



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

FRANCISCA GÉSSICA OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO SILDENAFIL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL.**

FORTALEZA

2022

FRANCISCA GÉSSICA OLIVEIRA SILVA

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO SILDENAFIL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL.

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes
Soares.

FORTALEZA

2022

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)

S58e Silva, Francisca Géssica Oliveira.
Efeitos anti-inflamatório e antioxidante do sildenafil em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil / Francisca Géssica Oliveira Silva. – 2022.
82 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

1. Inflamação. 2. 5-Fluorouracil. 3. Inibidor de fosfodiesterase 5. 4. Sildenafil. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCA GÉSSICA OLIVEIRA SILVA

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO SILDENAFIL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes
Soares.

Aprovada em: 07 /04 /2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires
Centro Universitário Estácio do Ceará

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

À **Deus**, primeiramente, pois sem sua presença em minha vida nada disso seria possível.

Aos meus pais, **Antônio** e **Gilberlânia** que sempre me incentivaram e me apoiaram a buscar meus sonhos e objetivos de maneira honesta e ao meu namorado **Gabriel** pela paciência, compreensão e alicerce.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Gilberlânia tenho um agradecimento muito especial pela dedicação, esforço, orações e por sempre acreditarem e torcerem pelo meu sucesso. Sou quem sou porque eles estiveram e sempre estarão ao meu lado. Espero, um dia, poder retribuir pelo menos um terço de tudo que fizeram e fazem por mim.

Ao meu namorado Gabriel por todo amor, dedicação, incentivo e compreensão nesta etapa final de conclusão do mestrado, me dando forças em momentos complicados para continuar e; fazendo com que eu acreditasse em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditava.

Aos meus sogros, Celina Bessa e Cláudio Bessa por toda atenção, acolhimento, incentivo e por compartilharem da minha felicidade em cada conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, meus sinceros agradecimentos por todo suporte, pela orientação científica, pela paciência, dedicação e compreensão durante todo processo para a realização e conclusão deste trabalho (exclusivamente durante o período pandêmico que não foi fácil para ninguém). Tudo isso foi de extrema importância para meu crescimento pessoal e profissional como pesquisadora.

À Dra. Priscilla Fernanda por todo incentivo à pesquisa durante a graduação. Um exemplo de ser humano e profissionalismo. Minha inspiração.

Aos membros e suplentes da banca examinadora de qualificação e dissertação, muito obrigada pela disponibilidade em fazer parte da banca e por todas as considerações que contribuíram e contribuirão para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo pela coorientação, ensinamentos ao longo do mestrado, pela paciência e dedicação que foram de suma importância para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Dr. Álvaro Xavier Franco por toda contribuição, suporte e ensinamentos cedidos durante a realização dos experimentos.

A todos os outros professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram de alguma forma para a minha formação no mestrado.

Aos meus grandes parceiros de experimento Paulo Roberto e Maria Felipe, em que nós três fomos denominados “a santíssima trindade”. Sempre nos ajudando e nos doando ao máximo para a execução de cada experimento. Obrigada por todo apoio e contribuição.

Às amigas que construí ao longo da graduação e que estão presentes no meu dia a dia, me apoiando, me ajudando e me incentivando a ser uma pesquisadora e pessoa melhor. Em especial: Sarah, Paulo, Maria, Klayre e Renata.

A todos os pós-graduandos e ic's que fazem parte do LEFFAG. Obrigada por todo acolhimento, ensinamento e pela oportunidade de aprendizado e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos de Morfologia do NEMPI, Júnior e Flávia, muito obrigado por toda ajuda no processamento das amostras e confecção de todos os pedidos de lâminas.

A coordenação da Pós-Graduação em Farmacologia que sempre demonstrou interesse, atenção e agilidade na resolução de processos burocráticos relacionados ao programa.

À família Torquato, em especial, Cláudia, Washington, Priscila e Júnior por terem me acolhido tão carinhosamente durante boa parte do meu mestrado em Fortaleza.

Aos meus avós, irmãs, tios e sobrinha por todo apoio e incentivo.

À CAPES pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução do meu trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”. (Charles Chaplin)

RESUMO

A mucosite intestinal (MI) é um dos efeitos adversos mais incidentes da quimioterapia por 5-fluorouracil (5-FU), sendo considerada um fator limitante principalmente no tratamento do câncer de mama e colorretal. O presente trabalho avaliou o possível efeito anti-inflamatório, antioxidante e protetor do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para isso, a MI foi induzida em camundongos *Swiss* (25-30g) pela administração de dose única intraperitoneal de 5-FU (450mg/kg). Os animais foram tratados com sildenafil (SIL) nas doses de 5, 10 e 25mg/kg por via oral trinta minutos antes da indução e; 24, 48 e 72 horas pós-indução da mucosite. Após trinta minutos da última administração do SIL, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de cetamina e xilasina. Os segmentos intestinais foram coletados para análise de nitrato/nitrito (NO_3/NO_2) e concentração de glutathiona reduzida (GSH) para escolha da melhor dose. A perda de peso foi avaliada por 3 dias. O tratamento com SIL na dose de 25 mg/kg foi a mais efetiva. Ela reduziu significativamente a concentração de nitrato/nitrito em comparação com as outras duas doses no duodeno ($1,478 \pm 0,20 \mu\text{M}$), jejuno ($1,245 \pm 0,02 \mu\text{M}$) e íleo ($1,273 \pm 0,15 \mu\text{M}$) quando comparado ao grupo 5-FU+veículo (duodeno: $2,590 \pm 0,11 \mu\text{M}$, jejuno: $2,748 \pm 0,21 \mu\text{M}$ e no íleo: $2,588 \pm 0,06 \mu\text{M}$) e; evitou o consumo de GSH (duodeno: $182,7 \pm 26,53 \mu\text{g/g}$; jejuno: $155,4 \pm 13,43 \mu\text{g/g}$ e íleo $202,5 \pm 24,32 \mu\text{g/g}$) ao comparar com o grupo 5-FU+veículo (duodeno: $94,64 \pm 11,51 \mu\text{g/g}$; jejuno: $114,7 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$ e íleo: $95,76 \pm 9,01 \mu\text{g/g}$). Observou-se que o tratamento com SIL evitou o agravamento da lesão intestinal que é caracterizada pelo encurtamento das vilosidades intestinais, necrose parcial das criptas, vacuolização de células e presença de infiltrados de polimorfonucleares. O tratamento com o SIL ($1388 \pm 233,7 \text{ células/mm}^3$) não melhorou significativamente a leucopenia ocasionada pelo 5-FU ($1331 \pm 83,77 \text{ células/mm}^3$) e atenuou a atividade da MPO (duodeno: $0,92 \pm 0,43 \text{ U/mg}$; jejuno: $2,036 \pm 0,28 \text{ U/mg}$ e íleo: $2,82 \pm 0,67 \text{ U/mg}$) em comparação com os camundongos com MI (duodeno: $6,67 \pm 1,3 \text{ U/mg}$; jejuno: $7,52 \pm 0,71 \text{ U/mg}$ e íleo: $8,29 \pm 1,37 \text{ U/mg}$). Na avaliação da integridade do epitélio ileal, observou-se uma proteção nos grupos em que receberam tratamento com SIL tanto na RETE ($25,0 \pm 3,512 \Omega/\text{cm}^2$) quanto na permeabilidade da mucosa nos tempos 60 minutos ($32,93 \pm 6,013 \mu\text{mol/cm}^2$) e 90 minutos ($51,63 \pm 8,295 \mu\text{mol/cm}^2$). Esses resultados demonstram que o tratamento com sildenafil atenua estresse oxidativo, inflamação e mantém a integridade epitelial podendo direcionar futuros estudos clínicos. Assim, o sildenafil pode ter impacto terapêutico relevante visando seu reposicionamento como um medicamento efetivo no tratamento ou como agente adjuvante da MI.

Palavras-chave: Inflamação. 5-Fluorouracil. Inibidor de fosfodiesterase 5. Sildenafil.

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF SILDENAFIL IN 5-FLUOROURACIL-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS EXPERIMENTAL MODEL

Intestinal mucositis (IM) is one of the most common adverse effects of 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy, being considered a limiting factor mainly in the treatment of breast and colorectal cancer. The present work evaluated the possible anti-inflammatory, antioxidant and protective effect of sildenafil (phosphodiesterase type 5 inhibitor) in an experimental model of intestinal mucositis induced by 5-FU. For this, IM was induced in Swiss mice (25-30g) by the administration of a single intraperitoneal dose of 5-FU (450mg/kg). The animals were treated with sildenafil (SIL) at doses of 5, 10 and 25mg/kg orally thirty minutes before induction and; 24, 48 and 72 hours post-induction of mucositis. Thirty minutes after the last administration of SIL, the animals were euthanized with an overdose of ketamine and xylasin. Intestinal segments were collected for analysis of nitrate/nitrite (NO₃/NO₂) and reduced glutathione (GSH) concentration to choose the best dose. Weight loss was assessed for 3 days. Treatment with SIL at a dose of 25 mg/kg was the most effective. It significantly reduced the concentration of nitrate/nitrite compared to the other two doses in the duodenum (1.478±0.20 µM), jejunum (1.245±0.02 µM) and ileum (1.273±0.15 µM) when compared to the group 5-FU+vehicle (duodenum: 2.590±0.11 µM, jejunum: 2.748±0.21 µM and in the ileum: 2.588±0.06 µM) and; avoided the consumption of GSH (duodenum: 182.7±26.53 µg/g; jejunum: 155.4±13.43 µg/g and ileum 202.5±24.32 µg/g) when compared with group 5-FU+vehicle (duodenum: 94.64±11.51 µg/g; jejunum: 114.7±4.6 µg/g and ileum: 95.76±9.01 µg/g). It was observed that treatment with SIL prevented the worsening of the intestinal lesion, which is characterized by the shortening of the intestinal villi, partial necrosis of the crypts, vacuolization of cells and the presence of polymorphonuclear infiltrates. Treatment with SIL (1388±233.7 cells/mm³) did not significantly improve the leukopenia caused by 5-FU (1331±83.77 cells/mm³) and attenuated MPO activity (duodenum: 0.92±0.43 U/mg, jejunum: 2.036±0.28 U/mg and ileum: 2.82±0.67 U/mg) compared to mice with IM (duodenum: 6.67±1.3 U/mg; jejunum: 7.52±0.71 U/mg and ileum: 8.29±1.37 U/mg). In the evaluation of the integrity of the ileal epithelium, protection was observed in the groups that received treatment with SIL both in the RETE (25.0±3.512 Ω/cm²) and in the permeability of the mucosa in the times of 60 minutes (32.93±6.013 µmol/cm²) and 90 minutes (51.63±8.295 µmol/cm²). These results demonstrate that sildenafil treatment attenuates oxidative stress, inflammation and maintains epithelial integrity, which

may guide future clinical studies. Thus, sildenafil may have a relevant therapeutic impact aiming its repositioning as an effective drug in the treatment or as an adjuvant agent for IM.

Keywords: Inflammation. 5-Fluorouracil. Phosphodiesterase inhibitor 5. Sildenafil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquematização da composição celular das camadas intestinais	14
Figura 2	– Ilustração esquemática dos tipos de células epiteliais do intestino delgado...	15
Figura 3	– Estrutura molecular do 5-FU	19
Figura 4	– Mecanismo de ação e metabolização do 5FU.....	20
Figura 5	– Fases Fisiopatológicas da MI de acordo com o modelo de mucosite oral de Sonis.....	22
Figura 6	– Síntese de GSH e ciclo catalítico	25
Figura 7	– Rota de sinalização NO/GMPc	27
Figura 8	– Etapas do processo de pesquisa e desenvolvimento para novos fármacos	28
Figura 9	– Etapas de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco <i>versus</i> Etapas de reposicionamento de fármacos.	28
Figura 10	– Desenho experimental	36
Figura 11	– Efeito do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) na variação de peso corporal nos grupos experimentais.....	42
Figura 12	– Sildenafil evita o consumo de glutathiona reduzida em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	43
Figura 13	– Sildenafil reduz os níveis de nitrito nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.....	45
Figura 14	– Fotomicrografias de amostras dos segmentos duodeno, jejuno e íleo após a administração do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos	47
Figura 15	– Efeito do tratamento com sildenafil (inibidor de fosfodiesterase tipo 5) nas alterações morfométricas nos segmentos intestinais induzidas por 5-FU em camundongos.....	49
Figura 16	– Efeito do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) na leucopenia induzida por 5-FU em camundongos	50

Figura 17 – Sildenafil reduz a atividade de MPO em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.	51
Figura 18 – Efeito do tratamento com o sildenafil (inibidor de fosfodiesterase) 5 na integridade da mucosa ileal dos camundongos com mucosite induzidos por 5-FU	53
Figura 19 – Modelo Hipotético do mecanismo de ação do sildenafil.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos e funções de células epiteliais intestinais	16
Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais.....	35
Tabela 3 – Critérios histopatológicos	38
Tabela 4 – Escores histopatológicos dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados ou não com sildenafil	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOM	Sulfato de sódio de azoximetano
ATV	Atorvastatina
ATP	Trifosfato de adenosina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCK	Colecistocinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPD	dihidropirimidina-desidrogenase
DSS	Dextrano
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécie Reativa de Oxigênio
GIP	Peptídeo inibidor gástrico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GO	Glutathione oxidase
GPx	Glutathione Peroxidase
GS	Glutathione sintetase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione dissulfeto

HTAB	Tampão de hexadeciltrimetilamônio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MI	Mucosite Intestinal
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
nm	Nanômetro
NO ₃ /NO ₂	Nitrato/Nitrito
NO	Óxido Nítrico
NT	Neurotransmissores
PAF	Ativação plaquetária
PDE	Fosfodiesterase
PI	Permeabilidade Intestinal
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PTX	Pentoxifilina
RETE	Resistência transepitelial
RNA	Ácido ribonucleico

RPM	Rotação por minuto
SIL	Sildenafil
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrintestinal
TLD	Talidomida
TLR	Receptores Toll-like
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TTX	Tetrodotoxina
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
UFC	Universidade Federal do Ceará
VOCCs	Voltage-Operated Ca ²⁺ Channels
γ -GCS	γ – glutamincisteína sintetase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
\pm	Mais ou menos
$<$	Menor que
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
n°	Número
Ω	Ômega
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Anatomia e fisiologia do intestino delgado	14
1.1.2	<i>A resposta inflamatória do trato gastrointestinal</i>	17
1.2	Quimioterápico 5- Fluorouracil	18
1.3	Mucosite intestinal associada à quimioterapia	20
1.3.1	<i>Contribuições do LEFFAG em modelos de mucosite experimental</i>	23
1.4	O papel das espécies reativas de oxigênio no processo inflamatório e de estresse oxidativo da mucosite intestinal	24
1.5	Fosfodiesterases	26
1.5.1	<i>Reposicionamento de fármacos – Sildenafil</i>	27
1.5.2	<i>Inibidor de fosfodiesterase 5 (sildenafil) e inflamação</i>	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivo específico	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Animais	34
4.2	Obtenção do inibidor de fosfodiesterase 5 – sildenafil	34
4.3	Protocolo experimental	34
4.3.1	<i>Grupos experimentais</i>	34
4.3.2	<i>Administração do 5-Fluorouracil e tratamento com sildenafil</i>	35
4.3.3	<i>Análise ponderal</i>	37
4.3.4	<i>Consumo de Glutathione reduzida</i>	37
4.3.5	<i>Dosagem nitrato/nitrito</i>	37
4.3.6	<i>Análise morfológica e histopatológica</i>	38
4.3.7	<i>Leucograma</i>	38
4.3.8	<i>Determinação de mieloperoxidase</i>	39
4.3.9	<i>Dissecação ileal</i>	39

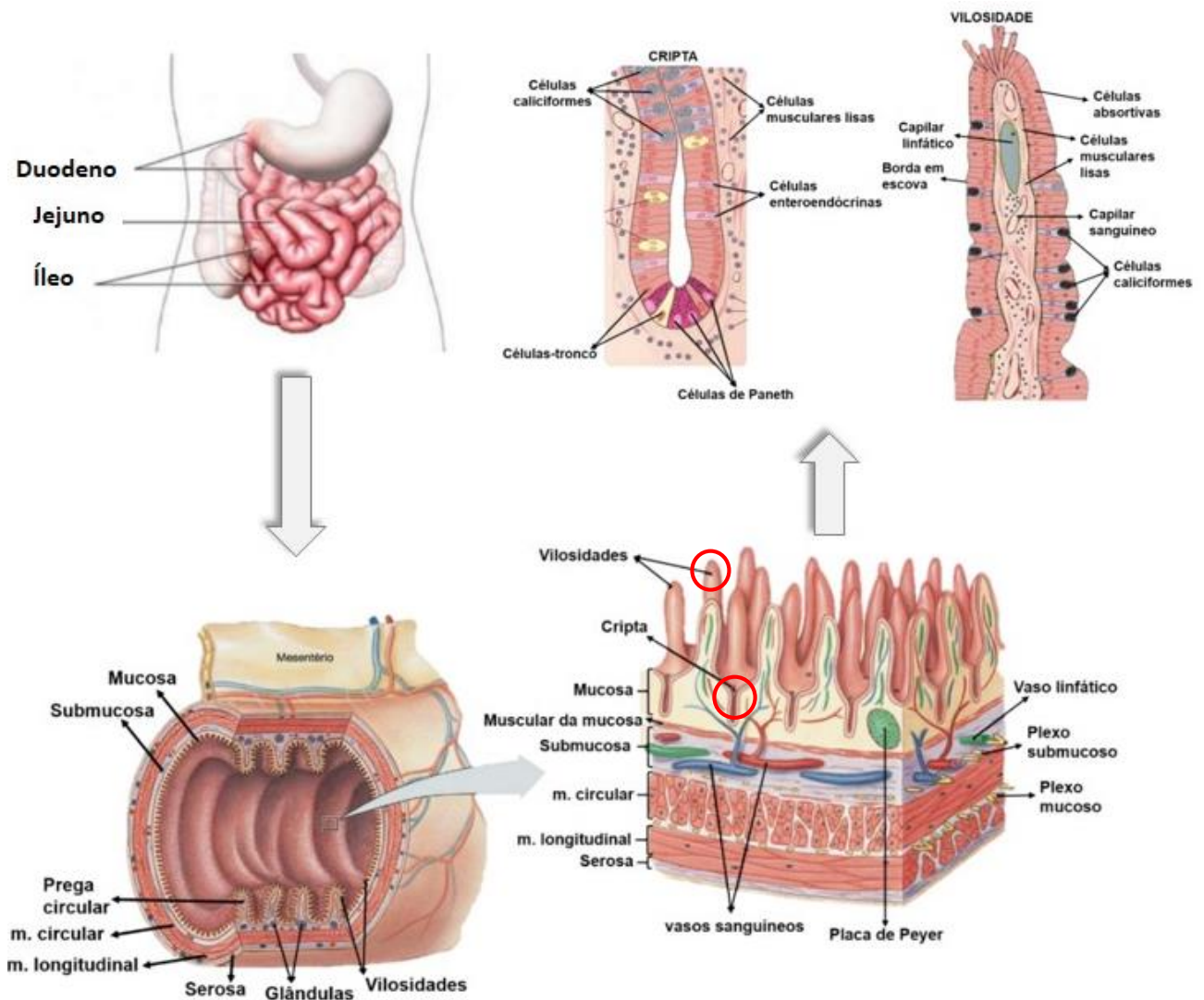
4.3.10	<i>Resistência transepitelial</i>	40
4.3.11	<i>Permeabilidade transepitelial</i>	40
4.4	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	40
5.1	Efeito do tratamento com o sildenafil na variação de peso corporal dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU	42
5.2	Efeito do tratamento com o sildenafil no consumo de GSH nos segmentos intestinais após indução do modelo de mucosite intestinal	43
5.3	Efeito do sildenafil no aumento das concentrações de nitrito nos segmentos intestinais após indução da mucosite	44
5.4	Efeito do sildenafil na análise histopatológica da lesão intestinal induzida por 5-FU	46
5.5	Efeito do sildenafil nas alterações intestinais morfométricas induzidas por 5-FU	48
5.6	Efeito do tratamento com o sildenafil sobre a leucopenia induzida por 5-FU em camundongos	50
5.7	Efeito do sildenafil no aumento da atividade de mieloperoxidase após indução da mucosite	51
5.8	Efeitos do sildenafil em resistência elétrica (RETE) e permeabilidade da mucosa ileal	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A - Certificado da comissão de ética no uso de animais	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e fisiologia do intestino delgado

O intestino delgado é um órgão complexo formado basicamente por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) que exercem funções fundamentais para um bom funcionamento do organismo, como por exemplo, digestão, absorção de nutrientes, produção de alguns hormônios reguladores e agem como barreira contra agentes nocivos atuando como órgão do sistema imune. (DUNCAN; GRANT, 2003).

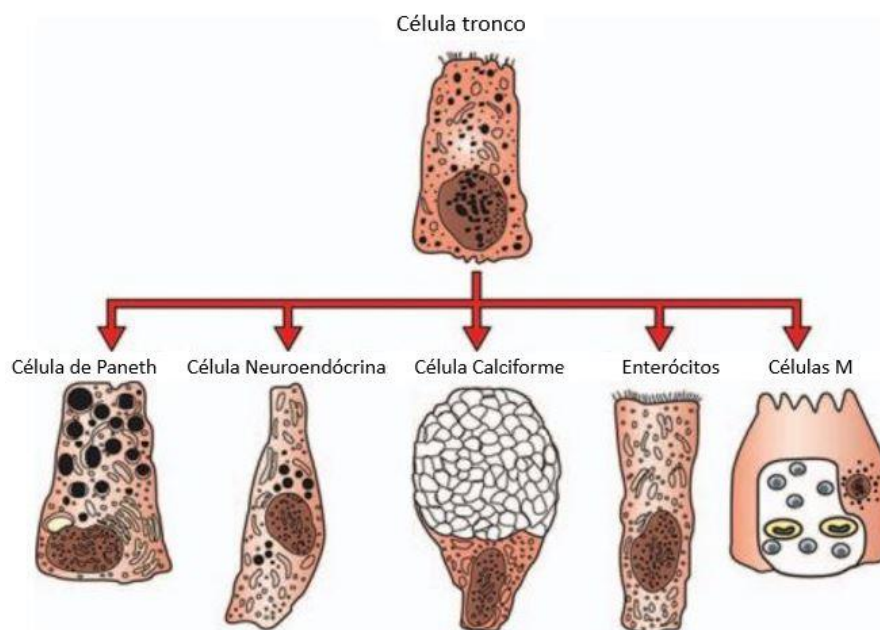
Figura 1 – Esquematização da composição celular das camadas intestinais



Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013

As vilosidades (vilos) presentes na mucosa apresentam projeções alongadas formadas pelo epitélio e lâmina própria com aproximadamente 0,5 a 1,5 mm de comprimento, representando as principais características histológicas relacionadas aos eventos de absorção. Nelas estão presentes os enterócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em continuidade com os vilos, encontram-se as criptas que representam a porção proliferativa do intestino (BARRETT, 2015; NASCIUTTI et al., 2016), ou seja, as células do epitélio intestinal necessitam constantemente de serem substituídas, enquanto as células-tronco, localizadas na base das criptas, são partes integrantes deste processo, sendo mediados por várias vias de sinalizações importantes. Ao amadurecer, essas células migram para as vilosidades (MADISON et al., 2005). As células epiteliais que revestem o lúmen estão organizadas no eixo-vilo cripta e apresentam morfologia e funções específicas, como observado na figura 2 e tabela 1.

Figura 2 – Ilustração esquemática dos tipos de células epiteliais do intestino delgado.



Fonte: Adaptado de DAMJANOV, I., E LINDER, J. (1996).

Tabela 1 – Tipos e funções de células epiteliais intestinais

CÉLULA	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ENTERÓCITOS	A principal célula de absorção do intestino delgado.	Predominantemente no epitélio
CÉLULAS DE PANETH	Secretam lisozima com a funcionalidade de defesa contra bactérias e pode regular flora intestinal.	Base das criptas
CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS	Regular localmente atividade intestinal por meio de hormônios secretores (CCK, secretina, GIP).	Localizadas principalmente no criptas, mas pode ser encontrado em outros locais dentro do epitélio.
CÉLULAS CALICIFORMES	Células secretoras de mucina que servem um papel citoprotetor e papel lubrificante no TGI.	Localizadas em todo o intestino delgado, maior concentração no íleo do que o jejuno.
CÉLULAS M	Células que participam da resposta imunológica e recobrem o folículo linfoides das placas de Peyer	Localizadas no íleo.

Fonte: Adaptado de YAMADA; ALPERS, 2003.

A camada muscular da mucosa é responsável pelo peristaltismo do intestino delgado e é subdividida em duas camadas: a camada circular interna e a longitudinal externa. A submucosa é composta por artérias e tecido linfático que auxiliam na função absorptiva do intestino delgado. Células especializadas secretam muco e bicarbonato para manter o pH do conteúdo gástrico neutralizado. Além disso, existe uma série de nervos e gânglios que compõem o plexo submucoso que se conecta ao plexo miontérico, composto por fibras simpáticas,

parassimpáticas e pós-ganglionares. Esses plexos, em conjunto, coordenam o peristaltismo (VOLK; LACY, 2017).

Os neurônios vasoconstritores presentes no plexo submucoso apresentam, predominantemente, norepinefrina, enquanto os neurônios inibitórios, no plexo mioentérico, contém polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), óxido nítrico (NO), trifosfato de adenosina (ATP) e peptídeo de AMP cíclico ativador da hipófise. A acetilcolina, a substância P e as taquicinas são os principais NTs excitatórios do TGI. Em geral, esses neurotransmissores são responsáveis por desempenhar um papel crucial na função motora, sensorial e secretora do intestino (FURNESS et al., 1985). A camada serosa é composta por um fino revestimento de células mesoteliais com uma camada frouxa subjacente (VOLK; LACY, 2017).

1.1.2 A resposta inflamatória do trato gastrointestinal.

O trato gastrointestinal (TGI) é constantemente exposto à agentes externos, como por exemplo, micro-organismos, antígenos e grande quantidade de enzimas digestivas que possuem potencial para comprometer a integridade dos tecidos, por esse motivo a resposta inflamatória é sempre presente. Componentes do sistema imune, como nódulos linfáticos, imunoglobulinas, macrófagos e células linfoides são bastante abundantes por todo o TGI. A interação destes elementos com a capacidade proliferativa dos enterócitos constituem a barreira física e imunológica capaz de regular a homeostase entre a mucosa intestinal e os micro-organismos devido ao controle da resposta inflamatória (ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011).

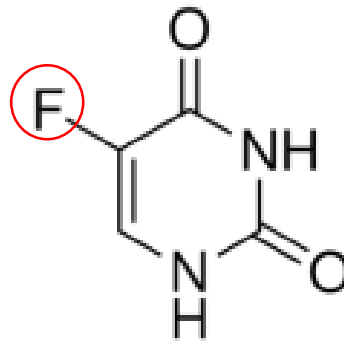
No TGI os neutrófilos são responsáveis por destruírem micro-organismos que rompeu a barreira epitelial e entraram no tecido ou na circulação. Os neutrófilos participam da resposta imune inicial, sendo as primeiras células a migrarem da circulação para o local do dano tecidual. Esse deslocamento celular é rápido, porém envolve diversas etapas sendo mediadas por várias moléculas (ABAS, 2008). Ao entrarem em contato com micro-organismos patogênicos, as células epiteliais e as células residentes (células dendríticas, macrófagos, mastócitos) sinalizam para a produção de quimiocinas (moléculas capazes de atrair os neutrófilos) e citocinas (IL-1, TNF- α). A ação das quimiocinas associada à vasodilatação e diminuição do fluxo sanguíneo local facilita a aproximação dos neutrófilos à margem dos vasos sanguíneos (RIBEIRO et al., 2016).

Quando os neutrófilos são fortemente ativados, os produtos microbicidas não diferenciam micro-organismos de tecidos próprios. Em consequência disso, quando esses produtos entram em contato com o ambiente extracelular são capazes de causar a lesão tecidual (ABBAS, 2008).

1.2 Quimioterápico 5- Fluorouracil

O 5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo câncer gastrointestinal, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, ginecológico, bem como para o tratamento primário do câncer colorretal, tendo maior impacto nesse último tipo (APETOH, 2015). O 5FU é um antimetabólito da classe das fluoropirimidinas (MAGALHÃES, 2018; SETHY; KUNDU, 2021). Por ser um antimetabólito, não inibe somente a síntese de DNA de células neoplásicas, mas também, de células normais que possuem índices elevados de divisão mitótica como tecidos de rápida proliferação (SMITH et al., 2008). Na medula óssea resulta em granulocitopenia e trombocitopenia; no trato gastrintestinal resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, entre outros. Seus efeitos adversos variam significativamente de acordo com o tratamento, dose utilizada e via de administração. (KOENIG; PATEL, 1970).

O mecanismo de ação do 5-FU está diretamente relacionado à natureza química desse fármaco e da uracila. A uracila é uma base nitrogenada presente nos ácidos nucleicos, sendo constituinte do RNA. O 5-FU foi desenvolvido com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, que é um processo essencial para síntese e metabolismo de novas células, já que é uma molécula com estrutura bioquímica suficiente para ser reconhecida pelo organismo, mas insuficiente para exercer as funções normais, e isso culmina na alteração do metabolismo celular (RUTMAN, et al., 1954). Um estudo demonstrou que havia uma enorme captação de uracila em hepatoma de ratos, e que a interferência nessa captação poderia ser alvo do controle tumoral. Então, foi adicionado um composto do grupo dos halogênios, denominado flúor, na posição 5 da uracila criando assim o composto 5-FU, classificado como análogo da pirimidina uracila (DEVITA; CHU, 2008).

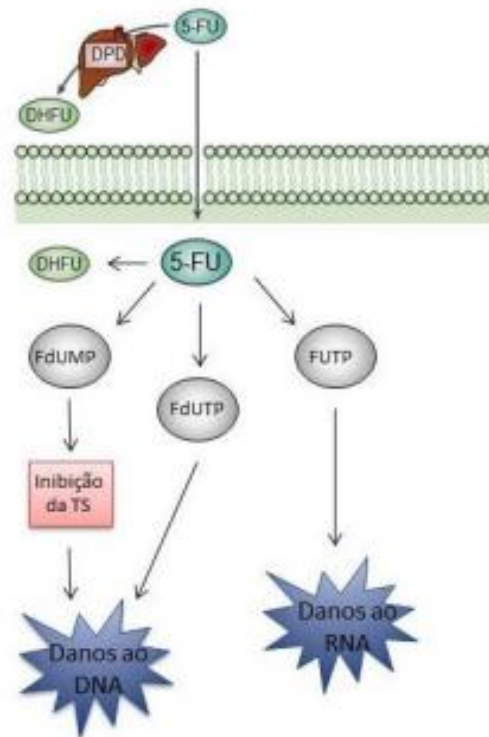
Figura 3 – Estrutura molecular do 5-FU

Fonte: Adaptado de Longley; Harkin; Johnston (2003).

Em relação a sua farmacocinética e farmacodinâmica, o 5-FU é rotineiramente administrado via parenteral na prática clínica, ingerindo-se via oral, chegando ao intestino é absorvido parcialmente e adentra ao sistema porta-hepático como qualquer fármaco ingerido por essa via. A biodisponibilidade do fármaco sofre redução significativa durante esse processo, sendo 15- 20% do fármaco excretado por via urinária (FOCACETTI et al., 2015).

O 5-FU foi projetado a fim de impedir a metilação da uracila, impossibilitando consequentemente sua síntese. O 5-FU é 80% catabolizado no fígado, onde uma enzima converte o 5-FU em diidrofluorouracila (DHFU). Dentro da célula o 5-FU é transformado em metabólitos de fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). O FdUMP se liga ao sítio ativo da enzima timidilato sintase, impedindo a ligação do substrato normal, inibindo a formação de novo timidilato; consequentemente, a síntese e reparação do DNA na fase S é cessada, o que resulta em morte celular. O metabólito FdUTP pode ser incorporado erroneamente ao DNA, levando à quebra da fita e resultando assim na morte celular. Já o metabólito FUTP pode ser amplamente incorporado ao RNA, alterando seu processo e funcionamento normais, apresentando toxicidade ao RNA em diferentes níveis (HAGENKORT, 2016; BANERJEE et al., 2017; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Figura 4 – Mecanismo de ação e metabolização do 5-FU



Fonte: Adaptado de Longley; Harkin; Johnston (2003).

Uma das principais preocupações, quanto a utilização do 5-FU, atualmente é a resistência dos tumores ao fármaco levando ao uso de concentrações cada vez maiores. O fármaco induz efeitos adversos como a citotoxicidade em células saudáveis, especialmente as células epiteliais e da medula óssea, pois não possui especificidade para células neoplásicas malignas (DO CARMO et al., 2018).

1.3 Mucosite intestinal associada à quimioterapia

A mucosite é o termo clínico utilizado para definir a inflamação faringo-esofágica-gaстрintestinal caracterizada por lesões das membranas das mucosas da cavidade oral ou intestinal que se manifestam por meio de um processo inflamatório e ulcerativo, de maneira localizada ou difusa em consequência dos processos quimioterápicos e radioterápicos utilizados no combate e/ou controle do crescimento tumoral. (CHIAPPELLI, 2005; MENEZES-GARCIA et al., 2018). A mucosite é considerada um fator limitante da quimioterapia (SONIS et al., 2002) sendo um dos principais efeitos colaterais que pode acometer cerca de 40% dos pacientes

submetidos ao tratamento quimioterápico. A prevalência da mucosite atinge quase 100% dos indivíduos que fazem quimioterapia associada à irradiação (GIBSON et al, 2013).

Os sintomas que se manifestam clinicamente no trato gastrointestinal (TGI) são inchaço, náuseas, dor abdominal e diarreia, com danos mais incidentes no intestino delgado (KEEFE et al., 2000). A diarreia é considerada um dos sintomas mais recorrentes da mucosite intestinal nos primeiros ciclos do tratamento, sendo observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia (KEEFE; GIBSON, 2007). Os efeitos colaterais causados por fármacos citotóxicos, em muitos casos, levam a redução da dose ou suspensão do protocolo de tratamento do câncer (GUSSGARD et al., 2014). Esses efeitos podem ser agravados a depender de fatores como: grau de malignidade da doença, capacidade de defesa e o estado nutricional do paciente (RAMANA et al., 2006).

Existem duas teorias aceitas quanto a etiologia da mucosite: uma refere-se mucosite direta, pois se trata da interferência citotóxica do quimioterápico sobre as células do trato gastrointestinal; a outra, denominada mucosite indireta, se refere a susceptibilidade às infecções oportunistas, principalmente as causadas por bactérias Gram-negativas e fungos, devido à neutropenia por citotoxicidade, causada pelo quimioterápico às células da medula óssea (RAMANA et al., 2006).

A mucosa do TGI é particularmente susceptível a complicações, sendo sua fisiopatologia multifatorial (SMITH et al., 2008). Sonis (2004) definiu a mucosite oral como tendo 5 fases que são: iniciação, regulação e geração de mensagens, sinalização e amplificação, ulceração e cicatrização. A primeira fase recebe esse nome porque ocorre imediatamente após a exposição do 5-FU ao lúmen intestinal. A toxicidade do fármaco culmina num dano ao DNA após exposição da célula, gerando um aumento na produção de EROs, bem como ativação de mediadores inflamatórios observados na fase de resposta a danos primários.

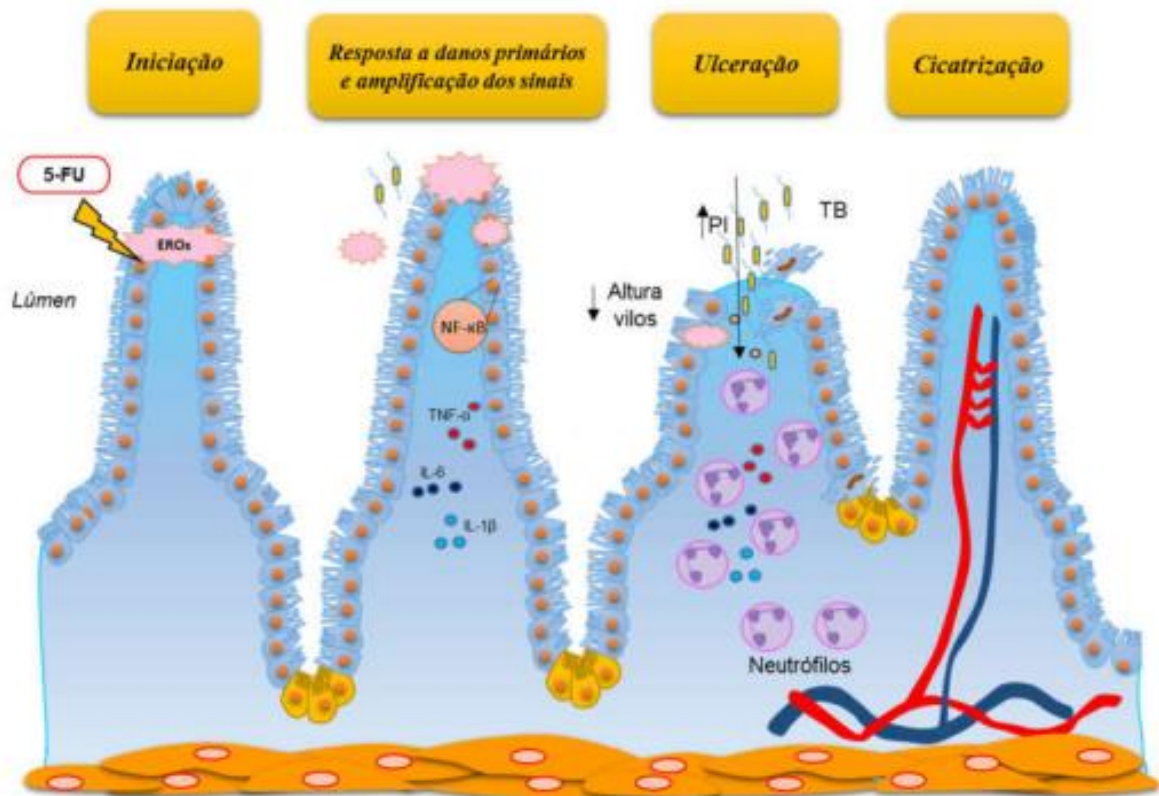
As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2, IFN- γ e TNF- α são os principais componentes da fase nomeada amplificação de sinais, pois potencializam a lesão tecidual devido a ativação adicional do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), consequentemente ativando várias outras vias de sinalização celular como a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrões, como receptores Toll-like (TLR) nas células imunes inatas e células epiteliais, que implicam, por exemplo, no recrutamento de neutrófilos (RIBEIRO et al., 2016).

A quarta fase é a ulceração. Nela ocorre um aumento da permeabilidade intestinal (PI) e perda da integridade da mucosa, pois, durante o tratamento quimioterápico, a proliferação

celular cessa e ocorre a perda progressiva de células do epitélio intestinal sem renovação, resultando em uma perda da estrutura vilo-cripta que culmina na perda da função intestinal (RIBEIRO et al., 2016).

A última fase, e menos elucidada até o momento, é a de cicatrização que é caracterizada pelo aumento da proliferação celular, diferenciação e migração de células epiteliais (SONIS, 2004; MAGALHÃES, 2018). Logo, cada fase oferece um alvo potencial para intervenção terapêutica, já que as fases ocorrem simultaneamente e se repetem clinicamente em qualquer paciente.

Figura 5 - Fases Fisiopatológicas da MI de acordo com o modelo de mucosite oral de Sonis.



Fonte: Magalhães (2018)

1.3.1 Contribuições do LEFFAG em modelos de mucosite experimental

Nosso grupo de pesquisa vem há vários anos desenvolvendo estudos relacionados a mediadores e mecanismos envolvidos nos efeitos colaterais da quimioterapia. Leitão et al., 2007 demonstraram o papel relevante do óxido nítrico na fase inicial da mucosite oral induzida por 5-FU. Observaram, também em Hamsters, que os inibidores seletivos do óxido nítrico sintase induzível reduzem o curso inflamatório da doença. Em um outro estudo, Medeiros et al., 2010 observaram que a atorvastatina (ATV) foi capaz de reduzir, significativamente, parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo induzidos pelo 5-FU na mucosa oral de hamsters.

Em relação aos modelos de mucosite intestinal, induzidas por diferentes antineoplásicos, foi observado que o tratamento com metotrexato, em ratos, induz uma importante atrofia de vilos com aumento da profundidade das criptas, no duodeno, jejuno e íleo. Além de aumentar a secreção de sódio e potássio, medida pelo modelo de perfusão intestinal, reduziu a área absorptiva, medida pela razão de excreção do manitol (CARNEIRO-FILHO et al., 2004). A indução com irinotecano em camundongos causou uma intensa e significativa diarreia nos animais, com diminuição da relação vilo-cripta. Foi observado, ainda, um aumento na concentração intestinal de TNF- α , IL-1 β e CXCL1. Demonstrou-se que o TNF- α , IL-1 β e o CXCL1 são importantes mediadores na patogênese da mucosite intestinal e que a pentoxifilina (PTX) e a talidomida (TLD) mostraram um efeito protetor nas estruturas intestinais. No entanto, apenas a PTX reduziu a severidade da diarreia induzida por irinotecano. Este resultado pode ser explicado devido a TLD ser mais seletiva na inibição do TNF- α (MELO et al.; 2008).

Quanto aos modelos de mucosite intestinal induzidos especificamente por 5-FU, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a MI em ratos está associada a alterações, na motilidade digestiva, que persistem mesmo após a resolução do processo inflamatório (SOARES et al., 2008). Lima et al., 2005 demonstraram que a pentoxifilina (PTX) e a talidomida (TLD) foram capazes de inibir a lesão macroscópica e microscópica, bem como o aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) em modelos de MI em Hamster. Soares et al., (2010) demonstraram pela primeira vez o papel do fator de ativação plaquetária (PAF) na patogênese da mucosite intestinal. Observou-se que os ratos PAFR / - foram protegidos contra os danos causados pelo tratamento com 5-FU na microscopia intestinal. Em outro estudo Justino et al., (2015) demonstraram que *Lactobacillus acidophilus* foram capazes de melhorar os aspectos inflamatórios e funcionais da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Lima (2016) observou que a dismotilidade durante a mucosite pelo 5-FU possui possível participação dos canais de sódio voltagem-dependentes sensíveis a TTX. Recentemente, Lima (2021)

demonstrou em seus estudos que a dismotilidade gastrointestinal na mucosite induzida por 5-FU é ocasionada por alterações no SNE e nos VOCCs, o que parece estar relacionada com alterações na cinética e/ou expressão dos receptores serotoninérgicos, devido a liberação de serotonina por macrófagos e mastócitos.

1.4 O papel das espécies reativas de oxigênio no processo inflamatório e de estresse oxidativo da mucosite intestinal

O excesso de espécies reativas de oxigênio e o consumo de quantidades elevadas de antioxidantes gerados nas fases iniciais do processo inflamatório da mucosite gera um desequilíbrio com instalação do estresse oxidativo (MONDIN et al., 2016). Isso culmina em um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias que atuam como marcadores para células do sistema imunológico (SUKHOTNIK et al., 2014). E, conseqüentemente ocorre elevação na atividade da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), resultando em maior produção de óxido nítrico (NO) (FANGEL et al., 2019).

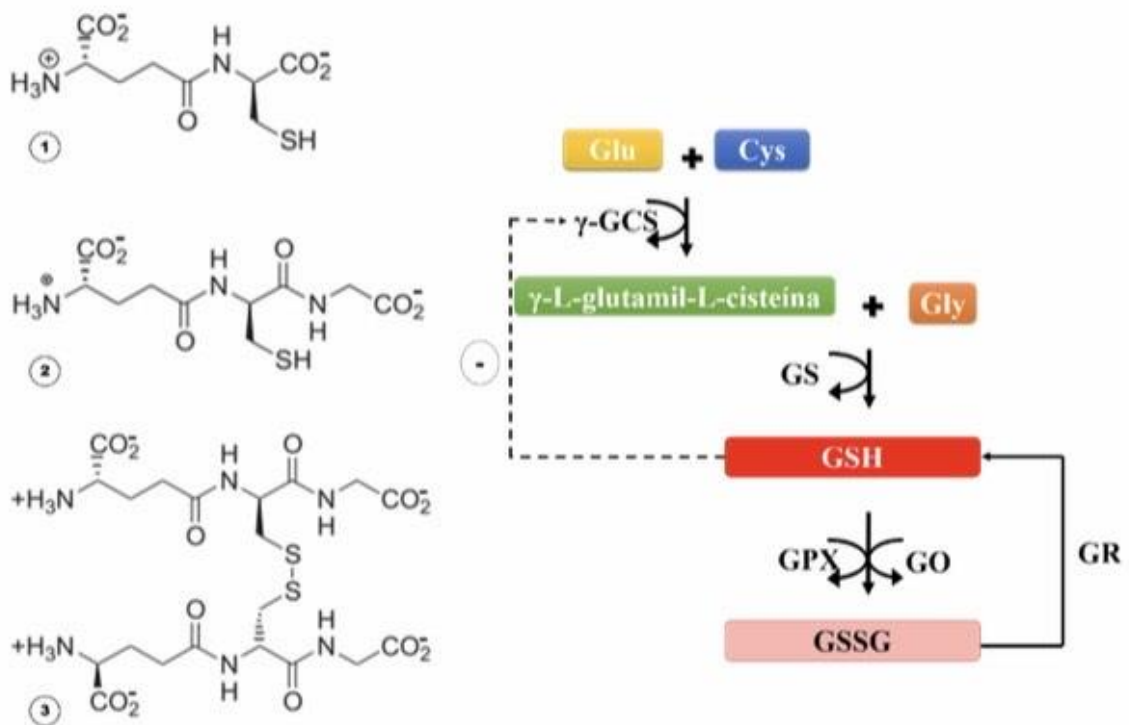
O óxido nítrico (NO) é um mediador crucial da defesa da mucosa gastrointestinal (MUSCARA; WALLACE, 1999), porém pode contribuir para danos na mucosa em alguns casos, como por exemplo, sendo um dos mediadores tóxicos durante a patogênese da mucosite provocando danos que resultam em dor e lesão aos tecidos (FANGEL et al., 2019). O NO desempenha um papel crítico na modulação de vários componentes da defesa da mucosa, incluindo fluxo sanguíneo e secreção de muco (WALLACE; MILLER, 2000).

Quando as EROs superam as defesas antioxidantes da célula como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e a glutathione (GSH), os danos aos tecidos ocorrem (RIBEIRO et al., 2016). Considerado o mais importante antioxidante não enzimático, a Glutathione, é encontrada em células eucarióticas na sua forma reduzida GSH (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina). A biossíntese do GSH ocorre, predominantemente, no fígado dependente da ação duas enzimas (γ -GCS e GS) (CHENG et al., 2014). Para que o desenvolvimento da atividade protetora da glutathione seja expressa e mantida, a GSH é regenerada pelo ciclo catalítico, através da atividade de três grupos de enzimas: a glutathione peroxidase (GPX), a glutathione oxidase (GO) e a glutathione reductase (GR) juntas formam o sistema de glutathione. GO e GSH-Px catalisam a oxidação de GSH à GSSG. Enquanto a GR é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (CHENG et al., 2017).

O estado redox intracelular (níveis GSH/GSSG > 90%) da célula são constantemente

utilizados como um marcador da capacidade antioxidante das células que minimiza o acúmulo de dissulfetos e fornece um ambiente redutor dentro da célula. O sistema redox GSH é essencial para manutenção da homeostase intracelular e processos fisiológicos celulares normais e, representa um dos mais importantes sistemas de defesa antioxidante para as células epiteliais e inflamatórias. Em várias doenças inflamatórias no TGI, o consumo dos níveis de GSH intracelular ou aumento dos níveis de GSSG está presente em conjunto com a indução de mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (SCHMITT et al., 2015). Para a quantificação do consumo de GSH por meio da espectrofotometria, tem como base a reação cinética de oxidação da GS a GSSG, promovida pelo DTNB (HUBER; ALMEIDA, 2008).

Figura 6 – Síntese de GSH e ciclo catalítico.



Fonte: Miranda (2020).

Alterações na permeabilidade intestinal pode estar relacionada a produção exacerbada de EROs por células inflamatórias (LEOCÁDIO, 2013). Estudos demonstraram que o aumento da permeabilidade intestinal tinha relação com o efeito do estresse oxidativo nas proteínas de

junção firmes e aderentes (RAO et al., 2002) sendo observado dissociação dos complexos occludina-ZO-1 e E-caderina- β -catenina, promovida pela fosforilação da tirosina nessas proteínas. Os autores relacionaram os resultados à ativação de tirosinoquinase e phosphatidylinositol 3-quinase pelas EROs (SHETH et al., 2003).

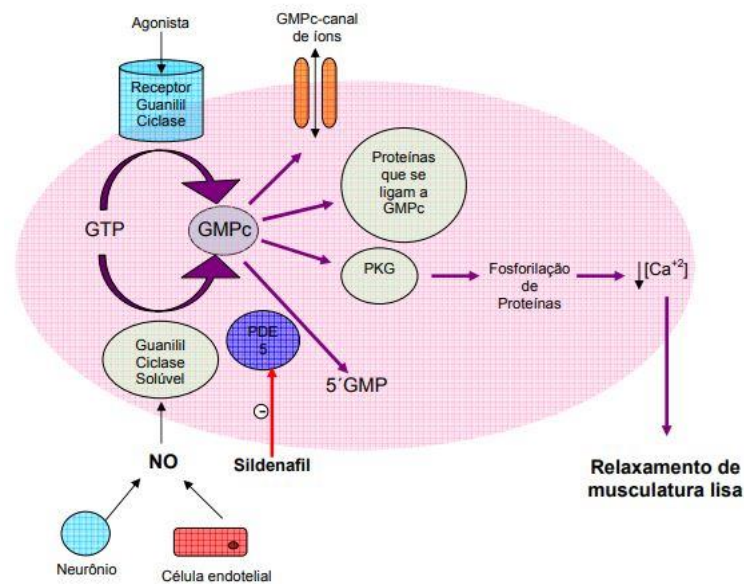
Outro estudo verificou que o aumento na expressão de iNOS, com conseqüente aumento na produção de óxido nítrico promove ruptura das junções firmes e fosforilação da miosina em enterócitos (WU et al., 2011). As citocinas pró-inflamatórias também têm sido relacionadas ao aumento da permeabilidade intestinal (SUZUKI, 2013).

1.5 Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDE) regulam uma série de processos fisiológicos, mediando a hidrólise do monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), às suas formas inativas 5' monofosfatos. Esses mensageiros intracelulares são responsáveis por mediar diversos processos, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos. A família das fosfodiesterases é composta por 11 isoenzimas distribuídas em órgãos e sistemas dos mamíferos (SHI; MA; TANG, 2021) em diferentes proporções nos tecidos e células (MOKRA; MOKRY, 2021).

Ao entrar na célula, o óxido nítrico (NO, liberado pelas terminações nervosas e endotélio vascular, atua diretamente com a enzima guanililciclase para aumentar as concentrações intracelulares de GMPc. O NO não necessita de um receptor específico na membrana celular para exercer o seu efeito relaxante. Então, ele atravessa com facilidade a membrana celular se liga à enzima guanililciclase e produz uma alteração conformacional na molécula para aumentar a sua atividade. A ativação da guanililciclase estimula a conversão da guanosina -5' - trifosfato (GTP) em guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc). A acumulação de GMPc intracelular vai dar origem a uma série de acontecimentos, resultando na diminuição do cálcio livre, intracelular, e conseqüente relaxamento do músculo liso. A atividade do GMPc termina devido à hidrólise do próprio GMPc, para guanosina trifosfato (GTP) por efeito de enzimas da família das Fosfodiesterases (PDE). Esse efeito está envolvido na regulação por feedback negativo dos níveis celulares de GMPc (BLOUNT et al., 2007).

Figura 7 – Rota de sinalização NO/GMPc



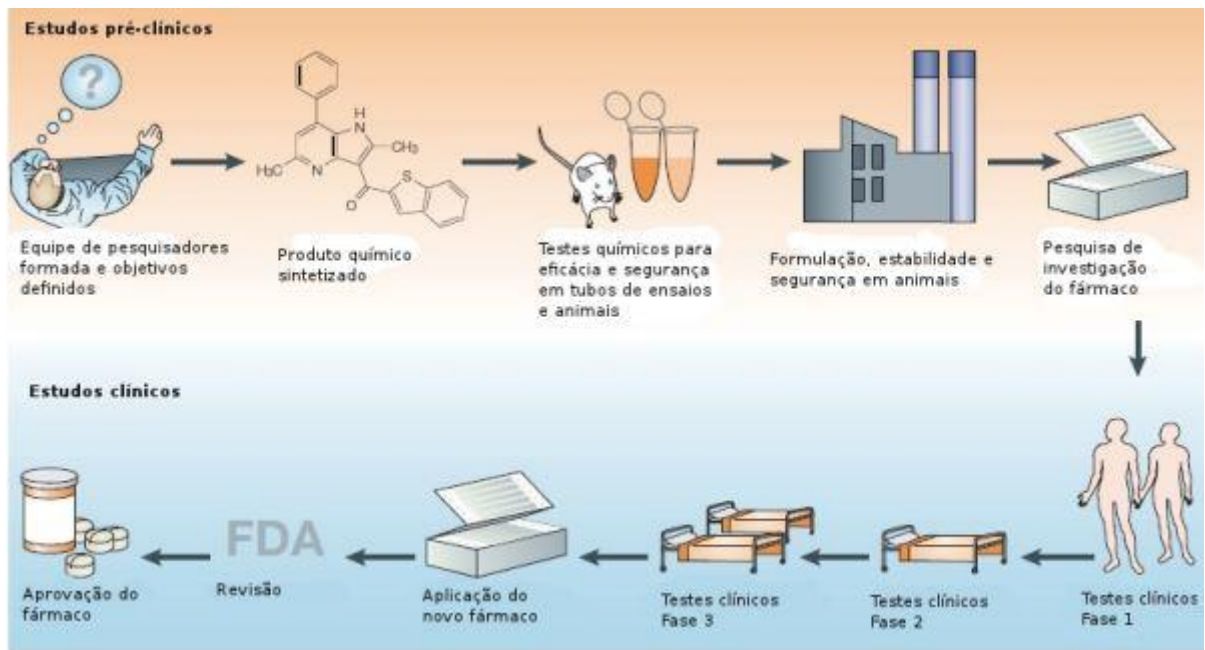
Fonte: SELBACH (2011)

Medicamentos que possuem como alvo as PDEs são fortemente consideradas por suas propriedades cardiotônica, vasodilatadora, relaxantes de musculatura lisa, antitrombótica, antiinflamatória e antiasmática (PRICKAERTS et al., 2004). O sildenafil é um inibidor competitivo da catálise pela PDE5 que promove um efeito de feedback positivo, representado pela inibição da degradação, com acúmulo do GMPc (BLOUNT et al., 2007).

1.5.1 Reposicionamento de fármacos – Sildenafil

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que vem ganhando força permitindo reduzir altos custos, tempo e falhas associadas a segurança ou toxicidade quando comparado ao processo tradicional de descoberta e desenvolvimento de fármacos (Figura 8) (ASHBURN; THOR, 2004). O reposicionamento é dividido em quatro etapas: Identificação, aquisição, testes clínicos e registro com durabilidade de três a doze anos para seu desenvolvimento, enquanto o processo de descoberta de um novo fármaco dura em torno de 11 à 17 anos e é dividido em seis etapas: Pesquisa sobre o alvo, “screening”, desenho do fármaco, avaliação biológica, testes clínicos e registro (JARDIM, 2013).

Figura 8 – Etapas do processo de pesquisa e desenvolvimento para novos fármacos.



Fonte: Lombardino; Lowe (2004)

Figura 9 – Etapas de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco *versus* Etapas de reposicionamento de fármacos.



Fonte: Adaptado de Ashburn; Thor (2004).

Diversos exemplos de sucesso de reposicionamento de fármacos são citados na literatura. Um caso bem conhecido é o do Citrato do sildenafil que foi desenvolvido para o tratamento de angina e durante os testes clínicos foi observado que sua função vasodilatadora agia primeiramente no órgão genital masculino e não no coração, o que orientou sua comercialização para o tratamento da disfunção erétil (ALA; JAFARI; DEHPOUR, 2020). Este medicamento foi patenteado em 1996, e aprovada para o uso terapêutico na disfunção erétil em 1998 (SCHWARZ et al., 2007). Em 2005, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou o uso do sildenafil no tratamento da hipertensão pulmonar (ZHAO et al., 2003). O sildenafil tem apresentado um efeito gastroprotetor potencialmente interessante, porém as vias ainda precisam ser elucidadas, e seu uso como agente gastroprotetor precisa ser validado (ALVES et al., 2020).

1.5.2 Inibidor de fosfodiesterase 5 (sildenafil) e inflamação

Os inibidores de PDE são uma classe de fármacos que atuam em PDEs específicos em células-alvo e podem ativar as proteínas quinases A/G, elevando os níveis de AMPc intracelular e/ou GMPc, promovendo fosforilação de proteínas de efeito a jusante, que é eficaz em diferentes doenças relacionadas à inflamação (SHI; MA; TANG, 2021).

Em pesquisas realizadas por Karakoyun et al, (2011) e Yildirim et al, (2010) foram vistas ações anti-inflamatórias do SIL em colite aguda e em modelos de fibrose pulmonar induzida em ratos por meio da prevenção de peroxidação lipídica, da produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos. Em um outro modelo de colite induzida por ácido acético, o sildenafil foi capaz de reduzir a atividade de MPO e peroxidação lipídica, além de melhorar as alterações histológicas da mucosa do colón, com um efeito semelhante ao da prednisolona (KHOSHAKHLAGH et al., 2007). Santos et al (2005), observaram que o Sildenafil foi capaz de atuar através do mecanismo dependente de NO inibindo a gastropatia induzida por indometacina, possivelmente através de uma redução da adesão e manutenção de leucócitos no fluxo sanguíneo gástrico. Outro estudo revelou que o sildenafil, devido a sua seletividade e potente inibição da fosfodiesterase 5, reduziu significativamente o estresse oxidativo e a severidade da reação inflamatória no tecido pulmonar de ratos submetidos a queimaduras experimentais (GOKAKIN et al., 2013).

Margonis e colaboradores (2015) demonstraram que o Sildenafil tem um efeito anti-inflamatório, inibindo a colite em ratos induzida pelo TNBS, reduzindo os níveis de TNF- α no

tecido de cólon e melhorando o peso corporal. Combinado com o composto U-74389G com propriedades antioxidantes, pode reduzir ainda mais os níveis de TNF- α e malondialdeído, reduzir o escore do índice de dano da mucosa e o escore de histopatologia microscópica. Além desse modelo, citado acima, em 2017, o pesquisador Lin et al. constatou em seu estudo que no modelo de câncer de colón em camundongo induzido pelo AOM/DSS associado à colite, a expressão de PDE5 no tecido de cólon foi regulada, e o sildenafil poderia modular o microambiente inflamatório, inibindo a infiltração de células no tecido e, conseqüentemente, inibindo a ocorrência de colite induzida pelo DSS e câncer de cólon causado pela colite.

Como mencionado acima, existe um conjunto de evidências do sildenafil que demonstram ação anti-inflamatória e aumento da capacidade de reparação tecidual. No entanto, os efeitos do SIL sobre o curso da mucosite ainda não foram relatados. Dessa forma, estudos para reposicionamento do medicamento sildenafil pode ser viável seja como tratamento, seja como agente adjuvante da mucosite intestinal.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais e mais incidentes doenças existente no mundo, sendo a segunda principal causa de morte nos últimos anos (WHO, 2021). A mucosite é recorrente em pacientes submetidos ao tratamento contra o câncer que, além de gerar desconforto e dor, afeta consideravelmente a qualidade de vida do paciente (MIRANDA, 2019). Isso pode se agravar, sendo necessário as reduções de dose ou mesmo a descontinuação do tratamento quimioterápico, culminando na redução da eficácia terapêutica e na taxa de sobrevida dos pacientes (CHIAPPELLI, 2005). Apesar de avanços e buscas por medicamentos para prevenção e cura dessa enfermidade, ainda não se tem à disposição, no mercado, um medicamento efetivo para tratamento da mucosite (MIRANDA, 2019). A terapia da inflamação da mucosa é apenas paliativa e não ataca o problema diretamente, propiciando, apenas, um alívio temporário dos sintomas (JUSTINO et al., 2015).

A busca por um tratamento, 100% eficaz, tem sido explorada. Pesquisas utilizando a abordagem de reposicionamento de fármacos vêm ganhando força nos últimos anos (JARDIM, 2013), isso porque, o processo de desenvolvimento de um novo fármaco é complexo e de alto custo financeiro, necessitando de esforços em diversos aspectos relacionados à inovação, tecnologia e gestão (GUIDO et al., 2008). Outra abordagem interessante é a redução considerável da taxa de falhas associadas a segurança ou toxicidade (estimada em 45%) (ASHBURN; THOR, 2004).

O sildenafil é um exemplo de sucesso de reposicionamento de fármaco. Há muito tempo o SIL (inibidor de PDE5) tem sido comercializado e utilizado no tratamento clínico de disfunção erétil quando, na verdade, ele foi desenvolvido para o tratamento de angina, ou seja, durante os testes clínicos foi observado que sua função vasodilatadora agia primeiramente no órgão genital masculino e não no coração (ALA; JAFARI; DEHPOUR, 2020). Anos depois foi aprovado pela ANVISA para o tratamento de hipertensão pulmonar (ZHAO et al., 2003).

A literatura tem demonstrado que inibidores de PDE reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TEIXEIRA et al., 1997; HEYSTEK et al., 2003) e possuem efeitos vasodiladores (ALENCAR et al., 2018). E, por todas as evidências de ação anti-inflamatória e aumento da capacidade de reparação tecidual, o reposicionamento do medicamento sildenafil pode ser viável seja como tratamento, seja como agente adjuvante da mucosite intestinal. Dessa forma, o projeto consistiu em avaliar o possível efeito anti-inflamatório e antioxidante do

sildenafil em animais com mucosite intestinal com intuito de buscar alternativas terapêuticas eficazes.

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo Geral

Analisar os aspectos anti-inflamatório e antioxidante do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar perda e/ou ganho da massa corporal dos grupos experimentais durante os três dias que correspondem ao curso da mucosite intestinal tratados com o sildenafil;
- Avaliar o consumo de Glutathiona reduzida (GSH) e Nitrato/Nitrito (NO₃/NO₂) nos segmentos duodeno, jejuno e íleo em animais tratados com o sildenafil em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, afim de observar um possível efeito antioxidante;
- Avaliar o efeito do sildenafil nas alterações histopatológicas e morfométricas nos segmentos duodeno, jejuno e íleo em animais com mucosite intestinal;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO) nos segmentos duodeno, jejuno e íleo em animais com mucosite intestinal tratados com o sildenafil;
- Avaliar a integridade do epitélio ileal por meio dos parâmetros de análise de resistência transepitelial (RETE) e permeabilidade em animais tratados com o sildenafil em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*) com massa corpórea variando entre 25-30 gramas, procedentes do Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará (UFC) do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Todos os animais foram mantidos em condições adequadas de luz (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e temperatura (constantes de temperatura equivalente a 26 ± 1 °C), acondicionados em caixas plásticas de polipropileno (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 17 cm de altura) com maravalha, recebendo água filtrada e ração padrão *ad libitum* até a realização dos experimentos.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos e manipulação animal conforme regido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), criado em 2008 pela Lei nº 11.794/08 (Lei Arouca). O projeto também seguiu as diretrizes impostas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, aprovado sob protocolo de nº 6943011220 (ANEXO A).

4.2 Obtenção do inibidor de fosfodiesterase 5 – Sildenafil

O citrato de sildenafil foi cotado, solicitado e comprado pela empresa Sigma Aldrich. As doses utilizadas de 5, 10 e 25 mg/kg para a realização da curva dose-resposta foram escolhidas de acordo com Yildirim et al (2010) e Karakoyun et al (2011); e dissolvidas em veículo DMSO à 4%.

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Grupos Experimentais

Os camundongos *Swiss* machos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos principais (Salina, 5-FU + Veículo e 5-FU + sildenafil). O grupo 5-FU + sildenafil foram subdivididos em 3 grupos para análise de 3 doses (5, 10 e 25mg/kg) e escolha da melhor dose, totalizando 5 grupos (TABELA 2).

Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais

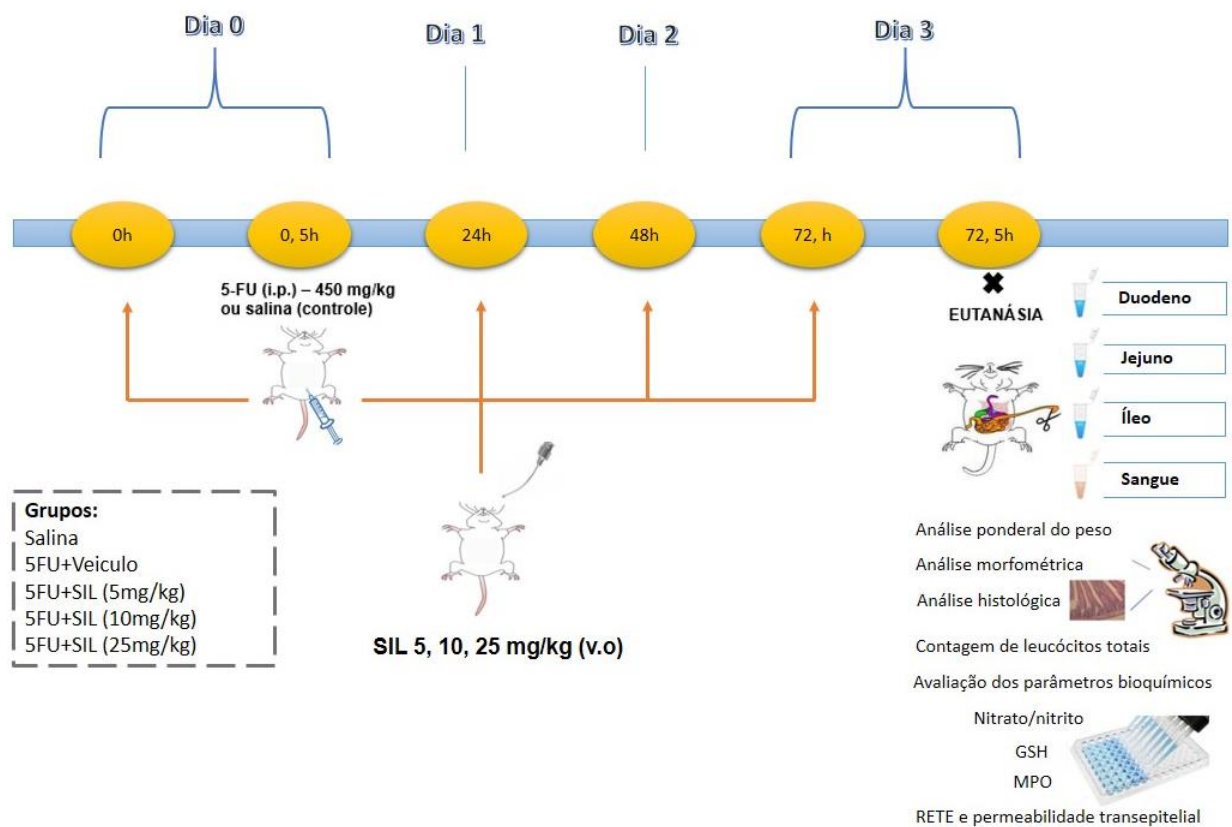
GRUPOS EXPERIMENTAIS		
GRUPO	DESCRIÇÃO	(n) ANIMAIS
Salina	Controle negativo em que foi administrado salina (NaCl 0,9% i.p), tratados com salina (gavagem durante 3 dias) e eutanasiados no terceiro dia experimental.	6
5FU+veículo	Animais em que foi administrado 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p., dose única), tratados com o veículo (DMSO 4% durante 3 dias) e eutanasiados no terceiro dia experimental.	6
5FU+sildenafil (5mg/kg)	Animais em que foi administrado 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p., dose única), tratados com sildenafil (5mg/kg, gavagem, durante 3 dias) e eutanasiados no terceiro dia experimental.	6
5FU+sildenafil (10mg/kg)	Animais em que foi administrado 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p., dose única) e tratados com sildenafil (10mg/kg, gavagem, durante 3 dias) e eutanasiados no terceiro dia experimental.	6
5FU+sildenafil (25mg/kg)	Animais em que foi administrado 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p., dose única), tratados com sildenafil (25mg/kg, gavagem, durante 3 dias) e eutanasiados no terceiro dia experimental.	6

4.3.2 Administração do 5-Fluorouracil e tratamento com sildenafil.

Os animais foram pré-tratados com DMSO 4% (50µL v.o) ou sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) nas doses de 5, 10 e 25mg/kg (50µL v.o). Em seguida, os animais foram tratados com uma dose única intraperitoneal de salina no grupo controle negativo e 5-FU (450 mg/kg) para a indução da mucosite intestinal nos grupos 5-FU + veículo e 5-FU + sildenafil. Os animais foram tratados 24, 48 e 72 horas após indução da mucosite intestinal com o sildenafil nas três doses mencionadas acima. Enquanto, os animais do grupo controle negativo receberam apenas salina (v.o). Esses animais foram pesados diariamente e eutanasiados no 3º dia (fase inflamatória), trinta minutos após o último tratamento com salina, DMSO 4% ou

sildenafil. Parte dos segmentos foram armazenadas no freezer -80°C para avaliações bioquímicas dos parâmetros de estresse oxidativo (glutaciona e nitrato/nitrito) a fim de obter a escolha da melhor dose nos três segmentos intestinais. Em seguida, com a melhor dose escolhida, foram realizados os seguintes testes: Análise histopatológica e morfométrica, na qual as amostras foram coletadas, mantidas em formol e posteriormente conservados em álcool 70%. Foi realizado, também, a leucopenia através da coleta de sangue pelo plexo retro-orbital dos camundongos, ensaio de mieloperoxidase do duodeno, jejuno e íleo e a análise funcional do tecido ileal por meio dos parâmetros de análise de resistência transepitelial (RETE) e permeabilidade.

Figura 10 – Desenho Experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 *Análise ponderal*

Um importante fenômeno no curso da mucosite é a perda de peso que pode ser decorrente de diarreia, caracterizada pelo desequilíbrio entre absorção e secreção no intestino. No intuito de avaliar a perda ou o ganho de peso dos animais nos grupos experimentais, durante os 3 dias que correspondem ao curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU, os animais foram pesados e ao final foi montada uma curva ponderal em porcentagem, considerando o peso inicial como 100%.

4.3.4 *Consumo de glutathiona reduzida (GSH)*

Com o objetivo de determinar a concentração dos níveis de grupos sulfidrílicos não-proteicos, as amostras dos segmentos duodeno, jejuno e íleo (40 a 50 mg) foram homogeneizadas em 1 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 µl do homogenato foram misturadas em 320 µl de H₂O destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação das proteínas. Em seguida o material foi centrifugado por 15 minutos em rotação de 3000 rpm à uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, novas alíquotas de 400 µl do sobrenadante foram misturadas com 800 µl de tampão TRIS com concentração de 0,4 M, pH 8.9 e com 20 µl 5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic acid (DTNB) e agitadas por 3 minutos. A absorbância foi determinada a 412 nm contra um reagente branco (ausência de homogenato) em espectrofotômetro. A concentração de GSH foi expressa µg/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.3.5 *Dosagem de nitrato/nitrito*

A dosagem de nitrito foi determinada nos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo congelados no freezer à -80°C e, foi obtida, sendo um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NO₂ / NO₃) no intestino através da concentração total nas amostras determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando placa de Elisa em 560 nm (Green et al. 1981). Os resultados foram expressos em micromoles.

4.3.6 *Análise morfométrica e histopatológica*

As amostras dos segmentos duodeno, jejuno e íleo dos animais salina, 5-FU + DMSO 4% e 5-FU + SIL 25mg/kg foram coletadas e fixadas em formol a 10%. Após 24 horas, os segmentos foram conservados em álcool 70% e posteriormente embebidos em parafina. Em seguida, foram cortados em seções de 5 µm com auxílio de um micrótomo e corados com hematoxilina-eosina. A seguir, com o auxílio de um microscópio ótico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilos e as profundidades de 10 criptas de cada lâmina para cálculo da razão vilos/cripta. As lâminas foram avaliadas por um histopatologista (PMGS) que não conhecia os tratamentos realizados utilizando os critérios histopatológicos descrito por MacPherson e Pfeiffer (1978) como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Critérios histopatológicos

ESCORES	ACHADOS MICROSCÓPICOS
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.
3	Mucosa: Vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrofílico.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor baseada na literatura descrita por MacPherson e Pfeiffer (1978).

4.3.7 *Leucograma*

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para coleta do sangue do plexo retro-orbital. O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado a partir da diluição com solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana

0,2%). A contagem dos leucócitos plasmáticos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso de microscópio ótico (100X) e um contador automático de células (Coulter Ac.T). A avaliação das amostras foi realizada através de um estudo cego por um biomédico experiente (P.R.P.F.). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contados nos quatro campos da câmara de Neubauer e posteriormente multiplicados pelo fator de correção da câmara. Por fim, os valores foram expressos como n^o células/mm³ (SOARES et al., 2008).

4.3.8 Determinação da atividade de mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares (KLEBANOFF, 2005) e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos, incluindo o trato gastrointestinal (GENOVESE, 2006).

Foram utilizados de 40 a 50 mg dos segmentos duodeno, jejuno e íleo. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (pH 6,0; 50 mg de tecido por mL de tampão) e em seguida foram maceradas com um homogeneizador de tecidos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 10 minutos, a uma temperatura de 4 °C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley et al (1982) utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio e o-dianisidina como substrato para a MPO. A medida de atividade de MPO baseou-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de H₂O₂, evidenciada pela mudança de absorbância medida a 450 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo BioMate 3S). Ânion superóxido é produzido à medida que ocorre degradação do peróxido de hidrogênio que é responsável por converter o-dianisidina em composto de cor marrom. Uma unidade de MPO será definida como aquela capaz de converter 1 µM de peróxido de hidrogênio à água em 1 minuto a 22 °C. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/ mg de tecido.

4.3.9 Dissecação ileal

Os animais foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma solução de Quetamina (100mg/Kg) + Xilazina (10mg/Kg) e eutanasiados por exsanguinação através de secção da aorta abdominal. Em seguida, realizou-se a identificação do íleo, dissecação e remoção

do mesmo que foi colocado numa placa de Petri com solução de Krebs fria (NaCl 116,25mM + MgCl₂ 6H₂O 1,2mM + NaHCO₃ 25 mM + CaCl₂ 2H₂O 1,25 mM + KH₂PO₄•2H₂O 2 mM + Glicose 11 mM). A porção serosa rente à camada muscular foi removida e, assim, foi utilizada uma Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems) para a identificação das porções, o que se procedeu com a realização de cortes adequados para análises de permeabilidade e resistência na Câmara de Ussing.

4.3.10 Resistência transepitelial

Após dissecada, a porção do íleo foi imediatamente montada numa Câmara de Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) adaptada, com a região da comissura anterior exatamente no orifício de 0.017 cm² do adaptador. Todas as câmaras de Ussing com os tecidos foram preenchidas com 3.5 ml de solução de Krebs (NaCl 116,25 mM + MgCl₂ 6H₂O 1,2 mM + NaHCO₃ 25 mM + CaCl₂ 2H₂O 1,25 mM + KH₂PO₄ 2H₂O 2 mM + Glicose 11 mM) com pH 7,4 para registrar a resistência transepitelial basal, calculada de acordo com a lei de Ohm através das alterações de voltagem induzidas por pulsos de corrente bipolares de 50 µA, duração de 200 milissegundos a cada 6 segundos, aplicada através de fios de platina. Todos os experimentos foram realizados em circuitos abertos.

Após um período para equilíbrio (cerca de 30 minutos) e registro da resistência basal, a RETE foi, então, continuamente gravada em 30 minutos e expressa em Ω cm².

4.3.11 Permeabilidade transepitelial

Para avaliação da permeabilidade transepitelial ileal, a RETE se registrou por 60 minutos, de acordo com metodologia descrita para a medida de RETE. Em seguida a solução do lado luminal foi substituída por solução de fluoresceína 1 mg/mL. Uma amostra de 100 µL foi retirada do lado seroso da câmara nos tempos 0, 1, 30, 60 e 90 minutos. A mesma quantidade de solução também foi retirada a cada intervalo de tempo do lado mucoso a fim de manter equilibrado o volume nos dois lados da câmara. Durante todo o período de utilização da solução de fluoresceína, o ambiente se manteve escuro para evitar degradação da mesma. A permeabilidade do tecido à fluoresceína se calculou a partir da medida de fluoresceína na amostra, mediante uso de um fluorímetro (Fluostar optima, BMG labtech. Ontemberg, Germany) e expresso na forma de razão de intensidade de fluorescência, dividindo-se a intensidade de fluorescência em cada tempo pela intensidade de fluorescência no tempo inicial.

4.4 Análise estatística

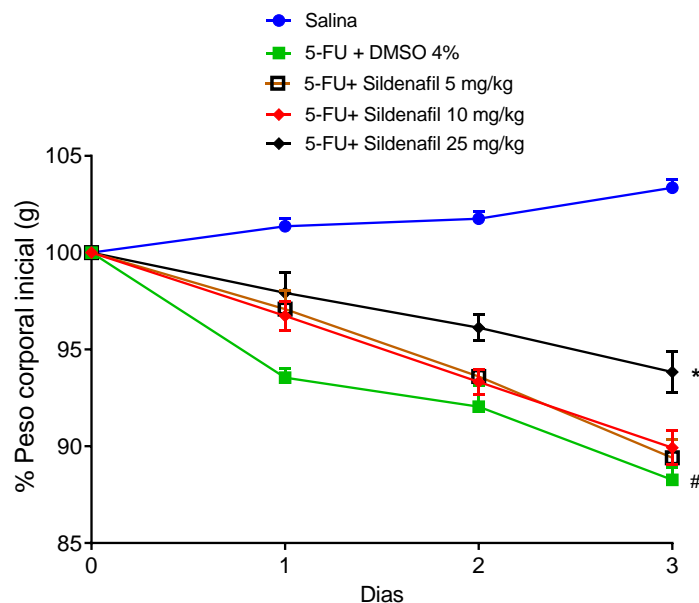
Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação entre os grupos experimentais foi utilizada a análise de variância univariada (One way-ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os gráficos foram plotados e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 9.0, sendo consideradas diferenças significativas quando o valor de p apresentou-se inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com o sildenafil na variação de peso corporal dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A Figura 11 demonstra que a indução da mucosite intestinal é caracterizada por uma mudança significativa de peso corporal. O 5-FU + veículo promoveram uma perda ponderal significativa 24 horas após a indução ($93,54 \pm 0,49\%$) que perdurou até o terceiro dia ($88,26 \pm 0,65\%$), quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina. Os animais tratados com 5-FU + sildenafil na dose de 25 mg/kg tiveram perda de peso, significativamente, reduzida no primeiro dia ($97,14 \pm 0,76\%$), segundo dia ($96,12 \pm 0,67\%$) e terceiro dia ($93,83 \pm 1,06\%$) em relação ao grupo tratado somente com 5-FU+veículo. As doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg não obtiveram resultados significativos. Observou-se ganho de peso corporal no grupo salina que ocorreu durante todo o período experimental, sendo o ganho máximo no terceiro dia de 3,4%, quando comparado ao primeiro dia. O grupo 5-FU+veículo teve uma perda de peso de cerca de 11,74% no último dia do experimento em relação ao primeiro dia, enquanto o grupo 5-FU + sildenafil teve uma perda de peso total de apenas 6,17%.

Figura 11 – Efeito do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) na variação de peso corporal nos grupos experimentais.



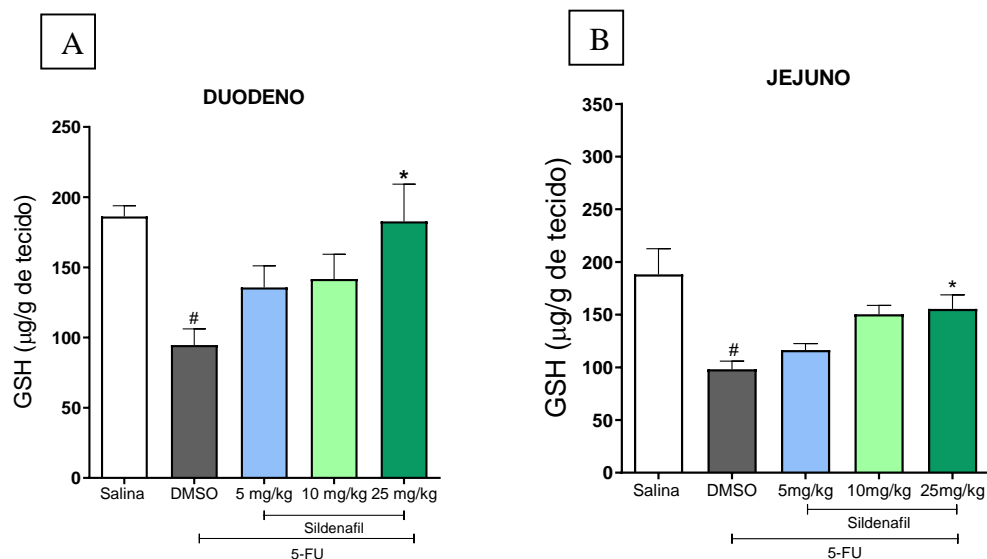
Os animais foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 5, 10 e 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados com

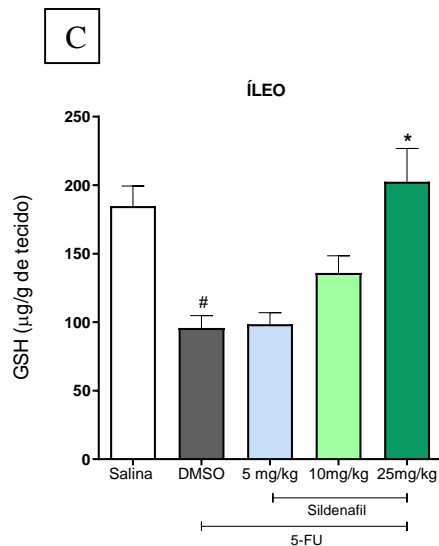
sildenafil durante 3 dias. Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparados com o grupo 5-FU + veículo, # $p < 0,05$ comparados ao grupo salina, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

5.2 Efeito do tratamento com o sildenafil no consumo de GSH nos segmentos intestinais após indução do modelo de mucosite intestinal.

A Figura 12 ilustra que a administração de 5-FU induz um consumo significativo ($p < 0,05$) de glutatona reduzida no duodeno (12A) ($94,64 \pm 11,51 \mu\text{g/g}$) no jejuno (12B) ($114,7 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$) e no íleo (12C) ($95,76 \pm 9,01 \mu\text{g/g}$) ao comparar com os segmentos dos animais do grupo controle salina (duodeno: $186,2 \pm 7,6 \mu\text{g/g}$, jejuno: $252,8 \pm 57,45 \mu\text{g/g}$ e íleo: $184,8 \pm 14,64 \mu\text{g/g}$). O tratamento com 5-FU+sildenafil impediu o consumo de glutatona no duodeno na dose de 25mg/kg ($182,7 \pm 26,53 \mu\text{g/g}$), no jejuno ($155,4 \pm 13,43 \mu\text{g/g}$), e no íleo a dose de 25mg/kg também se configurou como a melhor ($202,5 \pm 24,32 \mu\text{g/g}$), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU+veículo.

Figura 12- Sildenafil evita o consumo de glutatona reduzida em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.



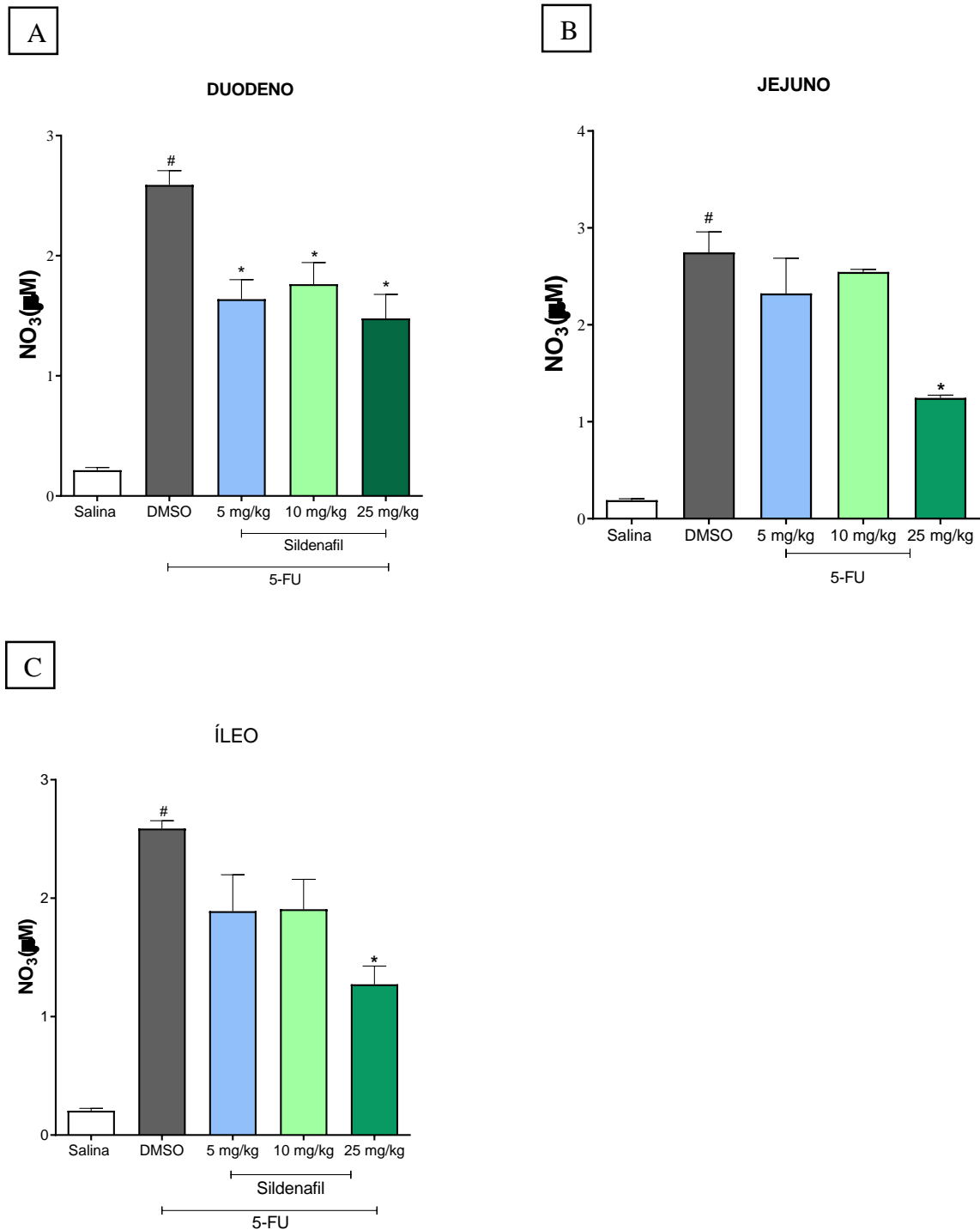


Os animais foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 5, 10 e 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e eutanasiados no terceiro dia para coleta dos segmentos duodeno (12A), jejuno (12B) e íleo (12C) para realização do ensaio de GSH. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). $\# < p < 0.05$ quando comparado ao grupo salina e $*p < 0.05$ quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.3 Efeito do sildenafil no aumento das concentrações de nitrito nos segmentos intestinais após indução da mucosite.

Na figura 13, observou-se que no duodeno, jejuno e íleo dos animais que receberam somente 5-FU e veículo, houve um aumento significativo das concentrações de nitrito no duodeno (13A) $2,590 \pm 0,11 \mu\text{M}$, jejuno (13B) $2,748 \pm 0,21 \mu\text{M}$ e no íleo (13C) $2,588 \pm 0,06 \mu\text{M}$, quando comparados ao grupo de animais salina (duodeno: $0,213 \pm 0,023 \mu\text{M}$; jejuno: $0,19 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e íleo: $0,205 \pm 0,02 \mu\text{M}$). O tratamento com SIL reduziu significativamente com a dose de 5 mg/kg apenas no duodeno ($1,638 \pm 0,16 \mu\text{M}$) e a dose de 10 mg/kg também reduziu apenas no duodeno ($1,764 \pm 0,18 \mu\text{M}$), enquanto na dose de 25 mg/kg houve uma redução significativa no duodeno ($1,478 \pm 0,20 \mu\text{M}$), jejuno ($1,245 \pm 0,02 \mu\text{M}$) e íleo ($1,273 \pm 0,15 \mu\text{M}$), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU+veículo. Sendo assim, a melhor dose-resposta nos segmentos intestinais foi a de 25mg/kg.

Figura 13- Sildenafil reduz os níveis de nitrito nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.



Os animais foram pré-tratados com Sildenafil nas doses de 5, 10 e 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e eutanasiados no terceiro dia para coleta dos segmentos duodeno (13A), jejunum (13B) e íleo (13C) para

realização do ensaio de nitrato/nitrito. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). Significância # p < 0.05 quando comparado ao grupo salina e *p < 0.05 quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.4 Efeito do sildenafil na análise histopatológica da lesão intestinal induzida por 5-FU.

Após a escolha da melhor dose, a partir dos testes de parâmetros de estresse oxidativo, foram realizados os demais experimentos. Conforme apresentado na tabela 4, os escores histopatológicos evidenciam que os animais que receberam somente salina apresentaram mucosa e camada muscular normais nos segmentos do duodeno, jejuno e íleo. O grupo que recebeu 5-FU+veículo apresentou mucosa com vilos encurtados e células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema, mas a camada muscular encontrou-se normal, o que conferiu um escore superior, quando comparado ao grupo salina. Já o grupo que recebeu o tratamento com sildenafil na dose de 25 mg/kg (5-FU+SIL 25 mg/kg) apresentou uma melhora significativa nos escores histopatológicos.

Tabela 4 - Escores histopatológicos dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados ou não com sildenafil.

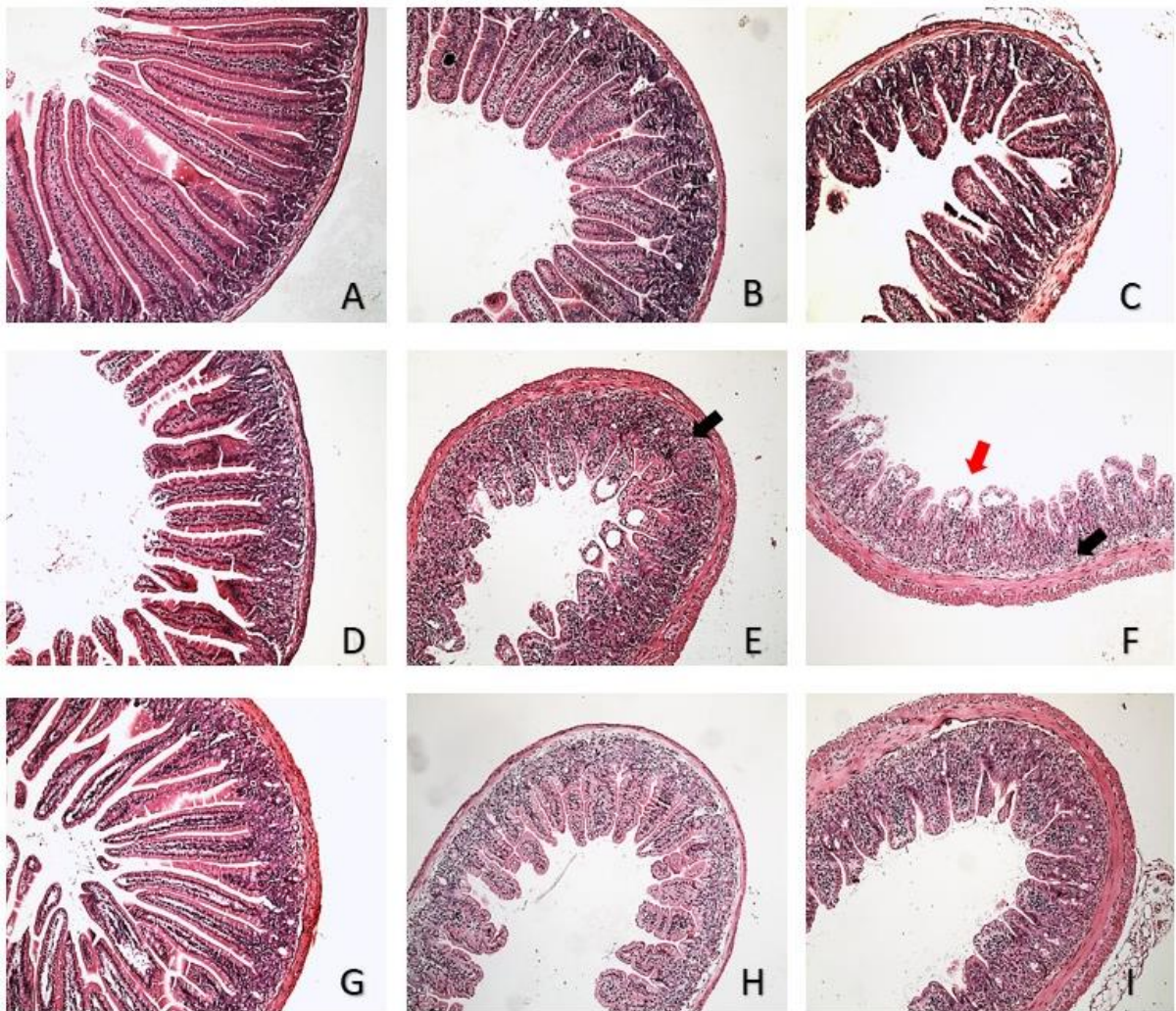
GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=6)	ESCORES		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Salina	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
5-FU+veículo	1 [#] (0-2)	2 [#] (1-3)	2 [#] (1-3)
5-FU+SIL 25 mg/kg	0* (0-1)	1* (0-1)	0* (0-1)

Os valores representam a média \pm E.P.M. # p<0,05 quando comparado ao grupo salina e * p<0,05 quando comparado ao grupo 5-FU + veículo. ANOVA e teste de Bonferroni.

Observou-se que o 5-FU promoveu uma redução da relação vilo-cripta em todos os segmentos intestinais (Fig 14 – D, E, F), quando comparados ao grupo salina (Fig 14 – A, B, C). Verificou-se, também, nas fotomicrografias do duodeno, jejuno e íleo (Fig 14 – D, E, F), respectivamente, a presença de células polimorfonucleares, caracterizando a infiltração neutrofílica *versus* o grupo salina (Fig 14 – A, B, C). Observou-se que o tratamento de 5-

5-FU+sildenafil 25 mg/kg atenuou essas alterações induzidas por 5-FU, no duodeno (Fig 14 – G), no jejunum (Fig 14 – H) e no íleo (Fig 14 – I).

Figura 14 – Fotomicrografias de amostras dos segmentos duodeno, jejunum e íleo após a administração do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.



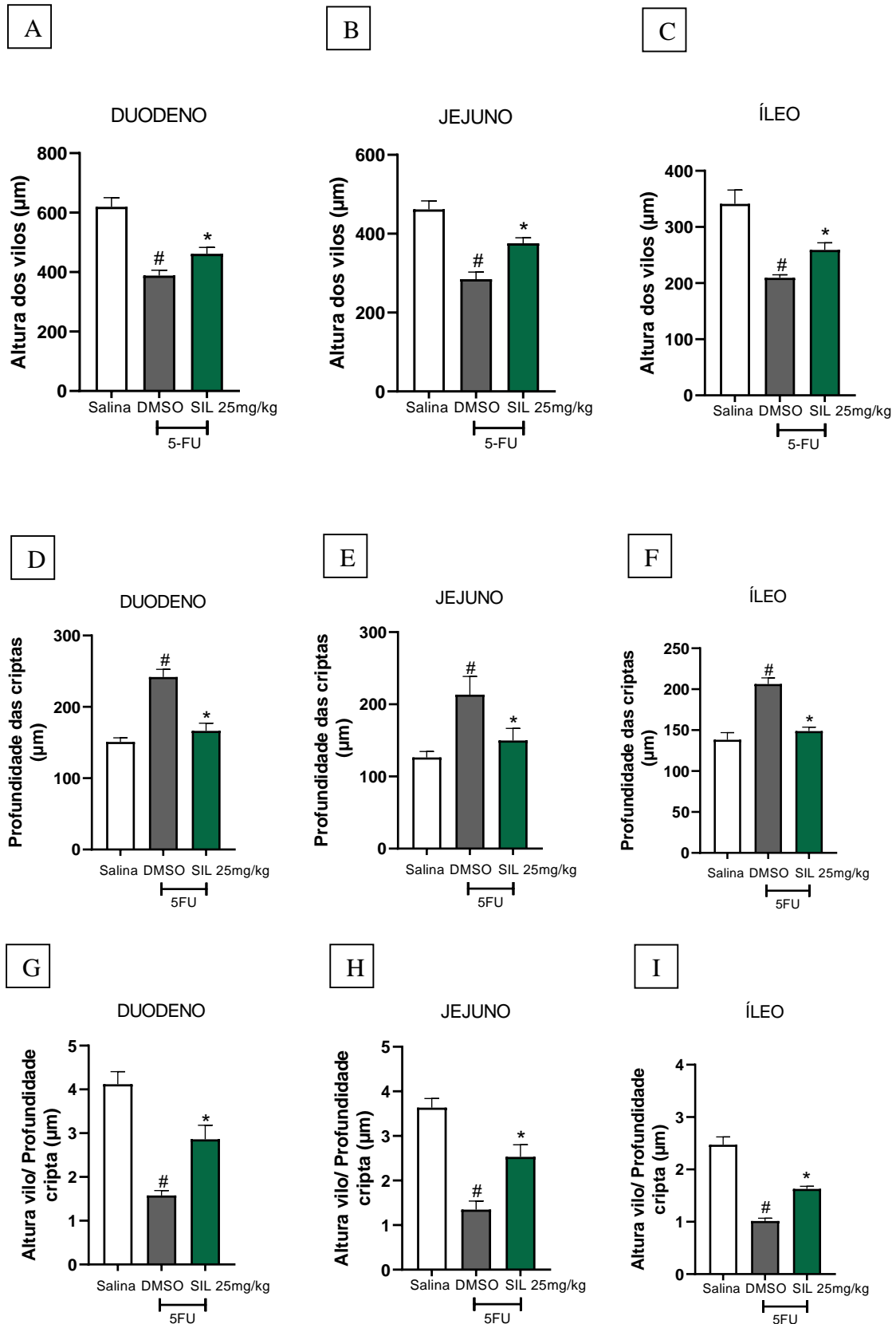
Fotomicrografias (40x) do duodeno, jejunum e íleo de camundongos tratados com salina (A, D, G), 5-FU+veículo (B, E, H) e 5-FU+SIL 25 mg/kg (C, F, I). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SIL 25 mg/kg (C, F, I) atenuaram o encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas induzidos por 5-FU+veículo (B, E, H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SIL (C, F, I) atenuaram o intenso infiltrado inflamatório e vacuolização, induzido por 5-FU. A – salina duodeno; B- salina jejunum; C- salina íleo; D – 5FU+veículo duodeno; E - 5FU+veículo jejunum; F - 5FU+veículo íleo; G- 5FU+SIL duodeno; H - 5FU+SIL jejunum; I - 5FU+SIL íleo; Destruição da arquitetura dos vilos e criptas (seta vermelha); Infiltrado inflamatório (setas pretas). Aumento 40x.

5.5 Efeito do sildenafil nas alterações intestinais morfométricas induzidas por 5-FU.

A figura 15 demonstra que o 5-FU induziu uma diminuição significativa na altura dos vilos dos segmentos duodeno ($388 \pm 9,165 \mu\text{m}$), jejuno ($284,7 \pm 9,1 \mu\text{m}$) e íleo ($209,4 \pm 2,77 \mu\text{m}$); causou um aumento na profundidade das criptas, também, no duodeno ($241,9 \pm 4,772$), jejuno ($213,5 \pm 12,63 \mu\text{m}$) e íleo ($206,4 \pm 3,790 \mu\text{m}$), quando comparados aos grupos controles dos segmentos tanto na altura dos vilos (duodeno: $619,9 \pm 17,43 \mu\text{m}$; jejuno: $461,7 \pm 10,76 \mu\text{m}$; íleo: $341,3 \pm 11,0 \mu\text{m}$) como na profundidade das criptas (duodeno: $150,8 \pm 3,364 \mu\text{m}$; jejuno: $126,4 \pm 3,341 \mu\text{m}$ e íleo: $138,3 \pm 3,909 \mu\text{m}$). Consequentemente, houve uma redução da relação vilo/cripta no grupo 5-FU+veículo (duodeno: $1,57 \pm 0,05 \mu\text{m}$; jejuno: $1,35 \pm 0,09 \mu\text{m}$ e íleo: $1,016 \pm 0,02 \mu\text{m}$) ao comparar com o grupo salina (duodeno: $4,117 \pm 0,16 \mu\text{m}$; jejuno: $3,637 \pm 0,091 \mu\text{m}$ e íleo: $2,471 \pm 0,069 \mu\text{m}$).

Observou-se que o tratamento com sildenafil foi capaz de impedir a diminuição da altura dos vilos (duodeno: $461,9 \pm 10,73 \mu\text{m}$; jejuno: $375,8 \pm 6,857 \mu\text{m}$ e íleo: $259,3 \pm 6,254 \mu\text{m}$), o aumento profundidade das criptas (duodeno: $166,4 \pm 4,79 \mu\text{m}$; jejuno: $149,9 \pm 8,339 \mu\text{m}$ e íleo: $148,9 \pm 2,104 \mu\text{m}$) e a diminuição da relação vilo/cripta (duodeno: $2,862 \pm 0,14 \mu\text{m}$; jejuno: $2,53 \pm 0,136 \mu\text{m}$ e íleo: $1,629 \pm 0,0249 \mu\text{m}$), quando comparados ao grupo 5-FU+veículo.

Figura 15 – Efeito do tratamento com sildenafil (inibidor de fosfodiesterase tipo 5) nas alterações morfométricas nos segmentos intestinais induzidas por 5-FU em camundongos.

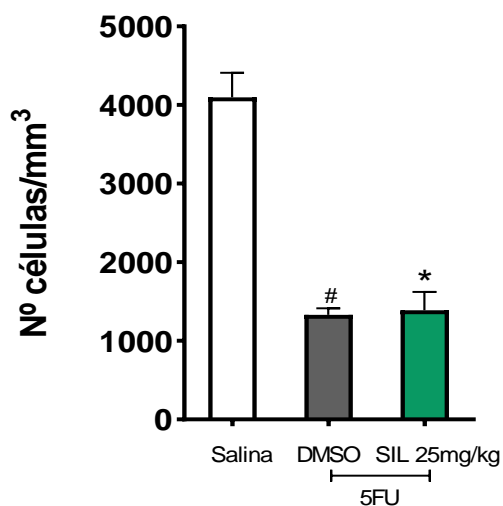


Os animais foram pré-tratados com sildenafil na dose de 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e eutanasiados no terceiro dia para coleta dos segmentos duodeno, jejuno e íleo para realização da análise morfométrica. Esses segmentos foram obtidos para a medida da altura dos vilos (15A, 15B e 15C), profundidade das criptas (15D, 15E e 15F) e razão vilo/cripta (15G, 15H e 15I). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). Significância #< p 0.05 quando comparado ao grupo salina e *p < 0.05 quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.6 Efeito do tratamento com o sildenafil sobre a leucopenia induzida por 5-FU em camundongos.

Conforme demonstrado na figura 16, a administração do 5-FU+veículo (1331 \pm 83,77 células/mm³) induziu significativamente leucopenia nos camundongos, quando comparados com o grupo salina (4100 \pm 308,4 células/mm³). O tratamento com sildenafil na dose de 25 mg/kg (1388 \pm 233,7 células/mm³) não modificou de maneira significativa a leucopenia ocasionada pelo 5-FU.

Figura 16 – Efeito do sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) na leucopenia induzida por 5-FU em camundongos.



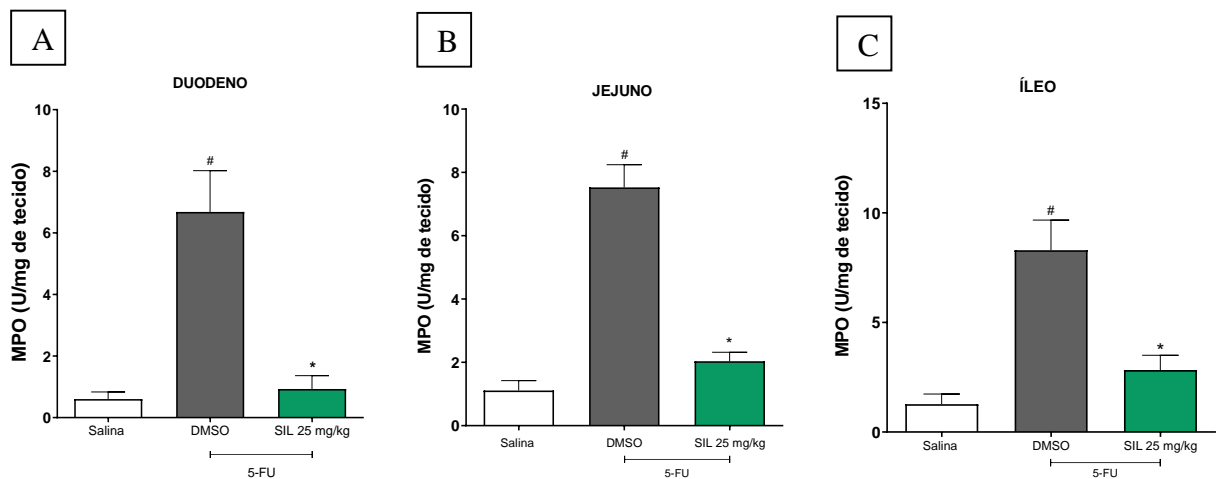
Os animais foram pré-tratados com sildenafil na dose de 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para coleta do sangue do plexo retro-orbital. Para realização do leucograma, em seguida foram eutanasiados. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 6).

Significância #< p 0.05 quando comparado ao grupo salina e *p < 0.05 quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.7 Efeito do sildenafil no aumento da atividade de mieloperoxidase após indução da mucosite intestinal.

A Figura 17 demonstra que a administração de 5-FU induz um aumento significativo ($p < 0,05$) da infiltração neutrofílica no duodeno (17A) ($6,67 \pm 1,3$ U/mg), jejuno (17B) ($7,52 \pm 0,71$ U/mg) e íleo (17C) ($8,29 \pm 1,37$ U/mg), quando comparados aos segmentos dos animais do grupo controle (duodeno: $0,60 \pm 0,2$ U/mg; jejuno $1,10 \pm 0,31$ U/mg e íleo: $1,27 \pm 0,46$ U/mg). O tratamento com 5-FU + sildenafil 25 mg/kg quando comparados ao grupo em que foi induzido a mucosite reduziu a infiltração neutrofílica no duodeno ($0,92 \pm 0,43$ U/mg), no jejuno ($2,036 \pm 0,28$ U/mg) e no íleo ($2,82 \pm 0,67$ U/mg).

Figura 17 – Sildenafil reduz a atividade de MPO em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.



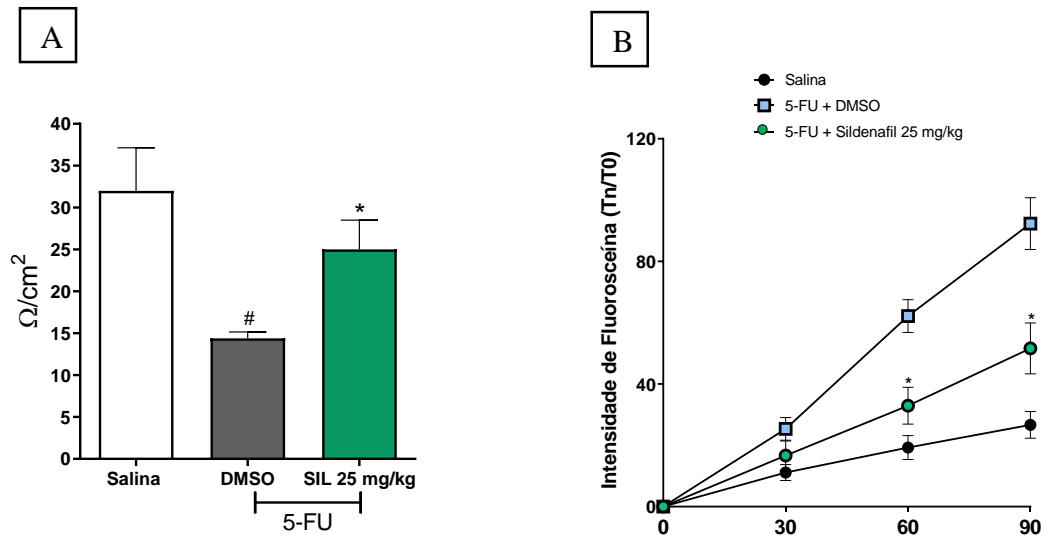
Os animais foram pré-tratados com sildenafil na dose de 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e eutanasiados no terceiro dia para coleta dos segmentos duodeno (17A), jejuno (17B) e íleo (17C) para realização do ensaio de MPO. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6). Significância #< p 0.05 quando comparado ao grupo salina e *p < 0.05 quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

5.8 Efeitos do sildenafil na resistência elétrica (RETE) e permeabilidade da mucosa ileal.

Conforme mostrado na figura 18A, a RETE da mucosa ileal do grupo salina foi de $32,0 \pm 5,141 \Omega/\text{cm}^2$ e $14,4 \pm 0,75 \Omega/\text{cm}^2$ no grupo 5-FU+veículo. O valor do RETE na mucosa do íleo 5FU+SIL 25mg/kg foi de $25,0 \pm 3,512 \Omega/\text{cm}^2$. Assim, observa-se que os achados demonstraram que a resistência elétrica transepitelial do íleo dos animais com mucosite intestinal foi reduzida, quando comparado com o grupo salina e, que o tratamento com sildenafil protegeu a função da integridade da barreira.

Conforme demonstrado na figura 18B, o grupo 5FU+veículo teve um aumento significativo na permeabilidade da mucosa do íleo em 30 minutos ($25,40 \pm 3,697 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$), em 60 minutos ($62,2 \pm 5,375 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) e 90 minutos ($92,33 \pm 8,453 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$), em relação ao grupo salina (30min: $11,13 \pm 2,601 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$; 60min: $19,26 \pm 3,904 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$; 90min: $26,65 \pm 4,351 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Por outro lado, a permeabilidade da mucosa do grupo tratado com sildenafil em 60 minutos ($32,93 \pm 6,013 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) e 90 minutos ($51,63 \pm 8,295 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) foi significativamente inferior ao grupo 5FU+veículo. Nenhuma diferença estatística foi identificada na permeabilidade da mucosa entre o grupo salina e o grupo 5-FU tratado com sildenafil.

Figura 18- Efeito do tratamento com o sildenafil (inibidor de fosfodiesterase 5) na integridade da mucosa ileal dos camundongos com mucosite induzidos por 5-FU.



Os animais foram pré-tratados com Sildenafil na dose de 25mg/kg e receberam uma dose única intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg.), trinta minutos após o pré tratamento. Em seguida foram tratados durante 3 dias e eutanasiados no terceiro dia para coleta e dissecação do íleo para realização dos experimento de resistência (A) e permeabilidade (B). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. (n = 6). Significância # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo salina e * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo 5-FU + veículo, pelo ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

Com o intuito de se estudar o sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) na mucosite intestinal induzida pelo 5-Fluorouracil, o presente estudo demonstrou que a administração de 5-FU causou uma lesão, apresentando as seguintes alterações: Perda ponderal de peso durante a fase inflamatória da doença, aumento do consumo de GSH, aumento das concentrações de óxido nítrico (NO), alterações histológicas e morfométricas, leucopenia, aumento da atividade de MPO e alterações na integridade da mucosa ileal. Todas essas alterações foram revertidas pelo tratamento com o sildenafil que foi capaz de reduzir de forma significativa essas alterações causadas pelo 5-FU. Foram analisados os três segmentos intestinais em três doses diferentes: 5 mg/kg, 10 mg/kg e 25 mg/kg. Inicialmente, observou-se que a melhor dose na análise ponderal do peso e nos testes bioquímicos para parâmetros de estresse oxidativo foi a de 25mg/kg. Portanto, optou-se pela dose de 25mg/kg para a realização dos demais experimentos: histologia, morfometria, leucopenia, mensuração de MPO e; para a avaliação da integridade da mucosa optou-se também pela dose de 25mg/kg, mas apenas no segmento ileal.

O 5-FU produz um efeito colateral importante que é a presença de leucopenia. Esse é um efeito esperado que demonstra que o quimioterápico está exercendo sua função farmacologicamente adequada. Isso já foi descrito por membros do nosso grupo de pesquisa (JUSTINO et al., 2015; QUARESMA et al., 2019; SOARES et al., 2008). O tratamento com sildenafil não alterou o curso da leucopenia, sugerindo que o inibidor de PDE-5 não interfere na ação farmacológica do 5-FU, quando se refere a contagem de leucócitos.

Efeitos protetores do pré-tratamento com o sildenafil já foram observados anteriormente em lesões intestinais. Soydan et al. (2009), demonstraram que o pré-tratamento com o sildenafil impediu que a isquemia promovesse o comprometimento das respostas de acetilcolina que poderia levar à dismotilidade e prejuízos vasculares. Foi sugerido, também, que o sildenafil induza mediadores endógenos que trabalhem para aumentar a produção de óxido nítrico, que, então ativa a guanilato ciclase para aumentar os níveis cíclicos de GMP. Elevações nesses níveis podem então trabalhar na vasodilatação do leito vascular do órgão (RAKESH C et al., 2005). Apesar de alguns relatos demonstrarem o efeito protetor do sildenafil em modelos de lesões inflamatórias (LIN et al., 2017), o potencial protetor deste medicamento, contra inflamação em camundongos com mucosite induzida por 5-FU, não foi relatado até o momento.

Estudos prévios em camundongos demonstraram que a administração de 5-FU induz a mucosite intestinal, sendo caracterizada por sintomas sistêmicos como diarreia e consequente

perda de peso (BENSON *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Isso porque a presença de inflamação intestinal resulta em prejuízos na função da barreira intestinal, uma vez que o aumento de radicais livres leva a ruptura das junções firmes e fosforilação da miosina em enterócitos (WU *et al.*, 2011). Além disso, citocinas pró-inflamatórias, também, promovem aumento da permeabilidade intestinal, dificultando a absorção de nutrientes que conseqüentemente influencia na perda de peso (SUZUKI, 2013). Nesse estudo, observou-se que houve perda de peso corporal dos animais tratados somente com 5-FU+veículo (11,74%) possivelmente devido à ativação de respostas inflamatórias. Logo, esse quadro justifica a menor capacidade de absorção do intestino, levando os animais a um quadro de desnutrição. Destacamos que àqueles que receberam 5-FU +sildenafil na dose de 25mg/kg obtiveram uma perda de peso menos acentuada (6,17%). Margonis *et al.*, 2015 também observou um ganho de peso em ratos nos quais foram induzidos colite por TNBS e tratados com sildenafil.

Estudos prévios em camundongos demonstraram que a administração de 5-FU induz a mucosite intestinal, sendo caracterizada, histologicamente, por encurtamento de vilosidades e destruição de criptas intestinais (BENSON *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Sabe-se que a lesão epitelial, associada à utilização de antineoplásicos, geralmente, é marcada pela infiltração neutrofílica, estando presente na mucosa intestinal que caracteriza a fase inflamatória (SONIS, 2004). Observou-se em nossos estudos que o tratamento com sildenafil reduziu os danos histológicos, reduzindo a infiltração de neutrófilos e preservando a relação vilosidade/cripta. Esses achados vão de acordo com o que foi demonstrado por MOORE *et al.*, (2020) que, também, evidenciaram uma melhora nos escores histológicos de lesões intestinais em modelo de isquemia mesentérica aguda. Estudos também demonstraram que o sildenafil possui esse efeito de propriedades protetoras epiteliais específicas. Em um modelo de lesão pulmonar aguda foi visto que o sildenafil diminuiu o dano oxidativo e a apoptose independente dessa sua propriedade (KOSUTOVA *et al.*, 2019).

A atividade da enzima mieloperoxidase é um parâmetro que tem sido amplamente utilizado para marcar de maneira indireta o quantitativo de infiltrado de polimorfonucleares no processo inflamatório em diversos tecidos, incluindo o trato gastrointestinal (JUSTINO *et al.*, 2015). Foi identificado um aumento da atividade da mieloperoxidase no grupo em que foi administrado 5-FU+Veículo e uma atividade reduzida nos animais que foram tratados com SIL, reforçando a ideia proposta por Justino *et al.* (2015) em que a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos azurófilos catalisa a formação de um poderoso ácido oxidante que pode culminar em danos no DNA, proteínas e lipídeos. Além de agir no endotélio vascular,

promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento da permeabilidade vascular e aumento da adesão de neutrófilos. Esses resultados corroboram com os achados da literatura, pois foi visto que o sildenafil foi capaz de reduzir a atividade da MPO em diversos modelos, incluindo a colite induzida por ácido acético (KHOSHAKHLAGH et al., 2007); em modelo lesão pulmonar e renal induzido em ratos (CARDICI et al., 2011); em modelo de fibrose pulmonar (YILDIRIM et al., 2010).

De acordo com a literatura, o 5-FU causa danos diretos na mucosa intestinal, culminando no aumento da produção de EROs e modificações no sistema de defesa antioxidante, levando a um quadro de estresse oxidativo (SONIS, 2004; SOARES et al., 2008; JUSTINO et al., 2014; JUSTINO et al., 2015; QUARESMA et al., 2019). O estresse oxidativo é marcado pelo desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade de sistemas antioxidantes induzindo graves danos às estruturas celulares, como lipídios de membranas, proteínas, DNA e RNA. Essa condição é consequência do aumento na produção EROs por diferentes vias metabólicas, e/ou da deficiência ou inatividade do sistema de proteção antioxidante (DA SILVA et al., 2020). A interrupção desse equilíbrio antioxidante na mucosa intestinal contribui significativamente para a patogênese de muitas doenças no TGI (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Avaliamos o consumo da glutathiona reduzida (GSH) que é um grupo sulfídrico não proteico que tem ação antioxidante, sendo essencial na proteção das células contra o estresse oxidativo e na multiplicação dos linfócitos (DANTAS, 2006); logo, o GSH é um marcador de estresse oxidativo que sofre alterações durante o curso da mucosite intestinal (QUARESMA et al., 2019), ou seja, o esgotamento dos níveis de GSH intracelular está presente concomitantemente com a presença de mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (SCHMITT et al., 2015). Estudos anteriores provaram que os antioxidantes inibem a ativação do NF- κ B e bloqueiam a expressão de citocinas inflamatórias (WANG et al., 2006). Observou-se, em nossos estudos, que a administração de sildenafil evitou o consumo de GSH nos segmentos duodeno, jejuno e íleo, quando comparados aos animais salina (controle), sugerindo uma redução do consumo de GSH, configurando seu efeito benéfico frente a mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Diversos estudos têm demonstrado esse efeito antioxidante do sildenafil em modelos de doenças inflamatórias. Laxmi et al., (2019) demonstrou em um modelo animal de asma brônquica que o sildenafil foi capaz de reduzir parâmetros de estresse oxidativo, tais como, MDA e aumentou os níveis de GSH no soro. Iordache et al., (2020) observou que o sildenafil evitou o consumo de GSH em modelo animal

de nefropatia, sugerindo que o sildenafil desencadeou a diminuição da superprodução de EROs.

Outro parâmetro utilizado para avaliar o estresse oxidativo foi o NO. O tratamento com sildenafil limitou os níveis de nitrato nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo. Esses dados estão correlacionados com os achados da literatura em que demonstra uma ação antioxidante do sildenafil mediado por esse parâmetro. Foi evidenciado por Kosutova et al., (2018) em seus estudos, o inibidor de fosfodiesterase 5 foi capaz de reduzir os níveis de nitrato/nitrito em modelo de lesão pulmonar aguda. Laxmi et al., (2019) demonstraram o mesmo efeito em modelo animal de asma brônquica. Além disso, Santos et al (2005), observaram que o sildenafil foi capaz de atuar através do mecanismo dependente de NO inibindo a gastropatia induzida por indometacina, possivelmente através de uma redução da adesão e manutenção de leucócitos no fluxo sanguíneo gástrico.

A evidência da diminuição de marcadores de estresse oxidativo ocasionados pelo sildenafil, fornecidos em nossos estudos, confirmam dados anteriores, indicando propriedades anti-inflamatórias. O AMPc e o GMPc controlam diversos processos celulares, como inflamação, sinais neuroendócrinos e degranulação de neutrófilos (LAXMI et al., 2019). O GMPc é sintetizado por guanilato ciclases solúveis e o sildenafil age como um antagonista de PDE-5, aumentando os níveis de GMPc e aumentando a sinalização de NO-GMPc. A ativação de guanilato ciclases solúveis e geração de GMPc medeiam os efeitos do NO. Além disso, NO sintase (NOS) é responsável pela formação do NO. O sildenafil também induz a expressão de mRNA de eNOS (ANDERSSON, 2018). Estudos demonstram que a produção de NO, a partir de eNOS em concentrações nanomolares, possuem atividade anti-inflamatória que pode está relacionada com a inibição do NF- κ B (AIZAWA et al., 2003). Em contrapartida, estudos demonstraram que o SIL inibiu a expressão de iNOS e produção de NO induzida por LPS em células microgliais primárias de ratos (ZHAO et al., 2011).

Durante o processo inflamatório que cursa a mucosite induzida por 5FU observa-se um aumento da permeabilidade intestinal e redução da RETE (DE BARROS *et al.*, 2018). Essa disfunção na barreira pode culminar em translocação microbiana, induzindo a inflamação (VANCAMELBEKE; VERMEIRE 2017). Em nossos achados observou-se que o sildenafil foi capaz de reverter esses parâmetros em ambos os testes de funcionalidade, evitando a disfunção da integridade da barreira. Porém, não há dados na literatura que associe o efeito do sildenafil sobre a permeabilidade intestinal e RETE. Sabe-se que fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , estresse celular, presença de patógenos, probióticos e peptídeos dietéticos têm ligação direta com a regulação da permeabilidade (VERDU, 2016; CAPALDO; NUSRAT

2009).

Embora a patologia da mucosite intestinal induzida por quimioterápico não seja totalmente elucidada, sabe-se da importante participação das citocinas, uma vez que estas regulam e ampliam a resposta imune, induzem lesão tecidual e medeiam complicações (SARTOR, 1994). Hamouda *et al.*, (2017) demonstraram que o 5-FU aumenta significativamente as citocinas pró- inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , IL-4 e IL-6, sendo provável que o TNF- α seja um mediador chave da apoptose em resposta a esse medicamento. Isso porque, os neutrófilos ativados, após dano tecidual, sinalizam para diversas citocinas que são cruciais nas respostas imunes inatas e adaptativas para a defesa do organismo (MANTOVANI *et al.*, 2011; MORTAZ *et al.*, 2018). Outros estudos demonstraram aumento de IL-1 β na mucosa intestinal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e em tecidos intestinais de animais submetidos à colite experimental (YANG *et al.*, 2017). Yan *et al.* (2006) demonstraram que a IL-1 β estimula a expressão de genes responsáveis pela produção de fatores inflamatórios em cultura de células epiteliais. Possivelmente, o aumento da expressão desses genes ocorre pela ação de NF-k β .

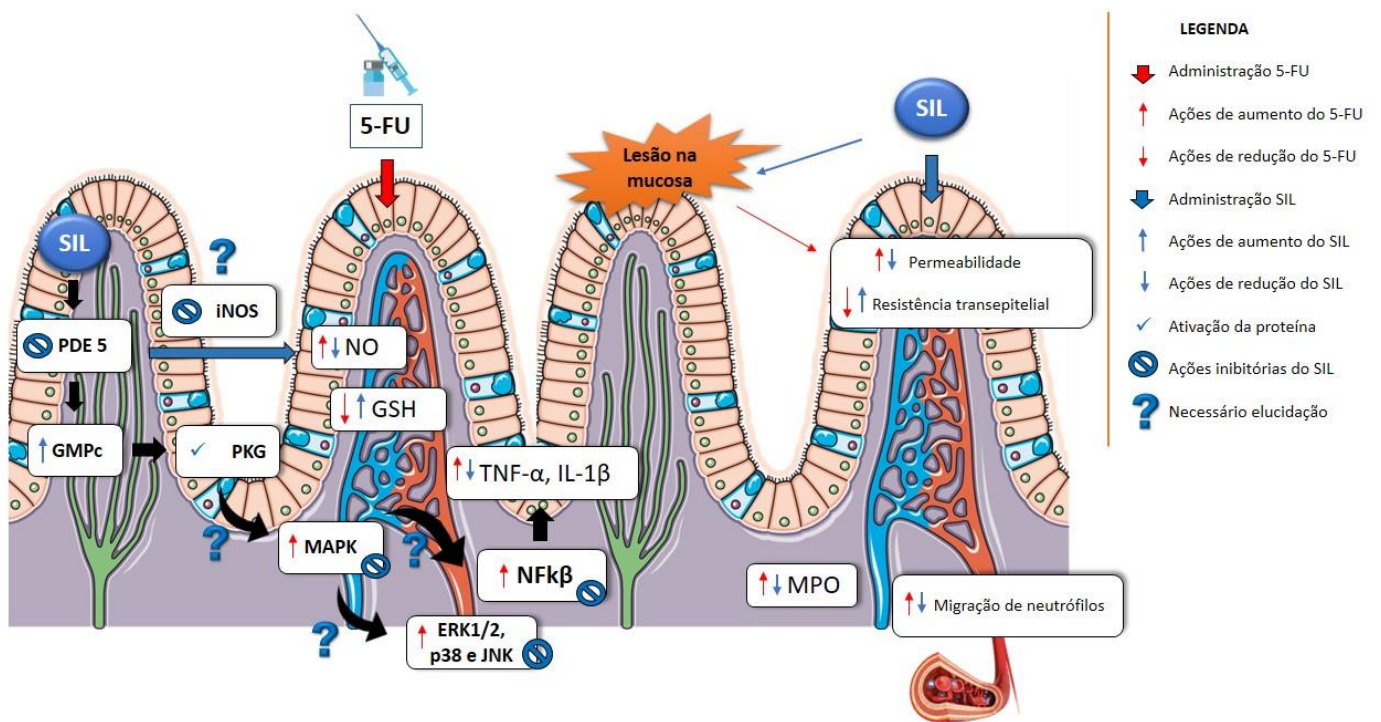
Estudos prévios demonstraram que inibidores de fosfodiesterase (PDE) reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição do NF-k β (TEIXEIRA *et al.*, 1997; HEYSTEK *et al.*, 2003; HERVE *et al.*, 2008; SCHAFER *et al.*, 2014). Zhao *et al.*, (2011) observaram que o SIL atenuou respostas pró-inflamatórias induzidas por LPS em células microgliais N9, regulando a ativação MAPK/ NF-k β , inibindo a fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK. A elevação dos níveis de GMPc pela inibição do PDE5 é um conhecido ativador da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que resulta na inibição de ativação da via MAPK (SUHASINI *et al.*, 1998). Essa é uma via pertinente a ser estudada na MI com o tratamento do SIL que, conseqüentemente, podem refletir numa diminuição do processo inflamatório.

Já é bem descrito na literatura que o 5-FU interfere na via MAPK. As vias envolvendo as MAPKs constituem as vias mais importantes da transdução do sinal, da superfície celular ao núcleo. Elas estão envolvidas na proliferação, diferenciação e morte celular. Dessa forma, as MAPKs ativam numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, culminando numa transdução de sinal. (JUSTINO *et al.*, 2015). Yang *et al.* (2010) mostraram o tratamento com 5-FU em células HT29 elevou, significativamente, o nível de phospho-p38 em células HT29 em comparação com as células não tratadas, sugerindo que o 5-FU aumentou a fosforilação da p38 em células HT29. Justino *et al.*, (2015) demonstraram em suas pesquisas que durante a fase inflamatória da mucosite intestinal ocorre a ativação da via MAPK que induz

a produção de NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando assim, o processo inflamatório.

Essa possibilidade sugere um modelo hipotético em que o sildenafil esteja associado ao processo de proteção da integridade da mucosa e diminuição de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, porém mais estudos são necessários acerca deste mecanismo.

Figura 19 – Modelo hipotético do mecanismo de ação do sildenafil.



Fonte: Elaborado pelo autor.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o sildenafil (inibidor de fosfodiesterase do tipo 5) melhorou os parâmetros inflamatórios, oxidantes e funcionais na mucosite intestinal, induzida por 5-FU, bem como preveniu a integridade da mucosa em camundongos, sugerindo um perfil anti-inflamatório, antioxidante e protetor. Esse efeito farmacológico do sildenafil se deve ao seu mecanismo de ação que já é bem descrito na literatura, visto que, ele apresenta efeito vasodilatador. Assim, o sildenafil pode ter impacto terapêutico relevante, visando seu reposicionamento como um medicamento efetivo no tratamento ou como agente adjuvante da mucosite intestinal. Porém, mais estudos sobre o mecanismo de ação do SIL são necessários, a fim de ser elucidada essa questão.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. B.; LICHTMAN, A. H.; PILLA, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABRAHAM, C.; MEDZHITOV, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**. v.140, n.6, p.1729-1737, 2011.
- AIZAWA T, WEI H, MIANO JM, ABE J, BERK BC, YAN C. Role of phosphodiesterase 3 in NO/cGMP-mediated antiinflammatory effects in vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v. 93, p.406-13, 2003
- ALA, Moein; JAFARI, Razieh Mohammad; DEHPOUR, Ahmad Reza. Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: thinking about new indications. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 235-259, 2 dez. 2020.
- ALENCAR, Allan K.; CARVALHO, Fábio I.; SILVA, Ananssa M.; MARTINEZ, Sabrina T.; CALASANS-MAIA, Jorge A.; FRAGA, Carlos M.; BARREIRO, Eliezer J.; ZAPATA-SUDO, Gisele; SUDO, Roberto T.. Synergistic interaction between a PDE5 inhibitor (sildenafil) and a new adenosine A2A receptor agonist (LASSBio-1359) improves pulmonary hypertension in rats. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 4, 20 abr. 2018.
- ALVES, Gisele Maziero; AIRES, Rafaela; SANTOS, Verônica Souza; CÔCO, Larissa Zambom; PETERS, Beatriz; ASSIS, Arícia Leone Evangelista Monteiro; ATHAYDES, Brena Ramos; AMORIM, Fernanda; NOGUEIRA, Breno Valentim; GONÇALVES, Rita Cássia Ribeiro. Sildenafil attenuates nonsteroidal anti-inflammatory-induced gastric ulceration in mice via antioxidant and antigenotoxic mechanisms. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 401-411, 18 out. 2020.
- ANDERSSON KE. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **Br J Pharmacol.**, v.175, p. 2554-65, 2018.

APETOH, L.; LADOIRE, S.; COUKOS, G.; GHIRINGHELLI, F. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure?. **Annals of Oncology**, p. 1-11, 2015.

ASHBURN TT, THOR KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 3, p.673-683, 2004.

BANERJEE, P. et al. Unveiling the Self-Assembling Behavior of 5-Fluorouracil and its N, N'-Dimethyl Derivative: A Spectroscopic and Microscopic Approach. **Langmuir**, v. 33, n. 41, p. 10978–10988, 2017.

BENSON, A. B., et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 14, p. 2918-26, Jul 2004.

BHATTACHARYYA, Asima; CHATTOPADHYAY, Ranajoy; MITRA, Sankar; et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**. v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014

BLOUNT M. A., et al. Conversion of phosphodiesterase-5 (PDE5) catalytic site to higher affinity by PDE5 inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 323, p. 730-737, 2007.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v.78, n.3, p. 206-209, 1982.

BROTHERTON, C. S. et al. High fiber diet may improve bowel function and health-related quality of life in patients with Crohn's disease. **Gastroenterology nursing: the official journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates**, v.37, n. 3, p.206-16, 2014.

CADIRCI, E; HALICI, Z; ODABASOGLU, F; A ALBAYRAK,; KARAKUS, E; UNAL, D; ATALAY, F; FERAH, I; UNAL, B. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. **Clinical And Experimental Immunology**, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 374-384, 8 nov. 2011.

CAPALDO CT, NUSRAT A. Cytokine regulation of tight junctions. **Biochim Biophys Acta** n.1788, p.864–871, 2009

CARNEIRO-FILHO BA, ORIA RB, REA KW, BRITO GA, FUJII J, OBRIG T, LIMA AA, GUERRANT RL. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-Fluorouracil–induced mucositis in mice. **Nutrition** 20: 934 – 941; 2004.

CHENG, S. B. et al. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2017.

CHIAPPELLI, Francesco. The Molecular Immunology of Mucositis: Implications for Evidence-Based Research in Alternative and Complementary Palliative Treatments. **Evid Based Complement Alternat Med**, USA, v. 2, n.4, p.489-494, 2005.

DANTAS, R. F. Atividade de glutathione peroxidase e relação de glutathione reduzida/glutathione 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.

DA SILVA, Alexandre de Souza; NUNES, Douglas Val Quintas; CARVALHO, Lenize Costa dos Reis Martins de; et al. Açai (Euterpe oleracea Mart) seed extract protects against maternal vascular dysfunction, hypertension, and fetal growth restriction in experimental preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**. v. 39, n. 2, p. 211-219, 2020.

DE BARROS, Patricia Aparecida Vieira; RABELO ANDRADE, Maria Emília; DE VASCONCELOS GENEROSO, Simone; et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomed Pharmacother**. v. 103, p. 1567-1576, 2018.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DO CARMO, F. L. R. et al. Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by

Lactobacillus casei BL23 and Propionibacterium freudenreichii 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–18, 2018.

DUNCAN M.; GRANT G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, n.2, p. 853 – 874, 2003.

FAVORITI, Pasqualino; CARBONE, Gabriele; GRECO, Marco; PIROZZI, Felice; PIROZZI, Raffaele Emmanuele Maria; CORCIONE, Francesco. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. **Updates In Surgery**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 7-11, mar. 2016.

FANGEL, Leticia Meda Vendrusculo; VALENTIM, Ana Paula Tomaz. Níveis de citocinas o óxido nítrico em mulheres com dor crônica causada por artrite reumatóide. In: **I Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso de Enfermagem da FCE/UnB**. 2019.

FOCACCETTI, C. et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–25, 2015

GIBSON, R.J. et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**, v.21, n.1, p.313-26, Jan 2013.

GOKAKIN AK, DEVECI K, KURT A, KARAKUS BC, DUGER C, TUZCU M TOPCU O. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns**, v. 39, p.1193-9, 2013.

GUIDO RVC, OLIVA G, ANDRICOPULO AD. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr Med Chem**, v.15, n.1, p.37-46, 2008.

HAGENKORT, A. **Exploiting Nucleotide Metabolism to Improve Cancer Therapy**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Médica e Biofísica). Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2016.

HEYSTEK, Heleen C.; THIERRY, Anne-Christine; SOULARD, Patricia; MOULON, Corinne. Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine

production and Th1-polarizing capacity. **International Immunology**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 827-835, jul. 2003.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-79, 2008.

IORDACHE, Andrei Mihai; DOCEA, Anca Oana; BUGA, Ana Maria; ZLATIAN, Ovidiu; CIUREA, Marius Eugen; ROGOVEANU, Otilia Constantina; BURADA, Florin; SOSOI, Simona; MITRUT, Radu; MAMOULAKIS, Charalampos. Sildenafil and tadalafil reduce the risk of contrast-induced nephropathy by modulating the oxidant/antioxidant balance in a murine model. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 135, p. 111038, jan. 2020.

JARDIM, Rodrigo. **Estudo de reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas causadas por protozoários através da integração de bases de dados biológicas usando Web Semântica**. 2013. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Cap. 1.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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

JUSTINO P.F. et al. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.75, n.3, p.559-567, Mar 2015.

KARAKOYUN, Berna; USLU, Unal; ERCAN, Feriha; AYDIN, Mehmet Serif; YUKSEL, Meral; OGUNC, Ayliz Velioglu; ALICAN, Inci. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. **Life Sciences**, [S.L.], v. 89, n. 11-12, p. 402-407, set. 2011.

KEEFE, D.M. et al. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, n.5, p.632-7, Nov 2000.

KEEFE, D.M.; GIBSON, R.J. Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. **Support Care Cancer**, v.15, n.5, p.483-490, May 2007.

KHOSHAKHLAGH, P., BAHROLOLOUMI-SHAPOURABADI, M., MOHAMMADIRAD, A., ASHTARAL-NAKHAI, L., MINAIE, B., ABDOLLAHI, M. Beneficial Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibitor in Experimental Inflammatory Bowel Disease; Molecular Evidence for Involvement of Oxidative Stress. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.17, n. 5, p. 281–288, 2007.

KIM, Seung et al. Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in a rat model. **Oncol Lett**, v.16, n.2, p.2585-2590, Aug 2018.

KOENIG, H.; PATEL, A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. **Arch neurol**, v.23, n.2, p. 155-160, Aug 1970.

KOSUTOVA P. et al. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil on the respiratory parameters, inflammation and apoptosis in a saline lavage-induced model of acute lung injury. **J Physiol Pharmacol**, v.69, n.5, Jan 2019.

LAXMI, Vijaya; GUPTA, Rachna; BHATTACHARYA, Swapan K.; RAY, Arunabha; GULATI, Kavita. Inhibitory effects of sildenafil and tadalafil on inflammation, oxidative stress and nitrosative stress in animal model of bronchial asthma. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 517-521, jun. 2019.

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 (5), p.603-612, 2007.

LEOCÁDIO, Paola Caroline Lacerda. **Efeito do pré-tratamento com l-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos**. 2013. 111 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

LIMA, V.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 113(3), p. 210–7, 2005.

LIMA, MARCOS AURÉLIO DE SOUSA. **Dismotilidade intestinal no curso da mucosite induzida por 5-fluorouracil: possível papel dos canais de sódio voltagem-dependentes sensíveis a tetrodotoxina.** 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico ou Profissional em 2016) - Universidade Estadual do Ceará, 2016. Disponível em: <<http://siduece.uece.br/siduece/trabalhoAcademicoPublico.jsf?id=83752>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2022

LIMA, MARCOS AURELIO DE SOUSA. **Dismotilidade gastrintestinal na mucosite induzida por 5-fluorouracil: papel dos macrófagos e mastócitos via serotonina.** 2021. 129 f. Tese (Doutorado em 2021) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <<http://siduece.uece.br/siduece/trabalhoAcademicoPublico.jsf?id=98308>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2022

LIN S, WANG J, WANG L, et al. A inibição de Phosphodiesterase-5 suprime a tumorigênese induzida pela inflamação cólon através do bloqueio do recrutamento de MDSC. **Am J Cancer Res**, v.7, n.1, p. 41-52, 2017.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-8, 2003.

MADISON BB, BRAUNSTEIN K, KUIZON E, et al. Epithelial hedgehog signals patter the intestinal crypt-villus axis. **Development**, p.132:279, 2005.

MAGALHÃES, Talita Alves Faria Martins. **Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (Euterpe oleracea Martius) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.** 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição,

Laboratório de Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-Mg, 2018. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/11796>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MANTOVANI, Alberto; CASSATELLA, Marco A.; COSTANTINI, Claudio; et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

MARGONIS, G. A., CHRISTOLOUKAS, N., ANTONIOU, E., ARKADOPOULOS, N., THEODOROPOULOS, G., AGROGIANNIS, G., PAPALOIS, A. E. Effectiveness of sildenafil and U-74389G in a rat model of colitis. **Journal of Surgical Research**, v.193, n.2, p. 667–674, 2015

MEDEIROS CA, LEITÃO RF, MACEDO RN, BARBOZA DR, GOMES AS, NOGUEIRA NA, ALENCAR NM, RIBEIRO RA, BRITO GA. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2010.

MELO, ML.; BRITO, GA.; SOARES, RC.; CARVALHO, SB.; SILVA, JV.; SOARES, PM.; VALE, ML.; SOUZA, MH.; CUNHA, FQ.; RIBEIRO, RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.**; 2008.

MENEZES-GARCIA, Z. et al. Mechanisms Underlying Chemotherapy-Associated Mucositis: The Role of Inflammatory Mediators and Potential Therapeutic Targets. **European Medical Journal** , v. 6, n. 1, p. 82–91, 2018.

MIRANDA, João Antônio Leal de. **Troxerrutina previne alterações morfológicas na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil: papel da via ciclooxigenase-2.** 2019. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MIRANDA, João Antônio Leal de. Mediadores inflamatórios e marcadores bioquímicos na mucosite intestinal. In: AYRES, Claudiane (org.). **Novos paradigmas de abordagem na biomedicina contemporânea.** 2020. ed. Paraná: Atena Editora, 2020. Cap. 3. p. 19-34.

MONDIN, T. C., DE AZEVEDO CARDOSO, T., MOREIRA, F. P., WIENER, C., OSES, J. P., DE MATTOS SOUZA, L. D., JANSEN, K., MAGALHÃES, P.V.S., KAPCZINSKI, F., DA SILVA, R. A. Circadian preferences, oxidative stress and inflammatory cytokines in bipolar disorder: A community study. **Journal of Neuroimmunology**, v.9, n.1. 2016.

MOKRA, Daniela; MOKRY, Juraj. Phosphodiesterase Inhibitors in Acute Lung Injury: what are the perspectives?. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 1929, 16 fev. 2021.

MORTAZ, Esmaeil; ALIPOOR, Shamila D.; ADCOCK, Ian M. et al; Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Front Immunol.** v. 9, p. 2171, 2018.

MUSCARA M.N., WALLACE J.L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol**, v.276, p. 1313 – 1316, 1999.

RAKESH C. KUKREJA; FADI SALLOUM; ANINDITA DAS; RAMZI OCKAILI; CHANG YIN; YVONNE A. BREMER; PATRICK W. FISHER; MICHAEL WITTKAMP; JOHN HAWKINS; ERIC CHOU; AMIT K. KUKREJA; XIAOYIN WANG; VIJAY R. MARWAHA; LEI XI. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. , v. 42, n.5, p.219–232, 2005.

QUARESMA, Marielle; DAMASCENO, Samara; Monteiro, CARLOS; et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Nutr Cancer.** v. 1, p. 11, 2019.

RAMANA, G. V. et al. Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis-Complicating the Treatment of Cancer. **Neoplasia**, v. 6, n. 5, p. 423–431, 2006.

RAO, R. K.; BASUROY, S.; RAO, V. U.; KARNAKY, K. J.; GUPTA, A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin–ZO-1 and E-cadherin– β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. **Biochem. J.**, v.368, p.471-481, 2002.

RIBEIRO, R.A et al. Irinotecan – and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.78, n.5, p.881-

893, Nov 2016.

RIBEIRO, R. A. et al. Bases da resposta inflamatória do trato gastrintestinal. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 29, p. 763-808, 2016.

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

PRICKAERTS J, SIK A, VAN STAVEREN WC, KOOPMANS G, STEINBUSCH HW, VAN DER STAAY FJ, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. **Neurochem Int**. v.45, p.915-928, 2004.

SANTOS CL, SOUZA MHLP, GOMES AS, LEMOS HP, SANTOS AA, CUNHA FQ, ET AL. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br J Pharmacol**; v.146, p. 481–6, 2005.

SCHMITT, B. et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. **Redox Biology**, v. 6, p. 198-205, 2015.

SCHWARZ E. R., et al. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int. J. Imp. Res.**, v. 19, p. 139-148, 2007.

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

SETHY, Chinmayee; KUNDU, Chanakya Nath. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: implication of dna repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 137, p. 111285, maio 2021.

SHETH, P.; BASUROY, S.; LI, C.; NAREN, A. P.; RAO, R. K. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. **J. Biol. Chem**, v.278, n.49, p.49239 – 49245, 2003.

SHI, Jianrong; MA, Wangqian; TANG, Huifang. Research progress of phosphodiesterase inhibitors in inflammatory bowel disease treatment. **Journal Of Zhejiang University (Medical Sciences)**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 659-665, 2021.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SMITH, C.L. et al. Lactobacillus fermentum BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. **Nutr Cancer**, v. 60, n.6, p. 757-767, 2008.

SOARES PM, MOTA JM, GOMES AS, OLIVEIRA RB, ASSREUY AM, BRITO GA, SANTOS AA, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts the resolution of inflammatory process. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2008.

SOARES PM, LIMA-JUNIOR RC, MOTA JM, JUSTINO PF, BRITO GA, RIBEIRO RA, CUNHA FQ, SOUZA MH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2010.

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

SONIS, S.T. A biological approach to mucositis. **J Support Oncol**, USA, v.2, n.1, p.21-32, Jan-Feb 2004.

SOYDAN, Güray; SÖKMENSÜER, Cenk; KdLdNÇ, Kamer; TUNCER, Meral. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 610, n. 1-3, p. 87-92, maio 2009.

SUHASINI, Modem; LI, Hien; LOHMANN, Suzanne M.; BOSS, Gerry R.; PILZ, Renate B.. Cyclic-GMP-Dependent Protein Kinase Inhibits the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase

Pathway. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 6983-6994, dez. 1998.

SUKHOTNIK, I., POLLAK, Y., CORAN, A. G., PILATOV, J., BEJAR, J., MOGILNER, J. G., BERKOWITZ, D. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutrition & metabolism**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.70, p.631–659, 2013.

TEIXEIRA, M.M.; GRISTWOOD, R.W.; COOPER, N.; HELLEWELL, P.G.. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future?. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 164-170, maio 1997.

VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v.11, p.821-834, 2017

VOLK, Neil; LACY, Brian. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics Of North America**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 1-13, jan. 2017.

WALLACE J.L., MILLER M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p.512-520, 2000

WANG, Jia-Yi; WEN, Li- Li; HUANG, Ya-Ni; CHEN, Yen-Tsun; KU, Min-Chi. Dual Effects of Antioxidants in Neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of gliamediated inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 12, n. 27, p. 3521-3533, 1 set. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 12 setembro 2018. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>, acesso em 15 de março de 2021.

WU, L.-L.; CHIU, H.-D.; PENG, W.-H.; LIN, B.-R.; LU, K.-S.; LU, Y.-Z.; YU, L. C.- H. Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of

enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta. **Crit Care Med**, v.39, p.2087–2098, 2011.

YAMADA T, ALPERS DH. Textbook of gastroenterology. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2003.

YANG, XiaoHong; LIU, Tao; CHEN, Bo; et al. Grape seed proanthocyanidins prevent 132 irradiation-induced differentiation of human lung fibroblasts by ameliorating mitochondrial dysfunction. **Sci. Rep.** v. 7, p. 62, 2017.

YILDIRIM, Alper; ERSOY, Yasemin; ERCAN, Feriha; ATUKEREN, Pinar; GUMUSTAS, Koray; USLU, Unal; ALICAN, Inci. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 215-221, jun. 2010.

ZHAO L., et al., Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. **Circulation**, v. 107, p. 234-7, 2003.

ZHAO, Siqi; ZHANG, Lijia; LIAN, Guoning; WANG, Xiaoxiao; ZHANG, Haotian; YAO, Xuechun; YANG, Jingyu; WU, Chunfu. Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathways in N9 microglia. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 468-474, abr. 2011.

ANEXO A – Certificado da comissão de ética no uso de animais.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação farmacológica de inibidor de fosfodiesterase do tipo 5 em modelo experimental de mucosite intestinal", protocolada sob o CEUA nº 6943011220 (ID 001801), sob a responsabilidade de **Pedro Marcos Gomes Soares e equipe; Carlos Eduardo da Silva Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 29/01/2021.

We certify that the proposal "Pharmacological evaluation of phosphodiesterase inhibitor type 5 in experimental model of intestinal mucositis", utilizing 30 Heterogenics mice (30 males), protocol number CEUA 6943011220 (ID 001801), under the responsibility of **Pedro Marcos Gomes Soares and team; Carlos Eduardo da Silva Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 01/29/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2021](#) a [12/2021](#) Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Físio-Farmacologia Gastrointestinal da UFC. O laboratório possui toda estrutura necessária para realização dos experimentos.

Fortaleza, 08 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará