindo novos alvos para o tratamento, de forma a melhorar o entendimento do processo e selecionar a fase apropriada para a intervenção nos pacientes (SONIS, 2004). Sabe-se que o controle e prevenção desses sintomas são de suma importância, uma vez que podem limitar o tratamento, levar à necessidade de sua interrupção, reduzir a motivação do paciente em prosseguir com o plano de tratamento e comprometer o controle local do tumor e as taxas de sobrevida (BRITO et al., 2012).

Desta forma, a mucosite intestinal tem sido foco de alguns estudos que possibilitaram além de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares, possíveis formas de prevenção e tratamento (PETERSON; BENSADOUN; ROILA, 2011), nos quais, fatores de crescimento, citocinas e antagonistas, além do uso de probióticos e diversos nutrientes são alguns dos alvos de estudo na área terapêutica (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2006; KEEFE, 2007; SULTANI et al., 2012; JUSTINO et al., 2015).

## 2.4 Contração musculo liso intestinal

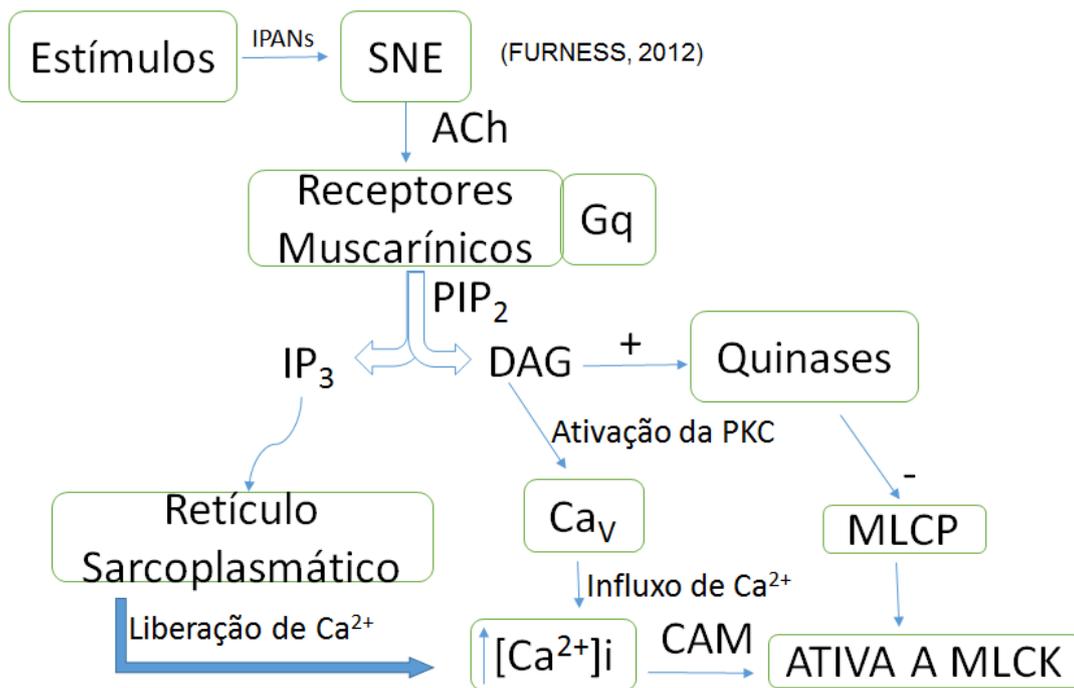
O músculo liso intestinal é do tipo unitário, de modo que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pela estimulação elétrica das células musculares adjacentes, uma vez que suas células se comunicam por junções intercelulares de baixa resistência elétrica, as *gap-junctions*. As fibras musculares estão dispostas em feixes e são inervadas por um único neurônio, formando uma unidade motora. Quando o neurônio secreta seus neurotransmissores, as células mais próximas são excitadas, e a estimulação é repassada a todas as células, graças as *gap-junctions*. Isso leva à onda de contração, peristaltismo (KOEPPEN E STANTON, 2009; AIRES, 2012).

Esse processo contrátil está diretamente relacionado ao aumento da concentração intracelular de cálcio  $[Ca^{2+}]_i$ . O  $Ca^{2+}$  utilizado para a ativação do aparelho contrátil entra no compartimento citoplasmático durante períodos de despolarização da membrana, estiramento mecânico, ou estimulação por agonistas (JHONSON, 2014).

A principal forma de entrada dos ions  $Ca^{2+}$  se dá pelos canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes em resposta a presença da despolarização da membrana muscular. Estando a

despolarização relacionada a acetilcolina (ACh) liberada pelos neurônios do Sistema Nervoso Entérico (SNE), que ativa os receptores muscarínicos acoplados a proteína G, presentes na fibra muscular lisa gastrointestinal, e promove a ativação da Fosfolipase C (PLC). Além desses mecanismos o  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula muscular pelos Canais de Entrada Capacitiva de  $\text{Ca}^{2+}$  (CCE), isso leva ao aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , figura 5, (SANDERS, 2001). Logo após a contração os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são bombeados para fora da célula, por uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (CMAP) e pelo cotransportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  (NCE) e do citosol para o retículo sarcoplasmático pela Bomba Sarco (Endo) Retículo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), assim a atividade da miosina-quinase é interrompida e uma fosfatase remove o grupo fosforidil da miosina, desligando o complexo actina-miosina e promovendo o relaxamento muscular, figura 6. (SANDERS, 2001; JHONSON, 2014).

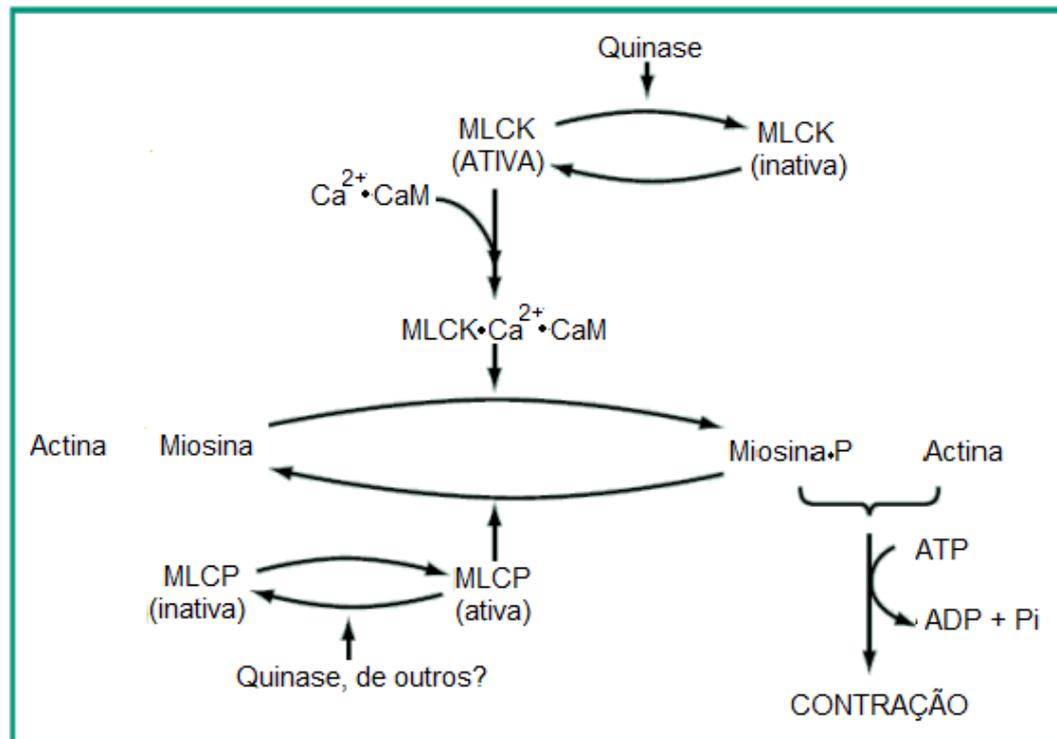
Figura 5. Aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na célula muscular lisa intestinal.



Fonte. Adaptado de Sanders, (2001); Aires (2012); Jhonson, (2014).

O potencial de repouso da fibra muscular lisa varia entre  $-40\text{mV}$  a  $-60\text{mV}$ , sendo sua despolarização deflagrada principalmente pela condutância de  $\text{Ca}^{2+}$  em conjunto com o menor influxo de  $\text{Na}^+$ . No que se refere a repolarização da fibra muscular lisa, a mesma, ocorre concomitante com o fim da condutância de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$  e devido principalmente ao efluxo  $\text{K}^+$  (SUZUKI, 2000; SANDERS et al., 2004; AIRES, 2012).

Figura 6. Mecanismos bioquímicos da contração do músculo liso



Fonte. Adaptado de Jhonson, (2014)

## 2.5 Alterações funcionais

As alterações de contratilidade no modelo de mucosite intestinal foi demonstrada pela primeira vez por Soares et al. (2008), onde na ocasião a administração de 5-FU causou a inflamação de todo o intestino delgado em ratos. E quando o músculo duodenal foi avaliado na presença de carbacol, o mesmo apresentou uma hipercontratibilidade na fase inflamatória e pós-inflamatória, contrastando com o retardo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal observado. Essa ambiguidade demonstra que a mucosite intestinal gera dismotilidade, o que pode estar associado aos sintomas colaterais observados nos pacientes tratados com 5-FU.

Além disso, o fato do dano disfuncional permanecer mesmo após o fim do processo inflamatório sugere uma neuroplasticidade entérica ocasionada pela mucosite, que tem início na fase inflamatória e altera o perfil contrátil do músculo liso intestinal de forma permanente, corroborando com os achados de outros modelos para a inflamação intestinal (COLINS, 1996; LOMAX; FERNADEZ; SHARKEY, 2005; VASINA et al., 2006; LOMAX et al., 2006).

Outro estudo em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, durante a avaliação funcional, Lima-Junior et al. (2012) encontram resultados de aumento da

contratilidade do músculo duodenal à ACh, reafirmando que o processo inflamatório da mucosa tem consequências no perfil contrátil da musculatura intestinal, seja pela interação entre mediadores inflamatórios e o SNE, ou pela alteração na modulação neuromuscular.

Os estudos específicos de avaliação contrátil em modelos de mucosite ainda são escassos, por isso faz-se necessário o emprego de outros modelos inflamatórios intestinais para compreender o dano funcional imposto ao intestino pela inflamação, porém, as alterações da contratilidade do músculo liso intestinal têm sido documentadas há bastante tempo independentemente do agente utilizado para induzir a inflamação (GROSSI, et al., 1993; MOURELLE et al., 1996).

Nesse intuito, vários estudos eletrofisiológicos foram realizados em modelos animais de inflamação gastrintestinal, a fim de elucidar os mecanismos subjacentes a dismotilidade intestinal durante os processos inflamatórios. Na colite induzida em cobaia com Ácido 2,4,6 – Trinitrobenzenoasulfônico (TNBS), neurônios aferentes intrínsecos primários no plexo mioentérico estavam hiperexcitados com um aumento na descarga do potencial de ação e da atividade espontânea (LINDEN et al., 2003), sugerindo que uma perturbação do componente aferente de reflexos motores intrínsecas podem ocorrer durante a inflamação e podem contribuir para alterações da motilidade do intestino. Como resultado da excitabilidade dos neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs), a amplitude e duração do potencial de ação de neurônios motores é reduzida (LINDEN et al., 2003).

Existem evidências na literatura que demonstraram a existência da alteração na contratilidade tanto do músculo circular como longitudinal do intestino após colite experimental induzida por TNBS. Porém essas alterações não estão bem compreendidas, entretanto, observa-se na literatura que essas alterações de motilidade induzidas por inflamação podem ocorrer por distúrbios de liberação de neurotransmissores do plexo mioentérico, por hipertrofia e por hiperplasia muscular (MOREELS et al., 2001).

Na procura de verificar essas mudanças, em modelo de colite foi encontrada um aumento da apoptose de neurônios mioentéricos no modelo de colite por TNBS o que pode explicar a função gastrointestinal alterada, quanto a motilidade e secreção, pela inflamação (BOYER et al., 2005; LINDEN et al., 2005). Um exemplo de alteração funcional em locais remotos a partir de cólon inflamado é evidenciado por uma diminuição da noradrenalina (JACOBSON et al, 1997; BLANDIZZI et al, 2003) e acetilcolina (BLANDIZZI et al., 2003) na liberação do jejuno e íleo.

No entanto, o aumento da contratilidade intestinal não ocorre apenas na fase inflamatória. Em modelos de inflamação intestinal por *Schistosoma* foi observado o aumento

da contratilidade intestinal quando induzidos por ACh, KCl, SP, e 5-HT, na 12ª semana depois da infestação, na fase de resolução. E quando na presença de indometacina a atividade espontânea do músculo liso intestinal era diminuída, sugerindo atividade moduladora de prostaglandina na manutenção do tônus intestinal (MOREELS et al., 2001).

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

O estudo de Moreels e colaboradores, 2001, utilizando TNBS para induzir ileite em ratos, demonstraram que no período da fase inflamatória, havia um aumento da responsividade do músculo a agonistas, como ACh, e que no período pós-inflamatório aumento da responsividade persistia, ou seja, hipercontração. Essa contração, no entanto, era bloqueada por 1µM de Tetrodotoxina (TTX) e 1µM de atropina demonstrando que o bloqueio do plexo mioentérico é importante para a modulação do processo contrátil do músculo intestinal. Foi demonstrado que a disfunção de motilidade resulta em risco para o desenvolvimento de síndrome do intestino irritável, em que pacientes com episódios de gastroenterites tem 10 vezes o risco aumentado para desenvolver síndrome do intestino irritável.

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

Na tentativa de esclarecer a disfunção da mucosa e da secreção colônica no período pós-inflamatório, Zamuner e colaboradores (2003) encontraram dados de que ratos tratados com TNBS apresentavam no período pós-colite um aumento na expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), isso era observado quando o cólon era tratado com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), a expressão de COX-2 estava aumentada em quase 700%, quando comparado ao cólon controle só tratado com LPS e sem colite. Essas

observações sugerem uma importância chave para a COX-2 como mediadora da disfunção epitelial pós-colite. E que também o óxido nítrico (NO) juntamente com a COX-2 poderia mediar essas alterações no transporte e na barreira da mucosa intestinal, como mostrado por Resta-Lenert e Barrett, 2002.

Contudo, o uso de antagonistas dos receptores de serotonina esses problemas tiveram uma boa resolução. Entretanto, pacientes sob terapia antineoplásica podem sofrer de outros sintomas, como dispepsia, disfagia e diarreia que não são controlados por drogas antieméticas (RIEZZO, et al., 2005). O conjunto desses sintomas foi denominado de síndrome dispéptica associado ao câncer. Sugere-se ainda que parte da causa dessa síndrome pode estar associada a anormalidades da motilidade do trato gastrointestinal (RIEZZO, et al., 2005). Na literatura mostram que hipomotilidade intestinal e diminuição do esvaziamento gástrico têm sido caracterizadas em modelo de ileite (DE JONGE, et al., 2003). Bem como mostram que o óxido nítrico produzido de leucócitos é importante na geração de inflamação intestinal e inibição na motilidade gastrointestinal depois de modelos de ileite (KALFF, et al., 2000).

A interação complexa dentro da parede gastrointestinal entre mastócitos, macrófagos residenciais e células da glia de um lado, com neurônios, células intersticiais de cajal e células de músculo liso do outro representa o binômio inflamação - contratilidade intestinal (De WINTER; De MAN, 2010). Isso, porque a inflamação intestinal provoca alterações no número e na codificação neuroquímica dos neurônios entéricos; mudanças neurais mediadas em pequenos e grandes padrões de motilidade intestinal; defeitos no controle neural das respostas secretoras epiteliais a uma variedade de estímulos; aumento da excitabilidade de neurônios entéricos e alterações na transmissão sináptica dentro dos microcircuitos entéricos. Outra observação de modelos animais é que a inflamação localizada pode conduzir a alterações neuronais em locais distantes do TGI (LOMAX; FERNADEZ; SHARKEY, 2006).

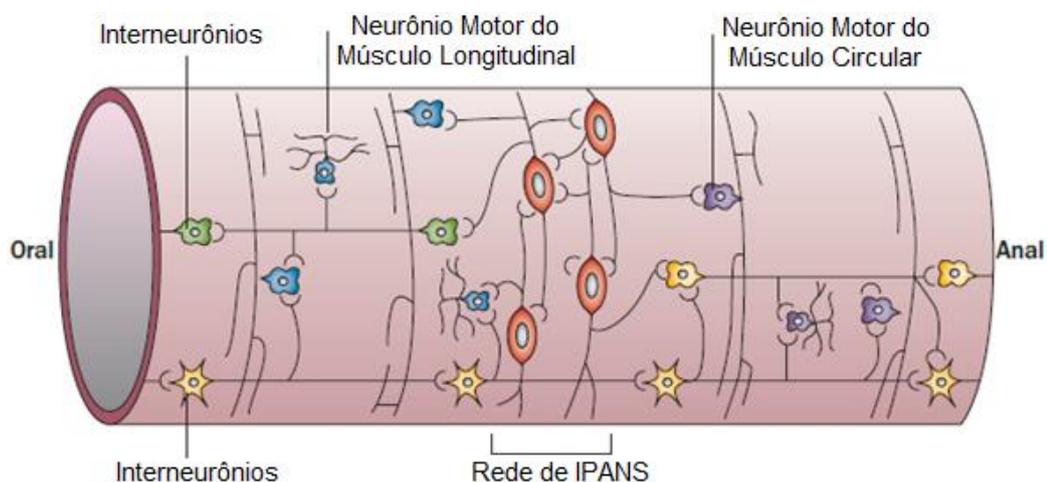
## **2.6 Sistema Nervoso Entérico**

O SNE pode ser referido como o “cérebro” do intestino. Essa ideia surgiu no início de 1900, quando se verificou que as contrações peristálticas intestinais eram coordenadas e os reflexos do TGI envolvem nervos intramurais, onde a maioria dos neurônios entéricos não contata os axônios parassimpáticos relacionados ao Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e, portanto, quase que apenas sobre o controle neural local do próprio TGI (GERSHON, KIRCHGESSNE, WADE, 2012). O SNE pode, talvez, ser mais bem visto como

uma parte deslocada do Sistema Nervoso Central (SNC), que mantém a comunicação com ele através de neurônios aferentes e eferentes simpáticos e parassimpáticos. A parte do sistema nervoso central, que está ligado com os neurônios entéricos é agora conhecida como a rede neural autonômica central. Juntamente com estas ligações, o sistema nervoso entérico fornece controle neural de todas as funções do trato gastrointestinal (RAJ et al.,1996).

Caracterizado por um conjunto de neurônios que juntamente com as células da glia formam uma rede complexa interligada, o SNE localizado na parede do trato gastrointestinal, controla tipos de arcos reflexos, de acordo com estímulos mecânicos e químicos, e pode funcionar independentemente do controle do SNC (FURNESS, 2006; GERSHON, KIRCHGESSNE, WADE, 2012). O SNE, portanto, se assemelha ao SNC, uma vez que este contém neurônios aferentes, interneurônios e neurônios motores, os componentes neurais dos arcos – reflexos que regulam a atividade do Sistema Gastrointestinal (SGI), tendo a habilidade de controlar a motilidade, secreção exócrinas e endócrinas, o fluxo de sangue, o crescimento da mucosa, estando também envolvido na regulação de processos imunológicos e inflamatórios (FURNESS, 2006), esquematizado na figura 7.

Figura 7. Circuito neural do intestino delgado.



Fonte. Nature Reviews/Gastroenterology & Hepatology (Adaptado de FURNESS, 2012).

O SNE pode ser estudado a partir de uma divisão anatômica e funcional de seus constituintes neurais, neurônios e células glia, em dois agregados neurais, os plexos, sendo eles: o plexo mioentérico e o plexo submucoso. O plexo mioentérico situa-se entre as camadas circulares e longitudinais de músculo liso e se estende a todo o comprimento do intestino.

O plexo mioentérico consiste principalmente em cadeias lineares de numerosos neurônios interconectados que se estendem por todo o comprimento do trato gastrointestinal. Quando estimulado seus principais efeitos são: aumento da contração tônica, maior intensidade das contrações rítmicas, e aumento da condução das ondas excitatórias ao longo da parede intestinal, resultando em movimentos mais rápidos das ondas peristálticas (GALLIGAN et al., 2000; GANONG, 2003; VASINA et al., 2006).

Até recentemente, as ondas lentas, ou a mudança rítmica do potencial de membrana das células do músculo liso, era atribuída a propriedades intrínsecas do músculo liso. Atualmente sabemos que as ondas lentas, ou marca passo das atividades do trato gastrointestinal, são gerados por um tipo especializado de células, chamadas de célula intersticial de Cajal ou simplesmente células de Cajal. Elas estão localizadas ao longo de todo o trato digestivo, adjacentes a fibras nervosas e miócitos. Localizam-se na musculatura longitudinal, circular, plexo mioentérico e plexo submucoso. (GANONG, 2003; VASINA et al., 2006). As células Intersticiais de Cajal são consideradas facilitadoras da propagação de estímulos elétricos e mediadoras da neurotransmissão na parede intestinal (VANDERWINDEN, 1999).

Várias substâncias identificadas no sistema nervoso entérico de mamíferos podem ser liberadas e participar do controle da motilidade gastrointestinal por agir diretamente sobre a musculatura lisa, causando contração ou relaxamento, ou indiretamente, modulando a liberação do mediador inibitório ou excitatório (FURNESS E COSTA, 1987). Dentre elas podemos citar o trifosfato de adenosina (ATP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP), óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e substâncias que ativam PARs (receptores ativados por proteases). Que podem causar, simultaneamente, uma resposta elétrica de hiperpolarização (potencial de junção inibitório, IJP) e o relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal (GOYAL E RATTAN 1980, BULT et al. 1990, RATTAN E CHAKDER 1993, LOWICKA et al. 2007).

A presença de substâncias ou o estiramento age estimulando os IPANs, uma vez ativados comunicam-se com os interneurônios. O impulso segue agora uma dupla direção: no caminho ascendente ocorre a interação entre interneurônios e neurônios motores excitatórios (colinérgicos), estimulando o músculo liso intestinal através de receptores muscarínicos e deflagrando a contração muscular. Já no sentido descendente, ocorre a comunicação entre interneurônios e neurônios motores inibitórios (purinérgicos), agindo no músculo através dos

receptores purinérgicos P2. O agonista do receptor excitatório é a ACh, já para o inibitório, um possível candidato é o ATP (FOONG et al 2012).

Os neurônios motores apresentam uma dualidade, existindo os motores excitatórios e inibitórios, cujos corpos celulares estão na parede do intestino. Quanto a sua morfologia, é classificado como Dogiel tipo I (DI). No estômago, esses neurônios podem ser ativados pela estimulação do nervo vago, já no intestino pela constituição do fluido intestinal. Os neurônios excitatórios apresentam como principais ativadores musculares a ACh e a Substância P (SP), apresentando assim uma via de ação colinérgica e outra não – adrenérgica não – colinérgica (NANC). Quanto à atividade inibitória, os principais candidatos a executores desses neurônios são o Óxido Nítrico (NO), o ATP, o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), e o Peptídeo Pituitário Ativador da Adenilato Ciclase (PACAP) (FURNESS 2006). Os efeitos dos neurônios motores excitatórios e inibitórios sobre os músculos intestinais são retransmitidos, pelo menos em parte, através das células intersticiais de Cajal (ICC), que são acopladas eletricamente ao músculo. As ICC têm os receptores ambos para os transmissores inibitório, NO, e excitatórios, SP (PORTBURY, 1996).

## **2.7 Via Colinérgica e via anti-inflamatória colinérgica**

### ***2.7.1 Sistema Colinérgico***

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor da junção neuromuscular de vertebrados, do sistema nervoso autônomo e de alguns neurônios do sistema nervoso central, constituindo-se o principal neurotransmissor das sinapses colinérgicas. No sistema nervoso autônomo, é o transmissor das fibras pré e pós-ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando inúmeras funções responsáveis pela homeostase como a contração da musculatura intestinal, ritmo cardíaco e secreção de alguns hormônios. Ela desempenha suas diversas funções através de dois tipos de receptores (chamados de receptores nicotínicos e receptores muscarínicos) que são amplamente distribuídos nos mais diversos tipos de células (GANONG, 2003).

Disfunção da transmissão colinérgica relacionada à síntese, liberação e armazenamento da ACh ou sua interação com receptores, tem sido implicada em várias doenças como, por exemplo, disfunção autonômica, síndrome miastênica, mal de Alzheimer e de Parkinson (SCHWARTZ et al. 1992; VINCENTE et al., 2001; ZHOU et al., 2001).

A ACh tem sido estudada pelos seus poderosos efeitos anti-inflamatórios na periferia. Foi primeiro descoberto que a estimulação vagal era suficiente para suprimir a inflamação sistêmica em resposta à endotoxina (BOROVIKOVA et al., 2000).

### ***2.7.2 Via anti-inflamatória Colinérgica***

Descobriu-se mais tarde que camundongos endotoxêmicos Knockout para o receptor  $\alpha 7$ -nicotínico de acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR $^{-/-}$ ) apresentam níveis sistêmicos aumentados de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, e esses camundongos não conseguiram suprimir os níveis de TNF- $\alpha$  com a estimulação vagal. Especificamente, a expressão de  $\alpha 7$ nAChR em macrófagos foi necessária para a supressão observada de TNF- $\alpha$  mediada por ACh (WANG et al., 2003). Em outro estudo que se seguiu, a estimulação do nervo esplênico produziu inibição semelhante da resposta inflamatória do TNF- $\alpha$  ao lipossacarídeo (LPS) (ROSAS-BALLINA et al., 2008).

No entanto, a inervação vagal resulta na liberação de ACh no gânglio celíaco, que por sua vez envia sinais noradrenérgicos para o baço através do nervo esplênico (BERTHOUD E POWLEY, 1993). Assim, permaneceu a questão de como a estimulação do nervo vago e esplênico é capaz de produzir efeitos semelhantes quando o nervo vago não inerva diretamente o baço e o nervo esplênico não produz acetilcolina; enquanto isso, os efeitos imunorreguladores pareciam funcionar através dos receptores de ACh. Em um estudo de mudança de paradigma em neuro-imunologia, células T produtoras de ACh foram descobertas para mediar esses efeitos. Essas células T secretaram ACh em resposta à ativação de seus receptores adrenérgicos  $\beta$ , e a ACh resultante ativou o  $\alpha 7$ nAChR em macrófagos para suprimir a produção de TNF- $\alpha$  (ROSAS-BALLINA et al., 2011).

A descoberta funcional de células T produtoras de ACh demonstrou os reflexos moleculares notáveis na interface dos sistemas nervoso e imunológico periférico, e essas descobertas expandiram imensamente a amplitude e a apreciação das interações neuro-imunes anteriormente conhecidas. No entanto, a pesquisa sobre as vias colinérgicas no trato gastrointestinal está apenas começando a aparecer na literatura. Por exemplo, foi recentemente demonstrado que a depleção específica de células T produtoras de ACh resulta em níveis reduzidos de AMP intestinal e alterações relativas na microbiota (DHAWAN et al., 2016).

Camundongos Knockout para receptores de ACh muscarínicos do tipo 3 (m3AChR $^{-/-}$ ) têm uma barreira intestinal enfraquecida, níveis basais mais elevados de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-17A e TNF- $\alpha$  (MCLEAN et al., 2015). Curiosamente, esses

camundongos também expressam níveis mais baixos de IL-4 e IL-13, resultando na depuração retardada de parasitas intestinais (MCLEAN et al., 2016).

Embora os nervos vago e pélvico tenham conexões ao longo do trato gastrintestinal, onde algumas terminações nervosas inervam diretamente a mucosa, elas não são a única fonte de ACh intestinal. Os neurônios intrínsecos também são imunorreativos contra a colina acetiltransferase (CHAT), a enzima limitante da velocidade na síntese de ACh (FURNESS, 2012). Além disso, essas terminações nervosas extrínsecas frequentemente fazem sinapses nos neurônios do plexo mioentérico. Assim, a ACh dos nervos parassimpáticos pode induzir a ativação de neurônios não-colinérgicos no Sistema Nervoso Entérico (SNE) e a subsequente liberação de outros compostos neuromoduladores.

No entanto, como o SNE pode iniciar seus próprios reflexos neuronais independentemente de ativações extrínsecas, é possível que circuitos intrínsecos isolados possam influenciar a função imune, e interações neuroimunes similares existentes no baço e na periferia também poderiam existir no trato gastrintestinal.

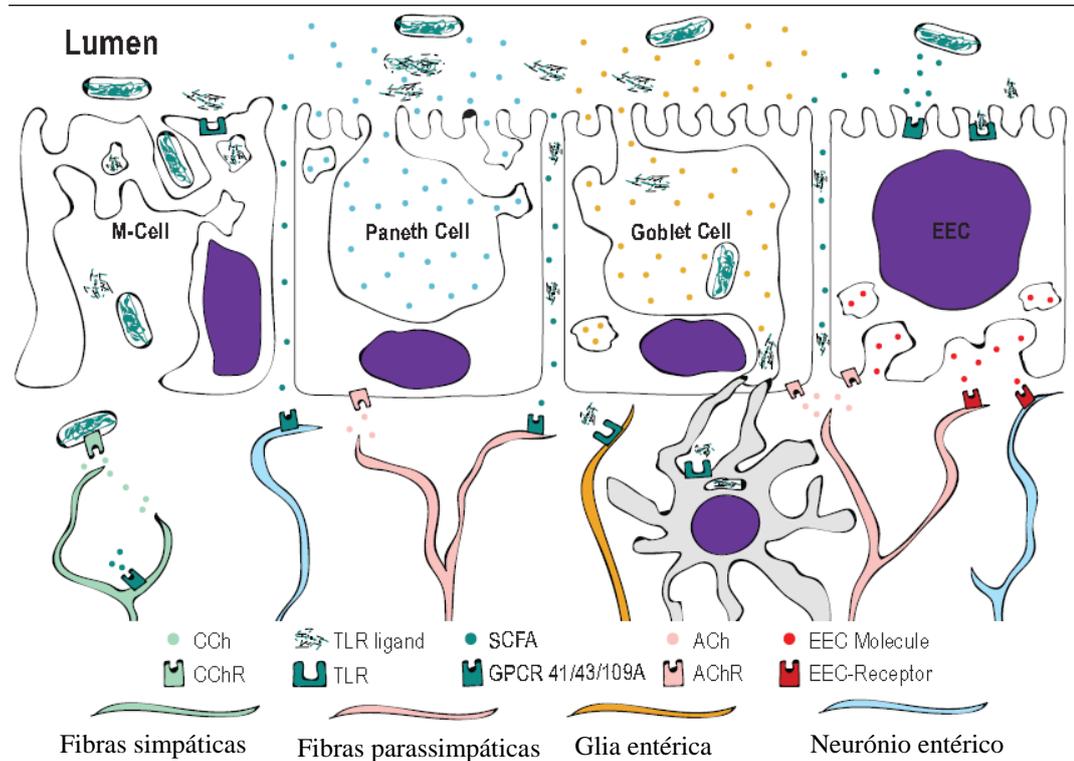
Sendo assim, tanto as células do epitélio intestinal (CEI), como as células imunes, estão em proximidade com projeções neuronais na mucosa. No entanto, ao contrário das células imunológicas, cada CEI está em associação direta com o lúmen. Esta dicotomia apical e basolateral faz das CEI um interessante e potencial mediador de comunicações neuro-imunes que ocorrem entre a mucosa e a microbiota. Especificamente, a ACh tem sido bem estudada por seus efeitos nas células de Paneth e caliciformes (Figura 8). A ativação do receptor de acetilcolina (AChR) é importante tanto para a degranulação de Paneth quanto para a de células caliciformes. Como tal, o betanecol, um agonista muscarínico de AChR (mAChR), estimula a desgranulação (SATOH et al., 1992), enquanto a atropina antagonista de mAChR suprime essa função (SATOH, 1988). Da mesma forma, a ativação da AChR nas células caliciformes induz a secreção de mucina (GUSTAFSSON et al., 2012; BIRCHENOUGH et al., 2016).

Em camundongos, a ativação da AChR também resulta no aumento das passagens de antígeno associadas às células caliciformes (GAPs), que permitem que as células caliciformes absorvam os antígenos luminiais e os entreguem às Células Dentríticas na lâmina própria (MCDOLE et al., 2012). Isto é particularmente interessante porque implica diretamente a ACh na via imunológica e microbiota luminiais (Figura 8).

Finalmente, como para as células caliciformes e Paneth, a estimulação colinérgica das Células Enteroendócrinas (CEE) induz a secreção de moléculas neuroendócrinas (ANINI E BRUBAKER, 2003). Em última análise, a ACh é um poderoso mediador da função

intestinal, mas, novamente, não está claro qual é a fonte endógena de ACh e se essa distinção afeta seu resultado funcional nas células do epitélio intestinal, sistema nervoso entérico e trato gastrintestinal em geral.

Figura 8. Interações do epitélio intestinal.



Fonte. Adaptado de Yoo e Mazmanian (2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Analisar a via colinérgica anti-inflamatória nos eventos inflamatórios e funcionais na mucosite intestinal induzida experimentalmente por 5-FU.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Verificar as respostas inflamatórias e funcionais que o tratamento com 5-Fluorouracil ocasiona a mucosite intestinal em camundongos;
- Medir a resposta contrátil à estimulação elétrica da musculatura intestinal durante o período inflamatório e pós-inflamatório da lesão intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar a participação da via colinérgica anti-inflamatória durante o período inflamatório da lesão intestinal induzida por 5-FU.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com massa variando entre 25 a 30g, procedentes do Biotério da Universidade Federal do Ceará (UFC) do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Os mesmos foram mantidos em gaiolas nas condições de temperatura e umidade controlada, sendo oferecido água e ração ad libitum. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e esse projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa animal da UFC, tendo sido aprovado sob Protocolo N° 74/2014.

#### 4.1.1 Grupos experimentais

O estudo deu-se através da comparação estatística dos resultados obtidos nos grupos mucosite e controle. Assim, os experimentos seguiram o seguinte desenho de grupos:

- **Grupo 5-FU 3 Dias:** Fase Inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU que representa a dose relativa à sua massa em gramas na dose de 5-FU de 450mg/kg i.p. e, 3 dias após a administração do 5-FU foram sacrificados (SOARES et al., 2008);

- **Grupo salina:** Grupo controle para 3 dias– animais receberam salina no volume que mimetiza a indução de mucosite intestinal por 5 FU, e foram sacrificados 3 dias após a administração de salina;

- **Grupo 5-FU 15 Dias:** Fase Pós-inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU na dose relativa à sua massa em gramas de 450mg/kg i.p. Os animais foram sacrificados 15 dias após a administração do 5-FU (SOARES et al., 2008);

- **Grupo salina:** Grupo controle da Fase Pós – Inflamatória – animais receberam salina no volume que mimetiza a indução de mucosite intestinal por 5 FU, e o sacrifício foi realizado 15 dias após a administração da salina.

- **Grupo 5-FU 3 Dias tratado com piridostigmina (2mg/kg i.p.):** Fase Inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU que representa a dose relativa à sua massa em gramas na dose de 5-FU de 450mg/kg e, 3 dias após a administração do 5-FU foram sacrificados;

- **Grupo 5-FU 3 Dias tratado com neostigmina (80µg/kg i.p.):** Fase Inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU que representa a dose relativa à sua massa em gramas na dose de 5-FU de 450mg/kg e, 3 dias após a administração do 5-FU foram sacrificados;

- **Grupo 5-FU 15 Dias tratado com piridostigmina:** Fase Pós-inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU na dose relativa à sua massa em gramas de 450mg/kg. Os animais foram sacrificados 15 dias após a administração do 5-FU;

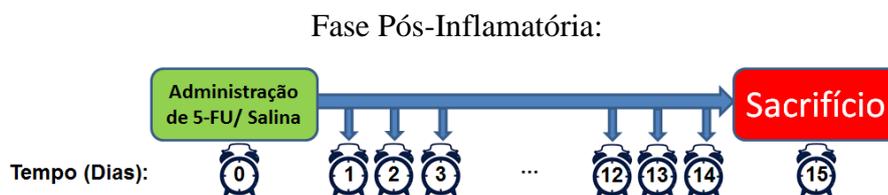
- **Grupo 5-FU 15 Dias tratado com neostigmina:** Fase Pós-inflamatória da mucosite – animais receberam volume de 5-FU na dose relativa à sua massa em gramas de 450mg/kg. Os animais foram sacrificados 15 dias após a administração do 5-FU;

#### 4.2 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos

Os animais receberam injeção única, por via intraperitoneal (i.p.), de 5-Fluorouracil (5-FU, adquiridos da empresa EUROFARMA<sup>®</sup>), na dose de 450 mg/kg, marcando o dia 0 da indução. Após a indução da mucosite, administração de 5-FU, e do controle, administração de salina, os animais das fases inflamatórias e controle foram sacrificados por deslocamento cervical no 3º dia e os animais das fases pós-inflamatória e controle no 15º dia (fase pós-inflamatória), figura 9. Posteriormente, foi realizada uma laparotomia e exérese do intestino delgado. Então amostras do íleo foram obtidas obedecendo sua divisão anatômica, da seguinte forma percentual: 20% de duodeno; 60% de jejuno e 20% de íleo (FERRARIS; VINNAKOTA, 1995), conforme a figura 09.

Figura 9. Indução da mucosite por 5-FU e, controle por salina.





### 4.3 Análise histopatológica e morfométrica na mucosite intestinal

As amostras do íleo obtidas após o sacrifício dos animais foram fixadas em formol 10% por 24 h. Em seguida foram transferidas para álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Posteriormente, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Logo depois, foram feitos cortes (5  $\mu$ m), colocados numa lâmina e corados com hematoxilina/eosina (H/E) para análise ao microscópio óptico.

A avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego. O grau e a severidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Macpherson e Pfeiffer (1978), sendo o escore 0 (Achados histológicos normais); 1 (Mucosa: vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: normal); 2 (Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: Normal) e 3 (Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrofilico).

A análise morfométrica do segmento ileal foi obtida pela avaliação da altura dos vilos e da profundidade das criptas, utilizando-se microscópio óptico com ocular milimetrada ou sistema de aquisição de imagens e posteriormente utilizado o software de medida (LEICA<sup>®</sup>). A análise foi obtida a partir da medida de 10 vilos e criptas para obtenção da medida estimada da altura dos vilos e da profundidade das criptas, bem como da relação vilos/cripta dos animais controle e dos animais com mucosite intestinal em ambas as fases destacadas no estudo.

#### 4.4 Ensaio para mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos (KLEBANOFF, 2005), o que permite estimar a sua infiltração no foco inflamatório por dosagem da sua atividade (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010), pois as concentrações teciduais da MPO estão relacionadas com o número de neutrófilos em um dado tecido (GENOVESE, 2006). Portanto, tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. A medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de o-dianisidina, evidenciada pela mudança de absorbância medida a 450 nm. Para esse experimento, foram utilizadas 50 a 100 mg de tecido animal (íleo) induzidos para mucosite por 5-FU, tratados e controle. Posteriormente, para a determinação da MPO as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido/mL de tampão) e homogeneizadas num Politron. Em seguida, centrifugadas (4500 rpm, 20 min, 4 °C) e colhido o sobrenadante. A atividade da MPO foi quantificada através da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio e o-dianisidina como substrato para a MPO. A unidade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 minuto a 22°C. À medida que ocorre degradação do peróxido de hidrogênio o ânio superóxido é produzido. Este é responsável por converter o-dianisidina em composto de cor marrom. As leituras foram realizadas a 450nm em espectrofotômetro UV/visível (Thermo Scientific®, modelo BioMate 3S) e os resultados expressos como unidade de MPO/mg de tecido. Essa técnica tem por objetivo validar os dias definidos nesse projeto sendo o 3º dia (fase inflamatória) e 15º dia (fase pós-inflamatória).

#### 4.5 Determinação de glutatona

A glutatona reduzida (GSH) é um grupo sulfidrílico não proteico que tem ação primordial como antioxidante, sendo essencial na proteção das células contra o estresse oxidativo e na multiplicação dos linfócitos (DAMASCENO et al., 2013). A dosagem da GSH foi realizada mediante o método de Sedlak e Lindsay (1968) nas amostras do íleo dos grupos da pesquisa. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg do íleo dos animais induzidos com 5-FU, tratados e controle foi homogeneizada em 1 ml de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,02 M para cada

100 mg de tecido. Alíquotas de 400  $\mu$ L do homogeneizado foram misturadas a 320  $\mu$ L de água destilada e a 80  $\mu$ L de Ácido Tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas os tubos foram centrifugados (3.000 rpm, 20 min, 4 °C). Para 400  $\mu$ L do sobrenadante foi adicionado 800  $\mu$ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20  $\mu$ L de DTNB 0,01 M (reagente de Ellman<sup>®</sup>). A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-proteicos foram expressas em  $\mu$ g de NP-SH/g de tecido.

#### **4.6 Dosagem de Malondialdeído**

A presença de estresse oxidativo tem como alvo o ataque aos ácidos graxos dos lipídios da membrana, terminando com a quebra de lipídeo peroxidado, aparecimento de malondialdeído (MDA) e outros produtos. (DANTAS, 2006). Para quantificação dos níveis de malondialdeído foi realizado o método de Tbars adaptado por Lee et al (2005). A mistura (50  $\mu$ L da amostra de íleo homogeneizado em KCL 1,15mM com 100  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio – SDS) ficou em banho-maria por 30 min a 37 °C. Em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L do ácido tiobarbitúrico (0,6%) nos tubos e esta solução permaneceu em banho-maria por mais 50 min a 100 °C. Como padrão foi utilizado o 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TMP). O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro e o resultado expressa a diferença de absorbâncias entre as faixas 535 nm e 525 nm, tendo como unidade nmols de MDA/g de tecido.

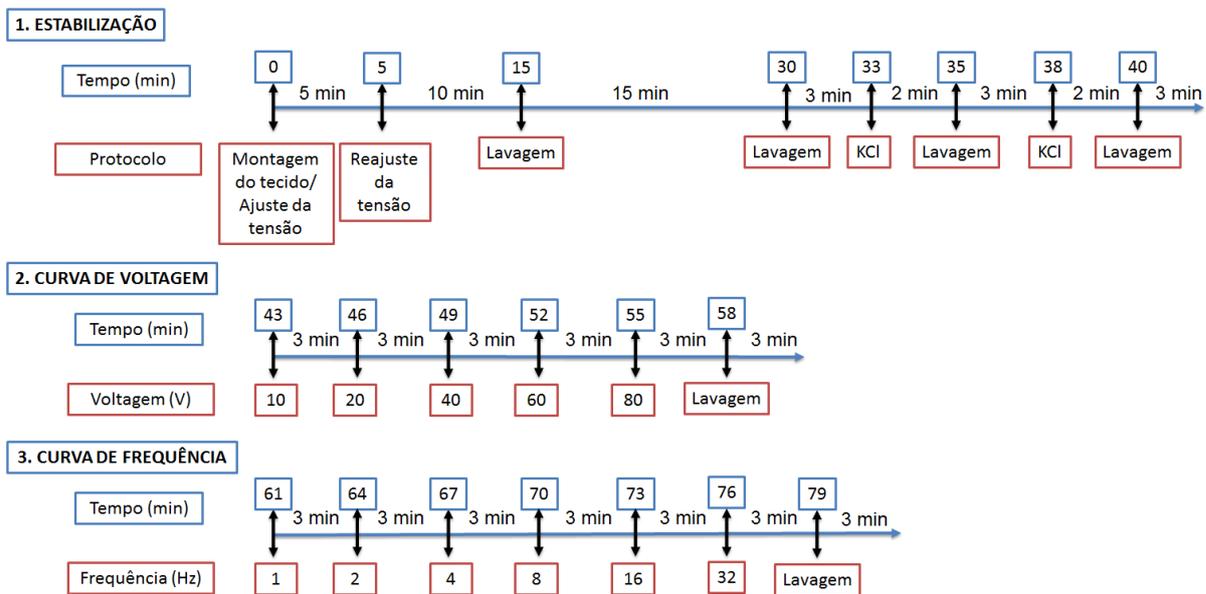
#### **4.7 Medidas de contratilidade**

Na avaliação da resposta funcional do intestino durante a mucosite foram utilizadas tiras longitudinais de intestino delgado (íleo) de camundongos controle tratados e com mucosite intestinal no comprimento de 1,0 cm. Essas tiras foram lavadas para limpeza e retirada de resíduos com solução nutritora de Krebs (pH= 7.4), composição (mmol/l): 118,3 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25,0 NaHCO<sub>3</sub> e 11,1 glicose. As tiras foram montadas em câmaras de banho de órgãos com volume de 10 ml, contendo solução nutritora de Krebs, a temperatura de 37°C, pH= 7.4, aeradas com mistura carbogênica - 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> (AUBÉ et al, 1996).

Na montagem do tecido uma das extremidades da tira foi presa à uma base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico (modelo Panlab<sup>®</sup> S.L, Barcelona, Espanha) por

um fio inextensível. Tendo sido aplicado ao tecido uma tensão de 1g por um período de equilíbrio de 40 minutos. Durante esse período o protocolo estabelecido foi posto em prática, sempre levando em consideração a montagem como tempo 0: 5 minutos após a montagem foi realizado o reajuste da tensão para 1g; 15 minutos, primeira lavagem; 30 minutos, segunda lavagem. Após esse período, foi obtida a primeira e segunda curva de contração em resposta ao KCl, no seguinte protocolo: 33 minutos após a montagem, primeira pipetagem de KCl (60mM na cuba), 2 minutos lavagem, 3 minutos após a última lavagem, pipetagem de KCl (60mM na cuba), passados 2 minutos lavagem, 3 minutos após a última lavagem, tem início o protocolo de eletroestimulação, de acordo com a figura 10.

Figura 10. Desenho do protocolo de estimulação elétrica.



Para avaliação da resposta eletromecânica do músculo liso intestinal, foi realizado protocolo descrito na figura 10. Assim, estabelecemos a comparação estatística da resposta elétrica de campo do músculo liso intestinal dos grupos controles tratados e mucosite, durante a dismotilidade intestinal, estabelecendo essa relação em comparação com a contração pelo KCl, na concentração de 60 mM, e  $\Delta g$  de contração.

#### 4.8 Modelo de estimulação elétrica

Para implementação desse protocolo utilizou-se um estimulador elétrico de campo modelo da Harvard® Apparatus/Harvard Bioscience, e os resultados obtidos das contrações ou relaxamentos foram registrados utilizando o sistema de aquisição PowerLab, que está

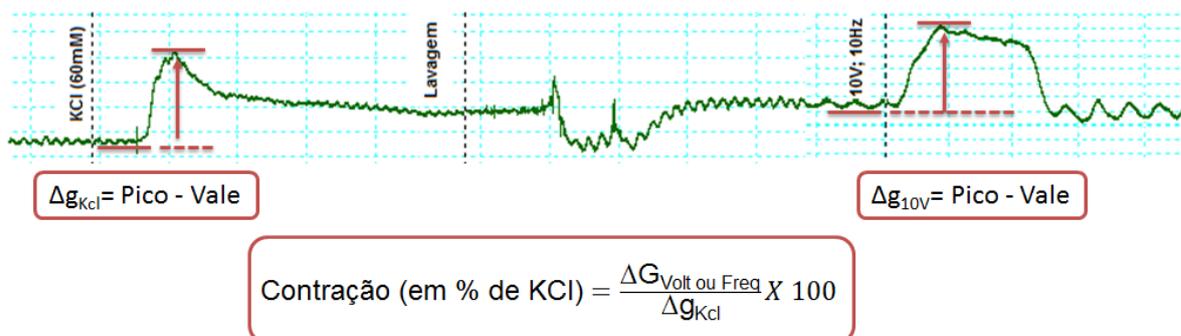
acoplado com o transdutor de força, e analisados com LabChart Software (AD Instruments®). Os parâmetros elétricos protocolados e empregados via estimulador elétrico de campo estiveram ajustados e adaptados, como demonstrado na figura 10, nos seguintes valores (BARBARA, et al., 1997):

- Pulso de 1ms, duração do estímulo de 10s, para as curvas de voltagem e frequência;
- Curva de voltagem: 10V; 20V; 40V; 60V e 80V com frequência fixa em 10Hz;
- Curva de frequência: 1Hz; 2Hz; 4Hz; 8Hz e 16Hz com voltagem fixa em 60V.

Os valores de contração ou relaxamentos obtidos nos segmentos intestinais pelo KCl e estímulo elétrico de campo foram expressos em gráficos de coluna como resultado do  $\Delta g$  de contração (ou em mN), fornecendo informações sobre a contratilidade muscular, mas sem discriminar entre alterações tróficas e funcionais (FARMER E LANIYONU 1984). Por isso, para normalização da resposta contrátil faz-se necessário expressar contrações como a porcentagem de uma contração de referência (GOLDHILL *et al.*, 1999). Assim, foi utilizado a relação percentual da contração em KCl 60mM.

Para cálculo do  $\Delta g$  de contração, foi estabelecido como valor inicial o vale mais estável antes do estímulo (KCl ou elétrico) e como valor final o pico maior e mais estável depois do estímulo que representa o valor da contração máxima (MOREELS et al., 2001), figura 11. Para a avaliação do  $\Delta g$  elétrico, o vale mais estável que antecede o estímulo de 10V foi estabelecido como valor inicial para todas as respostas elétricas, ou seja, antes do primeiro estímulo elétrico, essa escolha padronizou um valor basal universal antes de qualquer atividade elétrica para todos os estímulos elétricos, já o valor final foi escolhido pelo maior pico depois de cada estímulo.

Figura 11. Modelo de avaliação da resposta contrátil.



#### 4.9 Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal

Para a avaliar a motilidade do TGI foi realizado a técnica do esvaziamento gástrico descrita por Reynell e Spray (1956), com adaptações. Após 8 h de jejum alimentar, porém com água ad libitum, dependendo do grupo em teste, os animais, receberam, com auxílio da agulha de gavagem, 0,3ml de uma refeição-teste composta por Vermelho Fenol (VF) na dose de 0,75mg/ml e solução de glicose a 5%, mediante gavagem.

Decorridos 10 min, os animais foram um-a-um sacrificado através de deslocamento cervical e, então, submetidos à laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais (estômago e intestino delgado). Para tanto e de forma delicada, foram realizadas ligaduras obstrutivas, primeiramente, ao nível da região pilórica, com intuito de não mais permitir a passagem da refeição teste para o duodeno, seguido por uma segunda ligadura do esôfago abdominal ao nível da cárdia. Após as duas primeiras ligaduras, o estômago e o intestino delgado foram, então, cuidadosamente removidos (exérese) e posteriormente estendidos sobre uma prancha, com intuito de se determinar sua extensão, mensurado em cm. Finalmente, uma terceira ligadura foi colocada no íleo terminal, ao nível da junção íleocecal. As vísceras expostas foram divididas em quatro segmentos consecutivos: Estômago (Et), Intestino proximal (P – inicial), Intestino medial (M – intermediário) e Intestino distal (Dt – final). O intestino foi dividido nas seguintes proporções: P (40%), M (30%) e Dt (30%).

Para determinação dos volumes das vísceras, foi utilizada uma simples diferença volumétrica, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{VOL.}(v) = \text{VOL.}(t) - \text{VOL.}(p).$$

Onde: Vol. (v) = Volume visceral.

Vol. (p) = Volume da proveta contendo 10ml.

Vol. (t) = Volume total [Vol. (p) + víscera].

Após determinação dos volumes, os segmentos viscerais que se encontravam em provetas, juntamente com o NaOH 0,1N, foram colocados em béqueres para fragmentar em pedaços menores, através de homogeneização por 30 segundos utilizando um mixer elétrico (sector®). Após tal processo, o homogeneizado foi então, mantido em repouso por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram retirados 1000µl do sobrenadante para uma primeira centrifugação à 2800rpm durante 10min. Dessa primeira centrifugação, foram retirados 500µl para que as proteínas contidas nesse volume fossem precipitadas em 0,5ml de ácido tricloroacético 20% (TCA) e, posteriormente, centrifugadas por 20min a 2800rpm. Por fim, 0,2ml desse mais novo sobrenadante foram adicionados a 0,2ml de NaOH a 0,5N para

determinação, por espectrofotometria, da absorbância (ABS) das amostras em 570nm de comprimento de onda.

A retenção percentual (%) da refeição teste (vermelho-fenol + glicose 5%) em cada segmento foi calculada pela seguinte equação:

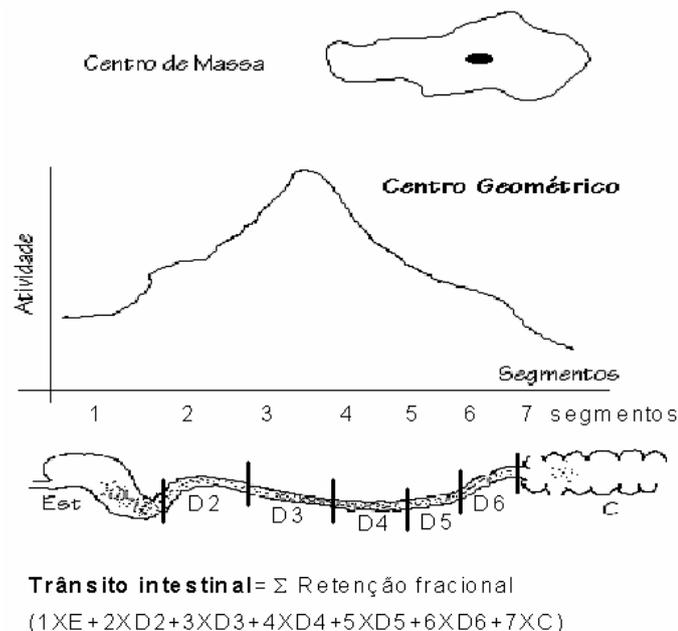
$$\text{Retenção no segmento } X = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento } X}{\sum \text{ da quantidade de VF recuperado nos segmentos do TGI}}$$

Onde: VF = Vermelho de fenol.

X = Segmento em questão

A retenção fracional de corante em cada segmento se prestara para estimar o trânsito intestinal da refeição de acordo com o método do centro geométrico (MILLER et al., 1981). De acordo com este princípio, obteremos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago, delgado 2, delgado 3, delgado 4, delgado 5, delgado 6 e cólon) pelo dígito identificador do respectivo segmento: (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7, respectivamente). A somatória destes valores indicara o centro geométrico da refeição propelida ao longo do intestino, aos moldes do centro de massa dos objetos (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática do centro geométrico de uma refeição teste.



Fonte: Adaptado de Miller et al., (1981)

#### 4.10 Atividade de colinesterase

A atividade da colinesterase (AChE) foi determinada por uma versão modificada do ensaio colorimétrico de Ellman et al. (1961) usando um analisador de microplacas. Sangue total fresco e a amostra do íleo foram diluídos 1:100 com tampão NaPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,4. A atividade da AChE foi determinada em 570nm.

#### 4.11 Dosagem de IL-1 $\beta$

A concentração de e IL-1 $\beta$  foi determinada nos fragmentos do íleo congelados no freezer à -80°C. Estes foram homogeneizados em solução tampão de PBS com anti – proteases, a amostra foi centrifugada por 10 min em 3000 rpm e o sobrenadante foi imediatamente coletado para dosagem de IL-1 $\beta$ . A detecção das concentrações dessa citocina foi realizada por ELISA espécie-específica, conforme orientação do fabricante (R&D<sup>®</sup> system). Os resultados foram expressos em pg/ml a partir de uma curva padrão fornecida pelo fabricante.

#### 4.12 Imunohistoquímica

Os animais receberam salina ou 5-FU e sacrificados por deslocamento cervical no terceiro e decimo-quinco dia experimental. Amostras de Íleo foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70%. Posteriormente foram desidratadas em álcool e xilol, e então parafinizadas. Os tecidos foram cortados em 5  $\mu$ m de espessura com o auxílio de um micrótomo. As secções de tecidos foram montadas em lâminas silinizadas especiais para imunohistoquímica. As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1M (pH 6.0), seguida da ativação antigênica (~100 °C por 18 min). Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>) a 3% por 15 min. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo primário anti-M3 (1:400, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) diluído em PBS –BSA 5%, overnight a 4°C. O controle negativo (background) não recebeu anticorpo primário. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas (30 min) com o anticorpo secundário diluído em PBS-BSA 5% na proporção de 1:400. Após a remoção do anticorpo, com lavagem em PBS as lâminas foram incubadas por 30 min com o complexo ABC (Horseradish

Peroxidase Standard. Santa Cruz Biotechnology®). Realizou-se a coloração com diaminobenzidina-peróxido (DAB-H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>) por 1min. Removeu-se o DAB/H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> com H<sup>2</sup>O destilada e realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Finalmente, foi realizada a desidratação e montagem das lâminas.

#### 4.13 Imunofluorescência

O segmento intestinal íleo dos animais submetidos ao modelo experimental de mucosite induzido por 5-FU foram removidos no terceiro dia após a administração, e colocados em tampão fosfato-salina (PBS: 0,15M NaCl em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2) para evitar a retração do material. O íleo foi aberto e limpo de seu conteúdo, e depois colocado e esticado por meio de alfinetes em uma balsa fina de madeira, com a túnica mucosa para baixo. Após este procedimento, o material foi imerso no fixador com paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,3 durante uma noite e refrigerado á 4 °C. No dia seguinte, os tecidos foram clareados do fixador com 03 lavagens, de 10 minutos cada, em dimetilsulfoxido (DMSO) seguido por 03 lavagens de 10 minutos em PBS. Após este procedimento, os tecidos foram estocados em PBS contendo 0,1% sódio-azida á 4 °C.

Após a fixação e o clareamento, os tecidos de cada animal foram seccionados em cerca de 1cm<sup>2</sup> e dissecados para a confecção dos preparados de membranas. Nesta fase, os preparados de membrana foram obtidos com o auxílio da lupa estereoscópica (ZM800 Nikon®), onde foram removidas as camadas mucosa, submucosa e a muscular circular, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. Com o preparado de membrana pronto, este foi novamente seccionado para obtenção 02 pedaços de 0,5cm<sup>2</sup>. Em seguida, os preparados foram imersos em uma solução contendo 10% de soro normal de cavalo, 1,5% de Triton-X (Sigma®) e PBS durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, os tecidos foram incubados em anticorpos primários durante 48 horas a 4 °C e em seguida lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada. As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações do anticorpo primário do receptor HuC/D com anticorpo primário para neurônios colinérgicos ChAT.

Após a incubação com os anticorpos primários, os tecidos foram lavados 03 vezes durante 10 minutos cada em PBS e incubados em anticorpos secundários por 01 hora á temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram, novamente, submetidas á 03 lavagens de 10 minutos cada em PBS e montados em glicerol tamponado com tampão carbonato de cálcio 0,5M pH 8,6.

#### **4.14 Análise estatística**

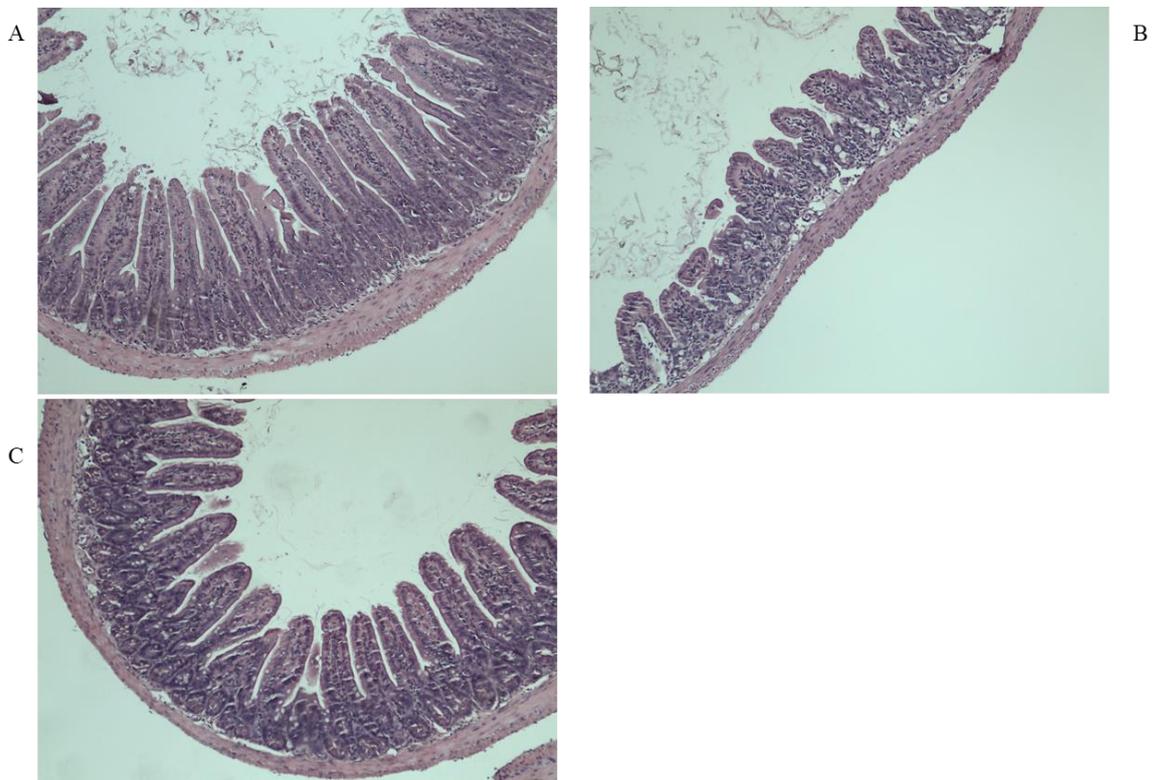
De todos os experimentos foram calculadas as médias  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) de um certo número de eventos ( $n = 8$  a  $12$ ) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias dos resultados do estímulo elétrico de campo e morfometria pelo pós-teste de Bonferroni; da mediana dos escores histopatológicos e trânsito pelo teste de “Mann-Whitney”. Nos casos de comparação dos grupos para MPO, MDA, GSH e centro geométrico da refeição foi utilizado o teste “t” de Student, nos respectivos 3 e 15 dias. Uma diferença de  $p < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Confirmação da mucosite intestinal pelos parâmetros inflamatórios

#### 5.1.1 Fotomicrografias

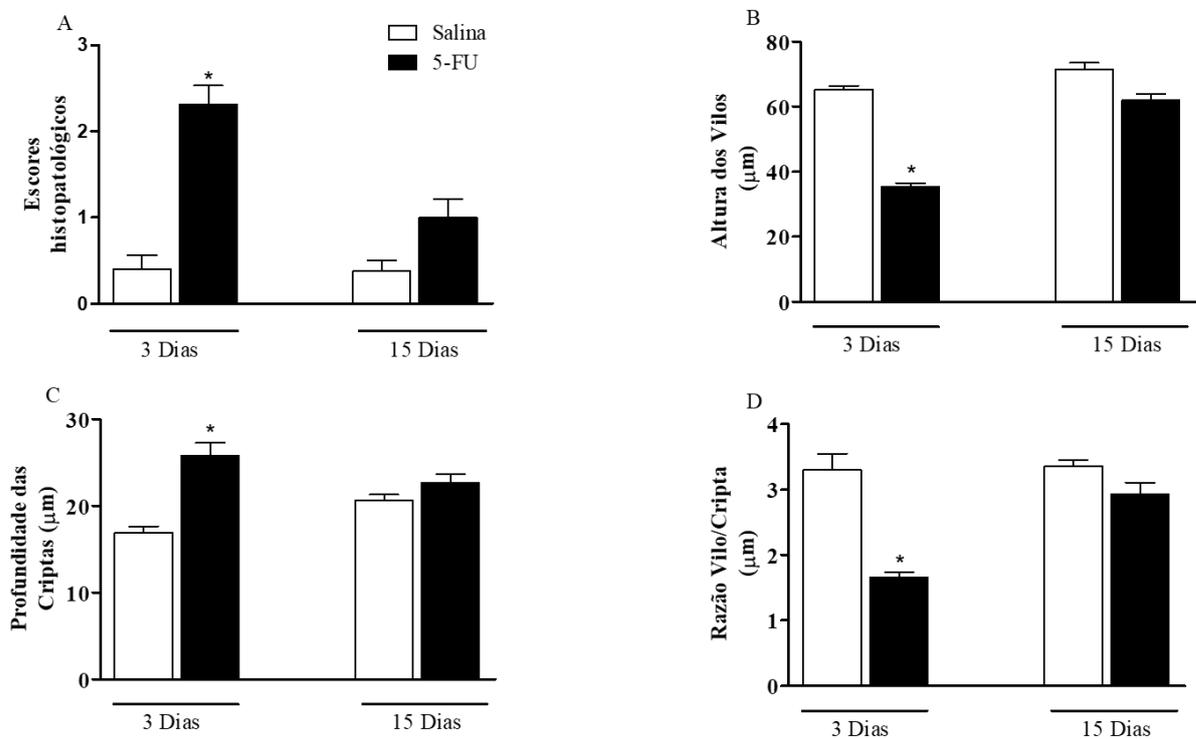
Fotomicrografias dos grupos salina (A), 5-FU 3 dias (B) e 5-FU 15 dias (C), de confirmação dos parâmetros inflamatórios após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado diferença na arquitetura dos vilos entre os grupos de animais sacrificados com 3 dias em comparação ao grupo salina, bem como foi observado diferença entre os grupos de animais sacrificados com 15 dias em relação aos grupos de animais sacrificados com 3 dias, onde consta uma reestruturação do segmento ileal dos animais com mucosite.



**FIGURA 13.** Análises das imagens do segmento ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina como grupo controle (A) ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias (B) ou 15 dias (C) após a administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina.

### 5.1.2 Análise histológica e morfométrica

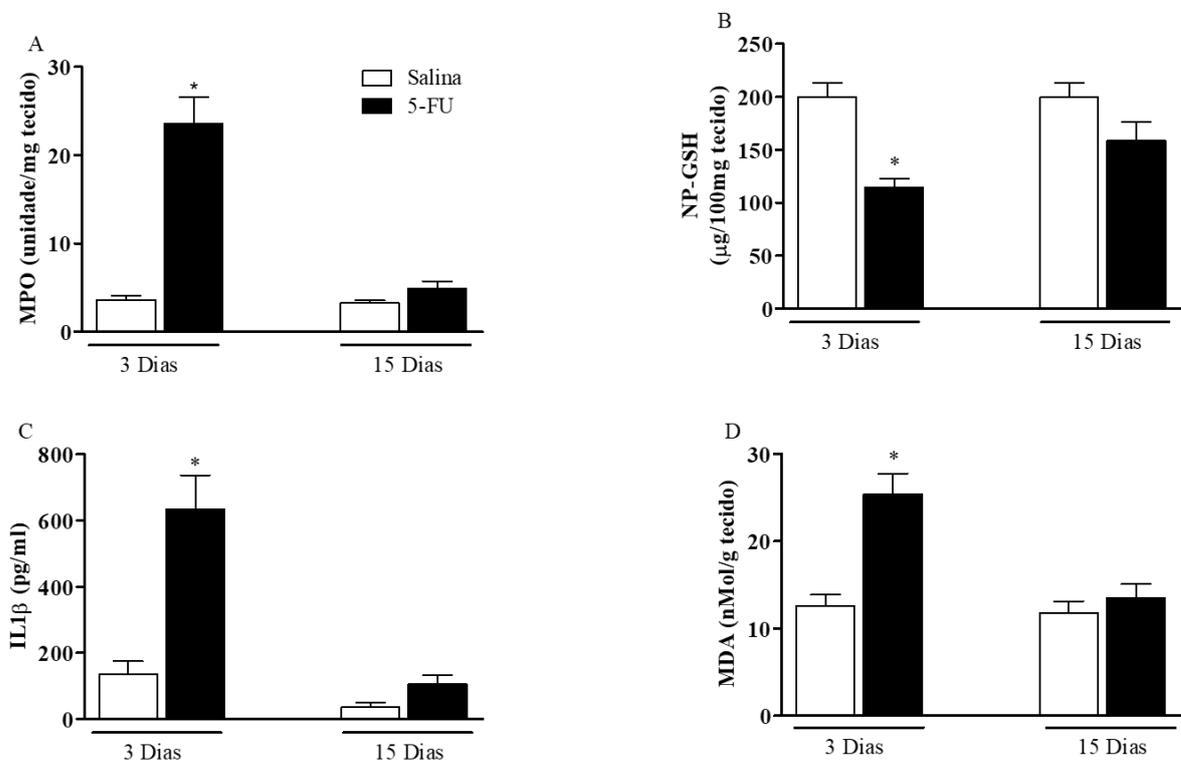
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos escores histológicos (S: 0 (0-1); 5FU 3d: 2 (2-3)\*; 5FU 15d: 1 (0-1) e da profundidade das criptas, bem como, diminuição da altura dos vilos e da razão vilo/cripta em comparação aos animais controle salina, resultados constatados nos grupos de animais sacrificados com 3 dias (Figura 14 - colunas à esquerda). Nos grupos sacrificados com 15 dias foi observado reestruturação do segmento ileal dos animais com mucosite (Figura 14 - Colunas à direita).



**FIGURA 14.** Análises histológica e morfométrica ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina como grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após a administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina. Os valores representam a média ± E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Kruskal-Wallis. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

### 5.1.3 Análise parâmetros bioquímicos

Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo na atividade da MPO, na quantidade de IL-1 $\beta$  e MDA em comparação aos animais controle salina, nos grupos de animais sacrificados com 3 dias (Figura 15 A, C e D, colunas à esquerda, respectivamente), bem como uma diminuição na dosagem de GSH (Figura 15 B – Colunas à esquerda). Nos grupos sacrificados com 15 dias (Figura 15 – Colunas à direita) não foi observado diferenças significativas no segmento ileal dos animais com mucosite.

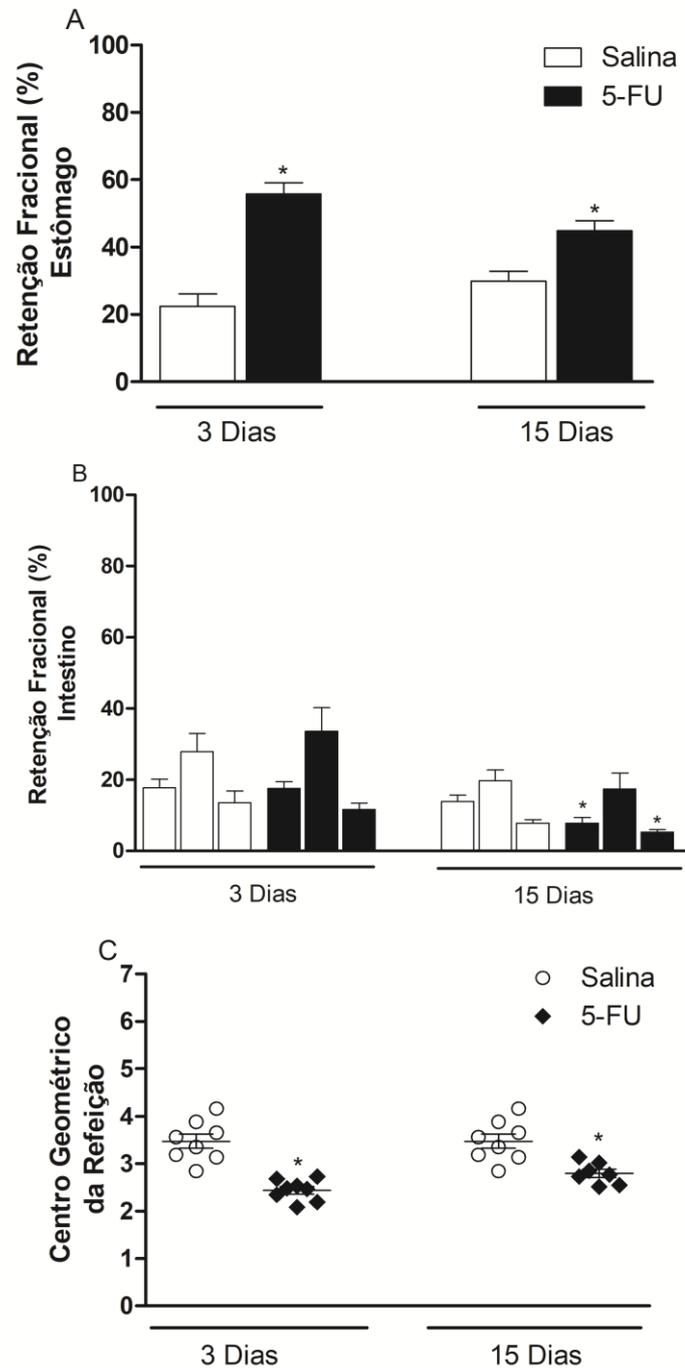


**FIGURA 15.** Análise dos parâmetros bioquímicos no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina como grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para dosagem por leitor de microplacas por absorbância. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

## 5.2 Avaliação Funcional

### 5.2.1 *Análise Esvaziamento gastrointestinal*

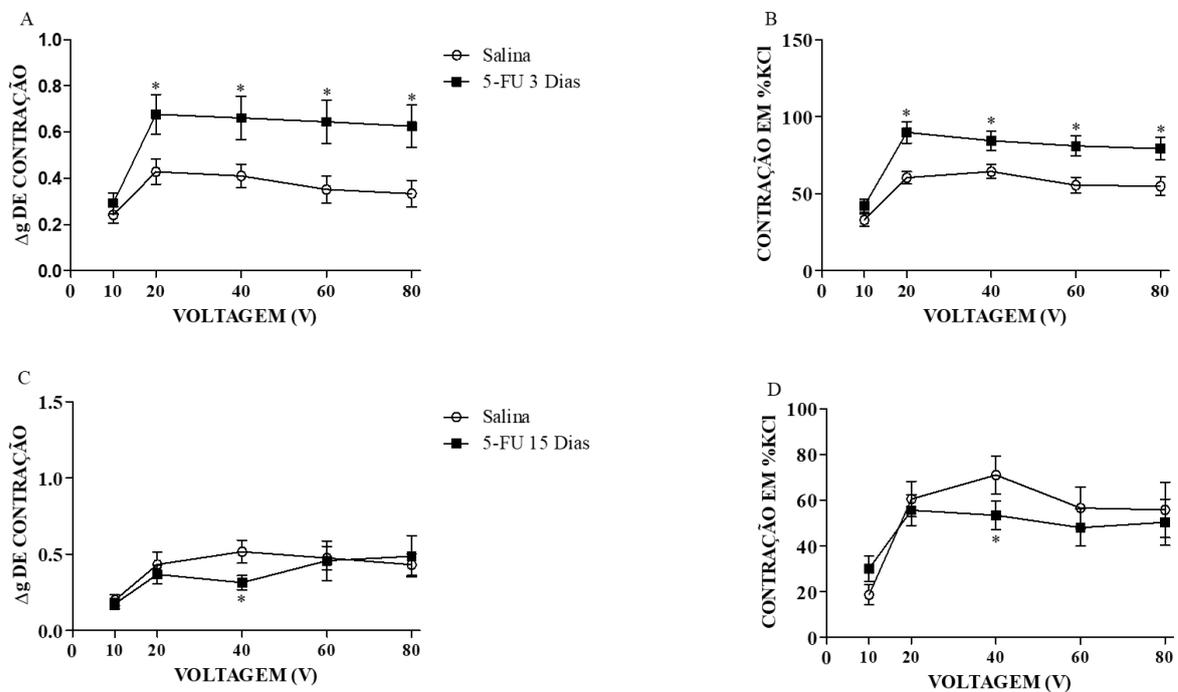
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um retardo significativo da refeição teste no estômago dos animais com mucosite sacrificados no terceiro dia em comparação aos animais controle salina  $55,76 \pm 3,43$  vs  $22,36 \pm 3,76$  representando um aumento de 149,37%, persistindo até 15 dias após a indução da mucosite,  $44,83 \pm 3,04$  vs  $29,89 \pm 2,88$ , um aumento de 49,98% (Figura 16 A). Não foi observada diferenças significativas no intestino em nenhuma das três porções em que foram divididos para análise após 3 dias da indução, (Figura 16 B – colunas à esquerda). Em análise do grupo de animais sacrificados com 15 dias constatamos diminuição da retenção na primeira porção e na última porção do intestino delgado, (Figura 16 B – colunas à direita). O Trânsito Intestinal, representado pelo centro geométrico da refeição teste, mostrou retardo nas primeiras porções intestinais dos grupos sacrificas com 3 dias após indução com 5-FU em comparação ao grupo controle. Nos grupos sacrificados com 15 dias ainda persiste o retardo encontrado, (Figura 16 C).



**FIGURA 16.** Análise da atividade do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foi retirado todo o intestino delgado para mensuração do vermelho de fenol, administrado por gavagem. O intestino delgado foi dividido em 4 porções (estômago, porção 1, porção 2 e porção 3). O centro de massa foi determinado dividindo o intestino em 7 porções e também utilizando o vermelho de fenol para leitura em mesma absorbância. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ .

### 5.2.2 Estudo da contratilidade por eletroestimulação – curva de voltagem

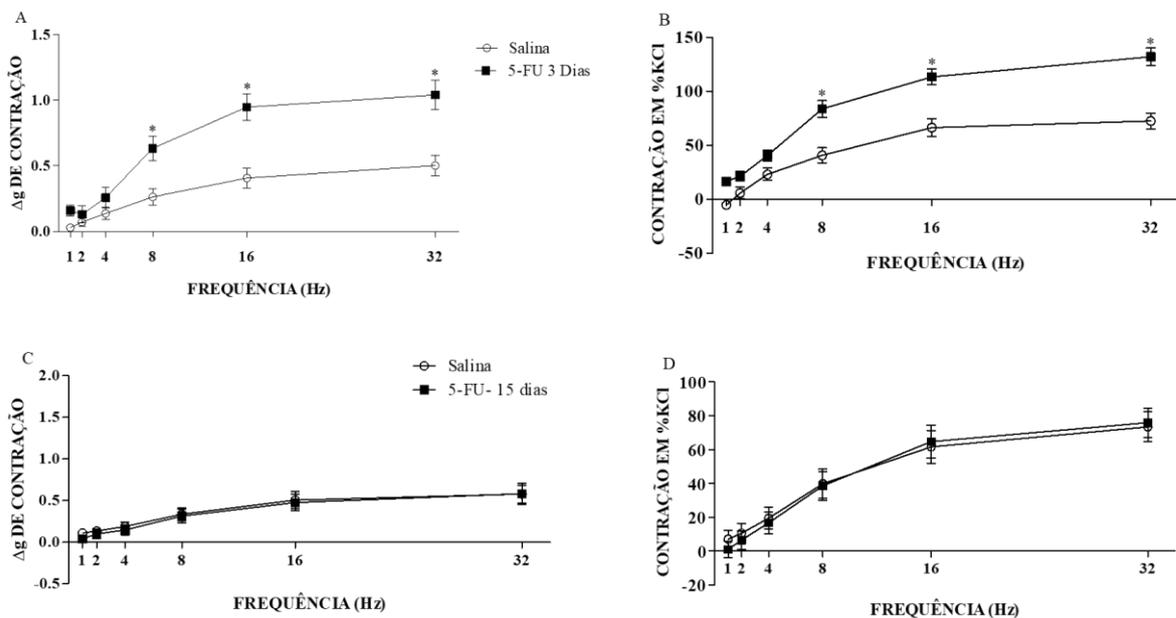
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo da contração do íleo, na curva de voltagem, dos animais com mucosite sacrificados no terceiro dia em comparação aos animais controle salina (Figura 17 A e B), mostram aumento significativo dessa contração nas estimulações em voltagem de 20, 40, 60 e 80 v ( $57,28 \pm 5,05$  vs  $97,77 \pm 5,93^*$ ;  $55,86 \pm 6,03$  vs  $94,08 \pm 5,33^*$ ;  $44,53 \pm 8,21$  vs  $89,15 \pm 5,54^*$ ;  $42,14 \pm 9,13$  vs  $91,27 \pm 3,50^*$  g). Foi observada diferença significativa no grupo de animais sacrificados 15 dias com uma diminuição da contração apenas na voltagem de 40 v,  $0,49 \pm 0,13$  vs  $0,22^* \pm 0,05$ g (Figura 17 C e D) após a indução da mucosite intestinal quando comparados aos animais salina.



**FIGURA 17.** Análise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina para grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para ser colocado em banho de órgãos contendo solução nutritora de Krebs e fixados em hastes polarizados ligadas a um eletroestimulador, em que o tecido ficou exposto ao estímulo elétrico de campo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

### 5.2.3 Estudo da contratilidade por eletroestimulação – curva de frequência

Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo da contração do íleo, na curva de frequência, dos animais com mucosite sacrificados no terceiro dia em comparação aos animais controle salina (Figura 18 A e B), mostram aumento significativo dessa contração nas estimulações em frequência de 8, 16 e 32 Hz ( $0,19 \pm 0,09$  vs  $0,64 \pm 0,12$ ;  $0,28 \pm 0,10$  vs  $0,84 \pm 0,15^*$ ;  $0,37 \pm 0,09$  vs  $0,91 \pm 0,15^*g$ ). Não foi observada diferença significativa no grupo de animais sacrificados 15 dias (Figura 17 C e D) após a indução da mucosite intestinal quando comparados ao grupo controle.

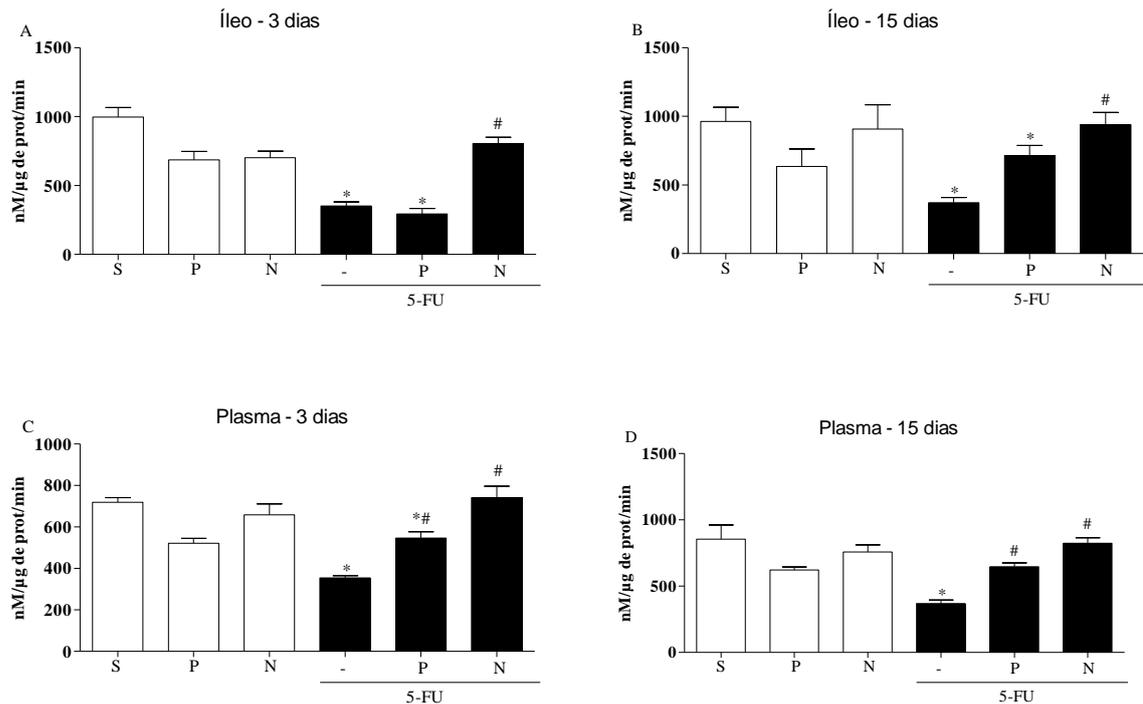


**FIGURA 18.** Análise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina para grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para ser colocado em banho de órgãos contendo solução nutritiva de Krebs e fixados em hastas polarizadas ligadas a um eletroestimulador, em que o tecido ficou exposto ao estímulo elétrico de campo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

### 5.3 Estudo do sistema colinérgico

#### 5.3.1 Atividade da Acetilcolinesterase

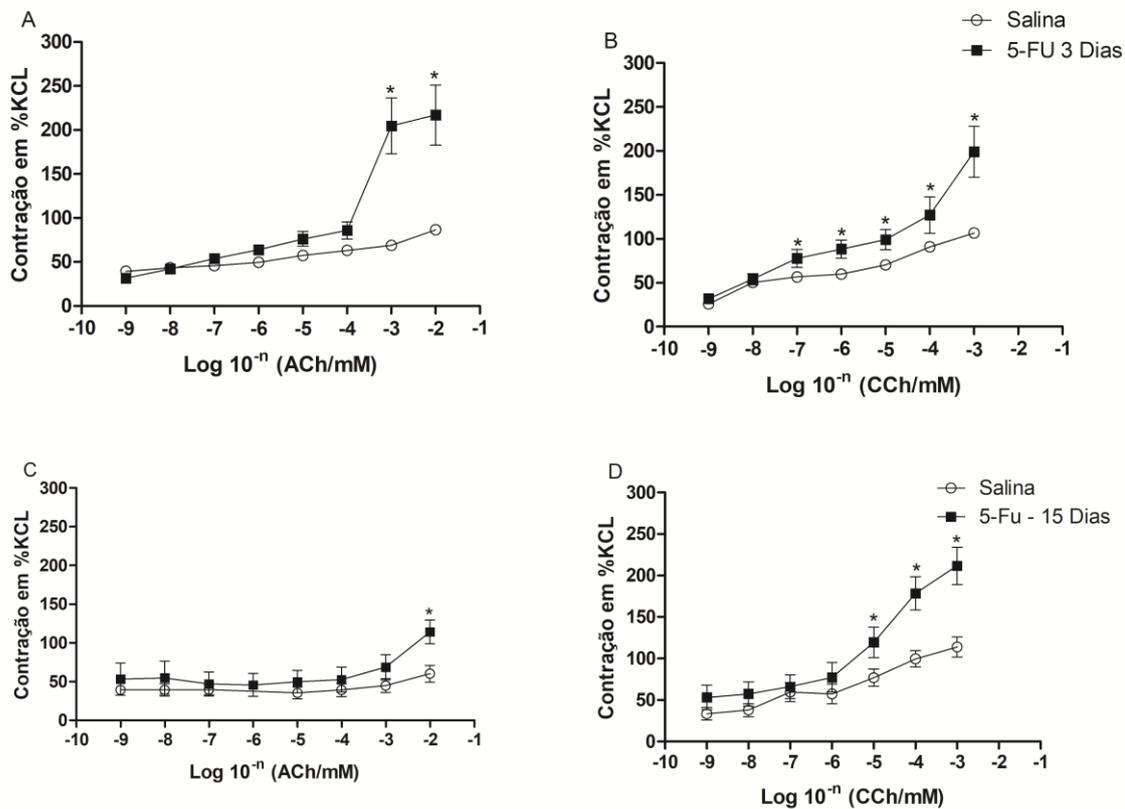
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), foi observado uma diminuição no segmento ileal (Figura 19 A e B), significativa na atividade da AChE em comparação aos animais controle salina (S), revertido pelo pre tratamento com Neostigmina (N), não observado nos animais pre tratados com Piridostigmina (P), semelhante ao resultado obtido por análise plasmática da atividade enzimática (Figura 19 C e D), nos grupos de animais sacrificados com 3 dias (Figura 19 A e C), (S:  $971,3 \pm 210,9$ ; 5FU:  $376,4 \pm 70,98$ ; P:  $593,5 \pm 100,9$ ; N:  $597,385 \pm 97,3$ ; FU+P:  $297,5 \pm 80,58$ ; 5FU+N:  $839,43 \pm 100,93$  nM/ $\mu$ g de proteína/min.). Nos grupos sacrificados com 15 dias (Figura 19 B e D) foi observado que atividade enzimática permanece diminuída no segmento ileal e na análise plasmática dos animais com mucosite.



**FIGURA 19.** Análise da atividade da acetilcolinesterase no íleo e no plasma de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado o plasma e um segmento de 1 cm do íleo para dosagem. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

### 5.3.2 Curvas de Acetilcolina e Carbacol

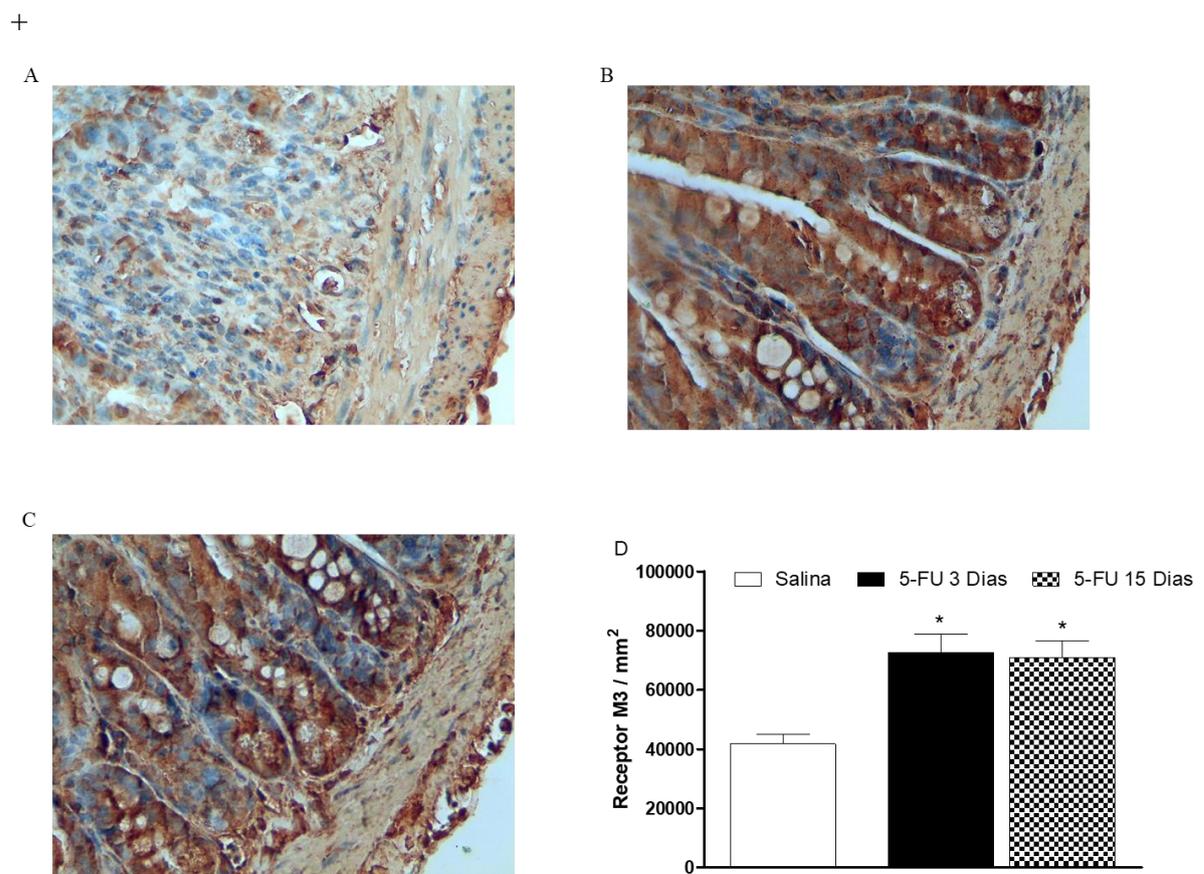
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na contração induzida por Acetilcolina (ACh) a partir da contração  $10^{-3}$  mM (Figura 20 A) em comparação aos animais controle salina, observado também na curva de Carbacol, onde mostra diferença a partir da concentração  $10^{-7}$  mM (Figura 20 B), diferente ao resultado nos grupos sacrificados com 15 dias foi observado diferença apenas em  $10^{-2}$  mM de ACh (Figura 20 C) e  $10^{-5}$  mM na contração induzida por carbacol (Figura 20 C).



**FIGURA 20** Análise das curvas de contração farmacológica por acetilcolina e carbacol em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

### 5.3.3 Imunohistoquímica para receptor M3

Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão do receptor muscarínico M3 nos animais com mucosite intestinal sacrificados 3 dias (B), em comparação aos animais controle salina (A), observado também o mesmo resultado nos grupos sacrificados com 15 dias (C), (S:  $41,87 \pm 6,41$ ; 5FU 3d:  $78,93 \pm 4,57^*$ ; 5FU 15d:  $76,24 \pm 5,53^*$  receptor M3/mm<sup>2</sup>).



**FIGURA 21** Análise da imunohistoquímica para receptor M3 de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (A) grupo controle ou 5-FU para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias (B) ou 15 dias (C) após administração do 5-FU. Foi retirado um segmento de 1 cm do íleo para Fixação, preparação e posterior análise de quantificação utilizando o software imageJ. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

**5.3.4 Análise da morfometria, através da técnica de imunofluorescência, dos neurônios imunorreativos ao receptor ChAT no modelo experimental de mucosite intestinal induzido por 5-FU;**

Há presença da imunorreatividade nos neurônios do plexo mioentérico do íleo de camundongos tratados com 5-FU. A dupla marcação do receptor Hu C/D com os neurônios ChAT, avaliada pela técnica de imunofluorescência, foi significativa no grupo tratado com 5-FU e sacrificados após 3 dias. A imunomarcação para ChAT foi identificada em neurônios motores excitatórios. Houve um aumento significativo do número de neurônios ChAT marcados no plexo mioentérico (Figura 22), quando comparado com o grupo controle.

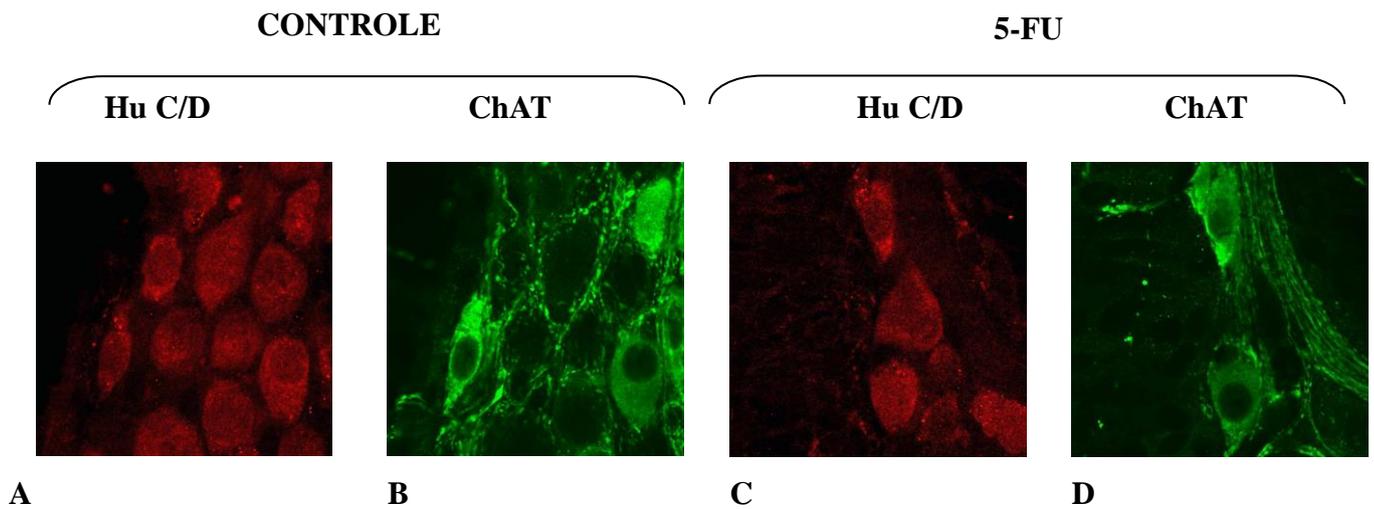
A avaliação da colocalização Hu/ChAT no íleo foi de  $66,6 \pm 2,1\%$  no grupo controle e  $80,3 \pm 3,7\%$  no grupo tratado com 5-FU (Tabela 1).

Tabela 1 – Colocalização dos neurônios do plexo mioentérico (íleo) de camundongos com mucosite intestinal induzido por 5-FU imunorreativos ao receptor Hu C/D e ChAT

<b>Grupo experimental (n=6)</b>	<b>Hu/ChAT (%)</b>
Controle	$66,6 \pm 2,1$
5-FU	$80,3 \pm 3,7^*$

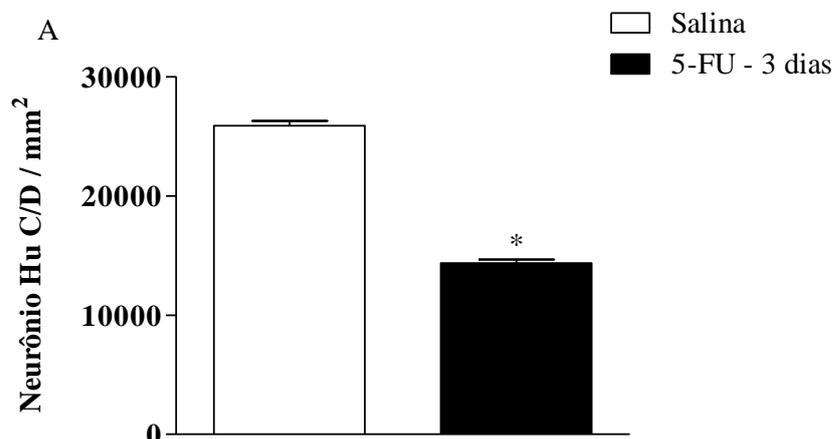
Os valores representam a média  $\pm$  DP. Foi utilizado o teste T de student, seguido do Mann Whitney. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

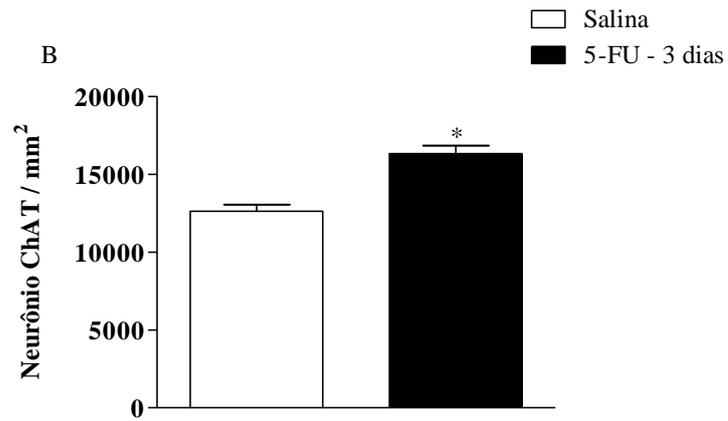
Fotografias do plexo mioentérico duplamente marcados, usando as combinações do anticorpo primário do receptor HuC/D com anticorpos primários ChAT, de camundongos tratados com 5-FU estão representados na figura 22, respectivamente. As imagens foram obtidas através de microscopia confocal.



**FIGURA 22.** Fotografias das imunofluorescência do plexo mioentérico duplamente marcados, usando as combinações do anticorpo primário do receptor HuC/D com anticorpos primários Chat de camundongos com mucosite intestinal induzido por 5-FU. Os preparados de membrana foram obtidos com o auxílio da lupa estereoscópica (ZM800 Nikon®), onde foram removidas as camadas mucosa, submucosa e a muscular circular, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações do anticorpo primário do receptor HuC/D (painel A e C) no segmento intestinal do íleo (B e D) de Camundongos do grupo tratado com 5-FU. As imagens foram obtidas através de microscopia confocal.

Na figura 23 B, a combinação do anticorpo primário do receptor HuC/D com anticorpo primário ChAT no plexo mioentérico do segmento estudado, de camundongos tratados com 5-FU (Figura 23), revelou um aumento importante da marcação de neurônios colinérgicos, ChAT, em relação a diminuição dos neurônios imunorreativos Hu C/D (Figura 23 A), quando comparado com o grupo controle.



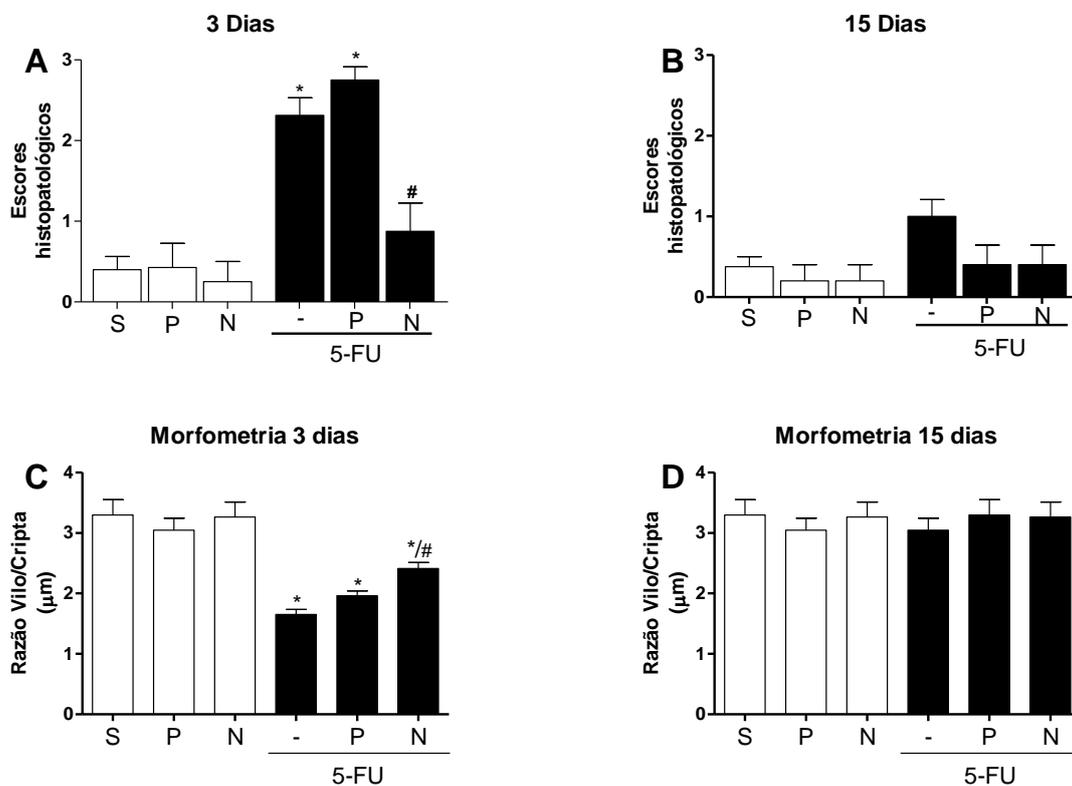


**Figura 23.** Densidade dos neurônios imunorreativos a Hu C/D e a ChAT, nos grupos tratados com 5-FU e sacrificados no terceiro dia de tratamento. Os camundongos foram tratados como salina (grupo controle) ou 5-FU (450 mg/kg). Uma porção íleo foi obtida para a obtenção do preparado de membrana. Com o auxílio da lupa estereoscópica manteve-se somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. Em seguida, os preparados foram imersos em uma solução estoque. Após este período, os tecidos foram incubados em anticorpos primários. As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações do anticorpo primário do receptor HuC/D com anticorpos primários ChAT. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

## 5.4 Estudo da participação a via colinérgica anti-inflamatória.

### 5.4.1 Parâmetros histológicos e morfometria

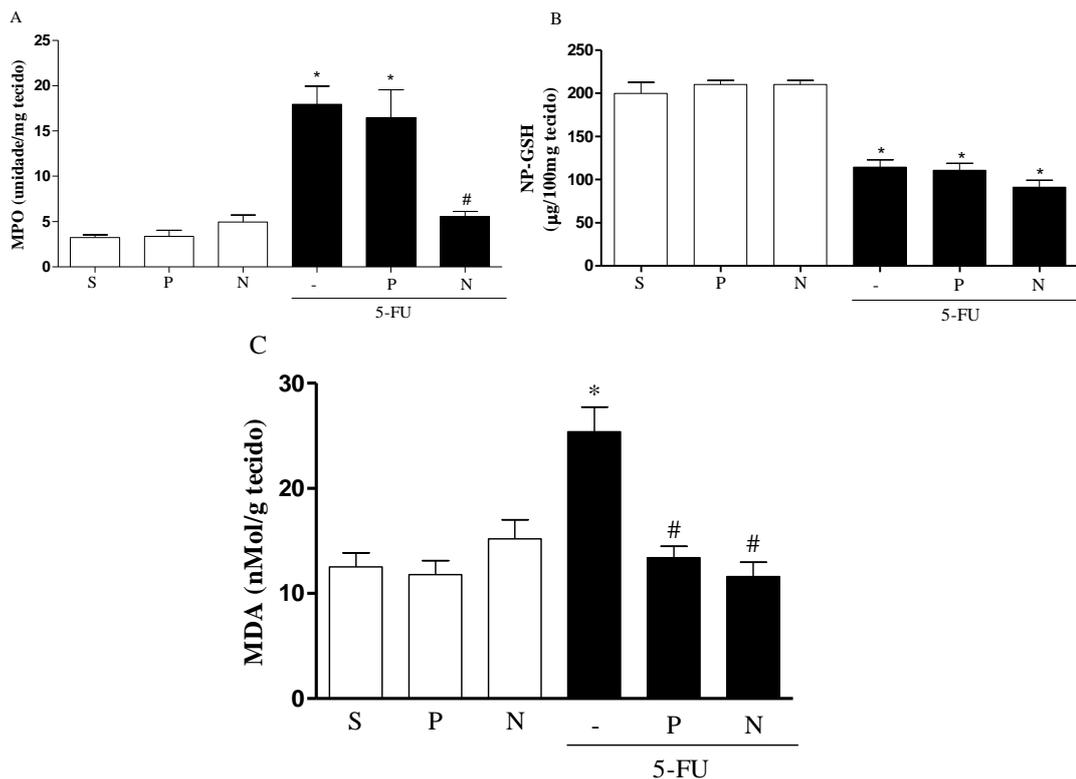
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos escores histológicos e da morfometria em comparação aos animais controle salina (S), revertido pelo pre tratamento com Neostigmina (N), dose de 0,5 mg/kg/dia, não observado nos animais pre tratados com Piridostigmina (P), nos grupos de animais sacrificados com 3 dias (Figura 24 A e C). Nos grupos sacrificados com 15 dias (Figura 24 B e D) foi observado reestruturação do segmento ileal dos animais com mucosite, resultado que pode ser foco de boas respostas pelo possível envolvimento da acetilcolina nesse protocolo de estudo, necessitando de mais estudos.



**FIGURA 24.** Análises histológica e morfométrica ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após a administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado um segmento de 1 cm para processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Kruskal-Wallis ou Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

### 5.4.2 Parâmetros Bioquímicos

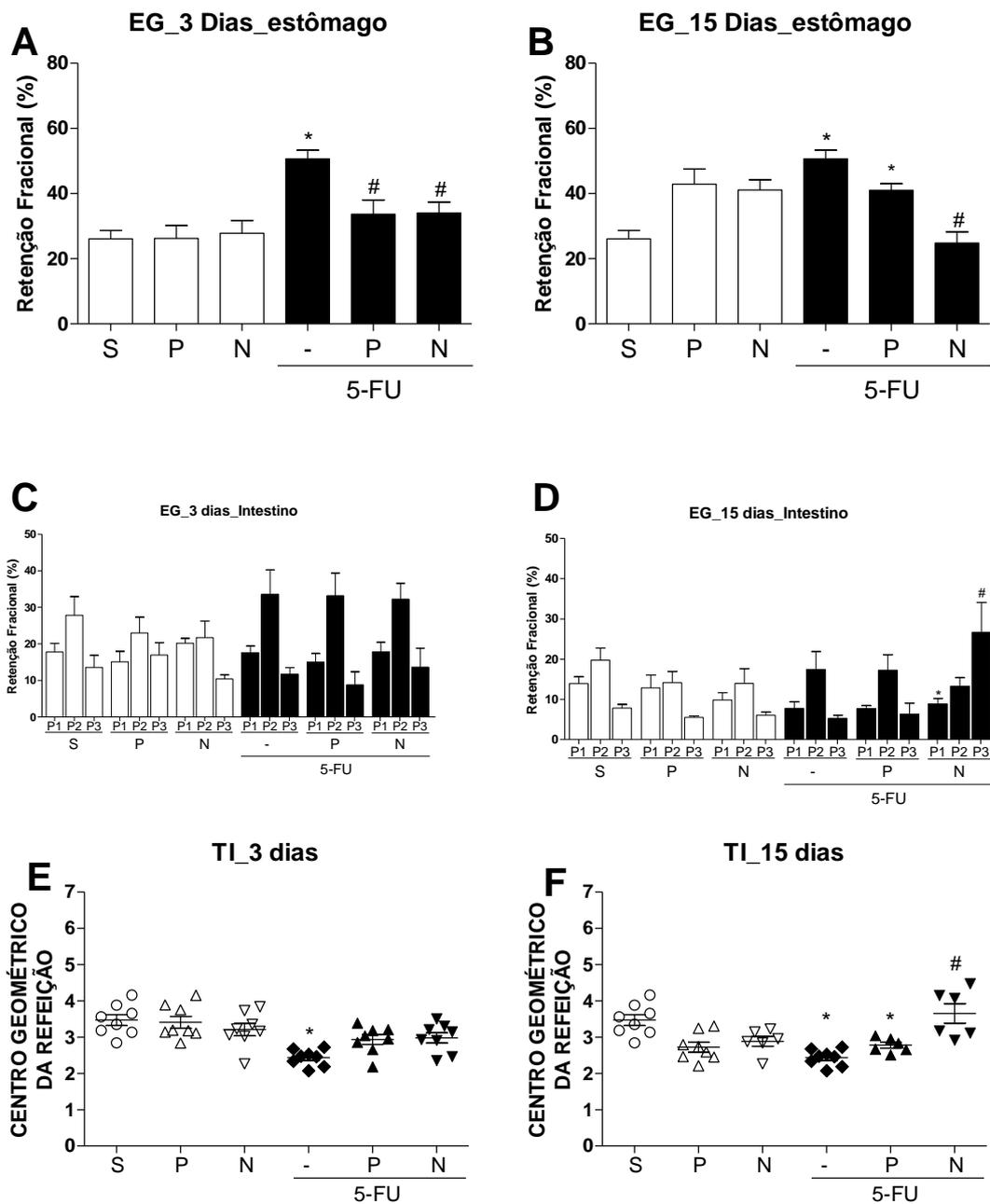
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), foi observado um aumento significativo na atividade da MPO (S:  $3,24 \pm 0,31$ ; 5FU:  $17,92 \pm 2,01^*$ ; P:  $3,37 \pm 0,69$ ; N:  $4,18 \pm 0,18$ ; 5FU+P:  $16,48 \pm 3,06^*$ ; 5FU+N:  $4,98 \pm 0,93^{\#}$  UMPO/mg tecido) e MDA, (S:  $12,5 \pm 1,31$ ; 5FU:  $29,12 \pm 2,8^*$ ; P:  $11,3 \pm 1,69$ ; N:  $13,48 \pm 0,18$ ; 5FU+P:  $11,48 \pm 0,06^{\#}$ ; 5FU+N:  $11,58 \pm 1,43^{\#}$  nMol/g tecido), em comparação aos animais controle salina (S), revertido pelo pre tratamento com Neostigmina (N), não observado nos animais pre tratados com Piridostigmina (P), nos grupos de animais sacrificados com 3 dias (Figura 25 A e C). Nos grupos de análise do GSH, (S:  $199,9 \pm 8,71$ ; 5FU:  $120,9 \pm 6,77$ ; P:  $107,5 \pm 9,38$ ; N:  $203,1 \pm 4,9$ ; 5FU+P:  $124,7 \pm 8,35$ ; 5FU+N:  $118,8 \pm 7,93^{\#}$  NP-GSH  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de tecido), foi observado diminuição da atividade enzimática no segmento ileal dos animais com mucosite (Figura 25 B).



**FIGURA 25.** Análise dos parâmetros bioquímicos no fêo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado um segmento de 1 cm do íleo para dosagem por leitor de microplacas. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

### **5.4.3 Estudo do Esvaziamento Gastrintestinal (EG) e Trânsito Intestinal (TI)**

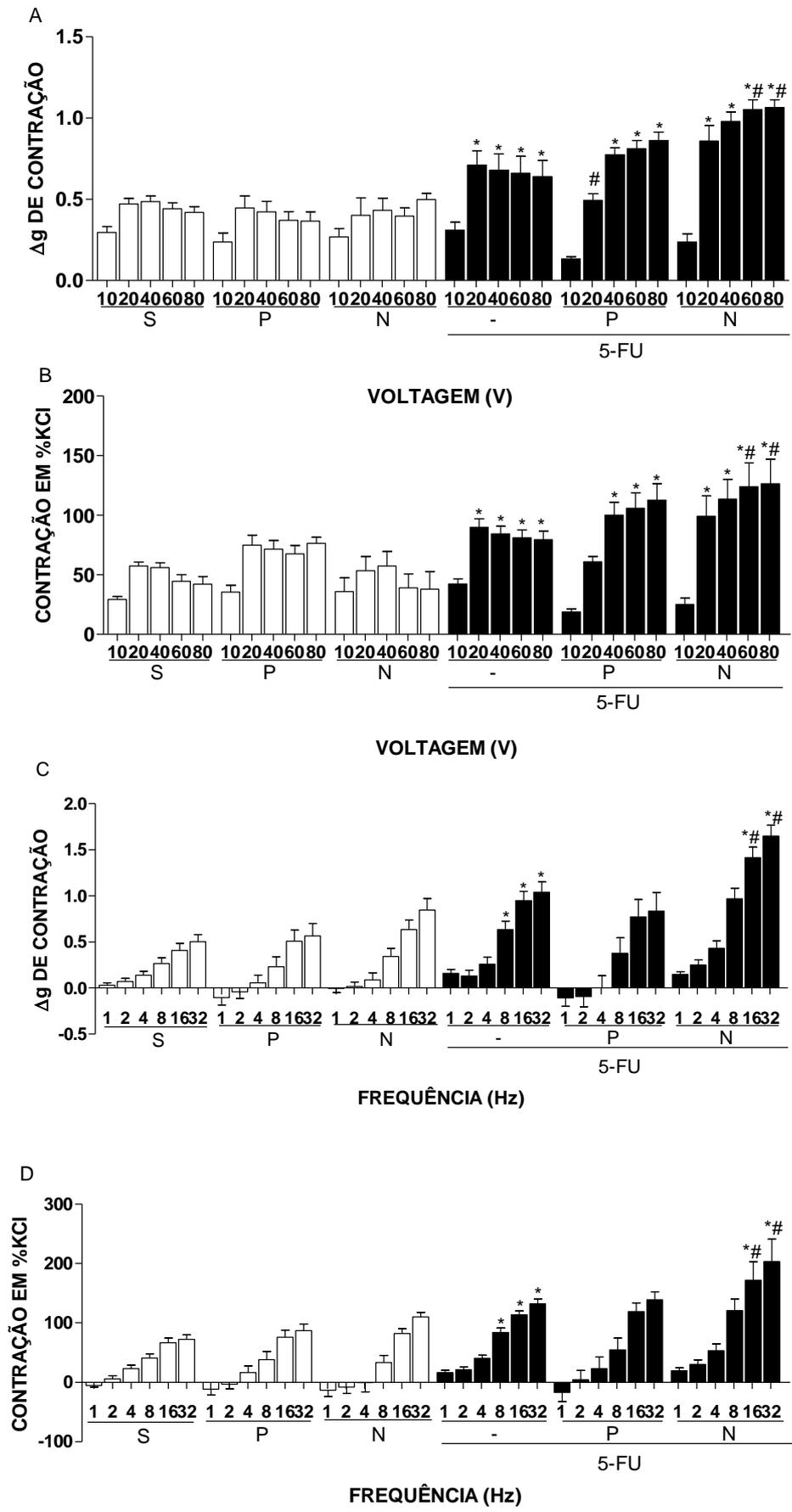
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um retardo significativo ( $p < 0,05$ ) da refeição teste no estomago dos animais com mucosite sacrificados no terceiro dia em comparação aos animais controle salina (S) (Figura 26 A), persistindo até 15 dias após a indução da mucosite ) (Figura 26 B), revertido pelo pre tratamento com Neostigmina (N), não observado nos animais pre tratados com Piridostigmina (P) (Figura 26 A e B). Não foi observada diferenças significativas no intestino em nenhuma das três porções em que foi dividido no grupo de animais sacrificados com 3 dias (Figura 26 C), mostrando diferença na primeira porção do intestino e na última porção nos animais sacrificados com 15 dias (Figura 26 D). O Trânsito intestinal - TI da refeição mostrou retardo nas primeiras porções em comparação ao grupo controle. Nos grupos sacrificados com 15 dias ainda persiste o retardo encontrado e revertido com o pre tratamento com neostigmina, não sendo revertido pelo pre tratamento com piridostigmina (Figura 26 E e F).



**FIGURA 26.** Análise da atividade do esvaziamento gastrointestinal (EG) e trânsito intestinal (TI) de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias ou 15 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado todo o intestino delgado para mensuração do vermelho de fenol, marcador não absorvível, administrado por gavagem 10 minutos antes do sacrifício dos animais, feito em leitor de microplacas na absorbância de 560 nm. O intestino delgado foi dividido em 4 porções (estômago, porção 1 (P1), porção 2 (P2) e porção 3 (P3)). O centro de massa foi determinado dividindo o intestino em 7 porções e também utilizando o vermelho de fenol para leitura em mesma absorbância. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

#### **5.4.4 Estudo da contratilidade por eletroestimulação – 3 dias**

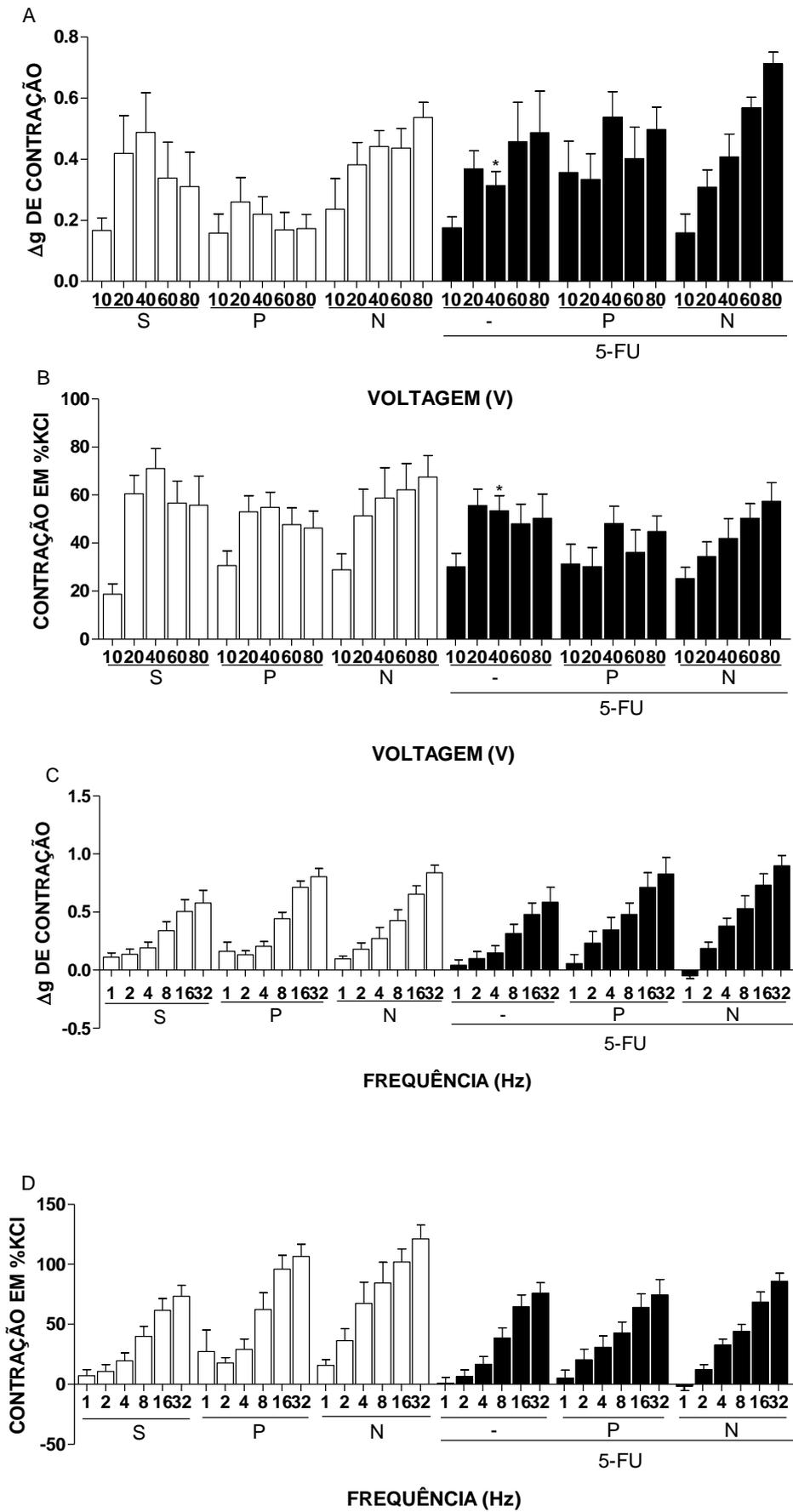
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da contração do íleo, na curva de voltagem (20, 40, 60 e 80 v), dos animais com mucosite sacrificados no terceiro dia em comparação aos animais controle salina (S), bem como os resultados da contração por curva de frequência (8, 16 e 32 Hz), mostram aumento significativo dessa contração. Nos animais pre tratados com neostigmina foi visto aumento significativo nas duas curvas de estimulação quando comparados aos animais com mucosite (5-FU) (Figura 27 A e C), bem como após fator de correção por porcentagem de contração de KCL, o resultado não altera em sua representação (Figura 27 B e D).



**FIGURA 27.** Análise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado um segmento de 1 cm do íleo para ser colocado em banho de órgãos contendo solução nutritora de Krebs, o tecido ficou exposto ao estímulo elétrico de campo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

#### **5.4.5 Estudo da contratilidade por eletroestimulação – 15 dias**

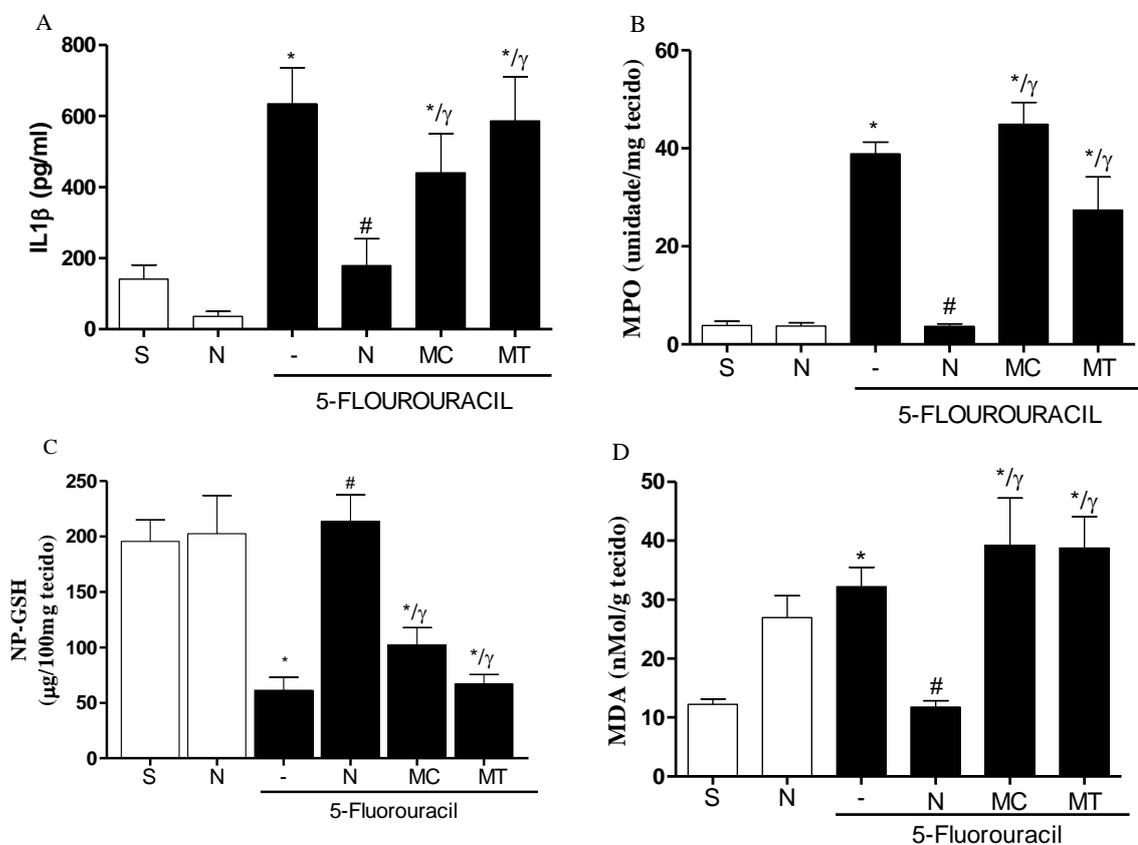
Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), na dose de 450mg/kg, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da contração do íleo, na curva de voltagem somente em 40 v, dos animais com mucosite sacrificados no decimo quinto dia em comparação aos animais controle salina (S), nos resultados da contração por curva de frequência, não mostram alterações significativas no perfil contrátil após estímulo. Nos animais pre tratados com neostigmina ou piridostigmina não observamos quaisquer alterações na contração após as duas curvas de estimulação quando comparados aos animais com mucosite (5-FU) (Figura 28 A e C), bem como após fator de correção por porcentagem de contração de KCL, o resultado não altera em sua representação (Figura 28 B e D).



**FIGURA 28.** Análise da contratilidade ileal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 15 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Piridostigmina (P) e Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase. Foi retirado um segmento para ser colocado em banho de órgãos contendo solução nutritora de Krebs e fixados em hastes polarizados ligadas a um eletroestimulador, em que o tecido ficou exposto ao estímulo elétrico de campo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.

#### 5.4.6 Parâmetros bioquímicos – uso de antagonistas do receptor nicotínico $\alpha 7$

Após administração do 5-Fluorouracil (5-FU), foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade da MPO, nas quantidades de IL1- $\beta$ , GSH e MDA em comparação aos animais controle salina (S), revertido pelo pre tratamento com Neostigmina (N). Onde com bloqueio inespecífico com Mecamilamina (MC), bem como bloqueio específico  $\alpha 7$  com Metilcocanitina (MT), notasse alteração do efeito reversivo da neostigmina, nos grupos de animais sacrificados com 3 dias.



**FIGURA 29.** Análise dos parâmetros bioquímicos no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fu. Os animais foram tratados com salina (S) grupo controle ou 5-FU (-) para grupo mucosite intestinal e sacrificados 3 dias após administração do 5-FU. Foram pre tratados com Neostigmina (N), inibidores da acetilcolinesterase conjuntamente com mecamilamina (MC) e metilcocanitina (MT). Foi retirado um segmento para dosagem por leitor de microplacas. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU.  $\gamma p < 0,05$ , quando comparado ao grupo 5-FU+N.

## 6 DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstra que o uso de 5-FU causa mucosite e tem implicações funcionais diversas no trato gastrointestinal. Sendo assim, encontrar um alvo terapêutico viável e com implicações positivas importantes, como a estimulação da via colinérgica antiinflamatória, usando fármacos, já aplicados na clínica para tratamento de outras doenças, por exemplo a Neostigmina. Essas alterações funcionais e contráteis da musculatura lisa do intestino delgado, presentes tanto no período inflamatório como pós-inflamatório da mucosite e pode ser revertido por uma estimulação colinérgica, como nossos dados sugerem.

Para se chegar a observação anterior, utilizamos um modelo de mucosite intestinal por 5-FU e posteriormente avaliamos as alterações nas fases inflamatória e pós-inflamatória. Para tanto, nosso alicerce, foi o modelo idealizado por Soares et al. (2008). Onde observou o pico inflamatório do intestino delgado ocorre no 3º dia após a administração do 5-FU, dose de 450mg/Kg, (fase inflamatória), porém no 15º dia após a administração do 5-FU o processo inflamatório está ausente (fase pós-inflamatória). No entanto, esse mecanismo ainda precisa ser investigado. A mucosite severa parece estar associada com aumento acentuado da mortalidade (SONIS et al., 2004). Em pesquisas de Sonis et al. (2001) relataram que a mucosite oral está associada a resultados clínicos e econômicos significativamente piores no transplante de medula óssea e transfusão sangue, devido à quimioterapia mieloablativa de alta dose usada para o condicionamento. No estudo da Sonis, os autores relataram um aumento de 3,9 vezes no risco de mortalidade de 100 dias na população investigada (SONIS et al., 2001).

Quando avaliados, nossos dados demonstram que houve a indução da mucosite, pois no 3º dia após a administração do 5-FU o processo inflamatório estava ativo, bem como aumento da produção de IL-1 $\beta$ , corroborando assim com os achados da literatura (SOARES et al., 2008; HAN et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; JUSTINO et al., 2014; JUSTINO et al., 2015; LIMA, 2016). Por outro lado, quando analisamos o grupo sacrificado 15 dias após a administração do 5-FU, vimos que as alterações estavam ausentes, portanto, o intestino havia se recuperado da lesão inflamatória imposta pelo 5-FU, reproduzindo a fase pós-inflamatória descrita por Soares et al (2008) e, reafirmando os resultados de Keefe et al. (2000) quando eles observaram que no 16º após administração do 5-FU o processo inflamatório havia cessado.

A destruição da arquitetura intestinal na fase inflamatória da mucosite encontrada na literatura, demonstra que o intestino delgado é especialmente susceptível aos danos da mucosite, principalmente pela sua elevada taxa proliferativa (SOARES et al 2008; LOPES,

2014; LEOCÁDIO et al 2015; TRINDADE et al, 2017) e, reafirmando uma das consequências diretas do uso de antineoplásicos é o dano das células epiteliais intestinais, acompanhado por destruição da mucosa e estabelecimento de um severo processo inflamatório (DUNCAN E GRANT, 2003; SONIS 2004; APRILE et al 2015; SONIS, 2018).

Dessa forma, a análise de citocinas, tais como IL-1 $\beta$ , é de suma importância para avaliação do desenvolvimento da mucosite intestinal e já tem sido mostrado que são marcadores associados ao tratamento de pacientes submetidos à terapia com 5-FU (MIWA; KOJIMA; NARUSE, 2001), alteração também já descrita em modelos experimentais (SOARES et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; YEUNG et al., 2015; YUAN et al., 2015). Em consonância com estudos prévios, no presente estudo, a administração de 5-FU aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  no íleo dos animais do grupo mucosite sacrificados no terceiro dia. Por outro lado, o aumento de acetilcolina ocasionado pela administração de inibidores da acetilcolinesterase demonstraram um importante potencial anti-inflamatório ao promover redução da produção desse mediador pro-inflamatório.

A intensa produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias mediada por macrófagos e linfócitos é um importante aspecto para o desenvolvimento das alterações vasculares observadas na resposta inflamatória induzida pelo tratamento com quimioterápicos, desencadeando a ativação do endotélio vascular o qual culmina no aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular e exacerbação do processo inflamatório (SONIS, 1998; PICO et al., 1998). Associado a esses eventos, as citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de promover quimiotaxia de polimorfonucleares (primariamente neutrófilos) para os tecidos inflamados, atuando como sinalizadores celulares que contribuirão para a fase de ulceração do tecido (WAGNER E ROTH, 2000).

A presença de neutrófilos no sítio lesado é uma característica primordial dos processos inflamatórios. Assim, buscou-se avaliar a magnitude do infiltrado neutrofílico como marcador indireto da fase inflamatória da mucosite uma vez que essas são as primeiras células de defesa a migrarem para o local da inflamação instalando-se preferencialmente na lâmina própria e nas criptas intestinais, e são responsáveis pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO), dos grânulos azurófilos, que catalisa a formação do ácido hipocloroso, levando a danos no DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, podem agir na exarcebação da resposta inflamatória estimulando o endotélio vascular a liberar mediadores pró-inflamatórios e moléculas de adesão, ocasionando o aumento da permeabilidade vascular e mais infiltrado neutrofílico. A desgranulação dos neutrófilos libera várias substâncias como proteínas antimicrobianas, proteases, radicais ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) componentes da resposta

oxidativa (FAURSCHOU E BORREGAARD, 2003; KWIECIEN et al., 2004; KONTUREK et al., 2010).

Nossos resultados coadunam com a literatura quando afirmam um aumento significativo da atividade MPO de todo o intestino delgado 3 dias após a administração do 5-FU ocorrendo principalmente no jejuno tanto em modelos de mucosite em camundongos como em ratos (AZEVEDO et al., 2012; SOARES et al., 2013; JUSTINO et al., 2015; GOU et al., 2016) como na avaliação em ratos (SOARES et al., 2008; LINDSAY et al. 2010). Esse resultado confirma a fase inflamatória da mucosite 3 dias após a administração do 5-FU e relaciona a presença da lesão epitelial associada ao uso de quimioterápicos com infiltração de neutrófilos para a mucosa intestinal (DUNCAN E GRANT, 2003; SONIS et al., 2004).

Além disso, a destruição das células epiteliais após a indução da mucosite intestinal é o principal estímulo para o recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal estando as ulcerações associadas com a ativação dos fatores nucleares de transcrição da família NF- $\kappa$ B (RUBEINSTEIN et al., 2004; SONIS, 2004; 2009; APRILE et al 2015). A migração de neutrófilos para as células epiteliais pode induzir alterações de permeabilidade do epitélio intestinal. Essas alterações da permeabilidade poderiam estar relacionadas a eventos dispépticos associados à mucosite intestinal por 5-FU (EDENS et al 2002).

O dano intestinal, relatado anteriormente, pelos quimioterápicos tem início com a liberação de EROs, e por consequência a desestabilização das estruturas orgânicas, levando a destruição do DNA das células epiteliais intestinais e morte celular, além de um poderoso estresse oxidativo (SONIS, 2004; MAEDA et al 2010). Por isso, torna-se crucial a quantificação da concentração da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glicina) que atua principalmente como um antioxidante endógeno, tendo papel crucial no combate a radicais livres, defendendo as células do estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2012). Seu consumo reflete uma defesa celular contra a liberação de EROs, que por sua vez estão presentes na fisiopatologia da mucosite (SONIS, 2004; MAEDA et al 2010).

Nessa perspectiva, quando analisamos nossos dados para a fase inflamatória da mucosite, detectamos uma redução significativa dos níveis de GSH para os três segmentos intestinais delgados, resultado que estabelece um elo com a literatura, quando consultamos os resultados de Soares et al. (2008), Justino et al. (2014; 2015) e Gou et al. (2016), reafirmando a presença de um intenso estresse oxidativo por causa da ação do 5-FU no intestino. Isso, somado a presença de um intenso infiltrado inflamatório nos dá um suporte fidedigno para confirmar a presença de uma fase inflamatória 3 dias após a administração do 5-FU, assim

como descrito por Soares et al. (2008).

Ainda com objetivo de caracterizar as fases da mucosite, continuamos avaliando o processo de estresse oxidativo, agora a luz da presença de peroxidação lipídica medida através da dosagem do malonildialdeído (MDA), uma vez que esse representa o principal aldeído reativo formado na peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas biológicas, sendo lido como marcador de dano celular via estresse oxidativo (VACA et al., 1988).

Nossos resultados são coerentes quanto ao aumento do MDA no segmento ileal após 3 dias da indução da mucosite. Assim, tomando como referência os níveis de MDA e GSH encontrados sugere-se que o antineoplásico 5-FU atue como pró-oxidante sobre o epitélio intestinal, mantendo a mucosa em constante dano oxidativo. Nosso resultado para os níveis de MDA coadunam com a literatura, pois vários autores relatam que os níveis EROs e peroxidação lipídica retorna aos valores normais cerca de 72 horas após a indução da mucosite, o MTX (MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004; MAEDA et al 2010). Os mesmos autores relatam ainda que o aumento do estresse oxidativo ocorreu no período entre 24 horas e 48 horas após a indução.

Enquanto que, em mucosite oral por 5-FU, aumento da peroxidação lipídica no primeiro dia após a indução, que voltou a níveis normais quando avaliada no quinto dia. Portanto, podemos destacar nossos resultados, pois a fisiopatologia da mucosite não pode ser considerada igual em todas suas fases para quimioterápicos diferentes (TAKUMA et al. 2008).

Os resultados acima tomados em conjunto permitem-nos inferir a presença da mucosite, quanto a sua fase inflamatória, sendo, portanto, um modelo válido para estudo das alterações funcionais do intestino delgado ocasionadas pelo tratamento quimioterápico por 5-FU; assim como avaliação das alterações na fase pós-inflamatória. Outrora, quando avaliamos os mesmos parâmetros, apresentados nos parágrafos anteriores, 15 dias depois da administração de 5-FU observamos ausência de indicativos inflamatórios, seja pela análise histopatológica, morfométrica, infiltrado inflamatório ou estresse oxidativo, confirmando recuperação do intestino delgado frente aos danos ocasionados mucosite, descrita como uma das fases de Sonis (2004), assim também descritas por Duncan e Grant (2003). Portanto, a metodologia empregada reproduz as fases descritas por Soares et al. (2008) e nos dá subsídios para futuras inferências sobre as alterações funcionais do intestino presentes tanto na fase inflamatória como pós-inflamatória da mucosite.

Nossos resultados mostraram que a contratilidade induzida por agonistas muscarínicos como acetilcolina (ACh) e carbacol (CCh) no íleo, foi aumentada tanto nas fases

inflamatória (após o terceiro dia) quanto no período pós-inflamatório (após o 15º dia) houve diferença entre o salina do grupo mucosite intestinal induzida por 5-FU. Como também descrito em pacientes dispépticos funcionais (TACK et al, 1998; SIMRÉN et al, 2003), o aumento da contratilidade do fundo gástrico poderia induzir uma acomodação gástrica prejudicada e, em seguida, sintomas dispépticos (SOARES et al, 2008).

A reação inflamatória durante a mucosite foi previamente descrita por modificar parcialmente o comportamento contrátil de tiras intestinais isoladas em resposta a agonistas colinérgicos (LIMA-JÚNIOR et al., 2012), que podem estar correlacionados com as câibras viscerais experimentadas clinicamente pelos pacientes. Os resultados de Lima-Júnior et al (2012) mostrou que a deleção genética da caspase-1 ou IL-18, ou a inibição farmacológica da IL-18 preveniu a hiperresponsividade do musculo intestinal à ACh em banho de órgãos, demonstrada pelo rebaixamento da resposta de efeito máximo de tiras intestinais isoladas contraídas com ACh, em relação aos níveis observados no controle. Esses achados apoiam fortemente a ideia de que a população de receptores colinérgicos muscarínicos é mantida durante o estabelecimento da mucosite intestinal, enquanto a capacidade da ACh e CCh para induzir a contração através desses receptores parece ser aumentada.

Uma "síndrome colinérgica", associada à administração de altas doses de irinotecano, foi observada 1h após a administração e consiste em lacrimação, miose, aumento da salivação, diaforese, rubor, rinite e hiperperistalse intestinal, que geralmente levam à diarreia de início precoce (HYATT et al., 2005). Na prática clínica, esta síndrome colinérgica é geralmente prevenida pela atropina, um antagonista do receptor muscarínico. Estudos de Hyatt et al. (2005) hipotetizaram que a atropina pode interagir e inibir a AChE como irinotecano e sua porção de 4-piperidinopiperidina pode inibir a atividade da AChE *in vitro*. Expandindo esses resultados, demonstramos aumento das respostas contráteis das tiras intestinais à ACh e CCh no grupo tratado com 5-FU na fase inflamatória.

Alguns estudos experimentais indicaram que a ativação de receptores nicotínicos em células inflamatórias, como macrófagos, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduz a morbidade durante a sepse experimental (BOROVIKOVA et al., 2000; PAVLOV et al., 2007). A ativação excessiva de tais receptores por concentrações aumentadas de ACh nas sinapses intestinais durante a mucosite intestinal relacionada com 5-FU pode ser responsável pela dessensibilização dos receptores colinérgicos nas membranas celulares e pela libertação aumentada de mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$ . Esse fenômeno levaria a danos nos tecidos, hiperresponsividade das camadas musculares do intestino e o desenvolvimento de diarreia.

Assim, na sequência realizamos a avaliação das alterações funcionais em virtude do processo inflamatório e pós-inflamatório imposto pelo 5-FU. Nessa análise, nossos dados demonstram um retardo no esvaziamento gastrointestinal e no trânsito intestinal (avaliação do centro geométrico da refeição) nas fases inflamatória e fase pós-inflamatória da mucosite, resultados que vão ao encontro com a literatura, pois Justino et al. (2014; 2015) tinham observado as alterações em esvaziamento gástrico e trânsito intestinal na fase inflamatória por 5-FU em camundongos, e por Soares et al. (2008), quando descrevem pela primeira vez a associação entre a mucosite induzida por 5-FU e o dano funcional no trato gastrointestinal traduzido por uma situação contraditória de retardo do esvaziamento gastrointestinal e trânsito intestinal e hipercontratilidade do músculo liso intestinal 3 e 15 dias após a indução de mucosite.

É fato que a mucosite intestinal induzida por 5-FU está associada a significativo retardo no esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal. Esse resultado exemplifica o que acontece na prática clínica, quando pacientes submetidos à terapia anticâncer manifestam distúrbios da motilidade gastrointestinal (NELSON et al., 2002, RIEZZO et al., 2005) com repercussão em sintomas tais como, dispepsia, disfagia e diarreia, onde esse conjunto de sintomas foi denominado síndrome dispéptica associada à quimioterapia do câncer (CADS) (RIEZZO et al., 2005).

Em sua hipótese, Soares et al. (2008) atribui o retardo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal às alterações na motilidade intestinal impostas pelo processo inflamatório intestinal, uma vez que o maior tempo do movimento de massa gastrointestinal em animais com mucosite ocorre na ausência de danos inflamatórios do estômago, mas com distúrbios inflamatórios intestinais. Além disso, as anormalidades do controle da motilidade gastrointestinal, ocorrem não somente na fase inflamatória, mas também na fase pós-inflamatória e em órgãos distantes nos modelos de lesão inflamatória (MOREELS et al., 2001; AKIHO et al., 2005). Portanto, as alterações inflamatórias intestinais teriam repercussão em todo trato gastrointestinal, sugerindo um dano plástico ao intestino, pois a ausência de sinais histopatológicos inflamatórios não garante a função motora intacta (TANOVIĆ et al., 2006), como demonstrado na fase pós-inflamatória.

Dessa forma, o efeito do 5-FU sobre o retardo do esvaziamento gástrico em camundongos, pode ser oriundo do aumento na complacência gástrica ou na resistência antroduodenal (HABA E SARNA, 1993). Também foi demonstrado que a hipomotilidade intestinal e o retardo do esvaziamento gastrointestinal podem ser encontrados em um modelo de íleo

paralítico em rato (DE JONGE et al., 2003). Observou-se ainda, que a sepse inibe a motilidade gastrointestinal podendo ser influenciada pela produção de óxido nítrico (De WINTER et al., 2002).

Outro resultado obtido que coaduna com a literatura, e foi observado de maneira isolada na fase inflamatória da mucosite, é aceleração do trânsito intestinal, fato esse que pode ser o responsável pela diarreia persistente que acomete os camundongos 3 dias após a administração de 5-FU, também observada em ratos (SOARES et al., 2008) e coincide com a observação clínica em humanos que fazem uso de 5-FU.

Somado a esses achados, nossos resultados da estimulação elétrica de campo demonstraram que existe uma clara relação entre a inflamação da mucosa intestinal e hipercontratilidade do músculo liso, uma vez que a maioria dos estímulos aplicados ao músculo liso intestinal em ambas as fases da mucosite manifestou um aumento na resposta contrátil do íleo exposto ao 5-FU.

Tomados em conjunto, os dados sobre as fases da mucosite, a avaliação funcional, e, agora, o padrão contrátil do músculo liso intestinal à estimulação elétrica de campo, demonstram a presença de uma dismotilidade induzida pelo processo inflamatório e que persiste no período pós-inflamatório da mucosite. Essa observação apoia-se na contradição funcional entre o retardo no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal e a hipercontratilidade do músculo liso intestinal delgado aos estímulos elétricos de campo, tanto na fase inflamatória como pós-inflamatória da mucosite.

A mucosite induzida por 5-FU ocasiona uma lesão inflamatória na mucosa do intestino delgado. Por hipótese, essa inflamação repercute no remodelamento do SNE, ocasionando a hiperexcitabilidade neuronal de IPANs, neurônios motores, interneurônios e mudanças na produção e liberação de neurotransmissores tendo como consequência a hipercontratilidade do músculo liso intestinal de forma persistente, mesmo após a resolução da inflamação.

Na perspectiva anterior, inúmeros trabalhos como de Lima, 2016 têm demonstrado que as alterações neuroplásticas no SNE ocorrem principalmente por eventos inflamatórios, sendo caracterizado por uma disfunção gastrointestinal sensório-motora, devido aumento da excitabilidade neural, das condutâncias iônicas dos neurônios, e na condução do potencial de ação. A medição *in vitro* de respostas neuro-musculares à estimulação elétrica de campo em amostras de jejuno e íleo com inflamação por *T. spiralis*, íleite por TNBS, íleite induzida por ácido acético e colite de pacientes com colite ulcerosa, demonstra uma hiperatividade muscular, que pode ser advinda de um desarranjo da função neuromuscular

ocasionado pela inflamação (PALMER et al., 1998; De GIORGIO et al., 2001; MOREELS et al., 2001; LINDEN et al., 2004; LOMAX et al., 2005).

De fato, o estado inflamatório ocasiona significativas mudanças nos parâmetros funcionais, tais como a alteração da contratilidade muscular, podendo essa ser responsável pelo aparecimento de sintomas como diarreia, vômitos, cólicas, dor abdominal (DUNCAN E GRANT, 2003), e tais alterações motoras persistem mesmo após a recuperação da estrutura normal da mucosa (SOARES et al., 2008) e, em alguns casos, elas não afetam apenas a área inflamada, mas também as regiões remotas do trato gastrointestinal (BERGIN et al., 1993; VERMILLION et al., 1993). Portanto, as mudanças nas respostas motoras não são apenas devido ao dano do músculo liso, mas também a distúrbios nos mecanismos mediados por receptores específicos e limitam a qualidade de vida de indivíduos acometidos (TANOVIĆ et al., 2006).

A dismotilidade está presente em todo o intestino delgado durante a fase inflamatória da mucosite. Nossos dados demonstram que o íleo apresenta uma resposta hipercontrátil aos estímulos elétricos de campo, sendo essa resposta provavelmente devido à mudanças elétricas em neurônios AH e S, ocasionando aumento na liberação de ACh e SP pelos neurônios motores entéricos excitatórios (KUNZE E FURNESS, 1999; VOGALIS; FURNESS E KUNZE, 2001; FURNESS, 2012) que tornaram-se hiperexcitáveis por causa de mediadores inflamatórios, onde a resposta ao  $\Delta g$  e %KCl estão aumentados em voltagens específicas, solidificando a ideia de que a inflamação ocasiona uma alteração eletrofisiológica.

No entanto, até esse momento não poderíamos supor se a alteração é muscular ou neural, mas quando analisamos a resposta contrátil do íleo para o estímulo elétrico de campo na fase pós-inflamatória, vemos que a hipercontratilidade é persistente, demonstrando que a contração por KCl é devido ativação de canais de  $Ca^{+2}$ , assim, como sua alteração não se faz presente por indução existiria o remodelamento neural entérico (TANOVIĆ et al., 2000).

Nosso achado para a resposta contrátil do íleo coaduna com a literatura, quando Soares et al. (2008) demonstraram que na fase inflamatória e pós-inflamatória da mucosite o músculo liso duodenal tem uma resposta hipercontrátil ao carbacol, sendo esse padrão também demonstrado por Lima-Junior et al. (2012), quando no modelo de mucosite intestinal por CPT-11 em camundongos C57BL/6, apresentaram um aumento da responsividade do duodeno à ACh no 5º dia após indução da mucosite, em ambos estudos é demonstrado um aumento da resposta contrátil ligada ativação dos receptores muscarínicos e conseqüente influxo de  $Ca^{2+}$ , o que pode ser relacionado ao nosso estudo se considerarmos que o estímulo elétrico de

campo promove a contração muscular em consequência da ativação dos neurônios motores entéricos e posterior liberação de ACh e SP (WOOD, 1994; FURNESS, 2006; 2012).

Como característica da alteração de todo o SNE pela inflamação, em todos os seguimentos intestinais, mas no íleo principalmente, teve seu processo contrátil desregulado. No que se refere a resposta jejunal aos estímulos elétricos de campo durante a fase inflamatória da mucosite, observamos um aumento da contratilidade (LIMA, 2016). Esse achado pode ser atribuído remodelamento ao neural inflamatório que altera a excitabilidade de IPANs, ocasionando aumento da excitabilidade do potencial dos neurônios AH, potencial de membrana despolarizado, e aumento da resistência de entrada, resultados observados tanto em modelos de jejunitis por *T. spiralis* (PALMER et al., 1998), como em colite por TNBS (LINDEN et al., 2004).

Quanto ao íleo, nosso modelo é contundente em demonstrar que a mucosite causa uma hipercontratilidade ileal durante a inflamação, pela contração mediada, e não mediada por receptores. Achado corroborativo foi demonstrado em medições *in vivo* de motilidade em cães durante ileíte induzida por ácido acético, onde a inflamação aumentou a frequência das contrações migratórias gigantes e diminuiu a frequência do complexo mioelétrico migratório (JOUET et al., 1995; SARNA, 2003), assim como Moreels et al. (2001) demonstraram uma hiperatividade muscular do íleo devido estimulação elétrica de campo por meio de registros *in vitro* no modelo de íelite por ácido acético em ratos. No entanto, uma contraproposição ao nosso achado foi demonstrado na Ileíte aguda por TNBS em ratos. Na ocasião a inflamação resultou numa diminuição da atividade espontânea do músculo longitudinal do íleo (MOREELS et al., 2001), dessa forma observamos que a resposta do SNE a inflamação varia de acordo com o tipo (aguda ou crônica), local ou disseminada e intensidade do estímulo inflamatório no trato gastrointestinal (COLLINS, 1996).

Fato observável no íleo, pois no período pós-inflamatório, foi registrada uma resposta contrátil ao estímulo elétrico de campo exatamente o contrário da fase inflamatória, ou seja, uma hiporesponsividade. Esse resultado tem sido relatado pela literatura demonstrando que após a resolução da desordem inflamatória aguda ocorre uma condição clínica conhecida como íleo paralítico (EKBLAD et al., 1998). Alguns autores pontuam que uma semana após a inflamação a alteração funcional do íleo ocorre devido à diminuição da SP (MOREELS et al., 2001). Além disso, também tem sido demonstrado que no íleo inflamado ocorre uma notável neuroplasticidade entérica no sentido de aumento da expressão do VIP submucoso (SCHNEIDER et al., 2001) e mioentérico (BELAI et al., 1997), estando esse fato presente no íleo paralítico de pacientes com a doença de Crohn (EKBLAD et al., 1998), por

ser o principal neurotransmissor inibitório, pode-se especular que o aumento de VIP na fase pós-inflamatória seja o principal responsável pela condição de íleo parálítico.

Do ponto de vista eletrofisiológico, nossa hipótese para esses resultados é o remodelamento neural do intestino delgado. Para o duodeno pode ser atribuído um aumento na excitabilidade dos neurônios AH pela inflamação tornando-o mais excitável (PALMER et al., 1998; KUNZE E FURNESS, 1999), no jejuno a principal alteração plástica neural seria um aumento nos EPSPs rápidos de neurônios S, aumentando sua excitabilidade (PALMER et al., 1998; LOMAX; MAWE; SHARKEY, 2005; KRAUTER et al., 2007) e para o íleo uma modificação nos neurônios S alteraria significativamente as suas propriedades eletrofisiológicas, tornando-os semelhantes aos neurônios AH, exibindo proeminente AHPs (NURGALI et al., 2007).

Portanto, para testar nossa hipótese repetimos os protocolos da análise dos parâmetros inflamatórios, de parâmetros funcionais e de estimulação elétrica de campo em ambas as fases da mucosite estudadas, porém, pre-tratando os animais com piridostigmina e neostigmina, são inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Com isso, a inibição da acetilcolinesterase reduziu significativamente os efeitos lesivos ocasionados pela mucosite nos parâmetros inflamatórios e funcionais, embora a produção de citocinas pró-inflamatórias ainda fossem detectáveis em concentrações consideráveis (PAVLOV et al, 2006; TRACEY, 2007). A ativação da via anti-inflamatória colinérgica pela inibição da colinesterase pode, portanto, reduzir suficientemente as concentrações séricas de citocinas para níveis subletais, prevenindo o choque e a morte. Além disso, os níveis residuais dessas citocinas são provavelmente suficientes e necessários para a eliminação de infecções bacterianas (BOUCHON et al, 2001).

Como a estimulação colinérgica muscarínica periférica não está envolvida na ativação da via anti-inflamatória colinérgica (PAVLOV et al, 2006; TRACEY, 2007), o mecanismo é mais provavelmente mediado pela estimulação do nAChR periférico. Até o momento, os mecanismos precisos que controlam a via anti-inflamatória colinérgica não são conhecidos. Pode-se especular que a rede muscarínica central influencie a resposta antiinflamatória colinérgica vagal (PASCUZZO et al, 1984; SOMNIER E TROJABORG, 1993; HEITMILLER, 1999; OSADCHII et al, 2007).

Isso sugere que quando a infusão de piridostigmina e neostigmina é descontinuado, o alto nível de acetilcolina ou dessensibilização induzida por neostigmina de acetilcolina os receptores são suavizados, resultando em melhora da função. Dessensibilização induzida por agonista é uma característica bem documentada para

adrenoreceptores e opiáceos receptores (KEELER, 1990; BESSER et al, 1991).

Vale ressaltar que alta dose, acima de 5 mg/kg, de piridostigmina tratamento por 28 dias também é capaz de reduzir a número de receptores de acetilcolina em macacos, mimetizando estado de miastenia gravis, embora através de um diferente mecanismo, nomeadamente estimulação agonista. Na miastenia gravis, o down-regulation é devido a anticorpos contra receptores de acetilcolina (HEITMILLER, 1999; OSADCHII et al, 2007).

Além dessa via aferente anti-inflamatória vagal, uma segunda, descrita em 2000 pelo grupo de Tracey, envolve vias eferentes vagais (BOROVIKOVA et al, 2000). Este grupo mostrou que a estimulação da extremidade distal do nervo vago, isto é, vias eferentes vagais, impediu um choque séptico de LPS em ratos. A estimulação do nervo vago teve um efeito anti-TNF $\alpha$  desde que os níveis de fator de necrose de tumor no fígado e sangue (TNF $\alpha$ ) foram atenuados. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18 em macrófagos humanos estimulados por LPS, foi diminuída pela liberação de ACh pelo nervo vago (PAVLOV et al, 2003).

Este grupo também identificou os receptores  $\alpha 7$  nicotínicos de ACh ( $\alpha 7$ nAChR) dos macrófagos envolvidos nesse efeito (WANG et al, 2003). de Jonge et al. (2005) caracterizaram o mecanismo celular dessa via que envolvia a ativação de macrófagos Jak2-STAT3 mediada por subunidades  $\alpha 7$  e Sun et al. (2013) mostraram que o microRNA-124 é responsável pela ação da PAC pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. O VN não está diretamente ligado aos macrófagos residentes no intestino, mas interage com os neurônios entéricos que expressam nNOS, VIP e ChAT e localizados dentro da muscular ao lado desses macrófagos que expressam o  $\alpha 7$ nAChR (MIKKELSEN et al, 1985; CAILOTTO et al 2014).

Em estudos de ileite pós cirúrgica em qualquer que seja a localização da cirurgia é definido por um esvaziamento gástrico retardado e um trânsito intestinal prolongado (LIVINGSTON E PASSARO, 1990). As funções do estômago e do intestino delgado normalizam dentro de 24 a 48 horas, enquanto o cólon geralmente leva mais tempo (até 72 horas). A recuperação da motilidade gastrointestinal pode levar mais tempo para a hospitalização e, portanto, maiores custos com a saúde.

As vias eferentes inibitórias não-colinérgicas e não-adrenérgicas vagal desempenham um papel nos mecanismos de inflamações intestinais, enquanto os neurônios sensíveis à capsaicina estão implicados na via aferente do reflexo (HOLZER, LIPPE, HOLZER-PETSCHKE, 1986). Núcleos cerebrais supra-espinhais também foram implicados em diversos tipos de inflamações intestinais, em particular neurônios hipotalâmicos e medulares

específicos envolvidos na regulação autonômica da função gastrointestinal (BONAZ, PLOURDE, TACHE, 1994). Outro fator, o estresse já é bem conhecido por inibir o esvaziamento gastrointestinal (TACHE; BONAZ, 2007). Mais recentemente, uma via periférica, envolvendo a via colinérgica anti-inflamatória, foi descrita no mecanismo de inflamações intestinais. De fato, a cirurgia abdominal induz a inflamação da muscular (DE JONGE, et al 2003) e a ativação de macrófagos residentes que liberam TNF $\alpha$ . Depleção e inativação da rede de macrófagos musculares previne o ou até rever efeitos inflamatórios intestinais. A administração sistêmica de agonistas seletivos para receptores nicotínicos, bem como a Estimulação Nervo Vago (ENV), reduz a resposta inflamatória à manipulação do intestino durante processos cirúrgicos (THE FO, et al, 2007).

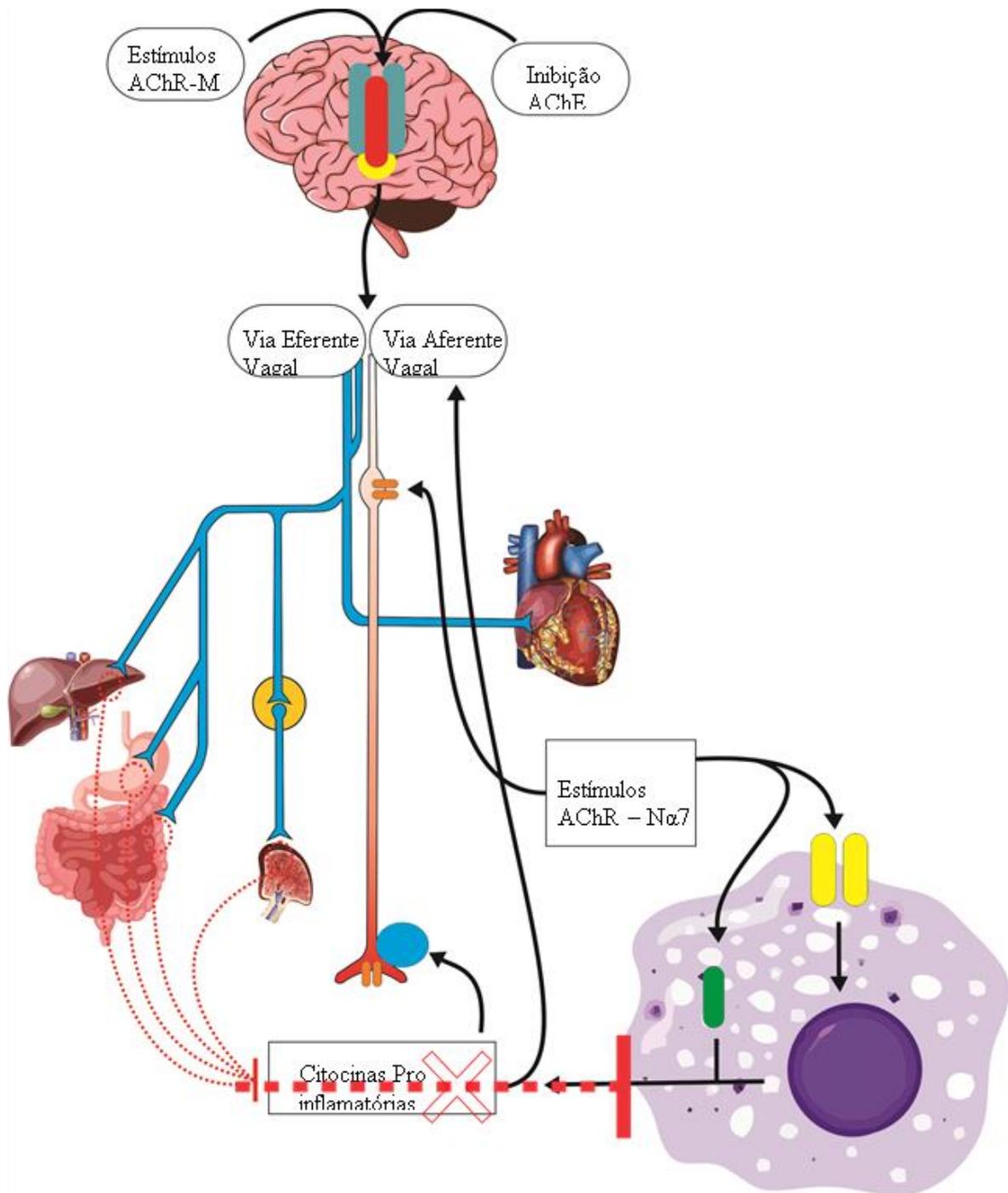
Este efeito anti-inflamatório, mediado por uma redução na ativação de macrófagos e produção de citocinas, é impulsionado pela via colinérgica anti-inflamatória colinérgica (MUNYAKA, et al 2014). Direcionar a via colinérgica anti-inflamatória colinérgica poderia, assim, melhorar a inflamação por sua ação anti-inflamatória e a ENV poderia, portanto, ser um tratamento potencial para prevenir. Em um modelo de manipulação intestinal em rato, de Jonge et al. (2005) mostraram que 5 min de ENV cervical antes de realizar laparotomia melhoraram o trânsito gastrointestinal através da ativação de Jak2-STAT3 mediada por subunidades alfa7 do recepto nicotínico em macrófagos intestinais, indicando que a ENV pode representar uma nova abordagem terapêutica. Stakenborg et al. (2017) recentemente exploraram o potencial terapêutico da ENV em pacientes submetidos à cirurgia abdominal para câncer colo-retal, randomizados para estimulação simulada (n = 5), estimulação de 5 Hz (n = 6) ou estimulação de 20 Hz (n = 7) grupo. Eles realizaram 1 ms e 2,5 mA durante 2 min de VNS no início e no final da cirurgia. Eles mostraram que a ENV abdominal reduziu significativamente a produção de IL8 e IL6 induzida por LPS pelo sangue total em pacientes. No mesmo estudo, eles mostraram que a ENV abdominal era tão potente quanto a ENV cervical em um modelo murino de POI. Assim, os neurônios S e AH sofrem uma mudança da composição/modulação iônica devido o processo inflamatório, sendo o segundo mais afetado.

Os neurônios AH são neurônios IPANs, representando uma fração significativa de  $1 \times 10^8$  dos neurônios entéricos (WOOD et al., 1989; 1994), onde em uma unidade de 10 mm do intestino de cobaia existem na ordem de 6.500 IPANs, para 4.000 neurônios motores inibitórios, e 3.000 neurônios de motores excitatórios, sendo os neurônios mais numerosos do SNE e os responsáveis imediatos pelo reflexo nervoso do intestino, seja por estímulos mecânicos ou químicos, estando seus axônios diretamente ligados aos vilos (KUNZE E FURNESS, 1999; FURNESS, 2012). Os neurônios AH possuem apenas um tipo de canal de

Na<sup>+</sup>, sendo caracterizado com um canal voltagem-dependente rápido sensível ao TTX. Assim, a corrente de sódio (INa) é um fator importante na determinação da excitabilidade e comportamento dos neurônios AH (ZHOLOS; BAIDAN; WOOD, 2002).

Como as respostas neurais entéricas são iniciadas principalmente pelos IPANs através de sua conexão com os interneurônios ascendentes e descendentes e desses com os neurônios motores inibitórios e excitatórios, portanto, os neurônios AH são cruciais para o funcionamento adequado do SNE. Nesse aspecto, como o nível de excitabilidade dos IPANs é determinado em resposta aos neurotransmissores/moduladores e sinais parácrinos a partir de células não-neuronais (por exemplo, a serotonina a partir de células enterocromafins) sendo especialmente sensíveis a mediadores das células imunitárias/inflamatórias (ZHOLOS; BAIDAN; WOOD, 2002).

Concluimos, estando manifestada a dismotilidade na fase pós-inflamatória da mucosite, podemos provocar uma estimulação da via colinérgica, afim de ativar os receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , presentes em macrófagos residentes, e assim bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrado no desenho esquemático deste trabalho, onde nossos resultados sugerem que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica pode ser um caminho interessante de investigação mais profunda no curso da mucosite intestinal na clínica.



**FIGURA 30.** Esquema hipotético do estudo; representando a estimulação colinérgica a nível de sistema nervoso central e liberação de maiores quantidades de acetilcolina na fenda sináptica, interação da acetilcolina no  $\alpha 7$ nAChR, bloqueando a produção das citocinas pró-inflamatórias, reduzindo assim a mucosite.

No entanto, mais estudos e experimentos são necessários para melhor esclarecimento da dismotilidade intestinal em processos inflamatórios e da estimulação colinérgica. Por último, reconhecemos a necessidade de de investigar mais a fundo o perfil dos macrófagos envolvidos e dos receptores nicóticos tão essenciais para ativação eficaz da via colinérgica anti-inflamatória.

## 7. CONCLUSÃO

- Administração, em camundongos, com 5-fluorouracil (5-FU) induziram uma mucosite intestinal importante acompanhada de um aumento significativo dos parâmetros histopatológicos, morfométricos e por atividade da mieloperoxidase no segmento intestinal estudado (íleo).
- 5-FU promove dismotilidade gastrointestinal. Observado aumento da contratilidade por eletroestimulação em duas curvas, voltagem e frequência, nos animais sacrificados no 3º dia.
- O presente estudo confirmou que a AChE está com sua atividade diminuída o que é mantido mesmo na fase pós inflamatório no segmento intestinal estudado (íleo) de camundongos tratados com 5-FU. Esses dados serão importantes para entender como a musculatura do intestino responsável pela contratilidade intestinal responde após tratamentos com drogas antineoplásicas e qual o papel do sistema nervoso entérico neste evento.
- Foi observado que há uma hipercontração ileal quando estimulado farmacologicamente com acetilcolina e carbacol 3 dias após a administração do 5-FU, mas não visto diferença significativa com 15 dias. Observado também aumento na imunomarcção para o receptor M3 nos animais sacrificados 3 dias após indução da mucosite, bem como nos sacrificados com 15 dias.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1335p, 2012.
- AKIHO, H. DENG, Y. BLENNERHASSETT, P. KANBAYASHI, H. COLLINS, SM. Mechanisms underlying the maintenance of muscle hyper contractility in a model of post infective gut dysfunction. **Gastroenterology**; 129: 131 – 141; 2005.
- AKIHO, H.; BLENNERHASSETT, P.; DENG, Y.; COLLINS, S. M. Role of IL-4, Il-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. G226-G232, 2002.
- ALTMANN, G. G. Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. **Am. J. Anat.**, v. 140, n. 2, p. 263-280, 1974.
- APRILE G, RIHAWI K, DE CARLO E, SONIS ST. Treatment-related gastrointestinal toxicities and advanced colorectal or pancreatic cancer: a critical update. **World J Gastroenterol**. 21(41): 11793-11803. 2015.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Arch Biochem Biophys**, Ireland, v. 500, n.1, p. 92-106, 2010.
- AUBÉ, A. C.; BLOTTIERE, H. M.; SCARPINGNATO, C.; CHERBUT, C.; ROZÉ, C.; GALMICHE, J. P. Inhibition of acetylcholine induce intestinal motility by interleukin 1  $\beta$  in the rat. **Gut.**, v.39, p.470-474, 1996.
- BALEMBA, O. B., MORTENSEN, K., SEMUGURUKA, W. D., HAYSCHMIDT, A., JOHANSEN, M.V., DANTZER, V. Vasoactive intestinal peptide and substance P-like immunoreactivities in the enteric nervous system of the pig correlate with the severity of pathological changes induced by schistosoma japonicum. *Int J Parasitol*, 31: 1503-1514, 2001.
- BALEMBA, O. B., MORTENSEN, K., SEMUGURUKA, W. D., HAYSCHMIDT, A., JOHANSEN, M.V., DANTZER, V. Neuronal nitric oxide synthase activity is increased during granulomatous inflammation in the colon and caecum of pigs infected with schistosoma japonicum. **Auton Neurosci**, 99: 1-12, 2002.
- BARBARA, G.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. M. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. **Gastroenterology.**, v. 113, p. 1224-1232, 1997.
- BELAI, A.; BOULOS, P. B.; ROBSON, T.; BURNSTOCK, G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. **Gut**. 40: 767– 774. 1997.
- BERGIN, A. J.; DONNELLY, T. C.; MCKENDRICK, M. W.; READ, N. W. Changes in anorectal function in persistent bowel disturbance following salmonella gastroenteritis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 5:617–20. 1993.
- BISHOP, J. F.; JOSHUA, D. E.; LOWENTHAL, R. M.; KRONENBERG, H.; WHITESIDE, M. G.; COBCROFT, R.; DODDS, A.; WOLF, M.; MANOHARAN, A. A phase I-II study of

cytosine arabinoside, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust. N. Z. J. Med.**, v. 16 (1), p. 48-51, 1986.

BLANDIZZI, C., FORNAI, M., COLUCCI, R., BASCHIERA, F., BARBARA, G., DE GIORGIO, R., DE PONTI, F., BRESCHI, M.C., DEL TACCA, M. Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by alpha2-adrenoceptors in the presence of experimental colitis. **Br. J. Pharmacol.** 139, 309– 320. 2003.

BONAZ B, PLOURDE V, TACHE Y. Abdominal surgery induces Fos immunoreactivity in the rat brain. **J Comp Neurol.** 349 (2):212–22. doi:10.1002/cne.903490205, 1994.

BOROVIKOVA LV, IVANOVA S, ZHANG M, YANG H, BOTCHKINA GI, WATKINS LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature.** 405(6785):458–62. doi:10.1038/35013070, 2000.

BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M.K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer**, v.14, p.713-731, 2006.

BOYER, L., GHOREISHI, M., TEMPLEMAN, V., VALLANCE, B.A., BUCHAN, A.M., JEVON, G., JACOBSON, K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Auton. Neurosci.** 117, 41–53. 2005.

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

BRITO, L. F.; SILVA, L. S.; FERNANDES, D. D.; PIRES, R. A.; NOGUEIRA, A. D. R.; BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A., JORDAENS, F. H., VAN MAERCKE, Y. M. & HERMAN, A. G. Nitric oxide as an inhibitory non adrenergic non cholinergic neurotransmitter. **Nature**, 200: 581-582, 1990.

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

CAILOTTO C, GOMEZ-PINILLA PJ, COSTES LM, VAN DER VLIET J, DI GIOVANGIULIO M, NEMETHOVA A, et al. Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen. **PLoS One** 9 (1):e87785. doi:10.1371/journal.pone.0087785. 2014.

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

CHEN, V. L.; SURANA, N. K.; DUAN, J.; KASPER, D. L. Role of murine intestinal interleukin-1 receptor 1-expressing lymphoid tissue inducer-like cells in salmonella infection. **PLoS One.** v. 8, n. 6, DOI 10.1371/journal.pone. 0065405, 2013.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for

motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology.**, v. 111, p. 1683-1699, 1996.

CUNHA K. S.; LEHMANN M. Drogas anticancer e seus efeitos genotóxicos. **Genética toxicológica**, p. 424, 2003.

DANTAS, R. F. Atividade de glutatona peroxidase e relação de glutatona reduzida/glutaciona oxidada como biomarcadores de estresse oxidante em mudilídeos. Dissertação (**Mestrado Acadêmico em Ciências**) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

DATASUS. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>, acessado em 08/jun/2018.

De GIORGIO, R.; BARBARA, G.; BLENNERHASSETT, P.; WANG, L.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; COLLINS, S. M.; TOUGAS, G. Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. **Gut**. 49: 822–827. 2001.

DE JONGE WJ, VAN DEN WIJNGAARD RM, THE FO, TER BEEK ML, BENNINK RJ, TYTGAT GN, et al. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. **Gastroenterology** 125(4):1137–47. doi:10.1016/S0016-5085(03)01197-1 2003.

DE JONGE WJ, VAN DER ZANDEN EP, THE FO, BIJLSMA MF, VAN WESTERLOO DJ, BENNINK RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nat Immunol** 6(8):844–51. doi:10.1038/ni0905-954b, 2005.

De MAN, J. G.; SEERDEN, T. C.; De WINTER, B. Y.; MARCK, E. A. V.; HERMAN, A. G.; PELCKMANS, P. A. Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. **British Journal of Pharmacology**.139, 172–184. 2003.

De WINTER, B. Y.; De MAN, J. G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. **World J Gastroenterol**. 16(44): 5523-5535. 2010.

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

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

EKBLAD, E., BAUER, A.J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. **Neurogastroenterol. Motil.** 16 (Suppl. 1), 123– 128. 2004.

FARMER S. G, LANIYONU A. A. Effects of *p*-chlorophenylalanine on the sensitivity of rat intestine to agonists and on intestinal 5-hydroxytryptamine levels during *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Br J Pharmacol**. 82:883–889; 1984.

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.** The Granulocyte Research Laboratory, Department of Haematology, Rigshospitalet 4042, University of Copenhagen, 9 Blegdamsvej, DK-2100 Copenhagen OE, Denmark. 2003.

FERRARIS, R. P.; VINNAKOTA, R. R. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. **J. Nutr.**, v.125, n.8, p.2172-2182, 1995.

FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R. G.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. **Lipids**, v.47, p.669–678, 2012.

FOONG, J. P. P., NGUYEN, T. V., FURNESS, J. B., BORNSTEIN, J. C., & YOUNG, H. M. Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. **J Physiol** 590.10 pp 2375–2390, 2012.

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

FURNESS, J. & COSTA, M. Enteric Nervous System. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York, 290p, 1987.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.** v 9, p.286-294. 2012.

FURNESS, J. B. The Enteric Nervous System. **Blackwell Publishing**, 2006.

FURNESS, J. B; BORNSTEIN J. C. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T, ed. **Textbook of gastroenterology.** 2nd ed. Vol. 1. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2-24, 1995.

FURNESS, J. B; ROBBINS, H. L; XIAO, J. H; STEBBING, M. J & NURGALI K. Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. **Cell Tissue Res.** 317, 1–12. 2004.

GALLIGAN, J.J., LEPARD, K. J., SCHNEIDER, D. A., ZHOU, X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, 81: 97-103, 2000.

GANONG F.W.: Review of Medical Physiology; McGraw –Hill Companies, USA; 21 ed. 2003.

GASPARINI, BRENDA; VALADÃO, MARCUS; MIRANDA-FILHO, ADALBERTO; DA SILVA, COSME MARCELO FURTADO PASSOS. Analysis of the age-period-cohort effect on mortality from colorectal cancer in Rio de Janeiro State, Brazil, from 1980 to 2014. **Cad. Saúde Pública**; 34(3): e00038017; 2018.

GENOVESE, T. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute

pancreatitis in mice. **Shock**, Ireland, v. 25, n. 2, p. 161-167, 2006.

GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER A. L.; WADE P. R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In Johnson LR, editor: ed 5, **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, vol 1, Elsevier. San Diego, 2012.

GHIA, J E.; BLENNERHASSETT, P.; KUMAR-ONDIVEERAN, H. et al. The nerve vagus: A tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**. 131, p. 1122-1130, 2009.

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

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Supportive Care inCancer.**, v.14, p.890-900, 2006.

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

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M.; LALLA, R. V.; BATEMAN, E.; BLIJLEVENS, N.; FIJLSTRA, M. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer** 21: 313–326. 2013.

GIMENEZ, D.L. **Quimioterapia**. In: IKEMORI, E.H.A; OLIVEIRA, T; SERRALHEIRO, I.F.D.; SHIBUYA, E. COTRIM, T.H.; TRINTIN, L.A. *et al*. Nutrição em oncologia. 1ª ed. São Paulo: Lemar; p.179-88. 2003.

GOLDHILL J. M., STOJADINOVIC, A., KIANG J, SMALLRIDGE, R., SHEA-DONOHUE T. Hyperthermia prevents functional, histological and biochemical abnormalities induced during ileitis. **Neurogastroenterol Motil.** 11:69–76; 1999.

GOU, H.; GU, L.Y.; SHANG, B. Z.; XIONG, Y.; WANG, C. Protective effect of Bu-Zhong-Yi-Qi decoction, the water extract of Chinese traditional herbal medicine, on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Hum Exp Toxicol.** 2016.

GOYAL, R. K. & RATTAN, S. VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurones. **Nature**, 288: 378-380, 1980.

GREM, J. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. **Investigational New Drugs**, v.18, p.299–313, 2000.

GROSS, S.; VAN WANROOIJ, R. L; NIJEBOER, P. *et al*. Differential IL-13 Production by Small Intestinal Leukocytes in Active Coeliac Disease versus Refractory Coeliac Disease, **Med Inflamm**, v. 8, 2013.

GROSSI, L.; MCHUGH, K.; COLLINS, S. M. On the specificity of altered muscle function

in experimental colitis in rats. **Gastroenterology**.104(4):1049-56. 1993.

HABA, T.; SARNA, S. K. Regulation of gastroduodenal emptying of solids by gastropyloroduodenal contractions. **Am J Physiol**. 264(2 Pt 1): G261-71. 1993.

HARRIS, S. M.; MISTRY, P.; FREATHY, C.; BROWN, J. L.; CHARLTON, P. A. Antitumour activity of XR5944 in vitro and in vivo in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. **British Journal of Cancer**.,v. 92, p. 722-728, 2005.

HEANUE, T. A.; PACHINS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nat Rev Neurosci**., V.8, P. 466-479, 2007.

HELLER, F.; FUSS, I. J.; NIEWENHUIS, E. E.; BLUMBERG, R. S.; STROBER, W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 629-638, 2002.

HIRST, G.D.S., HOLMAN, M.E., SPENCE, I. Two types of neurons in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. **J. Physiol**. 236, 303– 326. 1974.

HOLM, A.N., RICH, A., MILLER, S.M., STREGE, P., OU, Y., GIBBONS, S. Sodium current in human jejunal circular smooth muscle cells. **Gastroenterology**. 122: 178–187. 2002.

HOLZER P, LIPPE IT, HOLZER-PETSCH U. Inhibition of gastrointestinal transit due to surgical trauma or peritoneal irritation is reduced in capsaicin- treated rats. **Gastroenterology** 91(2):360–3. doi:10.1016/0016- 5085(86)90569-X, 1986.

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

HOWARTH, G. S.; FRANCIS G. L.; COOL, J. C.; XU, X.; BYARD, R. W.; READ L. C. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. **Journal of Nutrition**. v. 126, p. 2519–2530, 1996.

HUIZINGA, J. D., THUNEBERG, L., KLUPPEL, M., MALYSZ, J., MIKKELSEN, H. B., BERNSTEIN, A. *W/kit* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. **Nature**; 373:347-9, 1995.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) Ministério da Saúde. Coordenação Geral de ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância.

**Estimativa 2017-2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Inca, 2018.

Disponível em < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2017/estimativa-2018.asp> > Acesso em: 12 julho de 2018.

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

JHONSON, L. R. **Gastrointestinal Physiology**. The Mosby Physiology Monograph Series, 8<sup>th</sup> ed., 2014.

- JOUËT, P.; SARNA, S. K.; SINGARAM, C.; RYAN, R. P.; HILLARD, C. J.; TELFORD, G. L.; FINK, J.; HENDERSON, J. D. Immunocytes and abnormal gastrointestinal motor activity during ileitis in dogs. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 269: G913–24. 1995.
- JUSTINO, P. F. C.; MELO, L. F. M.; NOGUEIRA, A. F.; COSTA, J. V. G.; SILVA, L. M. N. SANTOS, C. M.; MENDES, W. O.; COSTA, M. R.; FRANCO, A. X.; LIMA, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; SOARES, P. M. G. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, 111, pp 1611-1621. 2014.
- JUSTINO, P. F. C.; MELO, L. F. M.; NOGUEIRA, A. F.; MORAIS, C. M. MENDES, W. O.; FRANCO, A. X.; SOUZA, E. P.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L.; SOARES, P. P. M. G. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**. 75:559–567. 2015.
- KALFF, J. C.; SCHRAUNT, W. H.; BILLIAR, T. R.; SIMMONS, R. L.; BAUER, A. J. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. **Gastroenterology**, v.118, p. 316–327, 2000.
- KATZUNG, B. G., MASTERS, S. B., TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12<sup>a</sup> ed. Lange. Artmed. Porto Alegre, s VIII, p 789 -1000. 2014.
- KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinions in Oncology**, v.19, p.323-327. 2007.
- KEEFE, D. M. K.; GIBSON, R. J; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, v.20, n.1, p.38-47, 2004.
- KEEFE, D. M.; CUMMINS, A. G.; DALE, B. M.; KOTASEK, D.; ROBB, T. A.; SAGE, R. E. Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 92, n. 4, p. 385-389, 1997.
- KIM, Y. A.; CHUNG, H. C.; CHOI, H. J.; RHA, S. Y.; SEONG, J. S.; JEUNG, H. C. Intermediate dose 5-fluorouracil-induced encephalopathy. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 36, n. 1, p. 55–59, 2006.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, Ireland, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.
- KLESNEY-TAIT, J.; KECK, K.; LI, X.; GILFILLAN, S.; OTERO, K.; BARUAH, S.; MEYERHOLZ, D. K.; VARGA, S. M.; KNUDSON, C. J.; MONINGER, T. O.; MORELAND, J.; ZABNER, J.; COLONNA M. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. **Journal of Clinical Investigation**. v. 123, n. 1, p. 138–149, 2013.
- KOENIG, H.; PATEL, A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. *Archive of neurology*, v. 23, p. 155-160; 1970.
- KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. Berne & Levy: **Fisiologia**, 6<sup>a</sup> ed., Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 491p. 2009.

KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; BURNAT, G. KWIECIEN, S.; PAWLIK, T.; HAHN, E. G., KONTUREK, S. J. Role of brain-gut axis in healing of gastric ulcers. **J Physiol Pharmacol.** 55(1 Pt 2):179-92. 2004.

KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; BURNAT, G.; SZLACHCIC, A., KOZIEL, J. KWIECIEN S, KONTUREK, S. J.; HARSCH, I. A. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. **J Physiol Pharmacol.** 61(4):429-36. 2010.

KRAUTER, E. M.; LINDEN, D. R.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. Synaptic plasticity in myenteric neurons of the guinea-pig distal colon: presynaptic mechanisms of inflammation-induced synaptic facilitation. **J Physiol.** 581: 787–800, 2007.

KRISHNA, S. G.; ZHAO W.; GRAZZIUTTI, M. L.; SANATHKUMAR, N.; BARLOGIE, B.; ANAISSIE, E. J. Incidence and risk factors for lower alimentary tract mucositis after 1529 courses of chemotherapy in a homogenous population of oncology patients: clinical and research implications. **Cancer.** 117: 648–655. 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins E Cotran. Patologia, bases patológicas das doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUNZE W. A.; FURNESS, J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu Rev Physiol.** 61:117-42. 1999.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. *et al.* Gastroprotection by pentoxifylline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. **J Physiol Pharmacol.** 55(2):337-55. 2004.

KWOK, K. K.; CURTIS, L. R.; SCHUBERT, M. M. Fármacos antineoplásicas. Em: YAGIELA, J. A., DOWD, F., JHONSON, B. S., MARIOTTI, A. J., NEIDLE, E. A. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas.** 6ª Ed, cap. 42, p. 674-702, Editora Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

LA ROVERE, M.T.; BIGGER, J.T. JR.; MARCUS, F.I. et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **Lancet.** 351:478-84, 1998.

LA ROVERE, M.T.; PINNA, G.D.; HOHNLOSER, S.H. et al. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. **Circulation.** 103, 2072– 2077, 2001.

LANSIAUX, A. Antimetabolites. **Bulletin du Cancer,** v. 98, n. 11, p. 1263-1274, 2011.

Le DOUARIN N. M., DUPIN E., ZILLER C. Genetic and epigenetic control in neural crest development. **Curr Opin Genet Dev;**4:685-95. 1994.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells,** v. 20, n. 3, p. 315-24, 2005.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.;

SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-Fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.59, p.603–612, 2007.

LEOCÁDIO, P. C. L.; ANTUNES, M. M.; TEIXEIRA, L. G. LEONEL, A. J.; LEITE, J. I. A.; MACHADO, D. C. C.; GENEROSO, S. V. CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. **Nutrition and Cancer**. 2015.

LIMA, F. R. F. *Bacillus clausii* atenua a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos. 2018. 104 f. Tese (**Doutorado em Farmacologia**) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIMA, M. A. S. Dismotilidade intestinal no curso da mucosite induzida por 5-fluorouracil: possível papel dos canais de sódio voltagem-dependentes sensíveis a tetrodotoxina. 117p. Dissertação (**Mestrado em ciências fisiológicas**), Instituto de Medicina, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

LIMA, V. Evidências da participação de TNF- $\alpha$  e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais. 2004, 212p. Tese (**Doutorado em Farmacologia**), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIMA-JÚNIOR, R.C.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H.C.; MELO, M. L.; WONG, D. V.; LEITE, C. A.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol**. 69(4):931-42. 2012.

LINDEN, D. R., SHARKEY, K. A., MAWE, G. M. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. **J. Physiol**. 547, 589– 601. 2003.

LINDEN, D.R., COUVRETTE, J.M., CIOLINO, A., MCQUOID, C., BLASZYK, H., SHARKEY, K.A., MAWE, G.M. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. **Neurogastroenterol. Motil**. 17, 751–760; 2005.

LINDEN, D.R.; SHARKEY, K. A.; HO, W.; MAWE, G. M. Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon. **J. Physiol**. 557, 191– 205; 2004.

LIVINGSTON EH, PASSARO EP JR. Postoperative ileus. **Dig Dis Sci** 35 (1):121–32. doi:10.1007/BF01537233; 1990.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemother Pharmacol**, v.63, p.239–251; 2009.

LOMAX A, MAWE G, SHARKEY K. Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. **J Physiol** 564: 863–875; 2005.

LOMAX, A. E., FERNANDEZ, E. & SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterol Motil** 17, 4–15; 2005.

LOMAX, A. E.; LINDEN, D. R.; MAWE, G. M.; SHARKEY, G. M. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** 126–127:250 – 257; 2006.

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

LOPES, A. et al. **Oncologia cirúrgica**. In: KOWASLKI, L.P.; ANELLI, A.; SALVAJOLI, J.V.; LOPES, L.F. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2ª ed. São Paulo: Âmbito Editores Ltda; p.81-91. 2002.

LOPES, L. G. Efeito do uso tópico de capsaicina na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos Swiss. Dissertação (**Mestrado em Bioquímica e Imunologia**). Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. 150p. 2014.

LOWICKA, E., BELTOWSKI, J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacology Reporter**, 59: 4-24, 2007.

LUNDGREN, O; SVANVIK J; JIVEGARD L. Enteric nervous system. I. Physiology and pathophysiology of the intestinal tract. **Dig Dis Sci.** 34:264-83; 1989.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids.** 2012.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. **Experimental production of diffuse colitis in rats.** *Digestion*; 17:135-50; 1978.

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

MAEDA, H. YAMAGATA, A., NISHIKAWA, S., YOSHINAGA, K., KOBAYASHI, S., NISHI, K., NISHIKAWA, S. I. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. **Development**; 116:369-75; 1992.

MAEDA, T.; MIYAZONO, Y.; ITO, K.; HAMADA, K.; SEKINE, S.; HORIE, T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.65, p.1117–1123; 2010.

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

MAWE, G. M.; COLLINS, S. M.; SHEA-DONOHUE, T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. **Neurogastroenterol Motility.** 16-1:133-

6; 2004.

McCARTHY, G.M.; AWDE, J.D.; GHANDI, H.; VINCENT, M.; KOCHA, W.I. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. *Oral Oncol*, v.34, n.6, p.484-90, 1998.

MCLEAN, L.P., SMITH, A., CHEUNG, L., URBAN, J.F., SUN, R., GRINCHUK, V., DESAI, N., ZHAO, A., RAUFMAN, J.-P., AND SHEA-DONOHUE, T. Type 3 Muscarinic Receptors Contribute to Intestinal Mucosal Homeostasis and Clearance of *Nippostrongylus brasiliensis* through Induction of Th2 Cytokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 311, G130–G141. 2016.

MELO, M.; BRITO, G.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: eVect of pentoxifylline and thalidomide. *Cancer. Chemoth. Pharm.*, doi:10.1007/s00280-007-0534-4; 2007.

MIKKELSEN HB, THUNEBERG L, RUMESSEN JJ, THORBALL N. Macrophage-like cells in the muscularis externa of mouse small intestine. *Anat Rec* 213(1):77–86. doi:10.1002/ar.1092130111; 1985.

MILANO, G., ETIENNE, M.C. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). *Anticancer Research*, v. 14, p. 2295– 2298; 1994. MILLER MS, GALLIGAN JJ, BURKS TF. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. *J Pharmacol Methods*. v.6, p.211-7; 1981.

MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*, v.39, p.1119-1127; 2004.

MO, B.; PATER, A. Apoptosis, 5-fluorouracil sensitivity and expression of apoptotic proteins in a human ectocervical cell carcinogenesis model using different media. *European Journal of Pharmacology*. v. 467, p. 15-22; 2003.

MOREELS T G; DE MAN J G; DE WINTER B. Y; HERMAN A.G; PELCKMANS P. A. How to express pharmacological contractions of the inflamed rat intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 364 :524–533; 2001.

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

MOREELS, T. G.; De MAN, J. G.; De WINTER, B. Y.; TIMMERMANS, J. P.; HERMAN, A. G.; PELCKMANS, P. A. Effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced ileitis on the motor function of non-inflamed rat gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.*13(4):339-52; 2001.

MOREELS, T. G.; De MAN, J. G.; DICK, J. M.; NIEUWENDIJK, R. J.; De WINTER, B. Y.; LEFEBVRE, R. A.; HERMAN, A. G.; PELCKMANS, P. A. Effect of TNBS induced

morphological changes on pharmacological contractility of the rat ileum. **Eur J Pharmacol.** 423:211–22; 2001.

MOURELLE, M.; VILASECA, J.; GUARNER, F.; SALAS, A.; MALAGELADA, J. R. Toxic dilatation of colon in a rat model of colitis is linked to an inducible form of nitric oxide synthase **Am J of Physiology.** V 270, n 3. G425-G430; 1996.

MUNYAKA P, RABBI MF, PAVLOV VA, TRACEY KJ, KHAFIPOUR E, GHIA JE. Central muscarinic cholinergic activation alters interaction between splenic dendritic cell and CD4+CD25- T cells in experimental colitis. **PLoS One** 9(10):e109272. doi:10.1371/journal.pone.0109272; 2014.

MURAKI, K., IMAIZUMI, Y. AND WATANABE, M. Sodium currents in smooth muscle cells freshly isolated from stomACh fundus of the rat and ureter of the guinea-pig. **J Physiol.** 442: 351–375; 1991.

NASH, D.T; NASH, S. D. Ranolazine for chronic stable angina. **Lancet** 372:1335–1341, 2008.

NASH, S.; STAFFORD, J.; MADARA, J. L. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 80, p. 1104–1113; 1987.

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

NESHATIAN, L.; STREGE, P. R.; RHEE, P.L.; KRAICHELY, R. E.; MAZZONE, A.; BERNARD, C. E.; CIMA, R. R.; LARSON, D. W.; DOZOIS, E. J.; KLINE, C. F.; MOHLER, P J.; BEYDER, A.; FARRUGIA, G. Ranolazine inhibits voltage-gated mechanosensitive sodium channels in human colon circular smooth muscle cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 309: G506–G512; 2015.

NEUNLIST, M., AUBERT, P., TOQUET, C., ORESHKOVA, T., BAROUK, J., LEHUR, P.A., SCHEMANN, M., GALMICHE, J.P. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut.** 52, 84–90; 2003.

NISHI, S., NORTH, R.A. Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **J. Physiol.** 231; 1973.

NOORDHUIS P.; HOLWERA 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 Thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 15, p. 1025-1032; 2004.

NORTH, R.A.. The calcium-dependent slow after-hyperpolarization in myenteric plexus neurones with tetrodotoxin-resistant action potentials. **Br. J. Pharmacol.** 49, 709– 711; 1973.

NURGALI, K., NGUYEN, T. V., THACKER, M. PONTELL, L. & FURNESS, J. B. Slow

synaptic transmission in myenteric AH neurons from the inflamed guinea pig ileum. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 297: G582–G593; 2009.

NURGALI, K.; NGUYEN, T. V.; MATSUYAMA, H.; THACKER, M.; ROBBINS, H. L.; FURNESS, J. B. Phenotypic changes of morphologically identified myenteric neurons following intestinal inflammation. **J Physiol** 583: 593–609; 2007.

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

OU, Y., GIBBONS, S.J., MILLER, S.M., STREGE, P.R., RICH, A., DISTAD, M.A. SCN5A is expressed in human jejunal circular smooth muscle cells. **Neurogastroenterol Motil** 14: 477–486; 2002.

PALMER, J. M.; WEISBRODT, N. W.; CASTRO, G. A. *Trichinella spiralis*: intestinal myoelectric activity during enteric infection in the rat. **Experimental Parasitology**. 57:132–41; 1984.

PALMER, J. M.; WONG-RILEY, M.; SHARKEY, K. A. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. **Am. J. Physiol.** 275, G922– G935; 1998.

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

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

PAVLOV VA, WANG H, CZURA CJ, FRIEDMAN SG, TRACEY KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**. 9(5–8):125–34; 2003.

PAVLOV, V A & TRACEY, K J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**. 19, p.493-499, 2005.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R.-J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**., v. 22, p.vi78–vi84, 2011.

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

PINEDO, H. M.; PETERS, G. F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **Journal of Clinical Oncology**., v.6, p.1653-1664, 1988.

PIRZADA, N. A.; ALI, I. I.; DAFER, R. M. Fluorouracil-induced neurotoxicity. **Annals of**

Pharmacotherapy.,v. 34, p. 35-38, 2000.

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

PORTBURY A. L, FURNESS J. B, YOUNG H. M, SOUTHWELL B. R, VIGNA S. R. Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract. **J. Comp. Neurol.** 367:342–51; 1996.

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

RAJ, K., GOYAL, M. D., HIRANO, I. M. D. The enteric nervous system. MECHANISMS OF DISEASE. FRANKLIN H. EPSTEIN, M.D.,*Editor* **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**. Vol. 334 No. 17. p.1106-1115; 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Fármacos Anticâncer. In: \_\_\_\_\_. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 55, p. 673-87; 2012.

RATTAN, S. & CHAKDER, S. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. **The American Journal of Physiology**, 265: G799-804, 1993.

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

REYNELL, R. S.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Physiology**, v. 131, p. 452-462; 1956.

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

ROSAS-BALLINA, M., OCHANI, M., PARRISH, W.R., OCHANI, K., HARRIS, Y.T., HUSTON, J.M., CHAVAN, S., AND TRACEY, K.J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 11008–11013; 2008.

ROSAS-BALLINA, M., OLOFSSON, P.S., OCHANI, M., VALDE´ S-FERRER, S.I., LEVINE, Y.A., REARDON, C., TUSCHE, M.W., PAVLOV, V.A., ANDERSSON, U., CHAVAN, S., et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science** 334, 98–101; 2011.

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

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.;

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

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. New York: Oxford University Press. 3a ed, 1995.

RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by pre-neoplastic rat liver. **Cancer Res.**, v.14, p. 119; 1954.

SAITO, Y.A.; STREGE, P.R.; TESTER, D.J.; LOCKE, G. R. 3<sup>rd</sup>.; TALLEY, N. J.; BERNARD, C. E.; RAE, J. L.; MAKIELSKI, J.C.; ACKERMAN, M. J.; FARRUGIA G. Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 296: G211–G218; 2009.

SANDERS, K. M. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **J Appl Physiol** 91: 1438–1449; 2001.

SANDERS, K. M.; KOH, S. D.; ORDÖG, T.; WARD, S. M. Ionic conductances involved in generation and propagation of electrical slow waves in phasic gastrointestinal muscles. **Neurogastroenterol Motil.**, v.1, p. 100-105; 2004.

SANTOS, G. D. dos. CHUBACI, R. Y. S. O conhecimento sobre o câncer de mama e a mamografia das mulheres idosas frequentadoras de centros de convivência em São Paulo (SP, Brasil). **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo-SP, v. 16, n. 5, p. 2533-2540; 2011.

SARNA, S. K. Neuronal locus and cellular signaling for stimulation of ileal giant migrating and phasic contractions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 284: G789–97; 2003.

SASSELLI, V., PACHNIS, V., BURNS, A, J., Review. The enteric nervous system. **Developmental Biology**. 366 64–73; 2012.

SAVVA-BORDALO, J.; RAMALHO-CARVALHO, J.; PINHEIRO, M.; COSTA, V. L.; RODRIGUES, A.; DIAS, P. C.; VEIGA, I.; MACHADO, M.; TEIXEIRA, M. R.; HENRIQUE, H.; JERÓNIMO, C. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. **BMC Cancer**. v. 10, p. 420–427; 2010.

SCHNEIDER, J., JEHLE, E.C., STARLINGER, M.J., NEUNLIST, M., MICHEL, K., HOPPE, S., SCHEMANN, M. Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. **Neurogastroenterol. Motil.** 13, 255–264; 2001.

SCHUCHARDT A, D'AGATI V, LARSSON-BLOMBERG L, COSTANTINI F, PACHNIS V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. **Nature**;367:380-3; 1994.

SCHWARTZ, P.J.; LA ROVERE, M.T.; VANOLI, E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death: experimental basis and clinical observations for postmyocardial infarction risk stratification. **Circulation**. 85:Suppl I:I77–I91, 1992.

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

SEIDLER, U.; LENZEN, H.; CINAR, A.; TESSEMA, T.; BLEICH, A.; RIEDERER, B. Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1072, p. 262–275; 2006.

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

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

SMIRNOV, S.V., ZHOLOS, A.V. AND SHUBA, M.F. Potential-dependent inward currents in single isolated smooth muscle cells of the rat ileum. **J Physiol** 454: 549–571; 1992;

SMITH, C. L.; GEIER, M. S.; YAZBECK, R.; TORRES, D. M.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. Lactobacillus fermentum BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation a model of intestinal mucositis in rats. **Nutr Cancer**. 60: 757-67; 2008.

SOARES, P. M., MOTA, J. M.; GOMES, A. S., OLIVEIRA, R.B., ASSREUY A. M., BRITO G. A., SANTOS A. A., RIBEIRO R. A., SOUZA, M. H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.63, p.91-98; 2008.

SOARES, P. M.; MOTA, J. M.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**. v. 61, n. 1, p. 46–49; 2013.

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

SONIS, S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncology**. v. 45, n. 12, p. 1015–1020; 2009.

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

SONIS, S. T. Regimen-related gastrointestinal toxicities in cancer patients. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 4, n. 1, p. 26–30; 2010.

SONIS, S. T. The Pathobiology of Mucositis. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 4, Abr.; 2004.

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

- SONIS, S. T.; TRACEY, C.; SHKLAR, G.; JENSON, J.; FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**. v. 69, n. 4, p. 437-443; 1990.
- SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; HAUTAMAKI, R. D.; MENDENHALL, W. H.; BOVA, F. C.; HOWARD, R. J.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. **J. Surg. Res.**, v. 48 (1), p. 1-5; 1990.
- SOUZA, C. L, et al. Perfil nutricional de pacientes com câncer assistidos pela casa de acolhimento ao paciente oncológico do sudoeste da Bahia. *Revista Brasileira de Cancer.*, v. 58, p. 163-71, 2012.
- SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 5, p. 985-994; 2001.
- SOUZA, N. V. M. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quimica Nova**, v. 27, p. 308-312; 2004.
- STAKENBORG N, WOLTHUIS AM, GOMEZ-PINILLA PJ, FARRO G, DI GIOVANGIULIO M, BOSMANS G, et al. Abdominal vagus nerve stimulation as a new therapeutic approach to prevent postoperative ileus. **Neurogastroenterol Motil** 29(9):e13075. doi:10.1111/nmo.13075; 2017.
- STRATER, J.; WELLISCH, I.; RIEDL, S.; WALCZAK, H.; KORETZ, K.; TANDARA, A.; KRAMMER, P. H.; MOLLER. P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 113, p. 160; 1997.
- STREGE, P.R., OU, Y., SHA, L., RICH, A., GIBBONS, S.J., SZURSZEWSKI, J.H. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 285: G1111–G1121; 2003;
- STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, S. J. A.; HAMILTON, J.; KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.430-441; 2009.
- SULTANI, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy induced gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy Research and Practice*, v.2012, p.1-11, 2012.
- SUN Y, LI Q, GUI H, XU DP, YANG YL, SU DF, et al. MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. **Cell Res** 23(11):1270–83. doi:10.1038/ cr.2013.116; 2013.
- SURPRENANT, A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. **Annu Rev Physiol**; 56:117-40; 1994.
- SUZUKI, H. Cellular mechanisms of myogenic activity in gastric smooth muscle. **Jpn J. Physiol.**, v. 50, p. 289-301; 2000.

SZURSZEWSKI, J. H; MILLER, S. M. Physiology of prevertebral ganglia. In Johnson LR, editor: ed 5, **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, vol 1, Elsevier, San Diego; 2012.

TACHE Y, BONAZ B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. **J Clin Invest** 117(1):33–40. doi:10.1172/JCI30085; 2007.

TAKUMA, D.; GUANGCHEN, S.; YOKOTA, J.; HAMADA, A.; ONOGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on 5-Fluorouracil-induced mucositis in hamsters. **Biol. Pharm. Bull.**, v.31, n.2, 250-254; 2008.

TANOVIC, A.; JIMÉNEZ, M; FERNÉNDEZ, E. Lack of effect of nitric oxide on KCl, acetylcholine and substance P induced contractions in ileal longitudinal muscle of the rat. **Life Sciences**. 67. 531-541; 2000.

THE FO, BOECKXSTAENS GE, SNOEK SA, CASH JL, BENNINK R, LAROSA GJ, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. **Gastroenterology** 133(4):1219–28. doi:10.1053/j.gastro.2007.07.022; 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 9, 418–428. doi: 10.1038/nri2566; 2009.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza; 2013.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. A review. **Mutat Research**, v. 195, n. 2, p. 137-149; 1988.

VAN YE, T. M.; ROZA, A. M.; PIEPER, G. M. Inhibition of intestine lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. **J Surgical Res**, v. 55, p. 553-558; 1993.

VANDERWINDEN, J. M., Role of interstitial cells of cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur J Morphol*, 37: 250-6, 1999.

VASINA, V.; BARBARA G.; TALAMONTI, L.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; TONINI, M.; DE PONTI, F.; DE GIORGIO ,R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Auton Neurosci.** 30;126-127:264-72; 2006.

VENKOVA, K., DUNN, S.T., ADESINA, A.M., GREEN-VAN, M.B. Neuromuscular dysfunction in the jejunum and colon of human leukocyte antigen B27 transgenic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 60-66, 2000.

VERDE, S. M. M. L. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida. **Dissertação de mestrado**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2007.

- VERMILLION, D. L.; HUIZINGA, J. D.; RIDDELL, R. H.; COLLINS, S. M. Altered small intestinal smooth muscle function in Crohn's disease. **Gastroenterology**. 104:1692–9; 1993.
- VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion**.,v.27, p. 159 -164, 2015.
- VINCENT, A.; PALACE, J.; HILTON-JONES, D. Myasthenia gravis. **Lancet**. 357: 2122-2128, 2001.
- VLIET, M. J. van; HARMSSEN, H. J. M.; BONT, E. S. J. M. de; TISSING, W. J. E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapyinduced mucositis. **PLOS Pathogens**, v.6, n.5, p.e.1000879; 2010.
- VOGALIS, F.; FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A. Afterhyperpolarization current in myenteric neurons of the guinea pig duodenum. **J Neurophysiol**. 85(5):1941-51; 2001.
- VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E.; DAHLÉN, G.; JONTELL, M. Oral and intestinal microflora in 5-Fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.5, p.278–284, 2003.
- von BÜLTZINGSLÖWEN, I.; BRENNAN, M. T.; SPIJKERVET, F. K. L.; LOGAN, R.; STRINGER, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; KEEFE, D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. **Support Care Cancer**., v.14, p. 519–527, 2006.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**. v. 52, n. 1, p. 349–374, 2000.
- WAITZBERG, Dan Linetzky. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu, 2006.
- WANG B, GLATZLE J, MUELLER MH, KREIS M, ENCK P, GRUNDY D. Lipopolysaccharide-induced changes in mesenteric afferent sensitivity of rat jejunum in vitro: role of prostaglandins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**; 289: G254-G260. 2005.
- WANG H, YU M, OCHANI M, AMELLA CA, TANOVIC M, SUSARLA S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** 421(6921):384–8. doi:10.1038/nature01333. 2003.
- WANG, D. W., ZHOU, R. B., YAO, Y. M., ZHU, X. M., YIN, Y. M., ZHAO, G. J., et al. Stimulation of a7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mice in vitro. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 335, 553–561. doi: 10.1124/jpet. 110.169961, 2010.
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, C. A., TANOVIC, M., SUSARLA, S., et al. Nicotinic acetylcholine receptor a7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** 421, 384–388. doi: 10.1038/nature01339, 2003.
- WARD, S. M.; SANDERS, K. M. HIRST, G. D. S. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. **Neurogastroenterol Motil** 16 (Suppl. 1), 112–

117; 2004.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. 1ª ed. Ed. Artmed. 2008.

WINTER, B. Y.; MAN, J. G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. **World J Gastroenterol**. 16(44): 5523-5535. 2010.

WIWANITKIT, V. Effect of interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha on osteopontin: molecular function and biological process. **Pediatrics International**. v. 50, n. 2, p. 213–215, 2008.

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

WOOD, J. D. Application of classification schemes to the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst.** 48, 17– 29. 1994.

WOOD, J.D. Electrical and synaptic behavior of enteric neurons. In: Wood, J.D. (Ed.), *Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System, Motility and Circulation*, vol. 1. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 465– 517; 1989.

WU, Z. Q.; HAN, X. D.; WANG, Y.; YUAN, K. L.; JIN, Z. M.; DI, J. Z.; YAN, J.; PAN, Y.; ZHANG, P.; HUANG, X. Y.; WANG, Z. G.; ZHENG, Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-Fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.68, p.87–96, 2011.

YEOH, A. S.; GIBSON, R. J.; YEOH, E. E.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; GIAM, K. A.; KEEFE, D. M. A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor-kappaB, COX-1, and COX-2. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 6, n. 8, p. 2319–2327, 2007.

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

ZHAO, Q.; WANG, J.; ZOU, M. J.; HU, R.; ZHAO, L.; QIANG, L.; RONG, J. J.; YOU, Q. D.; GUO, Q. L. Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism. **Toxicology Letters**, v. 197, p. 201-210, 2010.

ZHOLOS, A. V.; BAIDAN, L. V.; WOOD, J. D. Sodium conductance in cultured myenteric AH-type neurons from guinea-pig small intestine. **Auton Neurosci**. 18;96(2):93-102. 2002.

ZHOU, F. M.; LIANG, Y.; DANI, J. A. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. **Nature Neurosci**. 4 (12), 1224-9, 2001.

## ANEXO A – DECLARAÇÃO CEUA



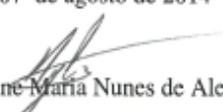
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 74/2014, sobre o projeto intitulado: “**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO NA PLASTICIDADE NEURONAL ENTÉRICA NO CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUORACIL**” de responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 07 de agosto de 2014.

Fortaleza, 07 de agosto de 2014

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

*Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar*