

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia  
Lana Claudinez dos Santos

**EFEITO DO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL NO PERFIL DO TECIDO  
ADIPOSO E NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE EM ANIMAIS  
DEFICIENTES DO RECEPTOR DE LDL (LDLr<sup>-/-</sup>)**

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia  
Lana Claudinez dos Santos

**EFEITO DO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL NO PERFIL DO TECIDO  
ADIPOSO E NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE EM ANIMAIS  
DEFICIENTES DO RECEPTOR DE LDL (LDLr<sup>-/-</sup>)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra Jacqueline I. Alvarez Leite

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudio e Inês, pelo amor, carinho e confiança depositados em mim e por me incentivarem em todos os momentos desta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e magnífica oportunidade de vivenciar esta experiência. Agradeço a Ele por me amparar nos momentos difíceis e iluminar meu caminho.

À Professora Dra Jacqueline I. Alvarez-Leite, por me acolher em seu laboratório, por compartilhar seus conhecimentos com tanta atenção, alegria e boa vontade, por acreditar em mim e valorizar minha capacidade.

Aos meus pais Cláudio e Inês que mesmo à distância transmitiram segurança e confiança para que eu pudesse seguir esta trajetória. Agradeço pelo apoio, carinho, amor e paciência em todos os momentos desta caminhada.

Ao meu irmão Alan Cláudio, pelo carinho e pela amizade.

À bioterista Maria Helena, pessoa essencial no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas alunas de Iniciação científica Isadora Froes, Juliana Távora e Franciele Silva, pelo auxílio, eficiência e comprometimento durante todas as etapas deste mestrado. Pela disponibilidade e disposição em cuidar dos animais e auxiliar na rotina laboratorial com tanta competência, precisão e interesse.

Aos amigos do curso de Bases I: Anita, Bárbara, Alda, Humberto e Samuel, pelos momentos de estudo e diversão.

À Maria Noviello, pelo carinho e cuidado na análise do material de medula óssea e por transmitir seus conhecimentos e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Denise Carmona Cara Machado, pela contribuição nas análises histológicas de intestino.

À amiga e colaboradora Alda Jusceline pela amizade, pelos ensinamentos e disposição em todos os momentos.

Ao amigo Edenil pelos ensinamentos e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Juliana Lauar, pelas discussões científicas e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelo auxílio nas análises e pelos momentos de descontração.

À Ana Cecília, pela amizade, ensinamentos e contribuição neste trabalho.

À Talita, pela disposição e transmissão de conhecimentos sempre com boa vontade.

À Fabíola pelos ensinamentos, discussões científicas, pela amizade e pelos momentos de diversão.

À Lílian, por me ensinar várias técnicas e cálculos e pelos momentos de diversão.

À Luciana, pelos ensinamentos transmitidos e discussões científicas.

A toda a equipe do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional pelo convívio, pela amizade, carinho, contribuições científicas e pelos momentos de alegria e diversão.

Ao Professor Ms. Erny Marcelo Simm pelo incentivo, exemplo e carisma no decorrer do curso de mestrado. Agradeço pela atenção em todos os momentos e pelas palavras de conforto.

Ao meu primo Bruno, pelo auxílio na formatação das imagens.

As minhas primas Ana Verônica e Bianca pelo carinho, amizade e apoio nesta jornada.

À amiga Danusa, pela amizade, carinho e pelos momentos de diversão.

À amiga Laila, pela amizade e pelo carinho.

À amiga Luciana, pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

A todos os meus amigos pela amizade e pelo apoio, essenciais nesta jornada.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia, pela disponibilidade quanto aos equipamentos e materiais.

Às agências financiadoras, em especial ao Conselho de Aperfeiçoamento em Pesquisa - CAPES, pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Existem dois dias no ano em que nada pode ser feito: o ontem e o amanhã. Portanto, hoje é o melhor dia para trabalhar, amar, sonhar, ousar, produzir e acima de tudo, ser feliz.”

Dalai Lama

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XXII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Quimioterapia.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 5-Fluorouracil.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Mucosite.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 A medula óssea.....</b>	<b>38</b>
2.4.1 Produção de células da linhagem vermelha – eritrócitos.....	39
2.4.2 Produção de células da linhagem branca.....	40
<b>2.5 Mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG), Peroxidase de eosinófilos (EPO).....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 Tecido adiposo.....</b>	<b>47</b>
<b>2.7 Metabolismo de lipídios e lipoproteínas.....</b>	<b>51</b>
<b>2.8 Aterosclerose.....</b>	<b>55</b>
<b>2.9 Modelos murinos de aterosclerose.....</b>	<b>60</b>
<b>2.10 Doenças cardiovasculares e quimioterapia com 5-FU.....</b>	<b>61</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>62</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2 Objetivo específico.....</b>	<b>64</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Animais experimentais.....</b>	<b>66</b>
<b>5.2 Delineamento experimental.....</b>	<b>66</b>



<b>5.3 Controle do peso corporal, consumo alimentar e hídrico.....</b>	<b>68</b>
<b>5.4 Sacrifício dos animais.....</b>	<b>69</b>
<b>5.5 Avaliação do perfil lipídico.....</b>	<b>69</b>
5.5.1 Determinação da concentração de colesterol total plasmático.....	69
5.5.2 Determinação da concentração de HDL-colesterol plasmático.....	70
5.5.3 Determinação do colesterol não HDL e relação de aterogênese.....	71
5.5.4 Determinação da concentração de triglicérides plasmáticos.....	71
<b>5.6 Avaliação da glicemia.....</b>	<b>71</b>
<b>5.7 Perfil lipídico hepático e nos conteúdos do ceco e do cólon.....</b>	<b>72</b>
<b>5.8 Avaliação do tecido adiposo visceral.....</b>	<b>73</b>
5.8.1 Peso do tecido adiposo pelo peso corporal.....	73
5.8.2 Avaliação histológica do tecido adiposo visceral.....	73
5.8.3 Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) no tecido adiposo visceral.....	74
<b>5.9 Avaliação do intestino delgado.....</b>	<b>75</b>
5.9.1 Peso do intestino pelo peso corporal.....	75
5.9.2 Comprimento intestinal.....	75
5.9.3 Avaliação do infiltrado inflamatório no intestino.....	75
5.9.3.1 <i>Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG.....</i>	<i>76</i>
<b>5.9.3.1.1 Quantificação indireta da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no intestino.....</b>	<b>76</b>
<b>5.9.3.1.2 Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG).....</b>	<b>77</b>
5.9.3.2 <i>Preparo das amostras e ensaio enzimático para quantificação da atividade indireta da peroxidase de eosinófilos (EPO).....</i>	<i>77</i>
5.9.4 Dosagem de proteína .....	78
5.9.5 Avaliação histopatológica do intestino.....	78
<b>5.10 Extração de medula óssea.....</b>	<b>79</b>
5.10.1 Contagem total de células mielóides.....	79
5.10.2 Preparo de lâminas histológicas de medula óssea.....	79
5.10.3 Contagem diferencial de células mielóides.....	80
<b>5.11 Avaliação de leucócitos circulantes.....</b>	<b>80</b>
5.11.1 Contagem total de leucócitos no sangue.....	80

5.11.2 Contagem diferencial de leucócitos no sangue.....	81
<b>5.12 Avaliação da aterosclerose .....</b>	<b>81</b>
5.12.1 Mensuração da área da válvula aórtica.....	82
5.12.2 Mensuração da área da placa aterosclerótica.....	82
5.12.3 Percentual de obstrução da válvula aórtica.....	82
5.12.4 Quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica.....	83
<b>5.13 Análises estatísticas.....</b>	<b>84</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>6.1 Evolução ponderal, ganho de peso, ingestão alimentar e hídrica.....</b>	<b>85</b>
<b>6.2 Perfil lipídico e glicemia plasmáticos.....</b>	<b>88</b>
<b>6.3 Perfil lipídico hepático e dos conteúdos do ceco e do cólon.....</b>	<b>89</b>
<b>6.4 Avaliação do tecido adiposo perigonadal.....</b>	<b>90</b>
6.4.1 Peso do tecido adiposo.....	90
6.4.2 Avaliação da área dos adipócitos.....	91
6.4.3 Avaliação do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo pela atividade da NAG.....	92
6.4.4 Contagem de estruturas em forma de coroa.....	93
<b>6.5 Avaliação do intestino delgado.....</b>	<b>94</b>
6.5.1 Peso do intestino.....	94
6.5.2 Comprimento do intestino.....	95
6.5.3 Avaliação da infiltração de neutrófilos no intestino pela atividade da MPO.....	96
6.5.4 Avaliação da infiltração de macrófagos no intestino pela atividade da NAG.....	96
6.5.5 Avaliação da infiltração de eosinófilos no intestino pela atividade da EPO.....	97
6.5.6 Avaliação morfológica do intestino delgado.....	98
<b>6.6 Mielograma.....</b>	<b>100</b>
<b>6.7 Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.....</b>	<b>100</b>
<b>6.8 Avaliação da aterosclerose.....</b>	<b>101</b>
6.8.1 Avaliação da área da válvula aórtica.....	101
6.8.2 Avaliação da área da placa aterosclerótica.....	102

6.8.3 Percentual de obstrução da válvula aórtica.....	104
6.8.4 Quantificação de macrófagos na lesão aterosclerótica.....	104
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>118</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO A – Parecer do CETEA.....</b>	<b>130</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Composição das lipoproteínas.....	52
Tabela 2	Classificação das lipoproteínas plasmáticas conforme a densidade, tamanho e apolipoproteínas presentes.....	53
Tabela 3A	Composição da dieta ocidental.....	68
Tabela 3B	Composição de macro e micronutrientes da dieta ocidental.....	68
Tabela 4	Peso corporal, colesterol total e triglicérides dos camundongos deficientes do receptor de LDL no início do experimento.....	85
Tabela 5	Perfil lipídico e glicemia dos camundongos deficientes do receptor de LDL após seis semanas de experimento e duas aplicações de placebo ou 5-FU.....	89
Tabela 6	Perfil lipídico do fígado e do conteúdo do cólon de animais deficientes do receptor de LDL.....	90
Tabela 7	Mielograma de animais deficientes do receptor de LDL tratados com placebo ou 5-FU.....	100
Tabela 8	Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes em animais deficientes do receptor de LDL.....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do 5-FU, uracil e timina.....	30
Figura 2	Metabolismo do 5-FU.....	32
Figura 3A	Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimidina (dTMP) a partir do composto monofosfato de deoxiuridina (dUMP).....	33
Figura 3B	Esquema representativo da ação inibitória do metabólito ativo de 5-FU, FdUMP.....	33
Figura 4A	Fase de iniciação da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia.....	36
Figura 4B	Fase de amplificação de sinais da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia.....	37
Figura 4C	Fase de ulceração da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia.....	37
Figura 4D	Fase de cicatrização da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia.....	37
Figura 5	Esquema representando os precursores da linhagem eritrocitária, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação do eritrócito maduro.....	40
Figura 6	Esquema representando os precursores da linhagem granulocítica, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação dos granulócitos neutrófilo,	

	eosinófilo e basófilo.....	43
Figura 7	Esquema representando os precursores da linhagem monocitária e linfocitária, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação das formas maduras macrófago e linfócito.....	45
Figura 8	Imagem representativa das EFC presentes no tecido adiposo de animais magros e obesos.....	51
Figura 9	Primeiro estágio de desenvolvimento da aterosclerose.....	58
Figura 10	Placa de aterosclerose desenvolvida ou madura.....	59
Figura 11	Esquema representativo das hipóteses da presente pesquisa.....	63
Figura 12	Esquema representativo da administração do quimioterápico 5-FU (grupo 5-FU) ou de placebo (grupo controle).....	67
Figura 13	Esquema representativo da câmara de Neubauer.....	81
Figura 14A	Avaliação da evolução ponderal dos animais deficientes do receptor de LDL.....	86
Figura 14B	Avaliação do ganho de peso dos animais deficientes do receptor de LDL.....	87
Figura 14C	Avaliação da ingestão alimentar dos animais deficientes do receptor de LDL.....	87
Figura 14D	Avaliação da ingestão hídrica dos animais deficientes do receptor de LDL.....	88

Figura 15	Peso do tecido adiposo perigonadal pelo peso corporal de animais deficientes do receptor de LDL.....	91
Figura 16A	Avaliação da área dos adipócitos de animal do grupo controle deficiente do receptor de LDL.....	91
Figura 16B	Avaliação da área dos adipócitos de animal do grupo tratado com 5-FU deficiente do receptor de LDL.....	92
Figura 16C	Representação gráfica da área dos adipócitos dos animais deficientes do receptor de LDL.....	92
Figura 17	Avaliação da infiltração de macrófagos pela atividade da enzima NAG no tecido adiposo de animais deficientes do receptor de LDL.....	93
Figura 18	Estruturas em forma de coroa por campo avaliado no tecido adiposo de animais deficientes do receptor de LDL.....	94
Figura 19	Peso do intestino de animais deficientes do receptor de LDL pelo peso corporal.....	95
Figura 20	Comprimento do intestino dos animais deficientes do receptor de LDL.....	95
Figura 21	Avaliação da infiltração de neutrófilos pela atividade da enzima MPO no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.....	96
Figura 22	Avaliação da infiltração de neutrófilos pela atividade da enzima NAG no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.....	97

Figura 23	Avaliação da infiltração de neutrófilos pela atividade da enzima EPO no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.....	98
Figura 24	Aspecto morfológico do intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.....	99
Figura 25	Avaliação da área da válvula aórtica de animais deficientes do receptor de LDL.....	102
Figura 26A	Área da placa aterosclerótica dos animais deficientes do receptor de LDL tratados com placebo.....	103
Figura 26B	Área da placa aterosclerótica dos animais deficientes do receptor de LDL tratados com 5-FU.....	103
Figura 26C	Representação gráfica da área da lesão aterosclerótica de animais deficientes do receptor de LDL.....	103
Figura 27	Avaliação do percentual de obstrução da válvula aórtica de animais deficientes do receptor de LDL.....	104
Figura 28	Quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica de camundongos deficientes do receptor de LDL tratados com placebo ou 5-FU.....	105



## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau centígrado

µL – microlitro

µm - micrômetro

5-FU – 5-Fluorouracil

apo B-100 – apolipoproteína B-100

apo B-48 – apolipoproteína B-48

apo C-II – apolipoproteína C-II

apo E – apolipoproteína E

apo E<sup>-/-</sup> - deficiente em apolipoproteína E

AVE – acidente vascular encefálico

BHT – Hidroxitolueno butilado

BSA – albumina soro bovina

CETP – proteína de transferência de ésteres de colesterol

CETEA – Comitê de Ética de Experimentação Animal

CH<sub>2</sub>THF - 5,10-metilenotetrahidrofolato

CL - colesterol

CuSO<sub>4</sub> – sulfato de cobre

DABI – diaminobenzidina

DHFU – diidrofluorouracil

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DPD – diidropirimidina desidrogenase

dUMP – monofosfato de deoxiuridina

dUTP – monofosfato de deoxitimidina

EC – ésteres de colesterol

EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético

EFC – estruturas em forma de coroa

EPO – peroxidase de eosinófilos

EROs – espécies reativas de oxigênio

Fase G1 – fase pré-sintética

Fase G2 – fase pró-sintética

Fase S – fase de síntese do ciclo celular

FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina

FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina

FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina

FL - fosfolipídios

FUDP – difosfato de fluorouridina

FUDR – fluorodeoxiuridina

FUMP – monofosfato de fluorouridina

FUR – fluorouridina

FUTP – trifosfato de fluorouridina

g/L – grama por litro

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HDL – lipoproteína de alta densidade

HDLc – colesterol em HDL

HE – Hematoxilina e Eosina

HETAB – *Hexadecyltrimethylammonium bromide*

IAM – infarto agudo do miocárdio

ICAM – molécula de adesão intracelular 1

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IDLc – colesterol em IDL

IL-1 $\beta$  – interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

Kg - quilogramas

LCAT – lecitina colesterol aciltransferase

LDL – lipoproteína de densidade baixa

LDLc – colesterol em LDL

LDLox – lipoproteína de densidade baixa oxidada

LDLr<sup>-/-</sup> - deficiente do receptor de LDL

LRP – proteína relacionada com o receptor de LDL

M – Molar

MCP-1 - Proteína Quimioatraente para Monócitos 1

M-CSF – fator estimulante de colônia de macrófagos

mg – miligrama

mg/dL – miligrama por decilitro

mg/kg – miligrama por quilograma de peso

mL - mililitro

mL/mg – mililitro por miligrama

mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico

MMPs – metaloproteinases

MOMA – monócitos/macrófagos

MPO – Mieloperoxidase

Na<sub>2</sub> - sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – carbonato de sódio

Na<sub>2</sub>EDTA – ácido Etileno Diamino Tetracético Na<sub>2</sub>

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – fostato dibásico de sódio anidro

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato tribásico de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NAG – N-acetilglicosaminidase

NF-κB – fator nuclear *kappa* B

NGS – soro normal de cabra

NKT – células T matadoras naturais

nm – nanômetros

OPD – ortofenileno-diamino

OPRT – orotato fosforibosiltransferase

p/v – peso por volume

PBS – salina tamponada com fosfato

PRPP – fosforibosil pirofosfato

QM – quilomícrons

QMR – quilomícrons remanescentes

RNA – ácido ribonucleico

RPM – rotações por minuto

RPMI – meio para cultura de células desenvolvido pelo “Institute Roswell Park Memorial” - (RPMI)

RR – ribonucleotídeo redutase

SR-A – receptor scavenger A

SR-B1 – receptor scavenger B1

TG – triglicérides

TGI – trato gastrointestinal

TK – timidina cinase

TMB – 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TP – timidina fosforilase

TS – timidilato sintase

UK – uridina cinase

UP – uridina fosforilase

VCAM1 – molécula de adesão celular vascular 1

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

VLDLc – colesterol em VLDL

## RESUMO

O quimioterápico 5-FU pode causar efeitos indesejáveis como a mucosite que aumenta os mediadores inflamatórios sistêmicos e locais e também a mielossupressão que resulta em leucopenia e anemia. Duas doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose e obesidade, são influenciadas por células imunes, especialmente macrófagos. Por isso, a quimioterapia pode interferir nas suas evoluções, negativamente pela inflamação gerada pela mucosite ou positivamente pela redução da infiltração de macrófagos devido à mielossupressão. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do 5-FU no tecido adiposo e na aterogênese. Animais LDLr<sup>-/-</sup> foram divididos nos grupos controle e 5-FU, recebendo dieta ocidental e duas aplicações de placebo ou 5-FU (150 mg/kg) respectivamente, no primeiro e no vigésimo segundo dia experimental. O sacrifício ocorreu três semanas após a segunda aplicação. Os resultados mostram que animais tratados com 5-FU perderam peso após as aplicações, que foi recuperado nas últimas semanas. O perfil lipídico foi semelhante entre os grupos, exceto pela redução de triglicérides no grupo 5-FU que ainda apresentou redução da gordura visceral e da infiltração de macrófagos neste tecido. O mielograma e leucograma mostraram resultados similares nos dois grupos, exceto pela redução de células eritrocitárias no grupo 5-FU. Apesar do grupo 5-FU apresentar discreta mucosite ao fim do experimento, a infiltração de macrófagos e neutrófilos no intestino foi semelhante entre os grupos. No entanto, a infiltração de eosinófilos foi inferior no grupo 5-FU. Na válvula aórtica, o tratamento com 5-FU reduziu a lesão aterosclerótica, obstrução luminal e a migração de macrófagos. Concluimos que o tratamento com 5-FU reduz a gordura visceral e a lesão aterosclerótica, associadas com diminuição de macrófagos nestes tecidos.

Palavras-chaves: 5-FU, mucosite, mielossupressão, aterosclerose, tecido adiposo.

## ABSTRACT

The 5-FU chemotherapy is related to side effects such as mucositis that increases local and systemic inflammatory mediators and myelosuppression that results in leukopenia and anemia. Two chronic inflammatory diseases, atherosclerosis and obesity, are influenced by immune cells, especially macrophages. Therefore, chemotherapy could negatively interfere with their development by increasing systemic inflammation or, instead, interfere in a positive way, reducing macrophages infiltration after myelosuppression. Our aim was evaluate the effect of 5-FU in adipose tissue and atherogenesis. LDLr<sup>-/-</sup> mice were divided into Control and 5-FU groups receiving western diet for 6 weeks and two injections of placebo or 5-FU (150 mg/kg), respectively at the 1<sup>st</sup> and 22<sup>nd</sup> experimental days. Animals were sacrificed 3 weeks after the second application. The results showed that 5-FU mice lost weight after each application but regained it in the last weeks. The lipid profile was similar between groups except for the reduction of triglycerides seen in 5-FU group which also showed a decrease in visceral fat and in the adipose tissue macrophages. No differences were seen in myelogram and leukogram, except for the reduction of erythrocytic series in 5-FU group. Although intestine presented discrete mucositis at the end of experiment, macrophages and neutrophils infiltrations were similar between groups. However, eosinophil infiltration was impaired in 5-FU group. In the aortic valve, 5-FU treatment reduced atherosclerotic lesion, luminal obstruction and macrophage migration. We conclude that 5-FU treatment reduces visceral fat and atherosclerotic lesion associated to the reduction of macrophages infiltration in these tissues.

Keywords: 5-FU, mucositis, myelosuppression, atherosclerosis, fatty tissue

## 1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia é um tratamento que emprega agentes antineoplásicos, administrados de forma isolada ou combinada. Diversos efeitos colaterais são associados ao uso destes fármacos. Seus efeitos começam a surgir logo após a administração da droga ou dias depois do início da terapia. Alguns parâmetros devem ser considerados antes de iniciar um tratamento quimioterápico, tais como as condições do paciente e as características do tumor.

Existem diferentes vias para administração das drogas antineoplásicas, sendo a mais comumente empregada a via intravenosa. Os agentes quimioterápicos são distribuídos em três grandes grupos, de acordo com sua especificidade no ciclo celular, estrutura química e função em nível celular. Dentre estes grupos, destaca-se aquele com especificidade no ciclo celular, dentre eles os análogos da pirimidina como o 5-fluorouracil (5-FU), que atua durante as fases G e S do ciclo celular.

O 5-FU atua como agente antimetabólito bloqueando a atividade da enzima timidilato sintase ou interferindo na síntese do RNA ou do DNA durante o ciclo celular. É utilizado no tratamento de diferentes tipos de tumores, especialmente aqueles do trato gastrointestinal. Este fármaco precisa ser ativado metabolicamente para desencadear sua ação tóxica. Desta forma, o 5-FU é metabolizado por enzimas corporais gerando seus precursores ativos: trifosfato de fluorouridina (FUTP), monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) e trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP). A degradação do 5-FU pode gerar outros metabólitos intermediários que serão convertidos a um dos precursores ativos. 5-FU também pode ser metabolizado a (diidrofluorouracil) DHFU e ser excretado pelo organismo. Vários efeitos adversos estão associados ao uso clínico do 5-FU em especial a mucosite e a mielossupressão.

A mucosite é um evento agudo, que se desenvolve logo após a aplicação do 5-FU e é caracterizada por um processo inflamatório que acomete as mucosas, especialmente a mucosa do trato gastrointestinal e promove aumento dos níveis circulantes de citocinas inflamatórias. Ela ocorre em cinco estágios que englobam desde as primeiras modificações na mucosa até a formação de ulcerações com posterior cicatrização e desaparecimento da inflamação. A mielossupressão por sua



vez é um evento tardio que surge por volta do sétimo dia após a administração do 5-FU e se caracteriza pela diminuição da produção de células pela medula óssea.

O tecido adiposo é um órgão que apresenta funções endócrinas e imunes, além de estocar energia sob a forma de triglicerídeos. É a principal reserva energética do organismo sendo mobilizada em processos de intenso catabolismo com elevada demanda energética. É constituído por adipócitos, macrófagos, pré-adipócitos, vasos sanguíneos dentre outros componentes. Este tecido é capaz de produzir e liberar mediadores denominados adipocinas. Existem cerca de cinquenta tipos de adipocinas que exercem diferentes funções. A principal adipocina produzida por este tecido é a adiponectina, uma proteína que exerce ação anti-inflamatória, antiaterogênica e antidiabética. No entanto, um desequilíbrio no armazenamento de energia e na homeostase do tecido adiposo favorecidos pelo aumento da deposição de triglicerídeos, resulta em modificação na produção das adipocinas, com aumento da liberação de mediadores de caráter inflamatório e diminuição de adiponectina. Este perfil do tecido adiposo contribui para o desenvolvimento ou agravamento de outras doenças ou processos inflamatórios.

Os macrófagos são produzidos e liberados pela medula óssea e migram para diversos tecidos do organismo como o tecido adiposo, conforme a demanda. O estabelecimento do quadro de mucosite e da mielossupressão, decorrentes da quimioterapia com 5-FU, podem interferir na migração de macrófagos para o tecido adiposo resultando em diminuição da concentração e atividade destas células neste tecido.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica iniciada pelo acúmulo de LDL oxidada (LDLox) na camada íntima da artéria e pelo recrutamento e retenção de macrófagos nesta região. A doença se caracteriza por dois estágios. O estágio inicial é marcado pela formação da estria gordurosa a partir do acúmulo primário de células espumosas enquanto o segundo estágio se caracteriza pelo aumento da placa aterosclerótica, participação de outras células do sistema imunológico, presença da capa fibrosa e calcificação. A liberação de mediadores pró-inflamatórios por outros tecidos ou processos inflamatórios pode contribuir para o desenvolvimento ou para o agravamento da aterosclerose.

A ocorrência de mielossupressão causada pela terapia antineoplásica com 5-FU pode interferir na formação do ateroma, devido a diminuição da produção de células mieloides, dentre elas o macrófago, componente essencial da placa. No

entanto, o processo inflamatório presente no quadro de mucosite e a liberação de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 pode contribuir para o agravamento da aterosclerose.

Efeitos cardiotóxicos decorrentes da administração do 5-FU têm sido bastante relatados. No entanto, nenhum estudo tem correlacionado a quimioterapia com 5-FU e a aterosclerose.

Este é o primeiro trabalho que avalia o desenvolvimento da aterosclerose e o perfil do tecido adiposo em animais submetidos a dois ciclos de quimioterapia com 5-FU.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Quimioterapia

A quimioterapia é um tratamento que surgiu em 1940 que emprega agentes antineoplásicos isolados ou combinados, com a finalidade de eliminar as células tumorais do organismo. Ela pode ser utilizada como modalidade única de tratamento ou associada à cirurgia ou à radioterapia. A cura pelo tratamento quimioterápico é definida pelo desaparecimento de qualquer sinal do tumor e pela sobrevivência do paciente. O tratamento é aplicado repetidamente desde que observado o intervalo de tempo necessário para a recuperação das estruturas corporais normais afetadas, dando condições ao paciente de prosseguir com o tratamento (CRAIG; STITZEL, 2005; FONSECA et al, 2000; WAITZBERG, 2006).

O tratamento quimioterápico gera efeitos tóxicos sobre as células tumorais, mas também afeta inúmeras células normais do organismo, especialmente aquelas de rápida proliferação como as células da medula óssea e das mucosas em geral. A produção e circulação de células brancas e vermelhas ficam reduzidas, resultando em aumento da incidência de infecções e hemorragias, que podem ser potencialmente fatais. Em geral, a toxicidade mielóide máxima ocorre no período de dez a quatorze dias após o início do tratamento quimioterápico, com recuperação da depleção mielóide em vinte e um a vinte e oito dias. Por sua vez, alguns quimioterápicos como as nitrosureias, podem desencadear toxicidade hematológica tardia que se manifesta dentro de quatro a seis semanas após o início do tratamento (CRAIG; STITZEL, 2005; FONSECA et al, 2000; WAITZBERG, 2006).

A indicação do tratamento quimioterápico deve levar em consideração diversos aspectos, tais como a idade do paciente, seu estado nutricional e condições de vida; as funções hepática, renal e pulmonar; a presença de outras doenças e infecções; o tipo do tumor, a presença de metástases e sua extensão. Algumas contra-indicações para a terapia também são apresentadas, como em casos de câncer terminal, septicemia, coma, mulheres no primeiro trimestre da gestação e em indivíduos com idade inferior a três meses ou com idade avançada (FONSECA et al, 2000).

Existem diversos métodos para administração de quimioterápicos, sendo a via intravenosa a mais empregada. Outras vias para administração são a via oral, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, intrapleural e intravesical (FONSECA et al, 2000).

Os agentes antineoplásicos são classificados conforme a especificidade no ciclo celular, estrutura química e a função em nível celular (FONSECA et al, 2000).

O ciclo celular envolve quatro fases: a fase G1, onde ocorre a produção dos componentes necessários à síntese do DNA; a fase S, onde ocorre a síntese do DNA da célula; a fase G2, onde ocorre a síntese dos componentes celulares necessários para a ocorrência da mitose e a fase M, caracterizada pela divisão celular onde uma célula dá origem a duas células-filhas idênticas. Alguns agentes antineoplásicos atuam com especificidade no ciclo celular e podem ser classificados em duas classes: os fármacos capazes de atuar na célula durante o período de repouso ou em qualquer momento do ciclo celular, denominados fármacos inespecíficos de fase e aqueles que atuam preferencialmente em uma ou mais fases, chamados fármacos específicos de fase (CRAIG; STITZEL, 2005; FONSECA et al, 2000; KATZUNG, 2007).

Quanto a estrutura química e a função em nível celular, podem ser citados os agentes alquilantes, os agentes antimetabólitos e os produtos naturais. Os agentes alquilantes reagem com o DNA de cadeia dupla evitando que as cadeias se separem para sua replicação. Isso resulta em inibição do DNA ou de sua replicação, levando à ocorrência de mutação ou morte celular (FONSECA et al, 2000).

Os agentes antimetabólitos são aqueles que atuam sobre o metabolismo das células em proliferação. Eles são distribuídos em três classes: os análogos da purina, da pirimidina ou do ácido fólico e apresentam estrutura e função semelhantes aos metabólitos envolvidos na síntese dos ácidos nucleicos. Assim, as células são capazes de utilizar estes agentes ao invés dos ácidos nucleicos, devido a sua semelhança, resultando em alterações na estrutura do DNA ou RNA destas células e conseqüente morte celular. Estes agentes também são capazes de inibir importantes enzimas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos, prejudicando a formação dos mesmos. Dentre os fármacos antimetabólitos pode ser citado o 5-FU, classificado como análogo da pirimidina (CRAIG; STITZEL, 2005; FONSECA et al, 2000; KATZUNG, 2007). É importante destacar que esta ação dos quimioterápicos

ocorre sobre as células tumorais, mas também sobre as células normais, desencadeando efeitos colaterais ao organismo.

Agentes naturais podem ser distribuídos em várias classes como inibidores da mitose, antibióticos dentre outros. Conforme descrito na literatura, estes agentes atuam inibindo a mitose, alterando a síntese e a função dos ácidos nucleicos, desencadeando a quebra do DNA ou prejudicando sua replicação além de bloquear a síntese do RNA (FONSECA et al, 2000).

Enzimas como a asparaginase e alguns hormônios ou antagonistas hormonais também podem ser empregados no tratamento quimioterápico (FONSECA et al, 2000).

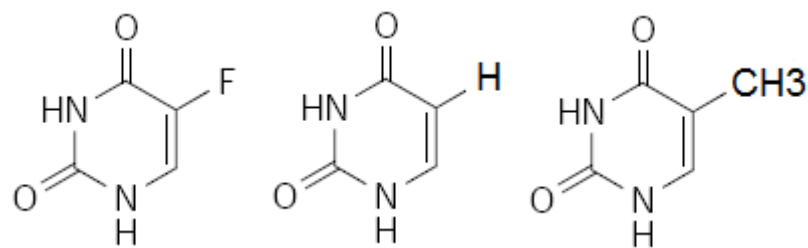
Os efeitos colaterais da quimioterapia começam a surgir poucos dias após o início do tratamento. Dentre eles, podem ser citados fraqueza, fadiga, indisposição, mal-estar, náuseas, vômitos, anorexia, alterações no paladar, disfagia, esofagite, diarreia, mucosite, dores, sangramento, perda óssea, além de danos ao folículo piloso resultando em alopecia parcial ou total (BJARNASON et al, 2008; CRAIG; STITZEL, 2005; WATZBERG, 2006). Outros achados clínicos também são relatados como perda de peso, atrofia muscular, perda de tecido adiposo e miopatia. Dentre os principais achados laboratoriais associados ao tratamento quimioterápico são citados a anemia, hipoproteinemia, hiperglicemia, depleção de eletrólitos, vitaminas, minerais e anergia. Os agentes antineoplásicos podem afetar indiretamente a ingestão alimentar e a absorção em decorrência da toxicidade gastrointestinal caracterizada pela presença da mucosite. Os efeitos tóxicos destas drogas dependem do tempo de exposição e de sua concentração plasmática (WATZBERG, 2006).

## **2.2 5-Fluorouracil (5-FU)**

O 5-FU é um agente quimioterápico classificado como antimetabólito, pertencente à classe dos fármacos análogos da pirimidina. É comumente utilizado em diversos tumores sólidos especialmente em cânceres do trato gastrointestinal (ASSERSOHN et al, 2003; LONGLEY et al, 2003; STRINGER et al, 2009b). Esse fármaco atua de duas maneiras: inibindo a atividade da enzima timidilato sintase (TS) e conseqüentemente afetando a produção do nucleotídeo timina ou sendo

incorporado ao DNA e/ou RNA da célula, impedindo seu funcionamento normal e induzindo apoptose (LONGLEY et al, 2003; SAVVA-BORDALO et al, 2010).

De acordo com Longley et al (2003) e Savva-Bordalo et al (2010), o 5-FU é um composto análogo do uracil e também da timina, que apresenta um átomo de flúor ligado ao carbono 5, em substituição ao átomo de H ou ao grupamento metil, característicos destas bases nitrogenadas (figura 1).



**Figura 1: Estrutura química do 5-FU, uracil e timina.** Nesta ordem, da esquerda para a direita. Adaptado de Longley et al (2003).

Além de ser empregado no tratamento de tumores do trato gastrintestinal, especialmente do câncer de cólon, o 5-FU é utilizado em outros tipos de tumores, sendo eles o câncer de pescoço, cabeça, mama, ovário, bexiga, próstata, pâncreas e fígado. Seu uso pode ser isolado ou combinado com outros agentes (LONGLEY et al, 2003; KATZUNG, 2007).

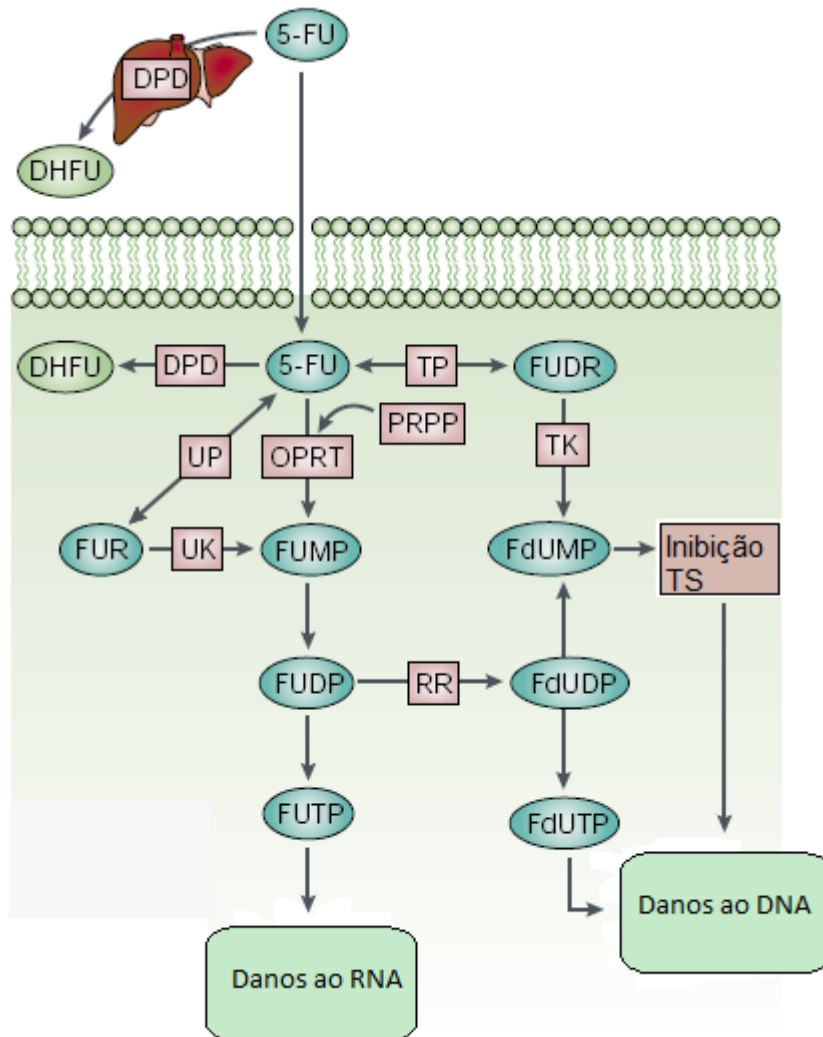
Vários efeitos colaterais estão associados com o 5-FU e dependem da via de administração e da dose administrada. Os principais efeitos colaterais são mucosite, mielossupressão de sete a quatorze dias pós-administração, leucopenia, náuseas, diarreia, alopecia, neurotoxicidade, toxicidade ocular e cardíaca. Alterações na microflora intestinal também são relatadas com o uso de 5-FU e podem contribuir para a ocorrência da diarreia (CRAIG; STITZEL, 2005; DIKKEN; SITZIA, 1998; KATZUNG, 2007; STRINGER et al, 2009a; SAVVA-BORDALO et al, 2010).

A principal via de administração do 5-FU é a via intravenosa. Este quimioterápico não pode ser administrado via oral uma vez que a mucosa intestinal apresenta elevados níveis da enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD), que degrada o 5-FU gerando o metabólito DHFU (diidrofluorouracil) que não apresenta nenhuma função específica, sendo excretado pelo organismo. Desta forma, o quimioterápico teria uma absorção bastante reduzida, não apresentando eficácia quanto a sua ação (CRAIG; STITZEL, 2005; KATZUNG, 2007).

De acordo com Craig e Stitzel (2005) e Longley et al (2003), o 5-FU é uma droga específica de fase, que atua na fase G1 e na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do RNA ou do DNA respectivamente. Para exercer sua ação tóxica, a droga precisa ser ativada metabolicamente, gerando por reações enzimáticas os compostos trifosfato de fluorouridina (FUTP), monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP).

Após a administração, o 5-FU entra rapidamente nas células, por meio do transporte facilitado. Grande parte da droga administrada é metabolizada no fígado pela ação da enzima DPD, que converte o 5-FU ao composto DHFU, que é excretado pelo organismo. Esta excreção pode ocorrer pela urina ou pela respiração (LONGLEY et al, 2003; SAVVA-BORDALO et al, 2010) (Figura 2).

A via principal de degradação do 5-FU é pela ação da enzima orotato fosforibosiltransferase (OPRT), que requer o co-fator fosforibosil pirofosfato (PRPP) para exercer sua função. Ela metaboliza o 5-FU formando o composto monofosfato de fluorouridina (FUMP). Este composto é fosforilado, gerando o difosfato de fluorouridina (FUDP) que por sua vez pode ser fosforilado e formar o metabólito ativo trifosfato de fluorouridina (FUTP) ou sofrer ação da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) e ser convertido a difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP). O metabólito FUTP é incorporado ao RNA desencadeando danos na composição desta molécula e consequente perda funcional e morte celular (LONGLEY et al, 2003) (Figura 2).

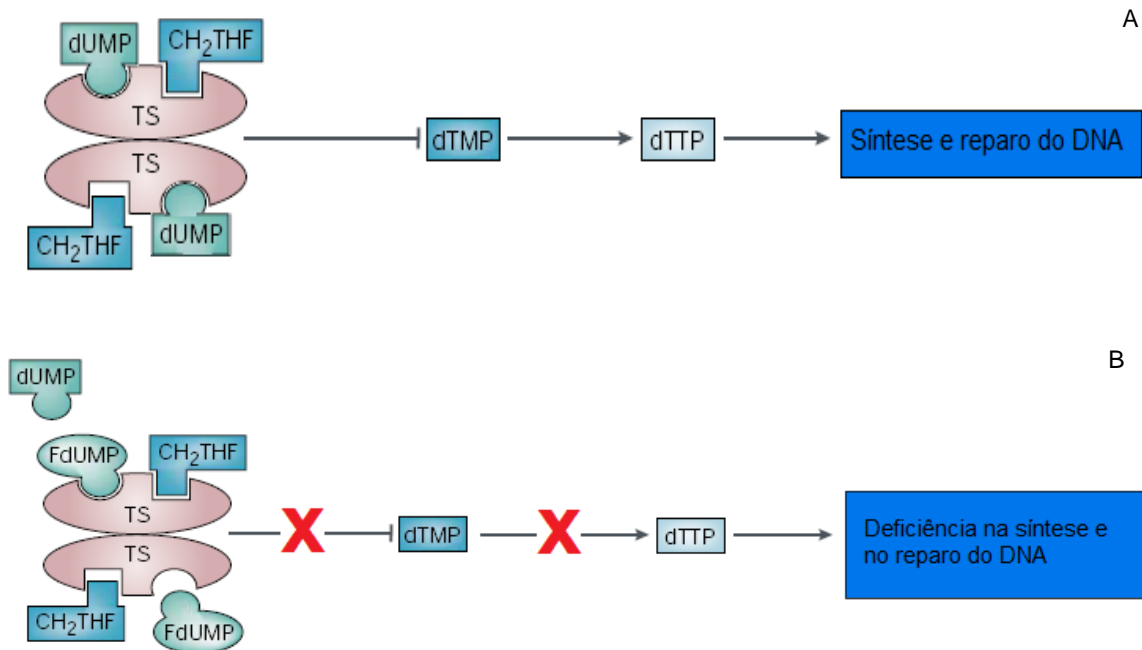


**Figura 2: Metabolismo do 5-Fluorouracil.** 5-FU – 5-Fluorouracil; DPD – diidropirimidina desidrogenase; DHFU - diidrofluorouracil; OPRT – orotato fosforibosiltransferase; PRPP – fosforibosil pirofosfato; FUMP – monofosfato de fluorouridina; FUDP – difosfato de fluorouridina; FUTP – trifosfato de fluorouridina; RR - ribonucleotídeo redutase; FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS – timidilato sintase; TK – timidina cinase; TP – timidina fosforilase; UP – uridina fosforilase; FUR - fluorouridina; UK – uridina cinase; FUDR - fluorodeoxiuridina. Adaptado de Longley et al (2003).

O composto FdUDP, formado a partir do FUMP pode ser desfosforilado ou fosforilado, gerando os metabólitos monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP), respectivamente. FdUMP, um importante metabólito ativo, é capaz de se ligar a enzima timidilato sintase. Esta enzima catalisa a conversão de monofosfato deoxiuridina (dUMP) a monofosfato deoxitimidina (dUTP), fornecendo timidilato para a síntese e reparo do DNA. Ela funciona como um dímero e ambas as subunidades possuem dois sítios de ligação específica sendo um para o dUMP e o outro para a molécula de CH<sub>2</sub>THF (5,10-metilenotetrahidrofolato), doadora do grupamento metil necessário para a produção do timidilato (figura 3A). O composto FdUMP é capaz de se ligar ao sítio de ligação



específica do nucleotídeo, formando um complexo ternário estável com a enzima e o  $\text{CH}_2\text{THF}$ , impedindo a ligação do composto dUMP e consequentemente a formação do timidilato, essencial na composição do DNA. Esta é uma das vias de ação do 5-FU sobre a síntese do DNA (LONGLEY et al, 2003) (Figura 3B).



**Figura 3A: Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimidina (dTMP) a partir do composto monofosfato de deoxiuridina (dUMP).** A enzima timidilato sintase (TS) junto ao cofator  $\text{CH}_2\text{THF}$  (5,10-metilenotetrahidrofolato) converte dUMP a dTMP que por sua vez gera dTTP (trifosfato de deoxitimidina), componente essencial da molécula de DNA. **Figura 3B: Esquema representativo da ação inibitória do metabólito ativo de 5-FU, FdUMP.** FdUMP se liga ao sítio ativo da enzima formando um complexo estável com ela e seu cofator, bloqueando a ligação do composto dUMP e a síntese de dTMP e dTTP, impedindo a síntese e/ou o reparo da molécula de DNA. Adaptado de Longley et al (2003)

Uma via alternativa de produção de FdUMP é mediada pela enzima timidina fosforilase, que metaboliza o 5-FU em FUDR o qual é convertido em FdUMP pela ação da timidina cinase (LONGLEY et al, 2003) (Figura 2).

Por sua vez, o metabólito ativo FdUTP, gerado a partir da fosforilação do composto FdUDP é incorporado pelo DNA, levando a danos em sua estrutura e resultando em morte celular (LONGLEY et al, 2003) (figura 2).

Outra via alternativa de degradação do 5-FU é mediada pela enzima uridina fosforilase que converte o 5-FU em fluorouridina, que é metabolizada pela enzima uridina cinase formando o composto FUMP. FUMP segue sua via de metabolização conforme descrito anteriormente (LONGLEY et al, 2003) (Figura 2).

### 2.3 Mucosite

A mucosite é uma condição clínica que envolve a ocorrência de um processo inflamatório acompanhado por lesões ulcerativas em qualquer segmento do TGI (LALLA et al, 2006; KEEFE, 2007). É um dos efeitos colaterais mais debilitantes decorrente do tratamento quimioterápico ou radioterápico (VLIET et al, 2010).

De acordo com Chiappelli (2005) e Stringer et al (2009b) 40% dos pacientes tratados com dose padrão de quimioterápico desenvolvem mucosite e 100% dos pacientes tratados com doses elevadas da droga exibem este efeito colateral. Desta forma, quanto maior a dose da droga antineoplásica empregada, maior o desenvolvimento de mucosite e outros sintomas associados. Segundo Chiappelli (2005) a modalidade da intervenção terapêutica e a forma de administração, além do tipo de câncer são fatores que contribuem para o grau de intensidade da mucosite.

A mucosite é comumente encontrada em pacientes submetidos ao uso de 5-FU. Ela ocorre em estágios que envolvem o início da inflamação da mucosa com posterior agravamento do quadro, evoluindo para o surgimento de ulcerações, alterações da permeabilidade e risco aumentado de infecções. Após cessar o tratamento, ocorre a regeneração do tecido lesado e restabelecimento da função normal da mucosa (SOARES et al, 2008; STRINGER et al, 2009b).

Clinicamente, a mucosite está associada com dor, diarreia, desnutrição, infecções bacterianas, administração de nutrição parenteral e uso intravenoso de analgésicos, além de aumentar o período de hospitalização e conseqüentemente, os gastos em saúde pública (SONIS, 2004; STRINGER et al, 2009b; VLIET et al, 2010). A presença da mucosite pode levar a interrupção do tratamento, modificação no esquema de administração da droga; mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses do agente antineoplásico, comprometendo a eficácia da terapia proposta e refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (SONIS, 2004; VADHAN-RAJ et al, 2010; VLIET et al, 2010). Não é conhecido um tratamento para a mucosite nem uma forma de prevenção ao seu desenvolvimento (SONIS, 2004). No entanto, alguns estudos têm avaliado a ação de diferentes substâncias sobre o desenvolvimento da mucosite. Ferreira (2010) sugere que a administração de ácidos graxos de cadeia curta é capaz de atenuar a mucosite em camundongos. Vadhan-Raj et al (2010) mostrou que uma dose única de palifermina na prática clínica pode reduzir ou impedir o desenvolvimento de um quadro de mucosite grave.

De acordo com Sonis (2004) o infiltrado de leucócitos é comumente observado na fase tardia da mucosite, em destaque na fase de ulceração. Por sua vez, os macrófagos associados com a restauração da mucosa gastrointestinal parecem acumular na camada submucosa no estágio final da mucosite, designado cicatrização. Pacientes tratados com agentes quimioterápicos apresentando mucosite possuem concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$  e IL-6 no sangue e nas mucosas (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004).

O desenvolvimento da mucosite é um processo dinâmico que ocorre em cinco estágios: iniciação, resposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (CHIAPPELLI, 2005; SONIS, 2004).

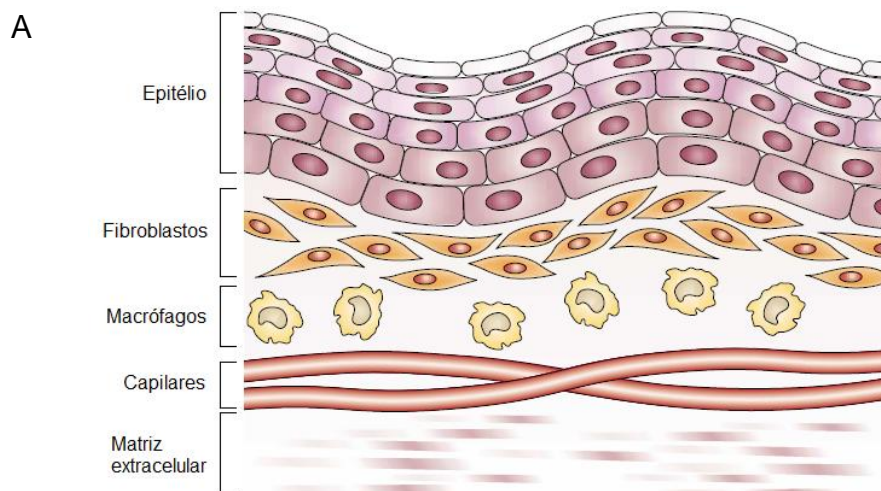
O estágio designado iniciação tem seu começo logo após a administração da droga quimioterápica ou da radiação. Nesta fase ocorrem as primeiras lesões ao DNA e RNA das células, resultando em apoptose e injúria tecidual. Simultaneamente, espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas, contribuindo para a agressão tecidual. Estes eventos iniciam o desenvolvimento da mucosite. Nesta fase, a camada mucosa se apresenta normal, aparentemente sem nenhuma modificação, no entanto, as primeiras alterações já começam a ocorrer na camada submucosa (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004) (Figura 4A).

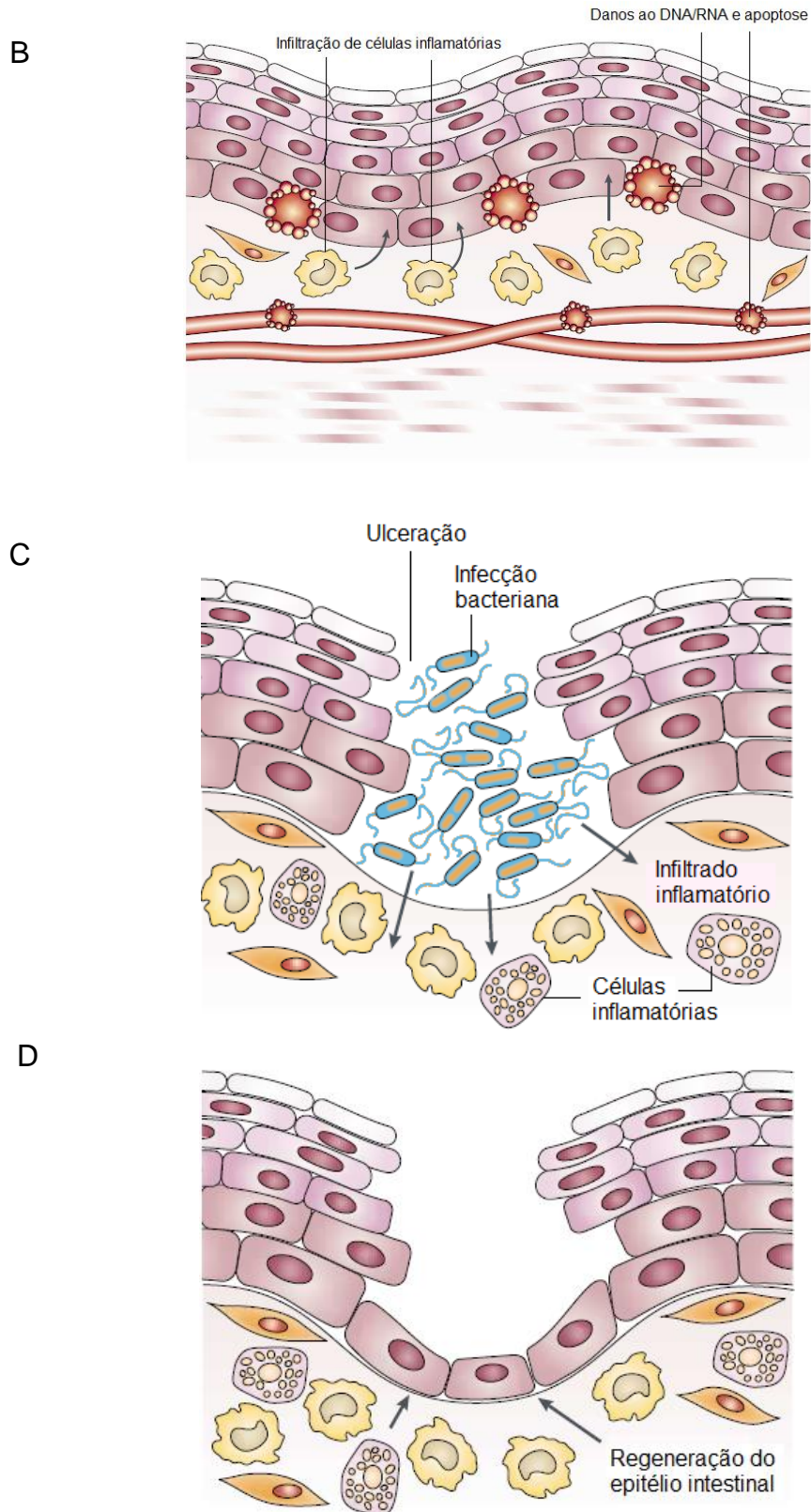
No segundo estágio, resposta a danos primários, ocorre um aumento dos danos ao DNA e RNA e ampliação da produção de EROs. Vários fatores de transcrição são ativados, dentre eles NF- $\kappa$ B e p53. NF- $\kappa$ B leva a ativação de genes da família BAX resultando no aumento da apoptose além de aumentar a produção de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Nesta etapa, as camadas mucosa e submucosa são afetadas (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004) (Figura 4B).

A amplificação de sinais é o estágio onde ocorre intensa produção de citocinas pró-inflamatórias que ficam acumuladas na mucosa contribuindo para a ocorrência de danos teciduais, estimulando o recrutamento de células inflamatórias para a mucosa. TNF- $\alpha$  induz a ativação da caspase três contribuindo para a ocorrência da apoptose. IL-1 $\beta$  juntamente ao TNF- $\alpha$  estimula a ativação das metaloproteinases um e três que causam a degradação do epitélio gastrointestinal, favorecendo o desenvolvimento das lesões na mucosa. O aumento da secreção destas citocinas pró-inflamatórias amplifica o processo inflamatório na mucosa, agravando os danos teciduais (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004).

A quarta fase da mucosite é a ulceração. Esta é a fase de maior preocupação no processo de mucosite. A perda da integridade da mucosa e submucosa resulta na formação de lesões ou ulcerações, que deixam o organismo exposto a entrada de agentes tóxicos e à colonização por microrganismos patogênicos, além de interferir na digestão e absorção de nutrientes. É uma fase caracterizada por dor intensa e que requer cuidados especiais uma vez que o paciente torna-se propenso ao desenvolvimento de doenças infecciosas e até mesmo sepse (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004). A digestão e absorção de nutrientes também ficam debilitados nesta fase, contribuindo para o agravamento do quadro clínico do paciente (Figura 4C).

A mucosite é um fenômeno agudo que desaparece espontaneamente. Sua última fase é a cicatrização, caracterizada por intensa proliferação celular, que resulta na restauração estrutural e funcional dos vilos e retorno da barreira intestinal e da superfície absorptiva. A resposta inflamatória diminui e a mucosa é completamente regenerada, retomando a sua função normal (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS, 2004; VLIET et al, 2010; XIAN et al, 1999) (Figura 4D).





**Figura 4A: Fase de iniciação da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. B – Fase de amplificação de sinais da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. C - Fase de ulceração da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. D - Fase de cicatrização da mucosite induzida por quimioterapia ou radioterapia. Adaptado de Sonis (2004)**

## 2.4 A medula óssea

A medula óssea é o órgão responsável pela produção das células brancas e vermelhas. Ela é capaz de armazenar o ferro sob a forma de ferritina e de hemossiderina e destruir os eritrócitos velhos. Pode ser encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). É um tecido amplamente vascularizado, isento de vasos linfáticos e que possui inúmeros capilares de parede excepcionalmente fina onde ocorrem as trocas entre sangue e medula (FISCHBACH; DUNNING, 2010; JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Durante o desenvolvimento fetal, a produção das células do sangue, processo designado hematopoiese, ocorre no saco vitelino e no mesênquima para-aórtico e posteriormente, no fígado e no baço. Gradualmente, a geração destas células vai sendo transferida para a medula óssea e desaparecendo dos outros órgãos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008) existem dois tipos de medula óssea: a medula óssea vermelha, responsável pela produção das células sanguíneas e a medula óssea amarela, rica em células adiposas e que não produz células sanguíneas. No recém-nascido toda a medula óssea é vermelha mas com o decorrer do tempo, grande parte da medula vermelha se transforma em amarela, ficando a medula vermelha restrita a algumas regiões como o fêmur, o esterno, as costelas e as vértebras. Porém, conforme a necessidade do organismo, a medula óssea amarela pode se transformar em medula óssea vermelha e voltar a produzir células do sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A hematopoiese é iniciada por uma única célula da medula óssea denominada célula-tronco pluripotente. Esta célula prolifera e forma duas linhagens: a linhagem mieloide, que dá origem aos eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas e a linhagem linfoide, que vai formar os linfócitos. Os linfócitos circulantes no sangue e na linfa se originam principalmente no timo mas também no baço, linfonodos e tonsilas palatinas, a partir das células progenitoras trazidas da medula óssea pelo sangue. Os linfócitos T sofrem sua maturação no timo, enquanto os linfócitos B maturam na medula óssea. Parte dos linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, células especializadas na produção de imunoglobulinas (FISCHBACH ; DUNNING, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A liberação das células produzidas pela medula óssea para o sangue é controlada pelos fatores de liberação, que por sua vez são produzidos e secretados conforme a necessidade do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A avaliação da produção das células pela medula óssea pode ser feita por meio de um exame denominado mielograma. Ele apresenta resultados referentes à celularidade da medula, que pode ser classificada como hiper celular, normocelular ou hipocelular e permite ainda a contagem diferencial das células mieloides, avaliando individualmente a porcentagem de cada precursor das linhagens branca e vermelha e seu estágio de maturação (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

#### 2.4.1 Produção de células da linhagem vermelha – eritrócitos

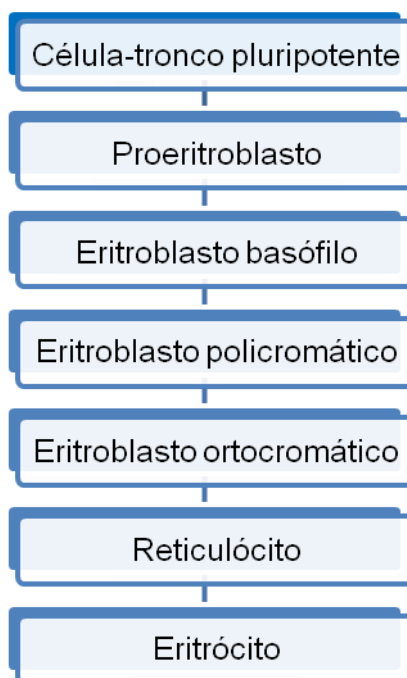
Na linhagem eritrocítica ou vermelha, diversos precursores são formados e sua nomenclatura oscila conforme o grau de maturação da célula. A eritropoiese é iniciada com o proeritroblasto, uma célula grande com cerca de 22 a 28  $\mu\text{m}$  de diâmetro originária de uma célula-tronco pluripotente. Essa célula possui intensa síntese protéica, núcleo esférico e central, cromatina com estrutura delicada e um ou dois nucléolos grandes. Seu citoplasma é abundante, tem propriedades basófilas e apresenta uma região clara em volta do núcleo, a qual contém mitocôndrias, um par de centríolos e o aparelho de Golgi. No restante do citoplasma são encontrados polirribossomos e um retículo endoplasmático pouco desenvolvido. A síntese protéica dos proeritroblastos é intensa. Neste estágio, ocorre ainda a produção de hemoglobina, a partir do ferro transportado pela transferrina (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

No próximo estágio de maturação a célula recebe o nome de eritroblasto basófilo, uma célula menor, com cromatina condensada em grânulos grosseiros e sem nucléolos visíveis. Possui um citoplasma rico em polirribossomos associados a síntese de hemoglobina e se cora fortemente devido a presença destas estruturas. Esta célula dá origem ao eritroblasto policromático, uma célula de tamanho inferior ao eritroblasto basófilo e que contém um núcleo com cromatina mais condensada. Seu citoplasma possui hemoglobina e polirribossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O eritroblasto ortocromático, correspondente a próxima fase de maturação da linhagem eritrocitária, possui um diâmetro com cerca de 8 a 10  $\mu\text{m}$  e núcleo com

cromatina muito condensada. Contém elevado teor de hemoglobina, conferindo ao citoplasma uma característica acidófila. Após sua maturação, esta célula perde o núcleo, tornando-se uma célula anucleada designada reticulócito. O reticulócito é uma célula que mede em torno de 9  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresenta vestígios de RNA. Ela dá origem ao eritrócito, uma célula vermelha que possui vida média de 120 dias (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A representação esquemática dos precursores da linhagem eritrocitária pode ser observada na figura 5.



**Figura 5: Esquema representando os precursores da linhagem eritrocitária, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação do eritrócito maduro.**

#### 2.4.2 Produção de células da linhagem branca

A linhagem branca é dividida em dois grupos principais: granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos correspondem às células que apresentam grânulos distintos no citoplasma, sendo elas os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. São células que possuem o núcleo multilobulado e podem ser designadas como polimorfonucleares. Os agranulócitos por sua vez correspondem às células que não possuem grânulos específicos no citoplasma e tem núcleo não lobulado, sendo elas



os monócitos e linfócitos, também denominados leucócitos mononucleares (FISCHBACH; DUNNING, 2010).

No processo de formação e maturação dos granulócitos, conhecido como granulocitopoiese, ocorrem diversas modificações citoplasmáticas caracterizadas por intensa síntese proteica e diferenciação celular. Este processo é dividido em duas etapas principais. A primeira etapa é a etapa de mitose, que dura em torno de cinco dias e tem seu término com o surgimento dos mielócitos. A segunda etapa compreende a fase de maturação, que leva cerca de dez dias para ocorrer e finaliza com a formação da célula madura que será liberada para a corrente sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BRASILEIRO-FILHO, 2009).

A primeira forma que origina a linhagem de granulócitos é o mieloblasto. O mieloblasto é uma célula que possui o citoplasma basófilo, núcleo grande e esférico, com cromatina muito delicada e um ou dois nucléolos. É rico em grânulos azurófilos, os quais contêm enzimas presentes nos lisossomos (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O promielócito é uma célula com tamanho inferior ao mieloblasto, com núcleo esférico e cromatina um pouco condensada. Comparado ao mieloblasto, o promielócito possui citoplasma mais basófilo e grânulos específicos de neutrófilo, eosinófilo ou basófilo, encontrados junto às granulações azurófilas originando o promielócito eosinófilo, o promielócito neutrófilo ou o promielócito basófilo (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A próxima forma da linhagem granulocítica é o mielócito cujo núcleo pode ser esférico ou em formato de um rim, com a cromatina condensada. O citoplasma deixa de ser basófilo e as granulações específicas aumentam. Nesta etapa têm-se o mielócito eosinófilo, o mielócito neutrófilo e o mielócito basófilo (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

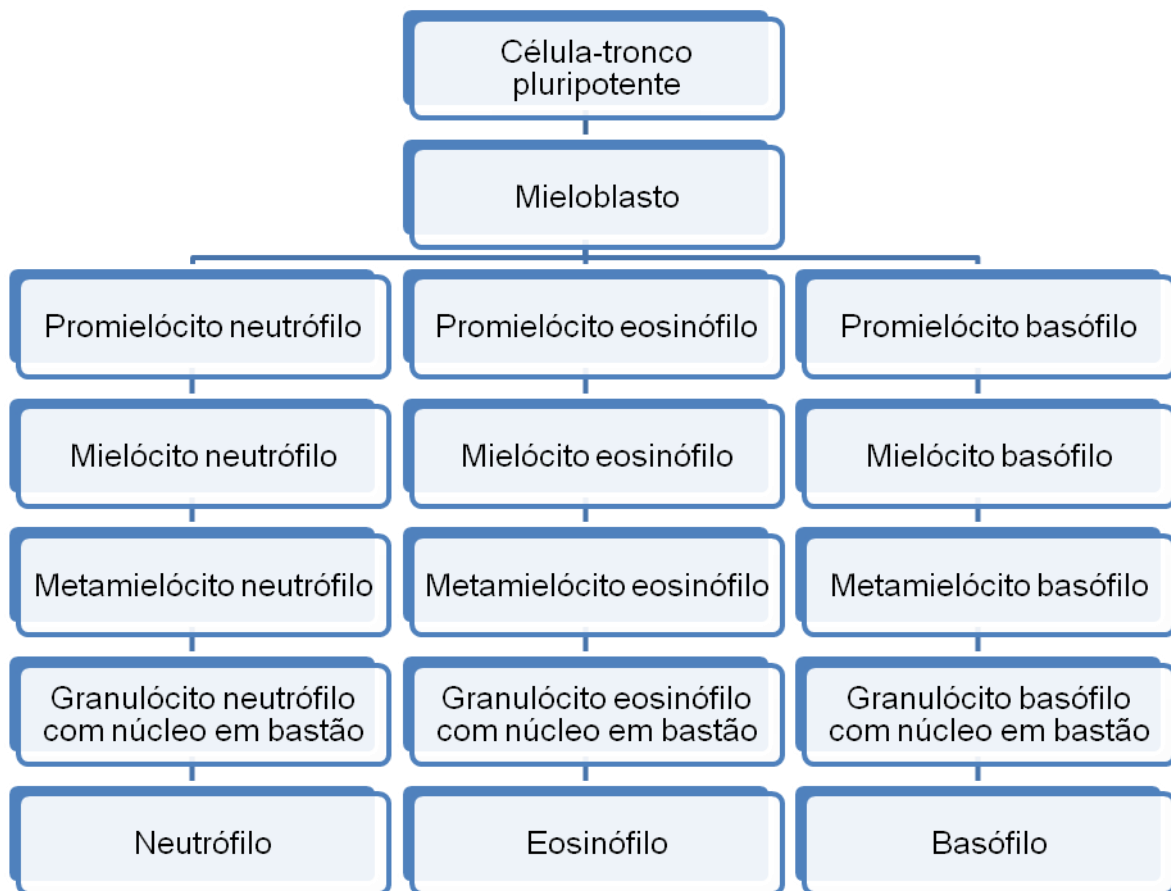
O metamielócito, por sua vez é uma forma que apresenta um núcleo com início de formação dos lóbulos, típicos dos granulócitos. Em seguida, o núcleo destes granulócitos adquire formato de bastão sendo designados granulócitos com núcleo em forma de bastão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A partir deste momento, tem-se a formação dos granulócitos maduros, sendo eles neutrófilos, eosinófilos ou basófilos.

Os neutrófilos maduros têm de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro e núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. Possui grânulos citoplasmáticos azurófilos e específicos.

Estes grânulos se diferenciam quanto ao seu formato e constituição. Além dos grânulos, os neutrófilos possuem vesículas secretoras e diversos receptores. São células importantes na fagocitose e eliminação de antígenos, desempenhando papel fundamental como primeira célula de combate imunológico (BRASILEIRO-FILHO, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os eosinófilos, por sua vez, são células pouco frequentes na corrente sanguínea, têm cerca de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentam um núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos maiores que aqueles presentes nos neutrófilos. Atuam especialmente em processos alérgicos e infecções parasitárias. Já os basófilos são células raramente encontradas no sangue, apresentam elevada concentração de grânulos citoplasmáticos que dificultam a observação do núcleo encurvado e arredondado. Possuem vida curta e atuam na modulação do processo inflamatório (BRASILEIRO-FILHO, 2009; JUNQUEIRA, 2005).

O esquema representativo dos precursores da linhagem granulocítica pode ser resumido na figura abaixo:



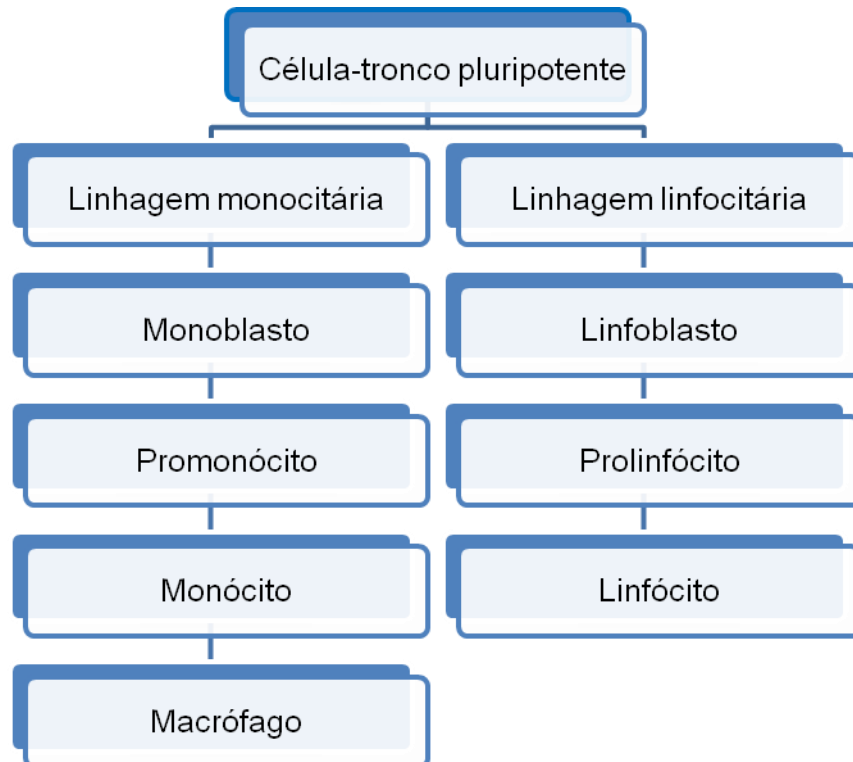
**Figura 6:** Esquema representando os precursores da linhagem granulocítica, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação dos granulócitos neutrófilo, eosinófilo e basófilo.

Na linhagem monocitária, o precursor mais jovem é o monoblasto, no entanto, esta é uma célula de difícil identificação e muitas vezes desconsiderada por alguns autores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O próximo precursor dessa linhagem é o promonócito, encontrado somente na medula óssea. É uma célula com cerca de 20 µm de diâmetro, possui cromatina delicada, citoplasma basófilo, aparelho de Golgi grande, retículo endoplasmático desenvolvido e apresenta numerosos grânulos azurófilos. O monócito é a maior célula circulante, tem o núcleo com um formato de rim e não possui grânulos citoplasmáticos. Após sua liberação para a corrente sanguínea onde permanece cerca de oito horas os monócitos migram para o tecido conjuntivo, onde sofrem maturação e são transformados em macrófagos (JUNQUEIRA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). De acordo com Brasileiro-Filho (2009) os macrófagos são células ricas em lisossomos, mitocôndrias e retículo

endoplasmático granular. Tem intensa atividade fagocitária e são importantes células apresentadoras de antígenos. Suas características e propriedades variam conforme sua localização e seu estado funcional. De acordo com o estímulo recebido, os macrófagos podem ser diferenciados em M1, que exercem efeitos inflamatórios ou M2, que atuam na resolução da inflamação, remoção de corpos apoptóticos e reparo de tecidos (BRASILEIRO-FILHO, 2009) (figura 7).

Os precursores da linhagem linfocitária são identificados com base no seu tamanho, estrutura da cromatina e presença de nucléolos. À medida que os precursores dos linfócitos sofrem maturação sua cromatina se torna mais condensada, os nucléolos ficam menos visíveis e a célula diminui de tamanho. Além disso, as subpopulações de linfócitos adquirem receptores de superfície específicos, facilitando a identificação destas células. A célula maior e mais jovem da linhagem linfocitária é o linfoblasto, que apresenta forma esférica, citoplasma basófilo e ausência de granulações azurófilas. Sua cromatina é relativamente condensada e possui dois ou três nucléolos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O próximo precursor desta linhagem é o prolinfócito, uma célula de tamanho inferior ao do linfoblasto e que contém granulações azurófilas. Sua cromatina é condensada e os nucléolos não são facilmente visíveis. Este precursor dá origem diretamente ao linfócito circulante (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os linfócitos são os menores leucócitos do sangue, apresentam núcleo arredondado e fortemente corado, não possuem grânulos citoplasmáticos, pouco retículo endoplasmático e aparelho de Golgi pouco desenvolvido (JUNQUEIRA, 2005) (figura 7).



**Figura 7: Esquema representando os precursores da linhagem monocitária e linfocitária, desde a célula originária (célula-tronco pluripotente) até a formação das formas maduras macrófago e linfócito.**

## **2.5 Mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO)**

A MPO ou mieloperoxidase é uma proteína encontrada especialmente em neutrófilos. No entanto, ela pode ser observada, em pequenas quantidades, em outros tipos de leucócitos (O'BRIEN, 2000).

Segundo Giovannini et al (2010), a MPO é uma proteína do grupo heme secretada por leucócitos ativados. Ela promove a conversão do peróxido de hidrogênio a ácido hipocloroso e de halogenetos em ácidos hipohalosos, levando a formação de compostos intermediários altamente reativos que por sua vez contribuem para a peroxidação lipídica (GIOVANNINI et al, 2010; O'BRIEN, 2000).

Muitos estudos mostram a relação da MPO com a doença cardiovascular. De acordo com O'Brien (2000), grandes quantidades dessa proteína são encontradas em lesões ateroscleróticas humanas. Além disso, Brevetti et al (2008) descrevem que níveis aumentados de MPO estão correlacionados com aumento da prevalência

de estenose coronariana e conseqüentemente, com a gravidade da doença cardiovascular.

Segundo Brevetti et al (2008), a MPO secretada em sítios de inflamação é capaz de converter a LDL em uma forma aterogênica, produzir espécies reativas de oxigênio e reduzir a disponibilidade do óxido nítrico, contribuindo para disfunção endotelial e maior risco para promoção e propagação da aterosclerose. A MPO pode contribuir para as várias fases de evolução da aterosclerose, participando da iniciação da lesão aterosclerótica, vulnerabilidade e ruptura da placa e suas manifestações clínicas (GIOVANNINI et al, 2010).

Os macrófagos são células de origem mieloide que circulam pelo sangue sob a forma de monócitos os quais, por sua vez, quando ativados sofrem diferenciação em macrófagos. Juntamente aos neutrófilos, os macrófagos constituem uma das primeiras linhas de defesa do organismo. Eles são fagócitos que promovem a internalização de partículas estranhas ou antígenos, liberando citocinas e ativando outras células imunes para seu combate e eliminação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; PARSLOW et al, 2004).

Para avaliar a infiltração de células mononucleares em um determinado tecido, especialmente de macrófagos, é possível avaliar a atividade da enzima *N-acetilglicosaminidase*, uma enzima presente em macrófagos. Esta enzima está presente no lisossomo dos macrófagos ativados e pode ser facilmente quantificada conforme propõem Bailey (1988)

Os eosinófilos são leucócitos formados e maturados na medula óssea e liberados na circulação. São recrutados em resposta a um estímulo inflamatório, migrando da circulação para o tecido alvo da infecção, onde podem liberar citocinas inflamatórias e quimiocinas. Essas células também atuam como apresentadoras de antígenos, ativando mastócitos e células T (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

De acordo com Rothenberg e Hogan (2006) os eosinófilos podem ser encontrados em níveis aumentados devido a reações alérgicas desencadeadas por medicamentos ou em processos patológicos como infecções parasitárias por helmintos, asma e distúrbios do trato gastrintestinal (esofagite eosinofílica, gastrite eosinofílica, gastroenterites, colite alérgica, doenças inflamatórias intestinais e doença do refluxo gastroesofágico).

Durante a resposta inflamatória, os eosinófilos podem induzir danos e disfunções teciduais, devido à intensa liberação de grânulos ou proteínas granulares

tóxicas e outros mediadores. Os grânulos dos eosinófilos contêm um núcleo cristalóide composto de MBP-1 e MBP-2 (proteína básica maior 1; 2) e uma matriz constituída por ECP (proteína catiônica de eosinófilo), EDN (neurotoxina derivada de eosinófilo) e EPO (peroxidase de eosinófilos), sendo essa última a mais abundante nos eosinófilos. Essas proteínas são capazes de promover a eliminação de patógenos como parasitas (especialmente helmintos), bactérias e fungos, desencadeando simultaneamente a indução de danos teciduais e disfunção endotelial. A liberação de proteínas granulares de eosinófilos também pode ser tóxica para diversos tecidos como coração, cérebro e pulmão (O'BRIEN, 2000; ROTHENBERG; HOGAN, 2006; SHI, 2004; WANG; SLUNGAARD, 2006).

Dentre as proteínas granulares dos eosinófilos, a EPO é bastante empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos. É uma proteína com peso molecular de 70 kDa que constitui cerca de 25% da massa de proteínas granulares secretadas pelos eosinófilos. Ela catalisa a oxidação de halogenetos, brometo, iodeto e óxido nítrico, formando espécies reativas de oxigênio e metabólitos reativos de nitrogênio responsáveis por morte celular via apoptose ou necrose (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

## **2.6 Tecido adiposo**

O tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo e essencial para o organismo, desempenhando importantes funções fisiológicas, que contribuem para a homeostasia corporal. Ele é constituído principalmente pelos adipócitos, mas possui outros componentes como pré-adipócitos, fibras nervosas, células imunes especialmente os macrófagos, vasos sanguíneos, nódulos linfóides e fibroblastos (FONSECA-ALANIZ et al, 2007; GALKINA; LEY, 2009; IBRAHIM, 2010).

Diversas atribuições são conferidas ao tecido adiposo, tais como o armazenamento de energia e as funções endócrina e imune (FARMER, 2009; GUIMARÃES et al, 2007; LIBBY et al, 2010; MOULIN et al, 2009; WAJCHENBERG et al, 2009).

Nos mamíferos são encontrados dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom (FARMER, 2009; FONSECA-ALANIZ et al, 2007). Estes tecidos apresentam distintas características e funções.

O tecido adiposo branco possui distribuição generalizada, abrangendo as regiões subcutânea e visceral. Várias funções são descritas para o tecido adiposo branco: preservação da temperatura corporal, armazenamento de energia, além de funções endócrinas, caracterizadas pela produção e secreção de adipocinas (FONSECA-ALANIZ, et al, 2007).

O adipócito branco jovem armazena múltiplas gotículas de lipídeos que formam uma partícula lipídica única no decorrer de seu amadurecimento. O adipócito branco maduro armazena os triglicérides em forma de uma gota lipídica grande e única, a qual ocupa a porção central da célula, deslocando o citoplasma, o núcleo e as demais organelas para a região periférica. Estas células apresentam um diâmetro entre 60 e 100  $\mu\text{m}$  e podem alterar o seu tamanho, conforme a quantidade de lipídeos acumulados (FONSECA-ALANIZ et al, 2007).

O tecido adiposo marrom é caracterizado pela produção de calor e regulação da temperatura corporal. Este tecido é encontrado principalmente em recém-nascidos, com localização na região em torno do ombro, apresentando elevada atividade metabólica (FONSECA-ALANIZ et al, 2007). Em adultos, este tecido pode ser encontrado, em pequenas quantidades, próximo ao pescoço e na parte superior do tórax, apresentando-se metabolicamente ativo (FARMER, 2009).

O adipócito que compõem o tecido adiposo marrom apresenta um diâmetro médio entre 30 e 40  $\mu\text{m}$  e armazena gotículas lipídicas de diversos tamanhos. Ele possui citoplasma abundante, núcleo esférico, além de numerosas mitocôndrias, principais responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos e produção de calor. A coloração do tecido adiposo marrom é caracterizada pela elevada concentração de citocromo oxidase, presente nas mitocôndrias (FONSECA-ALANIZ et al, 2007).

Além da classificação morfofuncional, o tecido adiposo pode ser designado subcutâneo ou visceral, conforme a sua localização. Segundo Fonseca-Alaniz et al (2007) o tecido adiposo subcutâneo é aquele que compreende os depósitos de gordura situados abaixo da pele, nas regiões abdominal, glútea e femural. Ele apresenta maior secreção de fatores anti-inflamatórios, tais como a adiponectina (BASTARD et al, 2006). Por sua vez, o tecido adiposo visceral compreende o depósito gorduroso encontrado próximo ou em torno dos órgãos da cavidade abdominal. Este último desempenha importante papel na patogênese da doença cardiovascular, por meio da produção e secreção de diversos mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6. De acordo com Libby, Ridker e Maseri (2002) a



produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelo tecido adiposo visceral pode potencializar a aterogênese. Assim, o acúmulo de tecido adiposo visceral é um fator preditor de distúrbios do metabolismo de lipídios e da glicose e para doenças coronarianas. (BASTARD et al, 2006; FONSECA-ALANIZ et al, 2007; HAJER et al, 2007).

Os adipócitos, principais constituintes do tecido adiposo, são células adaptadas para armazenar lipídeos e metabolizá-los sem comprometimento de sua integridade funcional (FONSECA-ALANIZ et al, 2007). De acordo com Bastard et al (2006), os adipócitos também apresentam propriedades semelhantes às daquelas do sistema imune, envolvendo a produção de mediadores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e ativação do sistema complemento. Além disso, os pré-adipócitos, células que dão origem aos adipócitos, desempenham funções de fagocitose, assim como os macrófagos (BASTARD et al, 2006; MOULIN et al, 2009).

Greenberg e Obin (2006) descrevem que o aumento ou expansão dos adipócitos caracteriza a ocorrência da obesidade. Esta condição favorece o aumento da produção e liberação de fatores pró-inflamatórios enquanto os níveis de adiponectina são reduzidos. A adiponectina é uma adipocina que possui propriedades anti-inflamatória, antiaterogênica e antidiabética, apresentando níveis reduzidos à medida que ocorre a expansão dos adipócitos e do tecido adiposo (HANSEN et al, 2009; IBRAHIM, 2010). Por outro lado, Moulin et al (2009) descreve que a perda de peso resulta em redução do tecido adiposo e consequentemente modificações no perfil imunológico, como a diminuição da secreção de mediadores inflamatórios e menor ativação de células inflamatórias.

Os adipócitos sintetizam e secretam proteínas chamadas adipocinas. As adipocinas são capazes de atuar sobre diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos e sua produção pode ser regulada por estímulos inflamatórios e mediante condições de hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, encontrando-se alterada em quadros de obesidade e síndrome metabólica. Estas adipocinas podem exercer papel anti-inflamatório ou pró-inflamatório (BASTARD et al, 2006; GREENBERG; OBIN, 2006; GUIMARÃES et al, 2007; KARMIRIS et al, 2006).

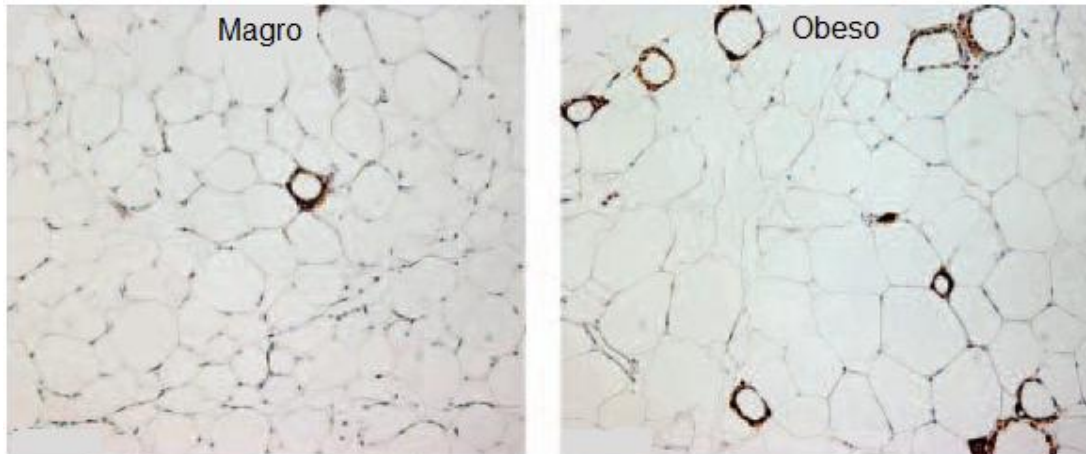
Existem mais de cinquenta tipos de adipocinas, as quais desempenham funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas, interferindo no metabolismo de lipídios e de glicose e contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e processos inflamatórios. Os adipócitos também são capazes de secretar quimiocinas como MCP-1, estimulando o recrutamento de macrófagos para

o tecido adiposo (BASTARD et al, 2006; FONSECA-ALANIZ et al, 2007; GREENBERG; OBIN, 2006; HAJER et al, 2007; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; TRAYHURN, 2005; WAJCHENBERG et al, 2009).

De acordo com Antoniades et al (2009) a produção e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo propicia uma correlação entre este tecido e outros sistemas corporais, devido as ações pró-inflamatória e anti-inflamatória de caráter endócrino, interferindo assim no desenvolvimento de doenças e em processos inflamatórios. Wajchenberg et al (2009) mostraram que o aumento na liberação de adipocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 contribui para o aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM1 e VCAM1, facilitando a adesão e rolamento de monócitos e sua migração para a íntima da artéria, favorecendo o desenvolvimento da aterosclerose (WAJCHENBERG et al, 2009).

Os macrófagos são importantes componentes do tecido adiposo. De acordo com Ibrahim (2010) os macrófagos são encontrados em maior concentração no tecido adiposo visceral, comparado ao tecido adiposo subcutâneo. A concentração destas células imunes está relacionada com a proporção do tecido adiposo. Segundo Rogacev et al (2010), o tecido adiposo expandido, caracterizando um quadro de obesidade, apresenta acúmulo de macrófagos em sua extensão e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias. De acordo com Cinti et al (2005) a concentração de macrófagos no tecido adiposo está associada diretamente com o tamanho dos adipócitos e o índice de massa corporal (IMC).

Segundo Murano et al (2008) grande parte dos macrófagos presentes no tecido adiposo são encontrados circundando os adipócitos mortos, formando as estruturas em forma de coroa (EFC) e promovendo a fagocitose dos lipídios remanescentes. Esta disposição favorece a identificação dos macrófagos e dos adipócitos mortos em toda a extensão do tecido, permitindo visualizar e contar as estruturas em forma de coroa (EFC) encontradas (MURANO et al, 2008). De acordo com Weisberg et al (2003) e Cinti et al (2005) as EFC são observadas frequentemente no tecido adiposo de animais obesos, quase não sendo encontradas em animais magros (figura 8). Assim, quanto maior a proporção do tecido adiposo e a extensão de seus adipócitos, maior a infiltração de macrófagos neste tecido e conseqüentemente a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para o desenvolvimento ou agravamento de doenças (MALAVAZOS et al, 2005).



**Figura 8: Imagem representativa das EFC presentes no tecido adiposo de animais magros e obesos.** As marcações em marrom indicam a presença de EFC. Adaptado de Cinti et al (2005).

De acordo com Schäffler et al (2006) existem dois mecanismos básicos que possibilitam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. O primeiro ocorre a partir da diapedese de monócitos circulantes para o tecido adiposo seguido de sua diferenciação em macrófagos. Esta diapedese é estimulada pela liberação de fatores quimioatraentes que dirigem a migração destes monócitos para o tecido adiposo. O segundo mecanismo é decorrente da diferenciação de pré-adipócitos ou células tronco mesenquimais em macrófagos residentes no tecido adiposo, conforme o estímulo.

## 2.7 Lipoproteínas e metabolismo de lipídios

As lipoproteínas são compostos hidrossolúveis formados por um núcleo central de lipídios apolares, constituído por triglicérides e ésteres de colesterol, uma monocamada superficial de fosfolipídios e colesterol e uma parte proteica, representada pelas apolipoproteínas (CURI et al, 2002; LEE; OLSON; EVANS, 2003; WAITZBERG, 2000) (tabela 1).

**Tabela 1 – Composição das lipoproteínas**

LIPOPROTEÍNA	COMPONENTES DE SUPERFÍCIE			LIPÍDIOS DO NÚCLEO	
	CL (%)	FL (%)	APO (%)	TG (%)	EC (%)
QM	35	63	2	95	5
VLDL	43	55	2	76	24
IDL	38	60	2	78	22
LDL	42	58	0,2	19	81
HDL2	22	75	2	18	82
HDL3	23	72	5	16	84

**Tabela 1: Composição das lipoproteínas.** CL – colesterol livre; FL – fosfolipídios; APO – apolipoproteínas; TG – triglicérides; EC – ésteres de colesterol; QM – quilomícrons; VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa; IDL – lipoproteína de densidade intermediária; LDL – lipoproteína de densidade baixa; HDL – lipoproteína de densidade alta. Adaptado de Curi et al (2002).

De acordo com Curi et al (2002) e Waitzberg (2000) as lipoproteínas podem ser classificadas em lipoproteínas ricas em triglicérides que compreendem os quilomícrons (QM) e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), ou lipoproteínas com baixo teor de triglicérides, que englobam a lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL), que pode ser subdividida em HDL2 e HDL3. Esta classificação envolve também o tamanho da lipoproteína e as apolipoproteínas presentes em sua composição. As apolipoproteínas estão diretamente relacionadas com a densidade da lipoproteína e têm como função reconhecer o sítio de ligação específico nas diferentes células e tecidos além de atuarem como coenzimas no metabolismo lipídico (WAITZBERG, 2000) (tabela 2).

**Tabela 2 – Classificação das lipoproteínas plasmáticas conforme a densidade, tamanho e apolipoproteínas presentes**

<b>LIPOPROTEÍNA</b>	<b>DENSIDADE (g/mL)</b>	<b>TAMANHO (nm)</b>	<b>APOLIPOPROTEÍNAS PRESENTES</b>
<b>QM</b>	<0,93	75-1200	AI, B48, CII, E
<b>VLDL</b>	0,93-1,006	30-80	B100, CI, CII, CIII, E
<b>IDL</b>	1,006-1,019	25-35	B100, CI, CII, E
<b>LDL</b>	1,019-1,063	18-25	B100, E
<b>HDL2</b>	1,063-1,125	9-12	AI, E, AIV
<b>HDL3</b>	1,125-1,210	5-9	AI, AII, AIV, CI, CII, D, E

**Tabela 2: Classificação das lipoproteínas plasmáticas conforme a densidade, tamanho e apolipoproteína presentes.** Fonte: Adaptado de Curi et al (2002)

A função das lipoproteínas é solubilizar os lipídios e promover seu transporte pelo sangue (WAITZBERG, 2000). O transporte de lipídios no organismo é realizado pela via exógena ou endógena. A via exógena é caracterizada pelos lipídios provenientes da dieta. Eles são metabolizados pela lipase pancreática, absorvidos no intestino delgado e levados até os tecidos periféricos ou ao fígado. Por sua vez, a via endógena é representada pelos lipídios produzidos no fígado e transportados até os tecidos periféricos (CURI et al, 2002).

Quilomícrons (QM) são formados no intestino delgado, a partir de componentes da dieta e são constituídos por TG e pela apo B-48, sendo essa sintetizada pelos enterócitos. Por meio do sistema linfático, os QM atingem a corrente sanguínea, onde passam por um processo dinâmico de troca de elementos de superfície com outras lipoproteínas, em especial a HDL, recebendo a apo C-II e apo-E. A apo C-II é responsável pela ativação da lipase lipoprotéica. Esta enzima é sintetizada pelo tecido adiposo e transportada para a superfície das células endoteliais. Ela atua hidrolisando os TG em ácidos graxos e glicerol, para captura pelas células periféricas e produção de energia ou reesterificação e armazenamento sob a forma de TG. Neste momento, a apo C-II é liberada e retorna para a HDL. As apo B-48 e a apo E permanecem no quilomícron que agora possui um reduzido teor de TG e é denominado quilomícron remanescente (QMR). Os QMR adquirem mais apolipoproteínas, em especial a apo-E, que possui alta afinidade pelos receptores B/E e pela proteína relacionada com o receptor de LDL, a LRP. As apolipoproteínas

presentes nos QMR identificam seus receptores presentes no fígado promovendo a capturação destes QMR e sua posterior oxidação (CURI et al, 2002; WAITZBERG, 2000).

O transporte endógeno dos ácidos graxos provenientes do tecido adiposo é feito principalmente pela albumina. Já aqueles provenientes do fígado são transportados pela lipoproteína VLDL e em pequena quantidade pela LDL e HDL (CURI et al, 2002).

A VLDL é sintetizada no fígado e contém a apo B-100. Na circulação, a VLDL realiza troca de elementos de superfície com outras lipoproteínas, em especial a HDL, ganhando a apo-CII. Nos tecidos periféricos, os TG presentes na VLDL sofrem ação da lipase lipoprotéica presente no endotélio dos capilares, que degrada os TG transportados em ácidos graxos e glicerol, liberando os ácidos graxos para as células periféricas. Após perder os TG, a VLDL, assim como os QM é enriquecida em apo-E e passa a ser chamada de IDL ou remanescente de VLDL. A IDL pode sofrer dois mecanismos distintos: ela pode ser captada pelo fígado por meio da interação entre a apo B-100 e apo-E e seus receptores hepáticos B/E ou pode ser metabolizada a LDL, pela ação da lipase hepática (CURI et al, 2002; WAITZBERG, 2000).

A LDL contém elevado teor de colesterol e vitamina E que são transportados aos tecidos periféricos. Ela permanece por um tempo prolongado no compartimento vascular. A remoção da LDL da circulação ocorre por meio de sua ligação aos receptores de LDL presentes na superfície das células. O colesterol liberado pela LDL é incorporado nas membranas celulares, armazenado na forma de ésteres de colesterol ou utilizado para sintetizar hormônios esteroides (ALVAREZ-LEITE et al, 2003; CURI et al, 2002; WAITZBERG, 2000).

A captação de LDL regula a concentração plasmática e intracelular de colesterol. Uma deficiência deste mecanismo de regulação resulta no aumento significativo da concentração plasmática de colesterol favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente da aterosclerose (CURI et al, 2002).

A HDL é uma apolipoproteína rica em FL, apo-AI e colesterol livre. Ela é sintetizada no fígado na forma discoide denominada HDL nascente. Ao atingir a corrente sanguínea, a HDL inicia o processo de remoção do colesterol periférico livre presente nas membranas celulares e seu transporte até o fígado para metabolização

e produção de ácidos e sais biliares. Este processo é conhecido como transporte reverso de colesterol. Deste modo, a HDL desempenha um papel ateroprotetor, prevenindo a aterogênese. Outras propriedades da HDL são a diminuição da expressão de VCAM e de citocinas inflamatórias, além de efeitos antioxidantes (CURI et al, 2002; GALKINA; LEY, 2009; LIBBY, RIDKER, MASERI, 2002; WAITZBERG, 2000; WANG et al, 2009).

A HDL converte o colesterol removido em ésteres de colesterol por meio da enzima LCAT, que é ativada pela apo-AI. Os ésteres de colesterol são incorporados ao núcleo da HDL, resultando em um aumento do tamanho desta lipoproteína e modificação da sua conformação, que passa a ser esférica. Nesta etapa, tem-se a HDL3, que é caracterizada por elevado teor de colesterol. O colesterol esterificado presente na HDL3 pode ser transferido para outras lipoproteínas por meio da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) mediante troca com TG, FL, apo-AI, apo-C e apo-E. Este processo origina a HDL2, que é maior, menos densa e com maior teor de triglicérides (CURI et al, 2002; WAITZBERG, 2000).

A remoção da HDL circulante ocorre mediante uma interação da apo-AI e da apo-E com receptores hepáticos específicos, o receptor B/E e o receptor de HDL (CURI et al, 2002; WAITZBERG, 2000).

## **2.8 Aterosclerose**

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que envolve a formação de lesões também chamadas de placa aterosclerótica e que acomete artérias de médio e grande calibre. É iniciada pela retenção de colesterol na íntima da artéria sob a forma de LDL e sua oxidação, gerando a LDL oxidada que causa inflamação crônica e fibrose. A doença acomete inicialmente a camada íntima da artéria atingindo outras camadas como a média e a adventícia conforme sua evolução (GALKINA; LEY, 2009; HANSSON; LIBBY, 2006; INSULL, 2009; TIAN et al, 2009).

Vários fatores de risco contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose. Dentre estes, podem ser citados a hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, diabetes melitus, obesidade, predisposição genética e hábitos alimentares (BINDER et al, 2002; INSULL, 2009; LIBBY et al, 2010).

A formação da placa de aterosclerose pode desencadear complicações clínicas como a estenose, hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, AVC,

insuficiência renal, aneurisma da aorta abdominal e isquemia de membros inferiores (HANSSON; LIBBY, 2006).

De acordo com Lusic (2000) nos vasos onde o fluxo sanguíneo é uniforme, as células endoteliais vasculares apresentam formato elipsoide e estão alinhadas na direção do fluxo. Porém, regiões onde o fluxo sanguíneo é perturbado, tais como em bifurcações e curvaturas, as células vasculares têm o formato poligonal e não seguem uma orientação específica, resultando em maior permeabilidade a moléculas como a LDL, caracterizando assim uma região preferencial para o desenvolvimento da aterosclerose.

A placa aterosclerótica é formada por células imunológicas, em especial macrófagos e linfócitos T, células endoteliais vasculares, células musculares lisas, matriz extracelular, lipídios e células *foam* incluindo uma região com a presença de núcleo necrótico e capa fibrosa (GALKINA; LEY, 2009; HANSSON; LIBBY, 2006).

A formação do ateroma ocorre em dois estágios. O primeiro estágio é caracterizado pelo surgimento das estrias gordurosas, decorrentes do acúmulo de colesterol e células imunes, especialmente macrófagos, na íntima da artéria (figura 9). No entanto, células T também são encontradas neste estágio (HANSSON; LIBBY, 2006; MAWHORTER; LAUER, 2001). A formação das estrias gordurosas é iniciada quando partículas de LDL circulantes migram por difusão passiva do sangue para a íntima da artéria onde sofrem modificações em sua estrutura originando a LDLox. Esta LDLox permanece retida na íntima, desencadeando uma reação inflamatória e consequente recrutamento de células imunes para a artéria (figura 9) (HANSSON, 2005; INSULL, 2009; LUSIC, 2000).

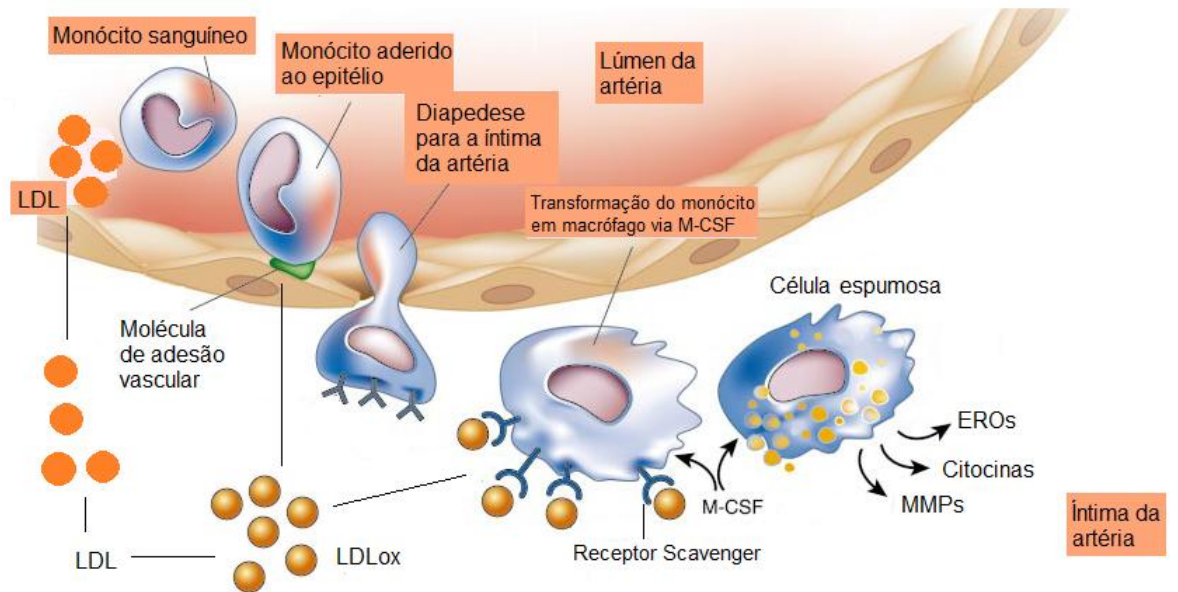
A LDLox presente na íntima da artéria contribui para a ativação das células endoteliais vasculares e aumento da expressão de moléculas de adesão como E-selectina, P-selectina e VCAM1 (HANSSON; LIBBY, 2006). O aumento da expressão dessas moléculas, em especial da VCAM1 promove maior migração de monócitos e linfócitos para a íntima da artéria (HANSSON; LIBBY, 2006; INSULL, 2009). Os monócitos e linfócitos se aderem às moléculas de adesão, onde ocorre o rolamento e posterior diapedese destas células para a íntima da artéria. Por sua vez, as células musculares lisas e as células endoteliais vasculares produzem e secretam M-CSF, um fator responsável pela diferenciação dos monócitos em macrófagos na íntima da artéria e pela expressão de receptores scavenger (figura 9) (HANSSON, 2005; HANSSON; LIBBY, 2006; LIBBY et al, 2010). De acordo com Hansson (2005)



esta etapa é fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose. Segundo Rogacev et al (2010) as células endoteliais vasculares liberam moléculas pró-inflamatórias contribuindo para o recrutamento de monócitos para a íntima da artéria.

Na íntima da artéria os macrófagos, principais células imunes envolvidas na aterosclerose, iniciam a endocitose da LDLox por meio de receptores scavenger como CD36, CD68, SR-A e SR-B1. Estes receptores são responsáveis pelo reconhecimento e internalização da LDLox, resultando na formação da célula *foam* e evolução do ateroma (HANSSON; LIBBY, 2006; INSULL, 2009). De acordo com Hansson (2005) e Rogacev et al (2010) a liberação de citocinas e quimiocinas na íntima da artéria contribui para aumentar o recrutamento de células imunes para a parede do vaso, ampliando a resposta inflamatória e favorecendo o desenvolvimento da placa (figura 9).

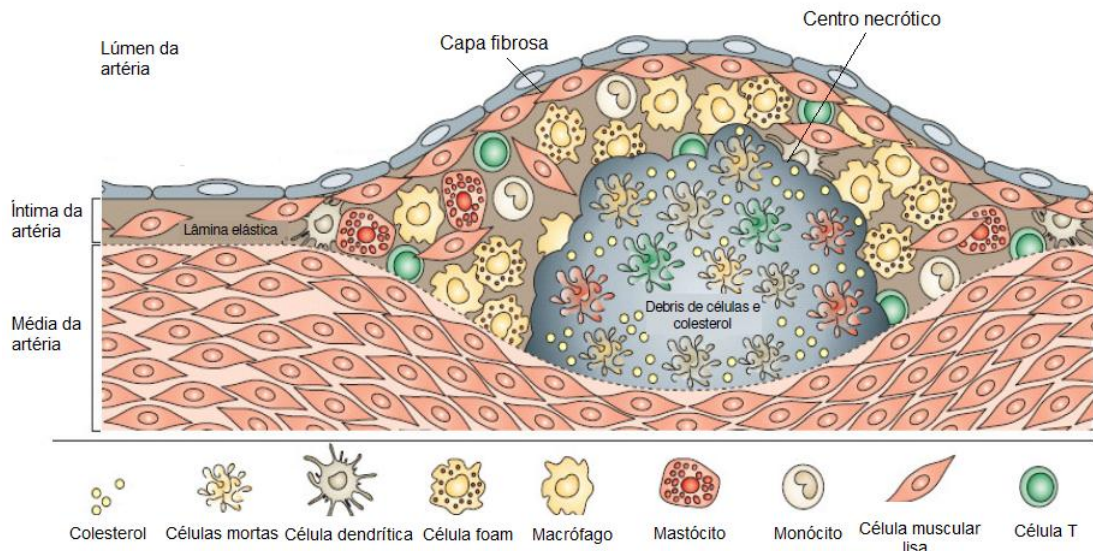
O acúmulo de células *foam* na íntima caracteriza a estria gordurosa e tem seu surgimento durante a infância e a adolescência. Estas estrias gordurosas não causam sintomas ao indivíduo e podem progredir, formando placas de aterosclerose avançadas ou desaparecer com o decorrer do tempo (HANSSON, 2005; HANSSON; LIBBY, 2006; INSULL, 2009). De acordo com Lusic (2000), as estrias gordurosas em humanos podem ser encontradas na aorta, logo na primeira década de vida; nas artérias coronárias, durante a segunda década de vida e nas artérias cerebrais a partir dos trinta anos de idade.



**Figura 9: Primeiro estágio de desenvolvimento da aterosclerose.** A LDL circulante migra para a íntima da artéria por difusão passiva onde sofre alterações em sua estrutura gerando a LDLox. A LDLox por sua vez estimula a expressão de moléculas de adesão vascular que propicia a adesão e diapedese dos monócitos sanguíneos para a íntima da artéria. Na íntima, o monócito sofre a ação da quimiocina M-CSF produzida pelas células endoteliais e musculares lisas sendo transformado em macrófago. O macrófago, por meio dos receptores Scavenger reconhece a LDLox promovendo sua endocitose e formando posteriormente a célula *foam*. A célula *foam* inicia a formação das estrias gordurosas, promove a liberação de citocinas, EROs e metaloproteínas (MMPs), estimulando o recrutamento de outras células imunes para a íntima da artéria, aumentando o processo inflamatório e levando à formação da placa de aterosclerose. Adaptado de Libby (2002)

O segundo estágio da formação da placa de aterosclerose é caracterizado pela etapa de maturação da placa, onde ela apresenta uma estrutura bastante complexa. Neste estágio, as células *foam* e aglomerados de colesterol são circundados por uma capa fibrosa constituída por colágeno, produzido pelas células musculares lisas que migram da camada média da artéria para a camada íntima. Esta migração e proliferação de células musculares lisas é estimulada por citocinas e fatores de crescimento produzidos por macrófagos e linfócitos. A capa fibrosa formada tem como função proteger a placa de aterosclerose e prevenir seu contato direto com o sangue. A ruptura desta capa leva a eventos trombóticos resultando nas diversas manifestações clínicas decorrentes da aterosclerose (HANSSON; LIBBY, 2006; INSULL, 2009; LUSIS, 2000). De acordo com Hansson e Libby (2006) e Lysis (2000), neste estágio, além de células mononucleares, outras células imunes são encontradas na placa, dentre elas as células dendríticas, mastócitos, células B e células NKT. Estas células produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN e TNF- $\alpha$

contribuindo para a ampliação do processo inflamatório na parede da artéria, gerando um aumento da placa aterosclerótica e conseqüentemente da estenose, favorecendo a ocorrência de outras complicações (figura 10).



**Figura 10: Placa de aterosclerose desenvolvida ou madura.** Nesta etapa, diversos componentes imunológicos, colesterol e células mortas são encontrados na composição da placa. No centro da placa há formação de um núcleo necrótico, composto por células mortas e colesterol livre. A capa fibrosa circunda a placa, envolvendo as células constituintes e protegendo o ateroma impedindo seu rompimento. Adaptado de Hanson e Libby (2006).

A espessura da capa fibrosa e a expansão da placa aterosclerótica definem a vulnerabilidade da placa à ruptura. Placas mais vulneráveis são aquelas que apresentam uma capa fibrosa fina, debilitada e com grande concentração de células inflamatórias. A manutenção da capa fibrosa depende de um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno. A liberação de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas (especialmente as metaloproteinases), produzidos pelos próprios componentes da placa são fatores que contribuem para sua desestabilização, uma vez que eles degradam o colágeno presente na placa tornando-a mais vulnerável à ruptura e favorecendo a formação do trombo. A estabilidade da lesão aterosclerótica também depende de processos como a calcificação e a neovascularização da placa (HANSSON, 2005; LUSIS, 2000).

## 2.9 Modelos murinos de aterosclerose

O modelo murino de aterosclerose é estudado em animais geneticamente modificados uma vez que os camundongos comuns são incapazes de desenvolver a doença (HANSSON, 2005). De acordo com Daugherty (2002), os camundongos são comumente usados em pesquisas de doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose, devido a facilidade de manipulações genéticas e a capacidade de gerar lesões ateroscleróticas semelhante às aquelas observadas em humanos. Além disso, por serem animais de pequeno porte, é fácil conseguir um número amplo de animais para estudar os mecanismos envolvidos na aterosclerose e obter resultados estatisticamente satisfatórios (DAUGHERTY, 2002).

As lesões formadas nos estudos sobre aterosclerose são restritas ao arco aórtico. Esta é a região mais comumente empregada na quantificação e caracterização da aterosclerose em modelo animal murino (DAUGHERTY, 2002).

De acordo com Hansson e Libby (2006) dois modelos murinos geneticamente modificados são bastante empregados no estudo da aterosclerose, sendo eles o modelo  $LDLr^{-/-}$  e o modelo  $apoE^{-/-}$ . O desenvolvimento da aterosclerose nestes modelos animais é semelhante ao processo que ocorre em humanos (HANSSON; LIBBY, 2006). Neste trabalho, utilizamos animais  $LDLr^{-/-}$  para estudar o efeito de duas aplicações do quimioterápico 5-FU no desenvolvimento da aterosclerose.

O animal  $LDLr^{-/-}$  necessita de uma dieta rica em lipídios para desenvolver hipercolesterolemia e formar a placa aterosclerótica (DAUGHERTY, 2002; HANSSON; LIBBY, 2006). Nos camundongos, a deleção do receptor de LDL leva a um modesto quadro de hipercolesterolemia quando os animais são alimentados com dieta normal. Desta forma, é necessário oferecer uma dieta modificada capaz de induzir a aterosclerose nestes camundongos (DAUGHERTY, 2002). Segundo Daugherty (2002) animais  $LDLr^{-/-}$  devem ser alimentados com uma dieta rica em ácidos graxos saturados e colesterol, a qual precisa ser ofertada por um período prolongado para propiciar aumento das concentrações circulantes de LDL, maior deposição desta partícula na íntima da artéria e formação das lesões ateroscleróticas. As lesões formadas nestes animais geralmente são caracterizadas como lesões iniciais constituídas principalmente por células *foam*. Lesões maduras contendo centro necrótico, capa fibrosa e calcificação requerem o fornecimento da

dieta aterogênica por um período ainda maior, assegurando o seu desenvolvimento (DAUGHERTY, 2002).

Em humanos, a ausência do receptor de LDL leva a um quadro clínico de hipercolesterolemia grave (DAUGHERTY, 2002; GOLDSTEIN; BROWN, 2009). Estes pacientes são altamente propensos à ocorrência de infarto agudo do miocárdio.

## **2.10 Doenças cardiovasculares e quimioterapia com 5-FU**

Algumas drogas antineoplásicas como o 5-FU são capazes de afetar as células cardíacas e desencadear efeitos colaterais cardiotoxícos (FONSECA et al, 2000). McGlinchey et al (2001) e Senkus e Jassem (2010) descreveram que a administração intravenosa do quimioterápico 5-FU pode causar angina, arritmia ventricular e supraventricular, isquemia ou mesmo morte súbita. Porém, cerca de 68% dos pacientes tratados com 5-FU são assintomáticos quanto aos efeitos cardíacos (SENKUS; JASSEM, 2010).

Para Monsuez et al (2010) a toxicidade cardíaca é um importante efeito colateral do 5-FU. Estes autores observaram modificações no eletrocardiograma e hipotensão arterial em pacientes tratados com 5-FU.

Os trabalhos de Jensen e Sorensen (2006) e Jensen et al (2010) relatam que o tratamento com 5-FU pode desencadear isquemia, arritmias, dores no peito que irradiam para o braço esquerdo e o pescoço, além de hipotensão arterial, infarto agudo do miocárdio e morte súbita.

No entanto, estes efeitos cardiotoxícos podem ser monitorados pela equipe de saúde que acompanha o paciente e tratados paralelamente à terapia quimioterápica.

Apesar do 5-FU estar relacionado com efeitos sobre o sistema cardiovascular, nenhum estudo correlacionou a ação desta droga com o desenvolvimento da aterosclerose, uma doença que causa complicações clínicas importantes como infarto, hipertensão arterial, trombose e AVC e tem o seu desenvolvimento relacionado aos hábitos alimentares do indivíduo, seu estilo de vida e condições do sistema imunológico.

### 3 JUSTIFICATIVA

O uso do 5-FU em oncologia é bastante comum, uma vez que este fármaco auxilia no tratamento de diversos tipos de tumores. Dois efeitos colaterais desencadeados pela droga são a mucosite e a mielossupressão. A mucosite é caracterizada pela presença de um processo inflamatório em toda a mucosa do trato gastrointestinal resultando no aumento das concentrações de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), em níveis locais e circulantes. O aumento destes mediadores pró-inflamatórios pode contribuir para o agravamento da doença aterosclerótica. Desta forma, os pacientes seriam tratados do câncer mas entrariam para um grupo de risco para doenças cardiovasculares, aumentando a probabilidade de morte por doenças decorrentes da aterosclerose (figura 11). Por outro lado, a mielossupressão tardia, causada pelo tratamento quimioterápico com 5-FU pode resultar em diminuição da produção de células mieloides como os macrófagos e conseqüentemente, reduzir sua migração para outros sítios corporais como a aorta e o tecido adiposo, diminuindo a inflamação nestes sítios e possivelmente, reduzindo a formação da lesão aterosclerótica na aorta (figura 11).

Diante da possibilidade do quimioterápico 5-FU exercer diferentes papéis sobre a aterosclerose e o tecido adiposo, fez-se importante a realização do presente estudo para avaliar se este agente quimioterápico tem influência sobre o tecido adiposo e se ele pode contribuir para o agravamento da doença aterosclerótica e maior probabilidade de morte por suas complicações ou se o 5-FU pode retardar o desenvolvimento da doença.

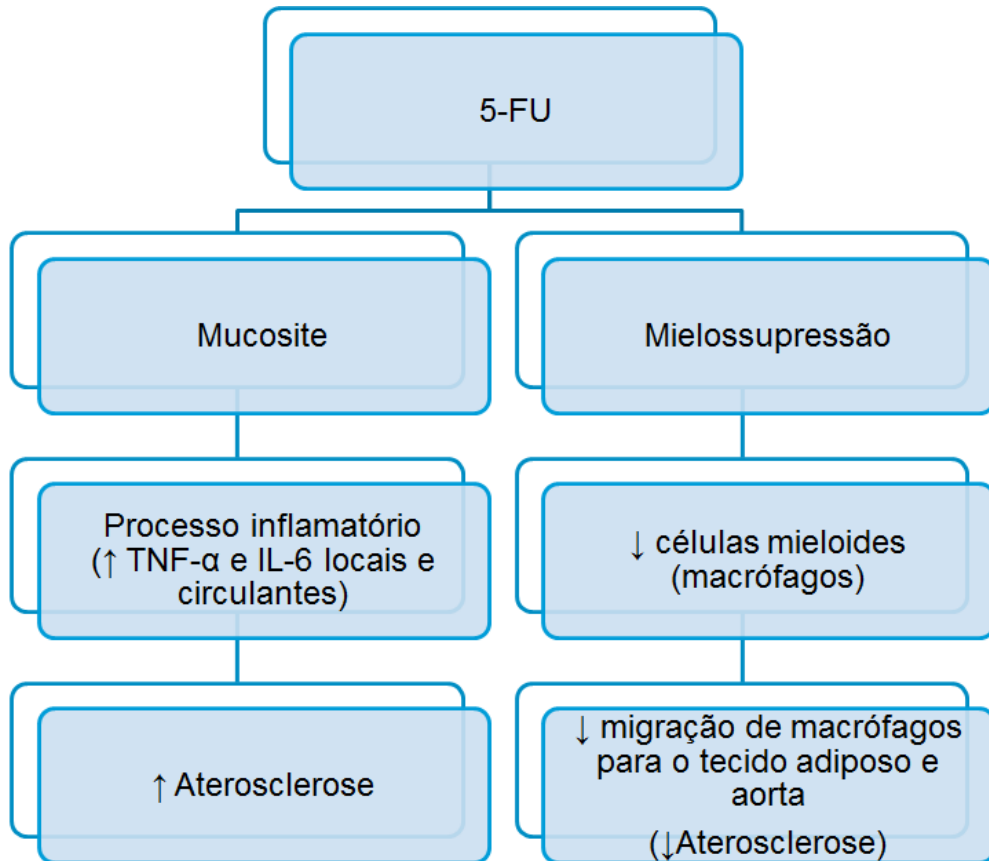


Figura 11: Esquema representativo das hipóteses da presente pesquisa.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de duas aplicações do quimioterápico 5-FU no perfil do tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em animais LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta ocidental.

### 4.2 Objetivos específicos

Neste trabalho, avaliamos se animais LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta ocidental, submetidos a duas aplicações de 5-FU, apresentam alterações metabólicas, comparados a animais controles. Para tais comparações, foram avaliados:

- evolução ponderal semanal;
- ingestão alimentar e hídrica;
- perfil lipídico plasmático, hepático e nos conteúdos do ceco e do cólon;
- glicemia plasmática;
- perfil do tecido adiposo – quantidade de tecido, tamanho dos adipócitos, atividade de macrófagos;
- perfil do intestino delgado - peso, comprimento e perfil inflamatório (quantificação indireta da atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos);
- aspectos morfológicos da mucosa intestinal;
- contagem total e diferencial de células na medula óssea e na circulação;
- extensão da válvula aórtica, área da lesão aterosclerótica e obstrução da válvula aórtica;



- quantificação de macrófagos na lesão aterosclerótica.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), número do protocolo 176/2009 (Anexo A).

### 5.1 Animais experimentais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos homocigotos para a ausência do gene que codifica o receptor de LDL ( $LDLr^{-/-}$ ), gerados no *background* C57BL/6, obtidos do Biotério Ênio Cardillo Vieira, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram usadas fêmeas, com idade entre seis e oito semanas. O uso de fêmeas foi estabelecido devido a maior formação de placas em animais deste sexo, comparados aos machos. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com temperatura controlada (22°C) e com ciclos de luminosidade de doze horas (07:00h às 19:00h).

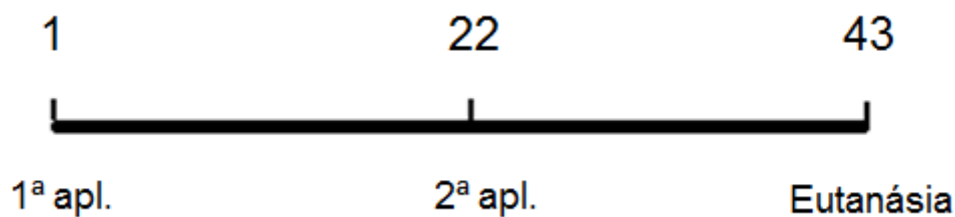
### 5.2 Delineamento experimental

Os camundongos deficientes do receptor de LDL ( $LDLr^{-/-}$ ) foram distribuídos em dois grupos, controle e 5-FU, conforme o peso corporal e as concentrações iniciais de colesterol total e triglicerídeos.

O grupo 5-FU recebeu duas aplicações do quimioterápico 5-FU, numa dosagem de 150mg/kg (Soares et al, 2008), a qual é capaz de induzir o desenvolvimento de mucosite com pico máximo de inflamação no terceiro dia pós quimioterapia. Neste trabalho, foi estabelecido um intervalo de três semanas entre as aplicações de 5-FU, uma vez que Soares et al (2008) mostraram que no décimo quinto dia após uma administração de 150 mg/kg de 5-FU, os animais apresentavam recuperação da morfologia da mucosa intestinal, com atividade normal de neutrófilos na mesma. Desta forma, optou-se neste trabalho por um intervalo de vinte e um dias entre as aplicações de 5-FU com o intuito de avaliar as alterações metabólicas em um período não-agudo da quimioterapia, mostrando os efeitos tardios que o 5-

FU poderia causar no organismo. Para comparação, o grupo controle recebeu duas aplicações de PBS, seguindo o mesmo protocolo.

As aplicações de 5-FU ou placebo foram realizadas com intervalo de 3 semanas ou seja no dia 1 e 22 e a eutanásia aconteceu 3 semanas após a segunda aplicação, ou seja, no dia 43 do experimento (figura 12).



**Figura 12: Esquema representativo da administração do quimioterápico 5-FU (grupo 5-FU) ou de placebo – PBS (grupo controle).** O dia 1 corresponde ao dia em que foi realizada a primeira aplicação dos agentes em estudo. O dia 22 corresponde ao momento da segunda aplicação dos agentes em estudo (5-FU e PBS). O dia 43 representa o momento em que ocorre a eutanásia dos animais.

Os animais de ambos os grupos foram alimentados com dieta ocidental (tabela 3) e ingeriram água filtrada sem nenhuma restrição, durante todo o período experimental.

**TABELA 3A – Composição da dieta ocidental**

<b>INGREDIENTES</b>	<b>Quantidade em gramas*</b>	<b>%</b>
<b>Sacarose</b>	341,46	34,146
<b>Manteiga sem sal</b>	210,00	21,0
<b>Caseína</b>	195,00	19,5
<b>Amido de milho</b>	150,00	15,0
<b>Celulose</b>	50,00	5,0
<b>Mistura de minerais</b>	35,00	3,5
<b>Mistura de vitaminas</b>	10,00	1,0
<b>Carbonato de cálcio</b>	4,00	0,4
<b>Metionina</b>	3,00	0,3
<b>Colesterol</b>	1,50	0,15
<b>BHT</b>	0,04	0,004

\* quantidades empregadas para o preparo de 1 kg de dieta ocidental.

**TABELA 3B – Composição de macro e micronutrientes da dieta ocidental**

<b>Macronutrientes</b>	<b>%</b>
<b>Carboidratos</b>	54,146
<b>Proteínas</b>	19,5
<b>Lipídios</b>	21,15
<b>Micronutrientes</b>	5,204
<b>% Total</b>	<b>100</b>

### 5.3 Controle do peso corporal, consumo alimentar e hídrico

A evolução ponderal e o ganho de peso dos animais foram acompanhados por meio da pesagem semanal em balança semi-analítica. A ingestão alimentar e a

ingestão hídrica foram monitoradas semanalmente, com base na quantidade ofertada anteriormente e a quantidade que restou na gaiola e mamadeira respectivamente. Os valores foram expressos como média de consumo (em gramas) por animal por dia.

#### **5.4 Eutanásia dos animais**

Após seis semanas de experimento, foi realizada a eutanásia dos animais por meio da exsanguinação. Para isso, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas. Em seguida, eles foram anestesiados com solução de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (11,5 mg/kg) diluídos em PBS. O anestésico foi administrado via intraperitoneal. Foram coletados sangue, medula óssea, intestino, fezes em formação no cólon (conteúdo do cólon), tecido adiposo perigonadal, fígado, coração e aorta, para a realização das análises.

#### **5.5 Avaliação do perfil lipídico**

##### **5.5.1 Determinação da concentração de colesterol total plasmático**

A concentração de colesterol total foi determinada pelo método da colesterol oxidase proposto por Allain et al (1974). Foi utilizado kit comercial Labtest, Brasil. A técnica consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase, formando colesterol livre. Este colesterol, na presença da colesterol oxidase e de oxigênio, gera peróxido de hidrogênio que por sua vez, reage com a peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produzindo um composto de coloração róseo-avermelhado que possui absorvância máxima de 500nm.

Para avaliar as concentrações de colesterol no plasma dos animais, após a aplicação do anestésico o sangue foi obtido pelo plexo inguinal, depois do jejum de doze horas. O sangue foi armazenado em tubo eppendorf contendo heparina e centrifugado em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243, a 6000 RPM por cinco minutos para separação do plasma.

A concentração de colesterol plasmático foi determinada por um ensaio em microplacas de 96 poços, conforme Fazio et al (1997). Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi diluída em 995 µL de água deionizada (1:200). Foram plaqueados

em duplicata, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra diluída. 100  $\mu\text{L}$  de reagente de colesterol total foram adicionados a cada amostra e a placa foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após a incubação, a absorvância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). Após a leitura, foi estabelecida a média de cada duplicata e a determinação dos níveis de colesterol total.

#### 5.5.2 Determinação da concentração de HDL-colesterol plasmático

A concentração de HDL-colesterol (HDLc) no plasma foi determinada por meio de kit enzimático Labtest, Brasil. O método consiste na precipitação das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúrgstico e cloreto de magnésio. 20  $\mu\text{L}$  de reagente precipitante foram adicionados a 20  $\mu\text{L}$  de plasma e agitados vigorosamente com a pipeta durante 30 segundos. As amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos e em seguida foram centrifugadas a 12000 RPM por 4 minutos. Após a centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade é determinado no sobrenadante. 10  $\mu\text{L}$  deste sobrenadante foram plaqueados em microplaca, em duplicata. Logo após foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de reagente de cor Colesterol Liquiform – Labtest (Brasil) a todas as amostras. A microplaca foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após a incubação, a absorvância foi lida a 492nm. Para posterior cálculo da concentração de HDLc utilizou-se a média de cada duplicata.

Para a determinação do padrão foram substituídos 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de amostra por 20  $\mu\text{L}$  de padrão de HDLc. Para o cálculo das concentrações de HDLc foi feita a determinação do fator de calibração (F) através da seguinte equação:

$$F = 40/\text{média da absorvância do padrão,} \\ \text{sendo F o fator de calibração;}$$

$$\text{HDLc (mg/dL)} = \text{absorvância da amostra} \times F$$

### 5.5.3 Determinação do colesterol não-HDL e relação de aterogênese

O colesterol não-HDL compreende as demais frações de colesterol sendo elas VLDLc, IDLc e LDLc. Elas são obtidas pela diferença entre a concentração de colesterol total e de HDLc.

A relação de aterogênese foi determinada pela razão entre a concentração de colesterol total e de HDLc.

### 5.5.4 Determinação da concentração de triglicerídeos plasmáticos

A concentração de triglicerídeos plasmáticos foi determinada conforme o método enzimático colorimétrico (FOSSATI, PRENCIPE, 1982), utilizando kit comercial Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos plasmáticos pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. O glicerol é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol fosfato, o qual, em presença de oxigênio, produz o peróxido de hidrogênio. A peroxidase age sobre o peróxido de hidrogênio que em presença de um reagente fenólico 4-clorofenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com absorção máxima a 510nm.

Para avaliar as concentrações de triglicerídeos no plasma dos animais, o ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi diluída em 495 µL de água deionizada (1:100). Foram plaqueados, em duplicata, 100 µL de cada amostra diluída. 100 µL de reagente de cor foram adicionados a cada amostra e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus). Após a leitura, utilizou-se a média de cada duplicata para determinação da concentração plasmática de triglicérides.

## 5.6 Avaliação da glicemia

A concentração de glicose no plasma foi dosada por meio do kit enzimático Labtest, Brasil. O teste se baseia na oxidação da glicose a ácido glucônico, por meio da glicose oxidase, liberando peróxido de hidrogênio. A peroxidase, em presença de

fenol e 4-aminoantipirina, reage com o peróxido de hidrogênio produzindo um composto róseo-avermelhado com absorção máxima a 520nm.

O sangue foi separado utilizando fluoreto como anticoagulante com ação antiglicolítica (Glistab, Labtest, composto de EDTA 6 g/L e fluoreto de potássio 12 g/L). Em uma microplaca, foram plaqueados, em triplicata, 2 µL de cada amostra com posterior adição de 200 µL do reagente de glicose em todos os poços. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C por 15 minutos. Após a reação, foi feita a leitura da absorbância a 492nm em leitor de microplaca (Modelar Devices, modelo Spectra Max Plus).

Para a determinação do padrão foram substituídos 2 µL da amostra por 2 µL de padrão. Para o cálculo da concentração de glicose em mg/dL foi utilizada a seguinte fórmula, indicada pelo kit Labtest:

$$\text{Concentração de glicose: (média da absorbância da amostra/média da absorbância do padrão) x 100}$$

### **5.7 Perfil lipídico hepático e nos conteúdos do ceco e do cólon**

Durante o sacrifício o fígado foi removido e congelado a -80°C para posterior quantificação da concentração de lipídios totais, colesterol total e triglicerídeos. Os conteúdos do ceco e do cólon foram removidos e armazenados separadamente a -80°C para a mesma avaliação do perfil lipídico.

A extração dos lipídios totais presentes no fígado e nos conteúdos do ceco e do cólon foi realizada conforme a metodologia descrita por Folch et al (1957).

Para a extração de lipídios no fígado, 100 mg de cada amostra foram pesados em tubos de ensaio de vidro e homogeneizados por três minutos com 1900 µL de solução de clorofórmio-metanol (2:1). Em seguida, foi acrescentado um jato forte de metanol, no volume de 400 µL. O homogenato foi centrifugado por dez minutos a 3000 RPM. O sobrenadante formado foi transferido para outro tubo de ensaio de vidro devidamente identificado. Foram acrescentados 800 µL de clorofórmio a cada amostra e em seguida, um jato forte de solução de NaCl a 0,73% no volume de 640 µL. As amostras foram homogeneizadas a 3000 RPM por 10 minutos. A fase superior foi desprezada e a parede de cada tubo foi lavada três vezes com solução



de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%), sendo utilizados 600 µL desta solução em cada lavagem. Os tubos foram colocados em estufa a 37°C até secagem dos solventes e obtenção da fração lipídica. A quantidade de lipídios extraídos foi pesada e realizou-se o cálculo do teor de lipídios totais pela diferença de peso. Após a obtenção da fração lipídica total, acrescentou-se 500 µL de isopropanol para ressuspender os lipídios extraídos e assim proceder a dosagem de colesterol total e triglicérides por meio de kits enzimáticos, conforme rotina.

Para a extração de lipídios dos conteúdos do ceco e do cólon, estes foram removidos, pesados e colocados em tubos de ensaio de vidro. O protocolo para extração de lipídios nestes conteúdos é o mesmo empregado para extração no fígado. Porém, deve-se utilizar ¼ dos reagentes mencionados, exceto a solução de Folch, onde devem ser utilizados 600 µL da solução, em cada lavagem. A mensuração dos lipídios extraídos também é realizada pela diferença de peso. Após obtenção da fração lipídica, devem ser acrescentados 500 µL de isopropanol para ressuspender os lipídios extraídos e assim proceder a dosagem de colesterol total e triglicérides por meio de kits enzimáticos, conforme rotina.

## **5.8 Avaliação do tecido adiposo visceral**

### **5.8.1 Peso do tecido adiposo pelo peso corporal**

No sacrifício, o tecido adiposo perigonadal, um tipo de tecido adiposo visceral, foi removido e lavado em PBS para remoção de resíduos. Em seguida, o tecido adiposo foi pesado em balança analítica. O peso foi registrado e posteriormente foi expresso com relação ao peso corporal.

### **5.8.2 Avaliação histológica do tecido adiposo visceral**

Para análise histológica, o tecido adiposo perigonadal, o tecido visceral mais abundante nos animais, foi removido, lavado em PBS e fixado em DMSO. Após permanecer sete dias em freezer -80°C as amostras foram processadas como rotina para inclusão em paraplast. Cortes de 10 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. A seleção de cortes para análise

foi feita com o auxílio de um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital utilizada na capturação das imagens. As imagens obtidas no aumento de 100x foram analisadas com o Programa Image Pro Plus. Foram avaliados 300 adipócitos por animal e obtida a média do tamanho dos adipócitos.

Para a contagem de estruturas em forma de coroa, dez campos de cada amostra foram analisados em microscópio óptico, com aumento final de 400x. As estruturas em forma de coroa (EFC) foram contadas em cada campo. O resultado foi expresso em número de estruturas tipo coroa por campo.

### 5.8.3 Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) no tecido adiposo visceral

Para a quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) presente em macrófagos, 100 mg de tecido adiposo perigonadal descongelado foram pesados e homogeneizados com 2 mL de solução Salina/Triton (Salina 0,9% e Triton x-100 0,1%) e em seguida centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 3000 RPM. 100 µL do sobrenadante foi coletado e diluído em tampão citrato fosfato (ácido cítrico 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M) para proceder o ensaio de NAG. Na microplaca foram plaqueados, em duplicata, 100 µL de cada amostra diluída. Foram acrescentados 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluído em tampão citrato fosfato. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados as amostras para paralisar a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 400nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

Realizamos a dosagem de proteínas no tecido adiposo seguindo o mesmo protocolo abaixo para o intestino. Após a dosagem de proteínas, os resultados obtidos para a atividade da enzima NAG foram corrigidos e expressos como mg/ptn

## 5.9 Avaliação do intestino delgado

### 5.9.1 Peso do intestino pelo peso corporal

Na eutanásia, o intestino delgado foi removido após incisões abaixo do piloro e na válvula íleo-cecal. O órgão foi perfundido com PBS para remoção de resíduos e em seguida pesado em balança analítica. O peso foi registrado e posteriormente foi expresso com relação ao peso corporal.

### 5.9.2 Comprimento intestinal

Após pesagem, o intestino foi medido com uso de uma régua milimetrada. O comprimento intestinal, expresso em centímetros, compreendeu a distância entre a porção inicial do intestino delgado e a porção distal do órgão.

### 5.9.3 Avaliação do infiltrado inflamatório no intestino

A avaliação do infiltrado inflamatório intestinal consistiu na medida da atividade das enzimas Mieloperoxidase (MPO), n-acetilglicosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO), presentes em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos respectivamente.

O intestino delgado após remoção foi perfundido com PBS para eliminação de resíduos e posterior avaliação da atividade das enzimas mencionadas. Inicialmente, o intestino foi dividido em suas porções anatômicas, sendo elas duodeno, jejuno e íleo. A divisão do intestino seguiu o protocolo proposto por Ferraris et al (1992), onde o duodeno compreende 20% do comprimento total do intestino, o jejuno corresponde a 60% e o íleo corresponde a 20%. Cada segmento foi devidamente identificado e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

Para as análises, as amostras foram descongeladas e pesadas em balança analítica. Foram separados 20 mg de cada segmento do intestino delgado para a realização de cada um dos ensaios enzimáticos. Os fragmentos foram armazenados em tubo eppendorf, seguindo a realização das devidas análises, conforme os seguintes protocolos.

### 5.9.3.1 Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas na solução *Buffer 1* gelada (NaCl 0,1M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M), numa proporção de 1,9 mL/100mg de tecido e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em solução de NaCl 0,2% e NaCl 1,6% acrescida de 5% de glicose, ambas geladas, numa proporção de 1,5mL/100mg de tecido. As amostras foram novamente homogenizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em *Buffer 2* (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e HETAB 0,5% p/v) solução esta armazenada à temperatura ambiente, numa proporção de 1,9 mL/100mg. As amostras foram homogeneizadas e metade do volume foi retirado para a dosagem da atividade da enzima NAG. A outra metade do homogenato foi utilizada para a determinação da atividade da MPO. A partir desta etapa, as amostras receberam tratamentos distintos.

#### 5.9.3.1.1 **Quantificação indireta da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no intestino**

Para o ensaio de MPO, após a divisão do homogenato, àquele destinado à dosagem da atividade da MPO foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em água a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado três vezes consecutivas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10000 RPM. Foi retirada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para diluição em *Buffer 2* e realização do ensaio enzimático.

Na microplaca, foram plaqueados, em duplicata, 25 µL de cada amostra. Foram adicionados 25 µL do substrato TMB, previamente diluído em DMSO. A placa foi colocada em estufa a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% e as amostras foram novamente incubadas a 37°C por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura da absorbância foi feita a 450nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para a determinação da atividade da enzima.

### **5.9.3.1.2 Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG)**

Após a divisão do homogenato, a avaliação da atividade da NAG foi feita separadamente. Para isso, foi acrescentado ao homogenato a solução Salina/Triton (Salina 0,9% e Triton x-100 0,1%), numa proporção de 2mL/100mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 3000 RPM. 100 µL do sobrenadante foi coletado e diluído em tampão citrato fosfato (ácido cítrico 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M) para proceder o ensaio de NAG. Na microplaca foram plaqueados 100 µL de cada amostra diluída. Foram acrescentados 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluído em tampão citrato fosfato. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados as amostras para paralisar a reação. A absorbância foi lida a 400nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

### **5.9.3.2 Preparo das amostras e ensaio enzimático para quantificação da atividade indireta da peroxidase de eosinófilos (EPO)**

Para quantificar a atividade da enzima peroxidase de eosinófilos, o tecido pesado para esta técnica foi acrescido de PBS 5% numa proporção de 1,9mL/100 mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuspenso em solução salina 0,2% e solução salina 1,6% com 5% de glicose, ambas na proporção de 1,5mL/100mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em solução de PBS com HETAB 0,5%, na proporção de 1,9mL/100mg de tecido. Após a homogeneização, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado três vezes. Após esta etapa, as amostras foram novamente centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. No ensaio enzimático, 75 µL de cada amostra foram plaqueados em microplacas, em duplicata. Acrescentou-se 75 µL do substrato OPD diluído em tampão tris-HCl

com acréscimo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e a placa foi mantida à temperatura ambiente e protegida da luz por 30 minutos, tempo necessário para ocorrer a reação desejada. A reação foi paralisada com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. A absorbância foi lida a 492nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

#### 5.9.4 Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi realizada em homogenatos de intestino obtidos durante o processamento deste tecido para análise enzimática. A técnica foi realizada conforme a metodologia proposta por Lowry et al (1951). Realizou-se uma diluição de 1:100 para intestino em água deionizada. 250 $\mu\text{L}$  desta diluição foram transferidos para outro eppendorf devidamente identificado. 250 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo  $\text{CuSO}_4$ , Tartarato de sódio e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , na proporção de 1:1:100 respectivamente, foi acrescentada em cada eppendorf. Em seguida 25 $\mu\text{L}$  do reagente de Folin, na proporção de 1:2, diluído em água deionizada, foram colocados em cada eppendorf, seguindo de uma agitação imediata em vórtex. Após trinta minutos em repouso à temperatura ambiente, 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram plaqueados, em duplicata, em microplacas. A absorbância foi lida a 660nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da concentração de proteínas.

Após a dosagem de proteínas, os resultados obtidos para a atividade das enzimas NAG, MPO e EPO foram corrigidos e expressos como mg/ptn.

#### 5.9.5 Avaliação histopatológica do intestino

Após o sacrifício, o intestino foi removido cuidadosamente e perfundido com PBS e formaldeído a 10%. Em seguida, o intestino foi dividido em suas três porções anatômicas: duodeno, jejuno e íleo, conforme descrito por Ferraris et al (1992). Cada segmento foi identificado em sua porção inicial e armazenado em formaldeído a 10%. As amostras foram processadas como rotina para inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos a 5  $\mu\text{m}$ . As lâminas foram devidamente codificadas e coradas em hematoxilina e eosina. O material foi submetido à análise histopatológica e morfométrica feita por uma especialista.

Para obtenção das imagens, os cortes foram selecionados a partir da observação em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e as imagens capturadas com o auxílio de um computador.

### **5.10 Extração de medula óssea**

Após o sacrifício foram removidos o fêmur direito e o fêmur esquerdo de cada animal após secção cutânea dos membros inferiores e retirada dos músculos anteriores e posteriores. Os materiais foram processados individualmente. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem individual da cavidade do fêmur com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de meio RPMI completo. A suspensão de células foi coletada em uma placa de petri e cuidadosamente homogeneizada com a própria seringa empregada na remoção da medula. Posteriormente, as células mieloides diluídas no meio de cultura foram transferidas para um tubo eppendorf e mantidas em gelo.

#### **5.10.1 Contagem total de células mieloides**

As células mieloides foram quantificadas em câmara de Neubauer após diluição de 1:10 em meio RPMI completo. A contagem foi realizada seguindo o mesmo protocolo utilizado para contagem total de células circulantes. Após proceder a contagem total do fêmur direito e do fêmur esquerdo, foi calculada a média para expressar o resultado final.

#### **5.10.2 Preparo de lâminas histológicas de medula óssea**

Para o preparo de lâminas histológicas de medula óssea, 10  $\mu$ L da solução contendo as células mieloides foram diluídos em 90  $\mu$ L de albumina 3%. A partir desta diluição foram confeccionadas lâminas para avaliação morfológica por meio de citocentrifugação. As lâminas foram coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947).

### 5.10.3 Contagem diferencial de células mieloides

Para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares presentes na medula óssea foram analisadas 500 células por lâmina por fêmur e por animal e o resultado transformado em porcentagem. Após proceder a contagem, foi calculada a média dos fêmures de cada animal para expressar o resultado final, em porcentagem. A partir da contagem total de células mieloides, foi determinado o valor absoluto para cada linhagem analisada.

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hematopoiéticos de camundongos foi baseada nos seguintes quesitos: relação núcleo-citoplasma, afinidade tintorial do citoplasma, presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, padrão de cromatina nuclear, presença ou não de nucléolos, diâmetro e segmentação ou não do núcleo.

Na série granulocítica, consideram-se as etapas maturativas: blastos, envolvendo o hemocitoblasto, mieloblasto e linfoblasto; formas jovens, englobando as etapas de promielócito e mielócito; formas em anel, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; segmentados e eosinófilos, incluindo as formas segmentadas a partir de dois lóbulos nucleares. Monoblastos, promonócitos, monócitos e macrófagos, foram reunidos em um grupo de células denominadas monócitos. As células da linhagem linfóide incluem prolinfócitos, linfócitos (típicos ou atípicos) e as células da linhagem plasmocitária foram agrupadas como plasmócitos.

Os precursores eritroides foram agrupados em: eritroblastos jovens, envolvendo proeritroblastos e eritroblastos basófilos; eritroblastos policromáticos e ortocromáticos, englobando todas as etapas em que as células apresentam cromatina condensada e citoplasma policromático incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico.

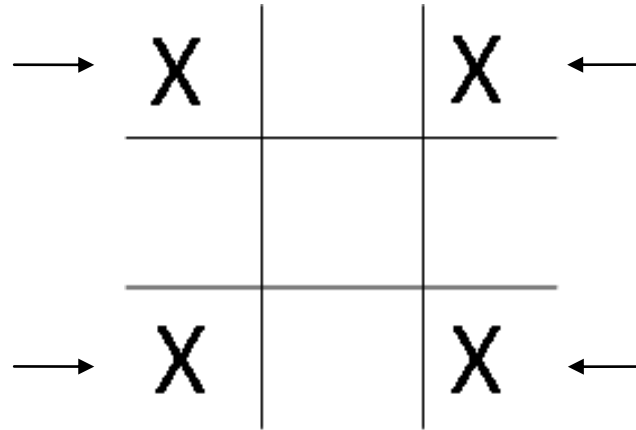
## 5.11 Avaliação de leucócitos circulantes

### 5.11.1 Contagem total de leucócitos no sangue

Para a contagem global de leucócitos no sangue, 10 $\mu$ L de sangue do plexo inguinal foram obtidos de cada animal e diluídos em 90 $\mu$ L da solução Turk. Desta diluição, 10 $\mu$ L foram colocados na câmara de Neubauer, a qual foi levada ao



microscópio óptico, em aumento final de 100x, para proceder a contagem das células viáveis. A contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais, conforme o esquema abaixo:



**Figura 13: Esquema representativo da câmara de Neubauer.** As setas indicam os quatro quadrantes onde foram realizadas as contagens de leucócitos totais no sangue. Após contagem em cada quadrante é obtida a média de células contadas.

Após a contagem feita nos quatro quadrantes, foi calculada a média das contagens. O valor obtido foi multiplicado por 10, que corresponde à diluição feita e novamente por 10, que corresponde à profundidade da câmara de Neubauer. Os resultados são expressos em células/mm<sup>3</sup>.

#### 5.11.2 Contagem diferencial de leucócitos no sangue

Para a contagem diferencial de leucócitos circulantes, 5 µL de sangue foram obtidos do plexo inguinal de cada animal e transferidos para uma lâmina. Com o auxílio de outra lâmina, foi feito o esfregaço. As lâminas contendo o esfregaço foram coradas com o kit Panótico Rápido. Foram analisadas 100 células, distribuídas em basófilos, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. A análise foi realizada com o auxílio do microscópio óptico, em aumento de 100x.

#### 5.12 Avaliação da aterosclerose

Para avaliar o desenvolvimento da aterosclerose nos animais em estudo, foram analisadas a área da válvula aórtica, a área da placa aterosclerótica, o percentual da lesão e a quantificação de macrófagos na placa.

Para tanto, durante o sacrifício, o coração de cada animal foi removido e separado cuidadosamente da aorta, de modo a obter a região proximal do órgão, onde está inserida a válvula aórtica. Em seguida o coração foi fixado em formaldeído 10% cerca de 8h e posteriormente transferido para a solução de PBS Sacarose 30% para desidratação. Após completa desidratação, o órgão foi acondicionado em papel alumínio e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de ser processado. Cada coração foi incluído em *Tissue Freezing Médium* (Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems, Wetzlar – Germany) também denominado OCT, conforme rotina e foram realizados cortes de 10  $\mu\text{m}$  em criostato. Os animais foram devidamente codificados e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

#### 5.12.1 Mensuração da área da válvula aórtica

Para análise da área da válvula aórtica foram selecionados dez cortes sequenciais representativos de uma extensão média de quatrocentos micrômetros da válvula. Foram obtidas imagens destes cortes no aumento de 40x para a realização da análise. Utilizou-se o Programa Image Pro Plus para quantificação da área da válvula.

#### 5.12.2 Mensuração da área da placa aterosclerótica

Para quantificar a placa aterosclerótica presente na válvula aórtica, foram obtidas imagens no aumento de 100x dos mesmos cortes analisados quanto a área da válvula aórtica. Após aquisição das imagens, o material foi analisado no Programa Image Pro Plus para obtenção da área do ateroma. O cálculo da lesão foi feito por meio do somatório dos valores obtidos nos dez cortes analisados, representando assim o valor da área da lesão.

#### 5.12.3 Percentual de obstrução da válvula aórtica

O percentual de obstrução da válvula aórtica representa a quantidade da luz do vaso que foi tomada pelo ateroma. A obstrução da luz da válvula aórtica foi estabelecida a partir da definição da área da válvula e da área da placa aterosclerótica. Realizamos o seguinte cálculo:

Área da válvula ( $\mu\text{m}$ )	-----	100%
Área da placa ( $\mu\text{m}$ )	-----	x

#### 5.12.4 Quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica

A quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica foi realizada pela técnica de imunohistoquímica. A análise é iniciada com a remoção do OCT utilizado para obtenção dos cortes. Para tanto, os cortes foram imersos em acetona gelada por 15 minutos. Decorrido o tempo, os cortes foram lavados com PBS gelado e o excesso foi removido com auxílio de papel absorvente. Cada corte foi circundado com uma caneta de parafina para evitar que as soluções escorram e os cortes sequem. Em seguida, as lâminas foram incubadas com a solução de 0,3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 70% de metanol PBS por trinta minutos, para inibição da peroxidase endógena. Após o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS gelado e acrescentou-se o bloqueio NGS (soro normal de cabra) diluído em PBS/BSA 1%, para inibição de ligantes inespecíficos. A incubação com o bloqueio NGS foi de trinta minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS por dois minutos e acrescentou-se 40  $\mu\text{l}$  do anticorpo primário (MOMA – monócitos e macrófagos) diluído em PBS/BSA 1%. O corte controle negativo não recebeu o anticorpo primário, apenas a solução PBS/BSA 1%. Os cortes foram incubados por duas horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após este período, procedeu-se a lavagem dos cortes com PBS, por cinco minutos cada. Acrescentou-se 30  $\mu\text{l}$  do anticorpo secundário seguindo de uma incubação por quarenta minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados com PBS gelado, três vezes, por cinco minutos cada. Acrescentou-se 40  $\mu\text{l}$  de DAB, diluído 1:50 em tampão específico que acompanha o produto. As lâminas foram imersas em água destilada para remoção do DAB e analisadas em microscópio óptico. Em seguida, foi feita a capturação de imagens nos aumentos de 40x e 100x. A região da placa constituída de macrófagos apresentou coloração marrom, decorrente da reação do DAB com a peroxidase presente no anticorpo secundário, que por sua vez apresenta-se ligado ao anticorpo primário, específico para identificação de monócitos/macrófagos.

A quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica foi realizada por intensidade de cor, com uso de imagens no aumento de 100x e auxílio do Programa Image Pro Plus. Foram quantificadas a área da placa aterosclerótica e os macrófagos nela presentes por meio da coloração. O percentual de macrófagos foi estabelecido pela seguinte equação:

<p style="text-align: center;">Quantidade de placa aterosclerótica ----- 100%</p> <p style="text-align: center;">Quantidade de macrófagos na placa ---- X</p>
---

### 5.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados encontrados foram submetidos ao teste de Grubb's para detecção de outlier e sua exclusão e aos testes de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilker e D'Agostinho e Pearson para verificar a distribuição dos dados. Para os dados distribuídos de forma paramétrica utilizou-se o teste T *Student* não pareado e para dados não-paramétricos, utilizou-se o teste de Mann Whitney. O nível de significância adotado foi o valor de p inferior a 0,05.

## 6 RESULTADOS

No início do experimento, os animais deficientes do receptor de LDL foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o peso corporal e as concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos, mantendo homogeneidade entre ambos os grupos (tabela 4).

**Tabela 4 – Peso corporal, colesterol total e triglicerídeos plasmáticos de camundongos deficientes do receptor de LDL no início do experimento**

	Controle	5-FU	p
<b>Peso corporal inicial (gramas)</b>	15,46 ± 0,84	16,02 ± 0,54	0,57
<b>Colesterol total inicial (mg/dL)</b>	236,1 ± 14,75	235,6 ± 7,67	0,97
<b>Triglicérides inicial (mg/dL)</b>	126,7 ± 19,15	134,2 ± 12,01	0,73

**Tabela 4: Parâmetros adotados na distribuição dos animais em grupo controle e grupo 5-FU, verificando a homogeneidade entre os grupos.** Animais tratados com dieta ocidental, sem restrição hídrica e duas aplicações de placebo ou 5-FU. Valores iniciais referentes ao peso corporal, colesterol total e triglicérides. Teste T *Student* com valores expressos em média ± erro padrão.

Após a divisão, os animais do grupo controle receberam placebo (PBS1x) enquanto os animais do grupo 5-FU receberam 150mg/kg do quimioterápico 5-FU, conforme descrito na metodologia.

### 6.1 Evolução ponderal, ganho de peso, ingestão alimentar e hídrica

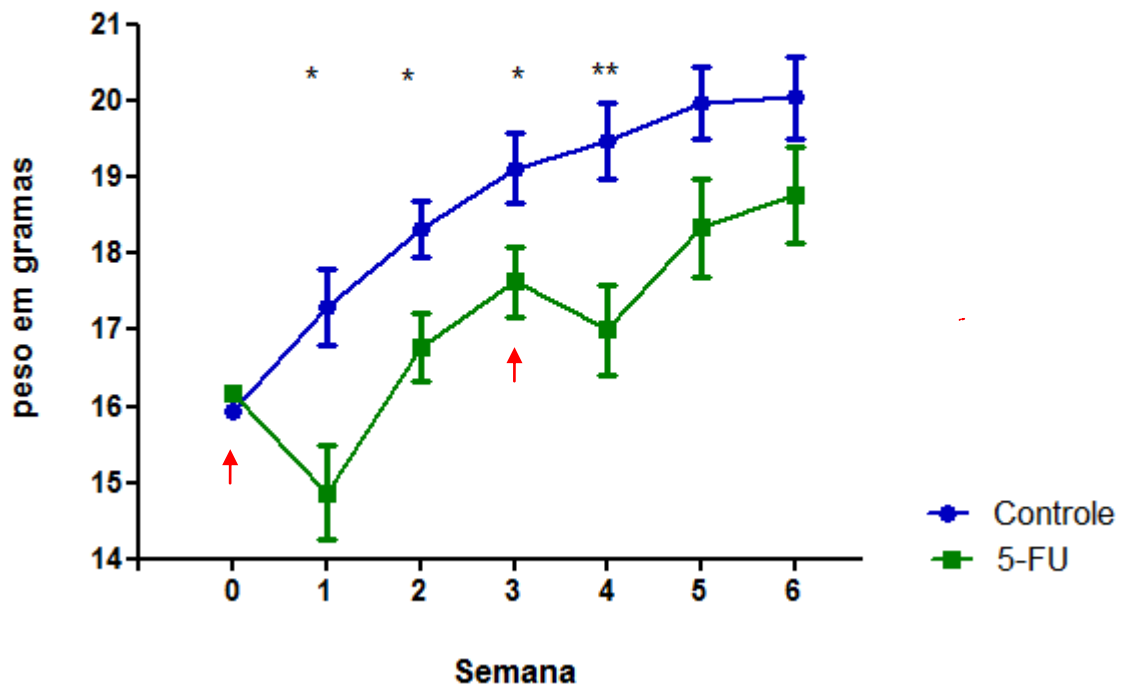
Os animais do grupo 5-FU apresentaram peso inferior comparado aos animais do grupo não-tratado com o quimioterápico, nas quatro primeiras semanas de experimento. Na quinta semana, os animais submetidos à quimioterapia apresentaram uma recuperação do peso corporal, mantendo valores semelhantes ao grupo controle. Este resultado também foi observado durante a sexta semana experimental (figura 14A). Quanto ao ganho de peso, os animais tratados com o placebo apresentaram maior ganho de peso comparado ao grupo tratado com o 5-FU. Os animais que receberam o quimioterápico tiveram perda de peso após cada aplicação do quimioterápico (semanas um e quatro). Na segunda e na terceira semanas de experimento, o ganho de peso entre os grupos foi semelhante, no entanto, os animais que receberam o 5-FU apresentaram peso total inferior ao seu

controle. Na quinta semana de experimento, os animais do grupo 5-FU apresentaram ganho de peso superior ao controle, enquanto na sexta semana experimental este parâmetro foi semelhante entre os grupos (figura 14B).

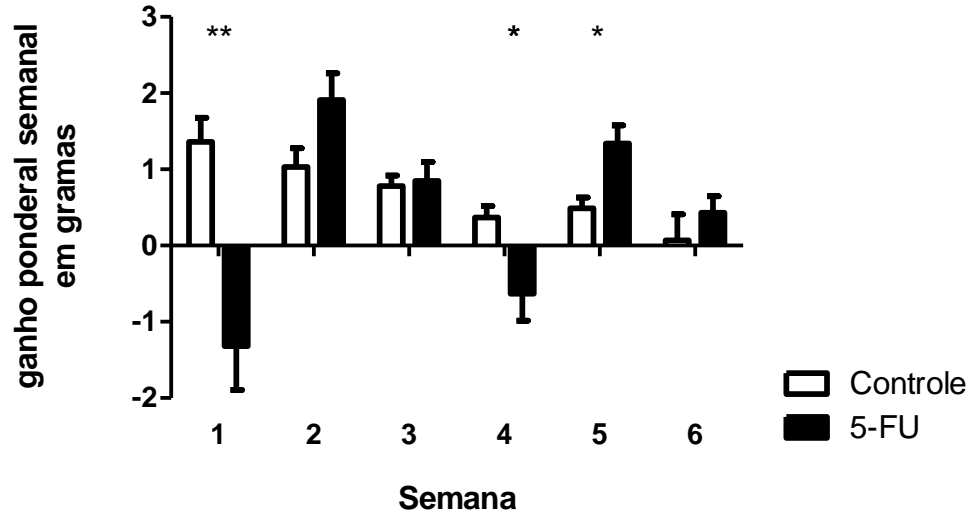
A ingestão alimentar e o consumo de água foram monitorados durante as seis semanas de experimento. Os dados foram expressos como a média da ingestão alimentar e hídrica diária por animal. Estes parâmetros não foram diferentes entre os grupos (figura 14C e 14D).

A

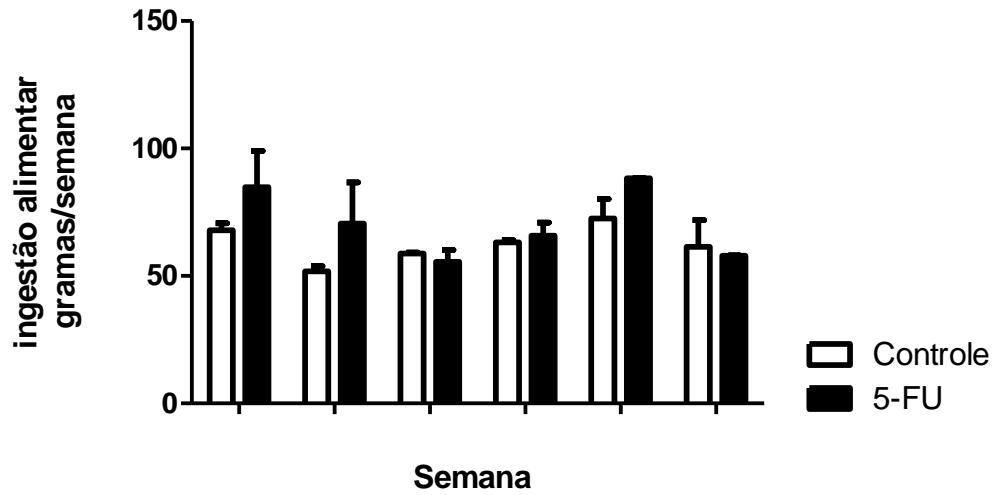
### Evolução ponderal semanal



B

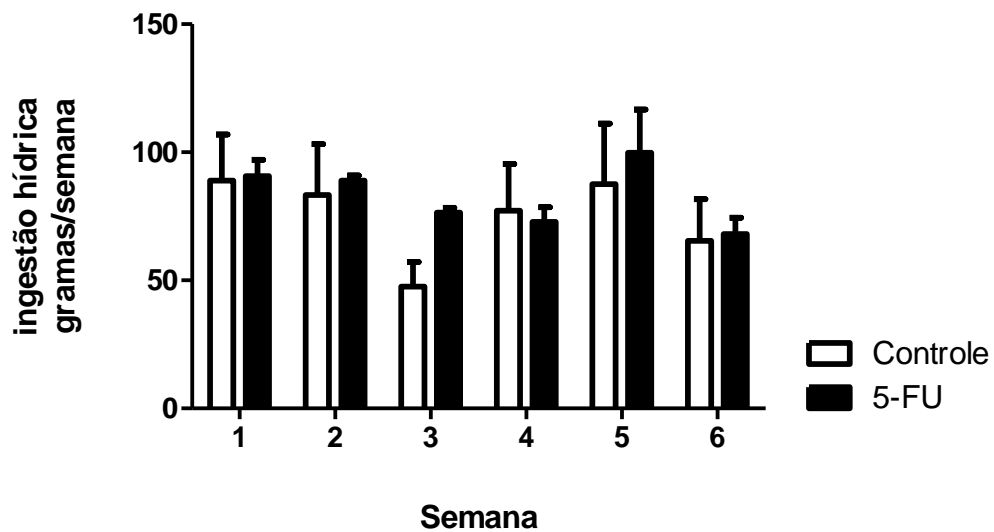
**Ganho ponderal semanal**

C

**Ingestão alimentar semanal**

D

### Ingestão hídrica semanal



**Figura 14A: Avaliação da evolução ponderal dos animais deficientes do receptor de LDL.** Evolução ponderal semanal; ponto zero: representa o peso dos animais no primeiro dia de experimento; pontos um a seis: representam a semana de experimento; seta indica os momentos em que foram realizadas as aplicações do quimioterápico 5-FU (150 mg/kg). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste T *Student*. Primeira semana: \* $p=0,01$ ; segunda semana: \* $p=0,02$ ; terceira semana: \* $p=0,04$ ; quarta semana: \*\* $p=0,009$ ; quinta semana:  $p=0,07$ ; sexta semana:  $p=0,15$ . **B - Avaliação do ganho de peso dos animais deficientes do receptor de LDL.** Ganho de peso semanal. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste T *Student*. Primeira semana:  $p=0,002$ ; segunda semana:  $p=0,06$ ; terceira semana:  $p=0,80$ ; quarta semana:  $p=0,02$ ; quinta semana:  $p=0,01$ ; sexta semana:  $p=0,40$ . **C - Avaliação da ingestão alimentar individual dos animais deficientes do receptor de LDL.** Ingestão alimentar individual. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste T *Student*.  $p>0,05$ . **D - Avaliação da ingestão hídrica dos animais deficientes do receptor de LDL.** – Ingestão hídrica individual. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste T *Student*.  $p>0,05$ . Animais tratados com duas aplicações de placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada, durante seis semanas de experimento.

## 6.2 Perfil lipídico e glicemia plasmáticos

A avaliação do perfil lipídico dos animais mostrou que as concentrações de colesterol total e HDL não diferiram entre os grupos. O colesterol não-HDL foi determinado e não foi observada diferença estatística quanto a este parâmetro. A relação de aterogênese também não foi diferente entre os grupos. Porém, a concentração plasmática de triglicerídeos no grupo 5-FU foi estatisticamente menor, comparada ao grupo controle. A concentração sérica de glicose foi avaliada e não apresentou diferença estatística (tabela 5).



**Tabela 5 – Perfil lipídico e glicemia dos camundongos deficientes do receptor de LDL após seis semanas de experimento e duas aplicações de placebo ou 5-FU**

	<b>Controle</b>	<b>5-FU</b>	<b>p</b>
Colesterol total (mg/dL)	852,6 ± 59,42	785,6 ± 90,17	0,54
HDL (mg/dL)	114,9 ± 26,27	85,12 ± 4,50	0,33
Colesterol não-HDL (mg/dL)	737,7 ± 66,13	667,9 ± 98,33	0,56
Relação de aterogênese	9,01 ± 1,89	8,44 ± 1,37	0,80
Triglicérides (mg/dL)	199,1 ± 24,78	120,8 ± 10,25	<b>0,009</b>
Glicose (mg/dL)	133,0 ± 17,92	120,4 ± 10,21	0,55

**Tabela 5: Perfil lipídico e glicemia dos animais deficientes do receptor de LDL após seis semanas de experimento.** Animais tratados com duas aplicações de placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Teste T *Student*, com resultados expressos em média ± erro padrão; n=8-10.

### 6.3 Perfil lipídico hepático e do conteúdo do cólon

A avaliação da concentração de lipídios totais no fígado não apresentou diferença estatística entre os grupos. Foram mensuradas as concentrações de colesterol total e triglicérides presentes neste órgão e os grupos apresentaram valores estatisticamente semelhantes (tabela 6).

Avaliamos a excreção de lipídios totais no conteúdo do cólon e não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e 5-FU. As concentrações de colesterol total e triglicérides presentes no conteúdo do cólon também foram mensuradas e não houve diferença entre os grupos em estudo (tabela 6).

**Tabela 6: Perfil lipídico do fígado e do conteúdo do cólon**

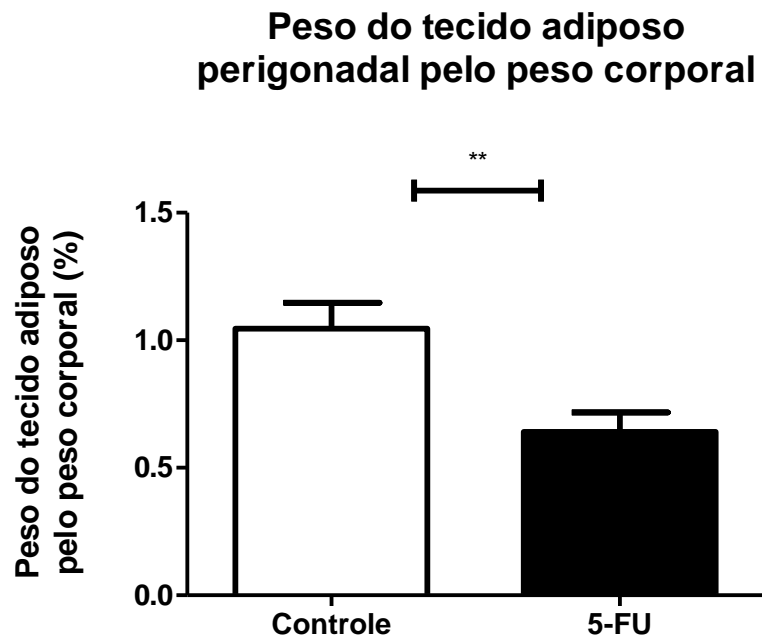
Parâmetros (mg/g)	Controle	5-FU	P
<b>FIGADO</b>			
<b>Lipídios totais</b>	245,9 ± 11,69	269,6 ± 26,54	0,44 <sup>a</sup>
<b>Colesterol total</b>	15,78 ± 2,04	14,47 ± 0,86	0,56 <sup>a</sup>
<b>Triglicérides</b>	38,19 ± 2,12	38,81 ± 1,89	0,63 <sup>b</sup>
<b>CÓLON</b>			
<b>Lipídios totais</b>	90,91 ± 27,01	69,71 ± 16,95	0,51 <sup>b</sup>
<b>Colesterol total</b>	9,51 ± 1,20	8,60 ± 0,99	0,59 <sup>a</sup>
<b>Triglicérides</b>	3,25 ± 1,11	3,87 ± 0,62	0,73 <sup>b</sup>

**Tabela 6: Perfil lipídico do fígado e do conteúdo do cólon de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com duas aplicações de placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. <sup>a</sup>Teste T *Student*, com resultados expressos em média ± erro padrão; <sup>b</sup>Teste Mann Withney, com resultados expressos em mediana ± erro padrão; n=6-10.

## 6.4 Avaliação do tecido adiposo perigonadal

### 6.4.1 Peso do tecido adiposo

Os resultados mostram que os animais tratados com 5-FU apresentam menor proporção de tecido adiposo perigonadal comparados ao grupo controle (figura 15).

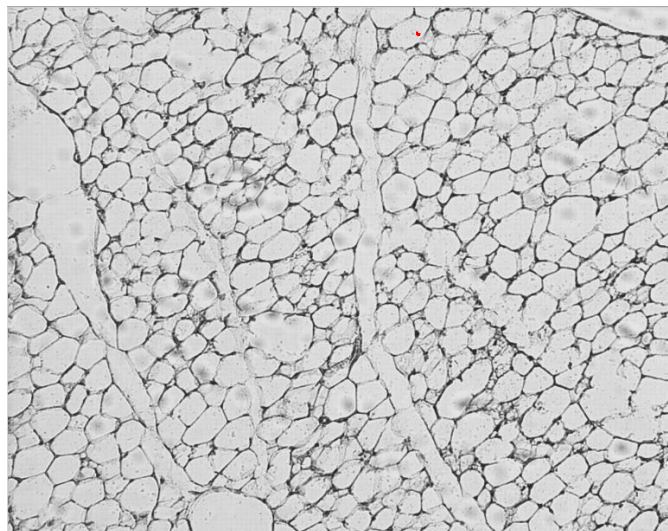


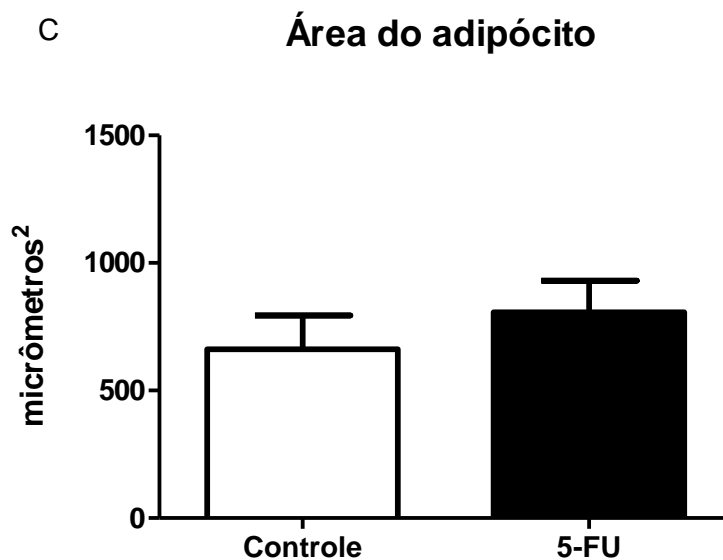
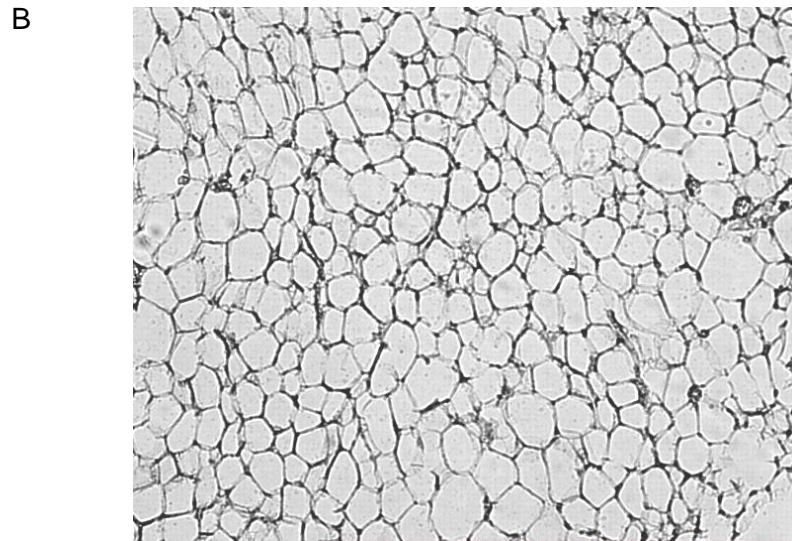
**Figura 15: Peso do tecido adiposo perigonadal pelo peso corporal de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=8-10. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*, \*\*p=0,004.

#### 6.4.2 Avaliação da área dos adipócitos

Apesar da menor proporção de tecido adiposo perigonadal nos animais tratados com 5-FU, nenhuma diferença estatística na área dos adipócitos foi observada entre os grupos (figura 16).

A

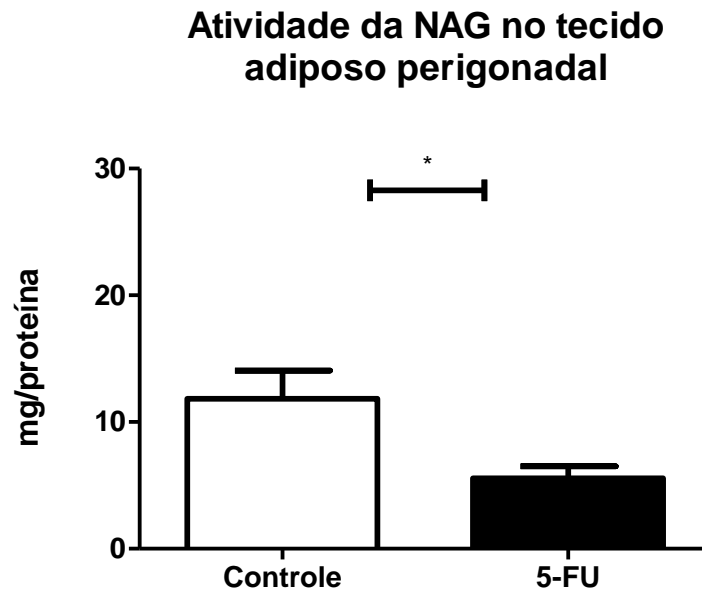




**Figura 16:** A - Avaliação da área dos adipócitos de animal do grupo controle deficiente do receptor de LDL. B – Avaliação da área dos adipócitos de animal do grupo tratado com 5-FU deficiente do receptor de LDL. C – Representação gráfica da área dos adipócitos dos animais deficientes do receptor de LDL. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p=0,40$ . Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Histologia de tecido adiposo; cortes corados com HE.  $n=8-10$ . Valores amostrais distintos em decorrência da disponibilidade de tecido para a realização da técnica.

#### 6.4.3 Avaliação do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo pela atividade da NAG

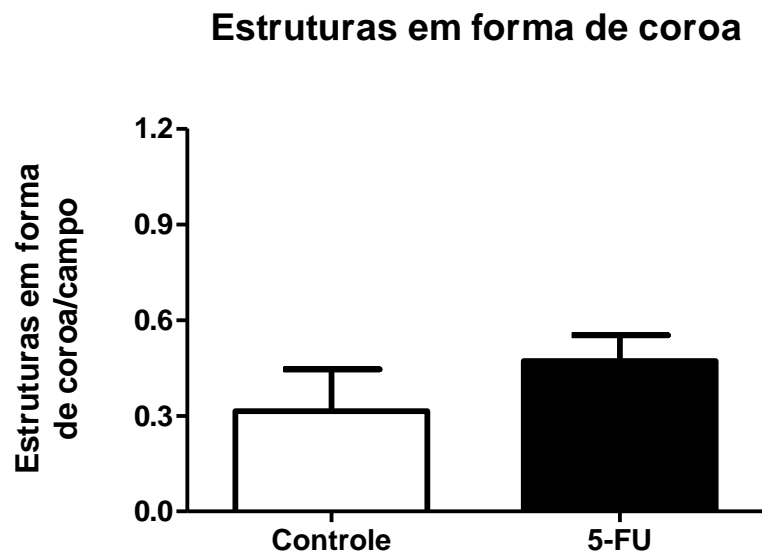
Para analisar o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, foi avaliada a atividade da enzima NAG neste tecido. Os resultados mostram que a atividade da NAG no tecido adiposo dos animais do grupo 5-FU está reduzida comparada ao grupo controle (figura 17).



**Figura 17: Avaliação da infiltração de macrófagos pela atividade da enzima NAG no tecido adiposo de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=6. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T Student, \*p=0,02.

#### 6.4.4 Contagem das estruturas em forma de coroa

As estruturas em forma de coroa relacionam-se com a inflamação ou apoptose de adipócitos. Assim, avaliamos a presença destas estruturas em ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística entre os valores obtidos para o grupo 5-FU e o grupo controle (figura 18).

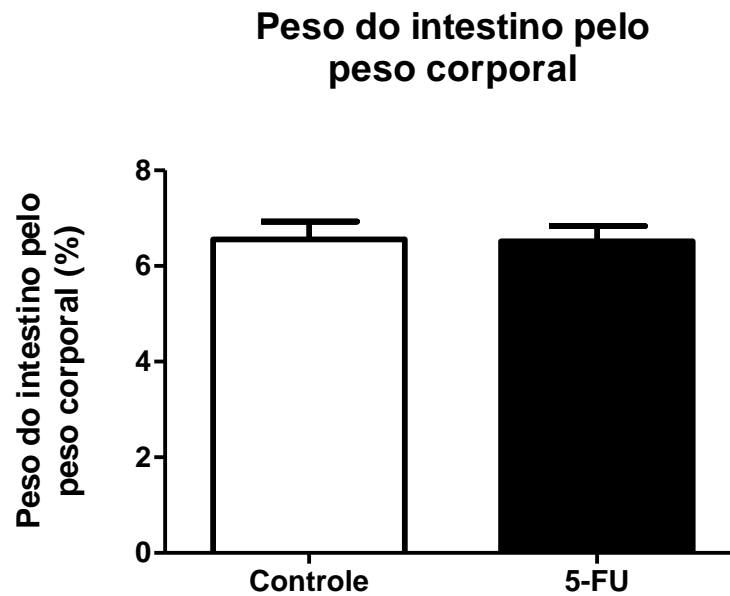


**Figura 18:** Estruturas em forma de coroa por campo avaliado no tecido adiposo de animais deficientes do receptor de LDL. Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=7. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p>0,05$ .

## 6.5 Avaliação do intestino delgado

### 6.5.1 Peso do intestino

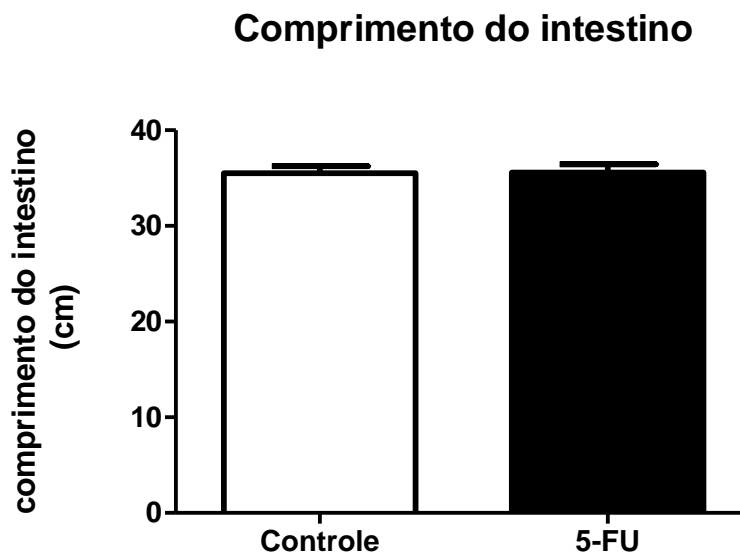
Não houve diferença no peso deste órgão entre o grupo controle e o grupo 5-FU (figura 19).



**Figura 19: Peso do intestino de animais deficientes do receptor de LDL pelo peso corporal.** Animais tratados com duas aplicações de placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Teste T *Student*, com resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=10; p>0,05.

#### 6.5.2 Comprimento do intestino

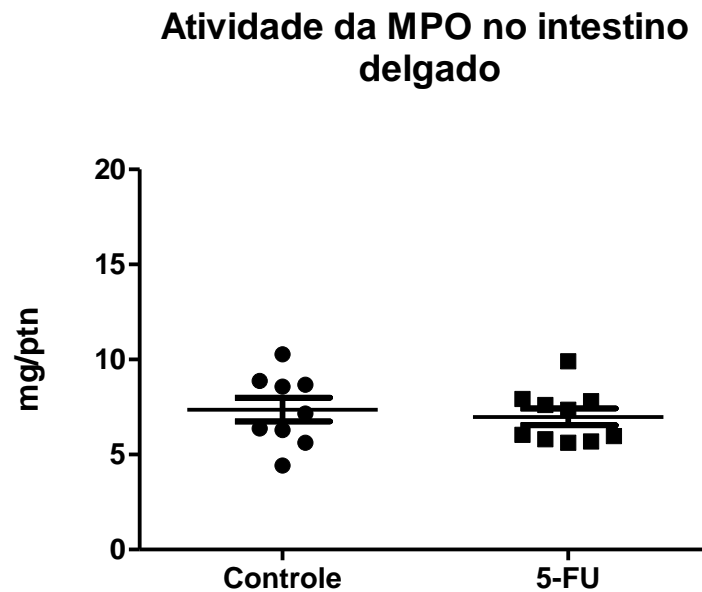
O comprimento do intestino também pode estar alterado em processos inflamatórios intestinais. Na avaliação do comprimento intestinal, não houve diferença significativa entre os grupos (figura 20).



**Figura 20: Comprimento do intestino dos animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com duas aplicações de placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Teste T *Student*, com resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; n=9-10; Valores de n distintos em decorrência da exclusão de outlier. p>0,05.

### 6.5.3 Avaliação da infiltração de neutrófilos no intestino pela atividade da MPO

A mensuração da atividade da enzima MPO foi realizada no intestino delgado e não observamos diferença entre os grupos em estudo (figura 21).

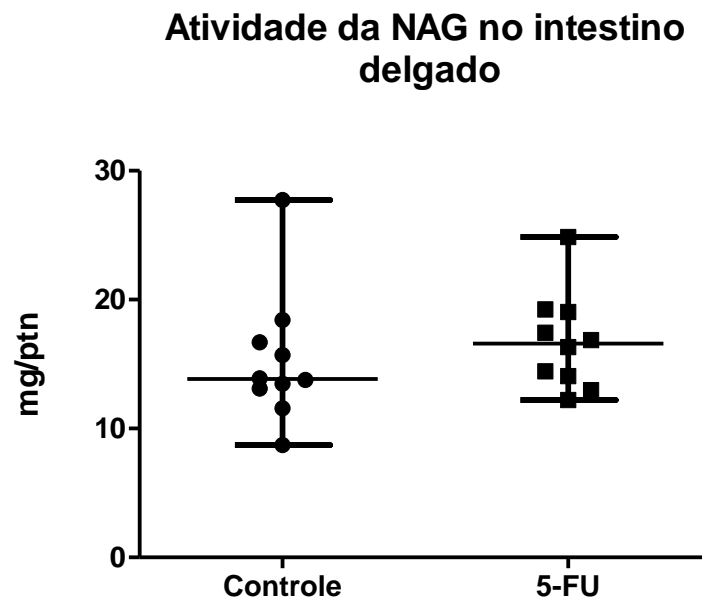


**Figura 21: Avaliação da infiltração de neutrófilos pela atividade da enzima MPO no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.** n=10, resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p > 0,05$ . Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Os valores apresentados correspondem à média dos três segmentos do intestino delgado.

### 6.5.4 Avaliação da infiltração de macrófagos no intestino pela atividade da NAG

Avaliamos a atividade da enzima NAG no intestino delgado. Não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e 5-FU (figura 22).

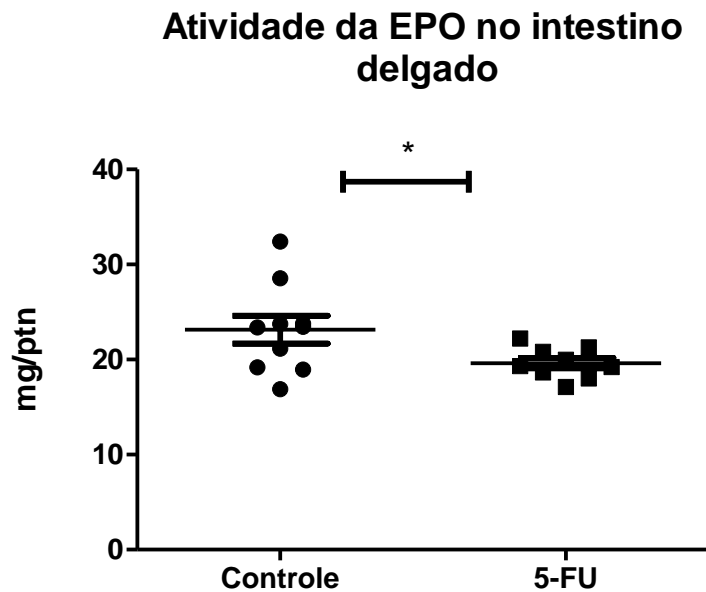




**Figura 22: Avaliação da infiltração de macrófagos pela atividade da enzima NAG no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.**  $n=10$ , resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p=0,24$ . Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Os valores apresentados correspondem à média dos três segmentos do intestino delgado.

#### 6.5.5 Avaliação da infiltração de eosinófilos no intestino pela atividade da EPO

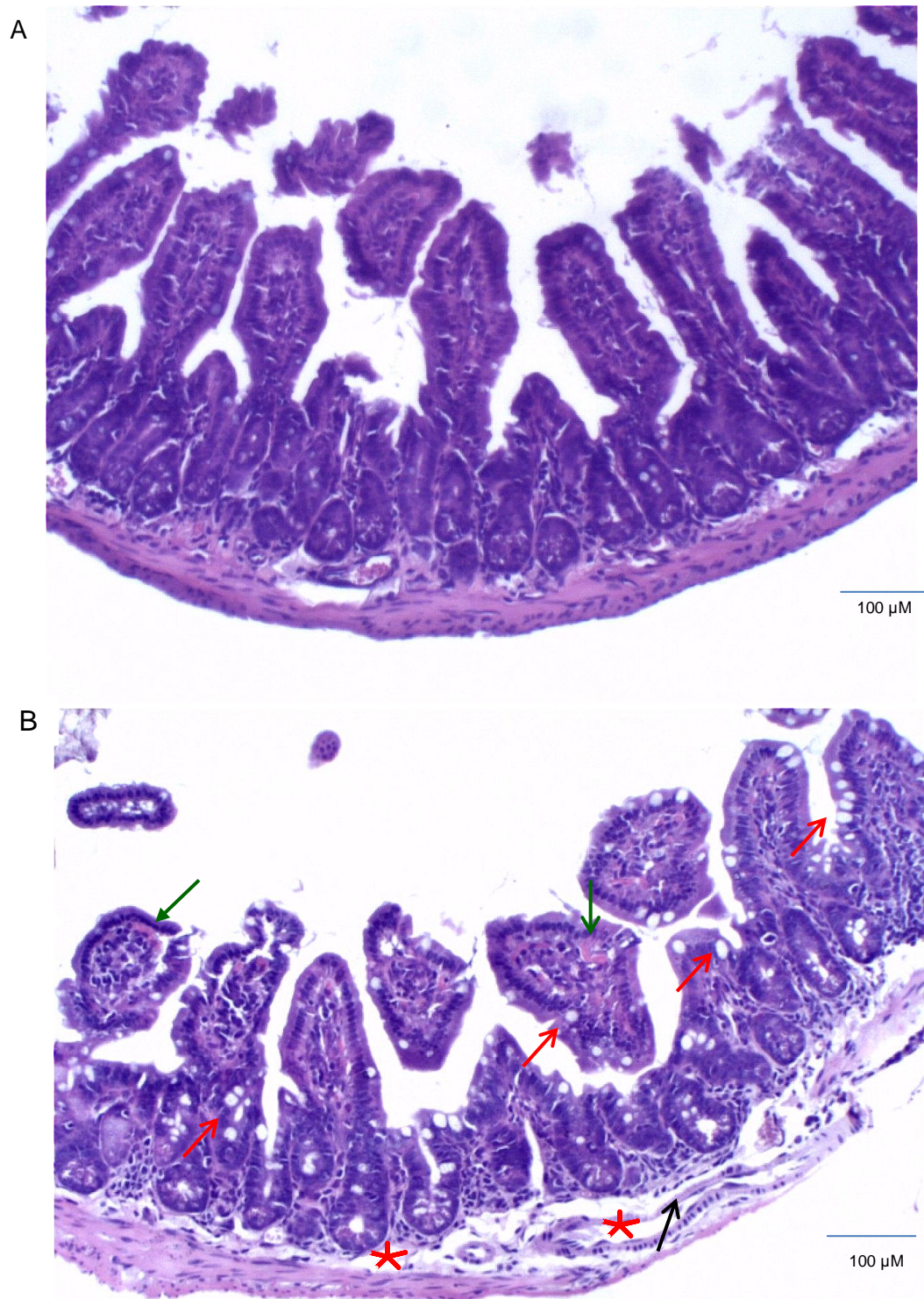
A mensuração da atividade da enzima EPO foi realizada no intestino delgado. Os resultados mostram que a atividade desta enzima está reduzida no grupo tratado com 5-FU comparado ao grupo controle (figura 23).



**Figura 23: Avaliação da infiltração de eosinófilos pela atividade da enzima EPO no intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.** n=10, resultados expressos em mediana  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*, p=0,04. Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. Os valores apresentados correspondem à média dos três segmentos do intestino delgado.

#### 6.5.6 Avaliação morfológica do intestino delgado

A avaliação morfológica do intestino delgado dos animais tratados com placebo ou 5-FU mostrou que o grupo placebo se apresenta dentro dos parâmetros de normalidade, com arquitetura preservada e as camadas mucosa e submucosa íntegras, conforme esperado. Porém, o grupo tratado com 5-FU ainda apresenta lesões intestinais classificadas como leves e caracterizadas por regiões com congestão vascular na camada mucosa e edema na camada submucosa. Há presença de um discreto infiltrado inflamatório na base dos vilos e grande concentração de células caliciformes em toda a extensão da mucosa intestinal. Os vilos apresentam-se íntegros, porém, menores que aqueles observados nos animais tratados com o placebo, mostrando que este grupo ainda não se recuperou da mucosite ocasionada pela administração do quimioterápico (figura 24).



**Figura 24: Aspecto morfológico do intestino delgado de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU e recebendo dieta ocidental e água filtrada. **A** – jejuno de animal do grupo controle; **B** – jejuno de animal do grupo 5-FU. Seta verde indica pontos de congestão vascular na mucosa intestinal; asterisco vermelho representa edema na submucosa intestinal; seta preta indica um discreto infiltrado inflamatório na base dos vilos; seta vermelha indica as células calciformes aumentadas no animal tratado com 5-FU. Os vilos do jejuno de animais tratados com 5-FU são menores que os vilos dos animais tratados com placebo.

## 6.6 Mielograma

A contagem de células na medula óssea não revelou diferenças quanto ao total de células mieloides entre os grupos (tabela 7). A contagem diferencial mostrou que as linhagens granulocítica, monocitária, linfocitária e os plasmócitos não apresentavam diferenças entre os grupos experimentais neste estágio. Na linhagem vermelha ou eritrocitária, o grupo 5-FU apresentou contagem de eritroblastos inferior ao grupo placebo (tabela 7).

**Tabela 7: Mielograma de animais deficientes do receptor de LDL tratados com placebo ou 5-FU**

<b>CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS MIELOIDES</b>			
<b>Controle</b> (células/mm <sup>3</sup> )	<b>5-FU</b> (células/mm <sup>3</sup> )	<b>p</b>	
21840 ± 2379	17330 ± 2891	0,26	
<b>CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS MIELOIDES</b>			
<b>Linhagem</b>	<b>Controle</b> (porcentagem - %)	<b>5-FU</b> (porcentagem - %)	<b>p</b>
<b>Série granulocítica</b>	47,1 ± 2,03	50,1 ± 2,10	0,32 <sup>a</sup>
<b>Série monocitária</b>	1,0 ± 0,29	1,0 ± 0,25	0,61 <sup>b</sup>
<b>Série linfóide</b>	24,9 ± 2,5	26,25 ± 3,2	0,47 <sup>a</sup>
<b>Série plasmocitária</b>	0,75 ± 0,40	0,5 ± 0,5	0,44 <sup>b</sup>
<b>Série eritrocitária</b>	26,25 ± 1,48	21,9 ± 0,98	<b>0,03<sup>a</sup></b>

**Tabela 7: Mielograma de animais deficientes do receptor de LDL tratados com placebo ou 5-FU.** Animais recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=6. Contagem total de células mieloides (número absoluto, células/mm<sup>3</sup>) e contagem diferencial (porcentagem). <sup>a</sup> Teste T *Student* com resultados expressos em média ± erro padrão; <sup>b</sup> Teste de Mann Withney com resultados expressos em mediana ± erro padrão.

## 6.7 Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos

A contagem total de leucócitos no sangue foi avaliada nos dois grupos em estudo e não foi encontrada diferença estatística entre eles (tabela 8). Foi realizada também a contagem diferencial de leucócitos no sangue, distribuídos em basófilos,

neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. A tabela 8 mostra que não houve diferença quanto ao número de células diferenciais circulantes entre os dois grupos avaliados.

**Tabela 8: Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes em animais deficientes do receptor de LDL**

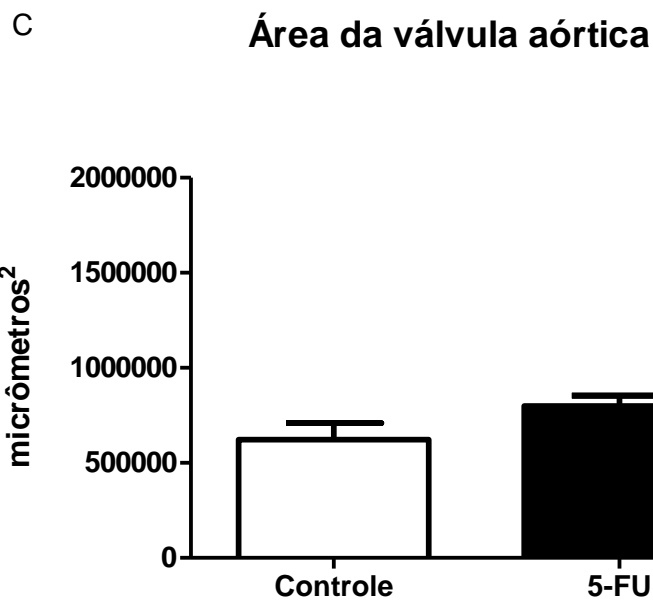
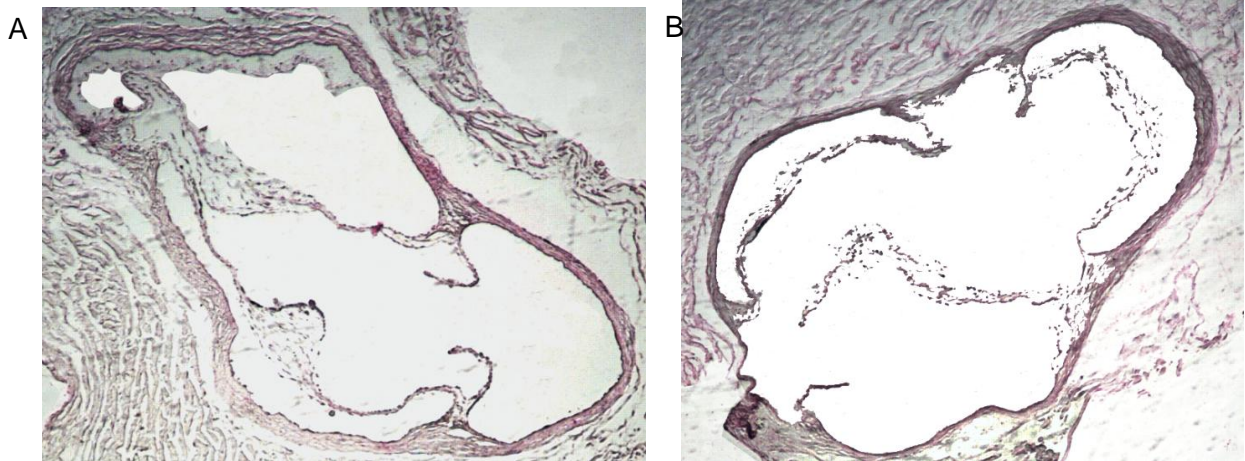
	<b>CONTROLE</b> (células/mm <sup>3</sup> )	<b>5-FU</b> (células/mm <sup>3</sup> )	<b>P</b>
<b>CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES</b>			
	6042 ± 992,8	5600 ± 1570	0,81
<b>CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES (porcentagem - %)</b>			
Basófilos	0,84	1,33	0,77 <sup>b</sup>
Neutrófilos	7,85	11,13	0,25 <sup>a</sup>
Eosinófilos	0,0	0,0	-
Células mononucleares	91,31	87,54	0,21 <sup>a</sup>

**Tabela 8: Contagem total (número absoluto, células/mm<sup>3</sup>) e diferencial (em porcentagem) de leucócitos circulantes de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=6. Teste T *Student* com resultados expressos em média ± erro padrão. <sup>a</sup> Teste T *Student*; <sup>b</sup> Teste de Mann Withney.

## 6.8 Avaliação da aterosclerose

### 6.8.1 Avaliação da área da válvula aórtica

A área da válvula aórtica dos animais foi mensurada e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os resultados obtidos para os grupos controle e 5-FU (figura 25).



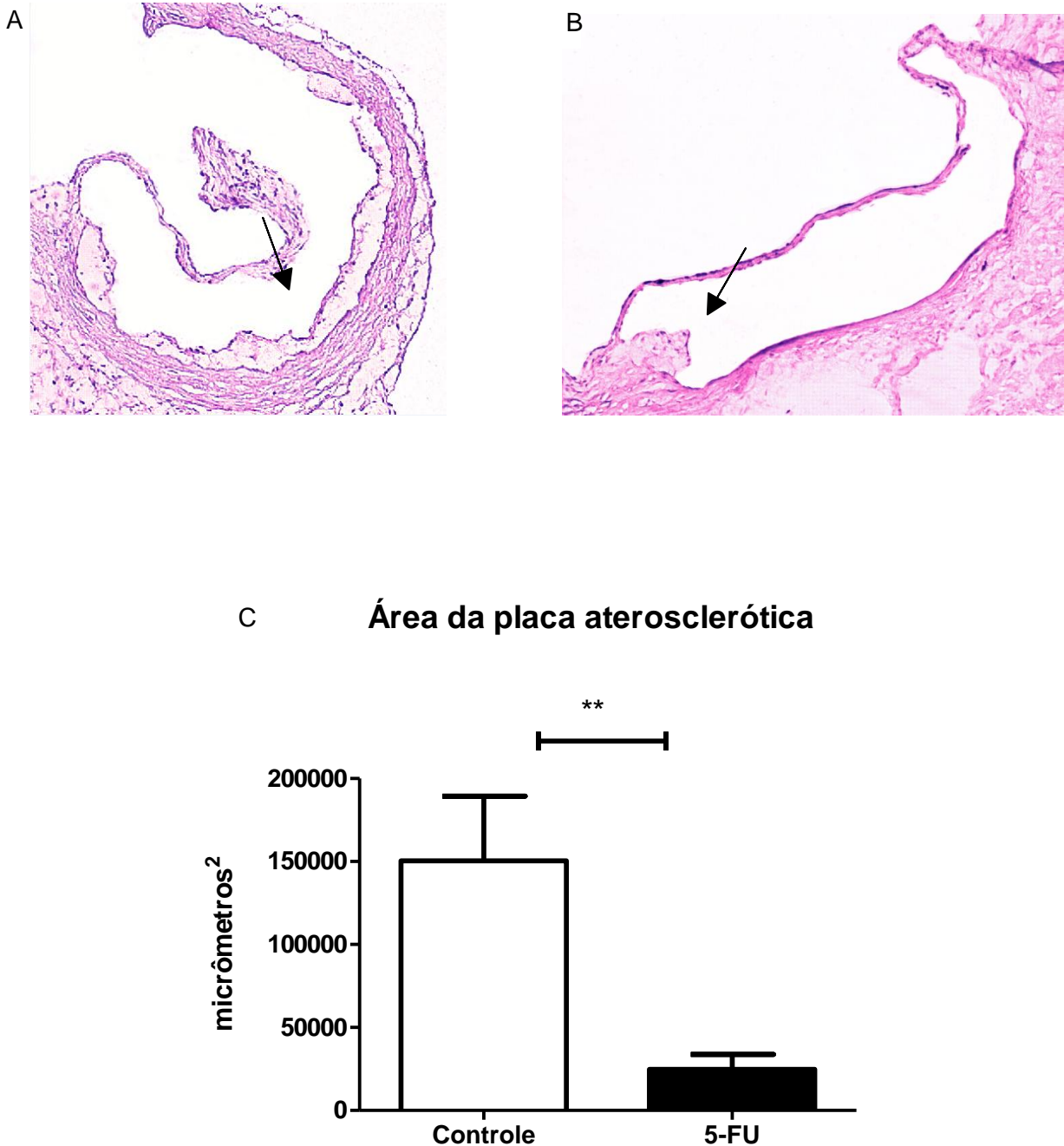
**Figura 25: Avaliação da área da válvula aórtica de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. A e B – histologia da válvula aórtica, coloração feita com HE. **A** – imagem representando a válvula aórtica de animal do grupo controle. **B** – imagem representando a válvula aórtica de animal do grupo 5-FU. **C** – representação gráfica da área da válvula aórtica. n=9. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p > 0,05$ .

### 6.8.2 Avaliação da área da placa aterosclerótica

Para estudarmos a formação da placa aterosclerótica nos animais que receberam duas aplicações de placebo ou 5-FU, foi realizada a quantificação da placa formada na válvula aórtica para posterior comparação entre os grupos. Os resultados mostram que os animais tratados com o quimioterápico 5-FU apresentam



menor formação de placa aterosclerótica na válvula aórtica, comparados aos animais que receberam placebo (figura 26).

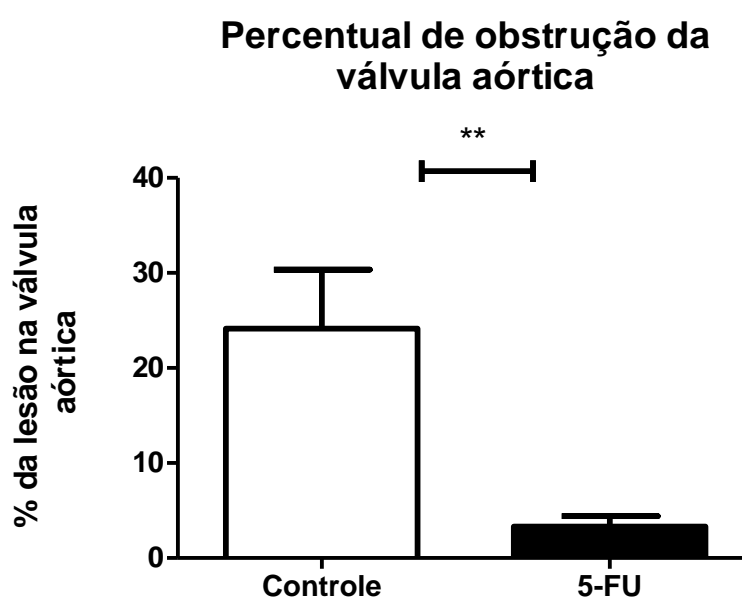


**Figura 26:** A - Avaliação da área da placa aterosclerótica dos animais deficientes do receptor de LDL tratados com placebo. B - Avaliação da área da placa aterosclerótica dos animais deficientes do receptor de LDL tratados com 5-FU. C - Representação gráfica da área da lesão aterosclerótica de animais deficientes do receptor de LDL. Animais recebendo dieta ocidental e água filtrada por seis semanas. Histologia da válvula aórtica, coloração HE; Setas identificam a placa de aterosclerose. A - animal grupo controle, aumento 100x; B - animal grupo 5-FU, aumento 100x. Observa-se pouca formação de placa de aterosclerose nos animais tratados com o quimioterápico 5-FU. C - representação gráfica da área da placa aterosclerótica. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p=0,009$ .  $n=9$ .

### 6.8.3 Percentual de obstrução da válvula aórtica

Diante dos dados referentes a área da válvula aórtica e a área da placa aterosclerótica, foi determinado o percentual de obstrução da válvula aórtica, ou seja, a quantidade da luz do vaso que foi tomada pelo ateroma.

Conforme esperado, o percentual de obstrução da válvula aórtica dos animais tratados com 5-FU foi menor que dos animais que receberam o placebo (figura 27).

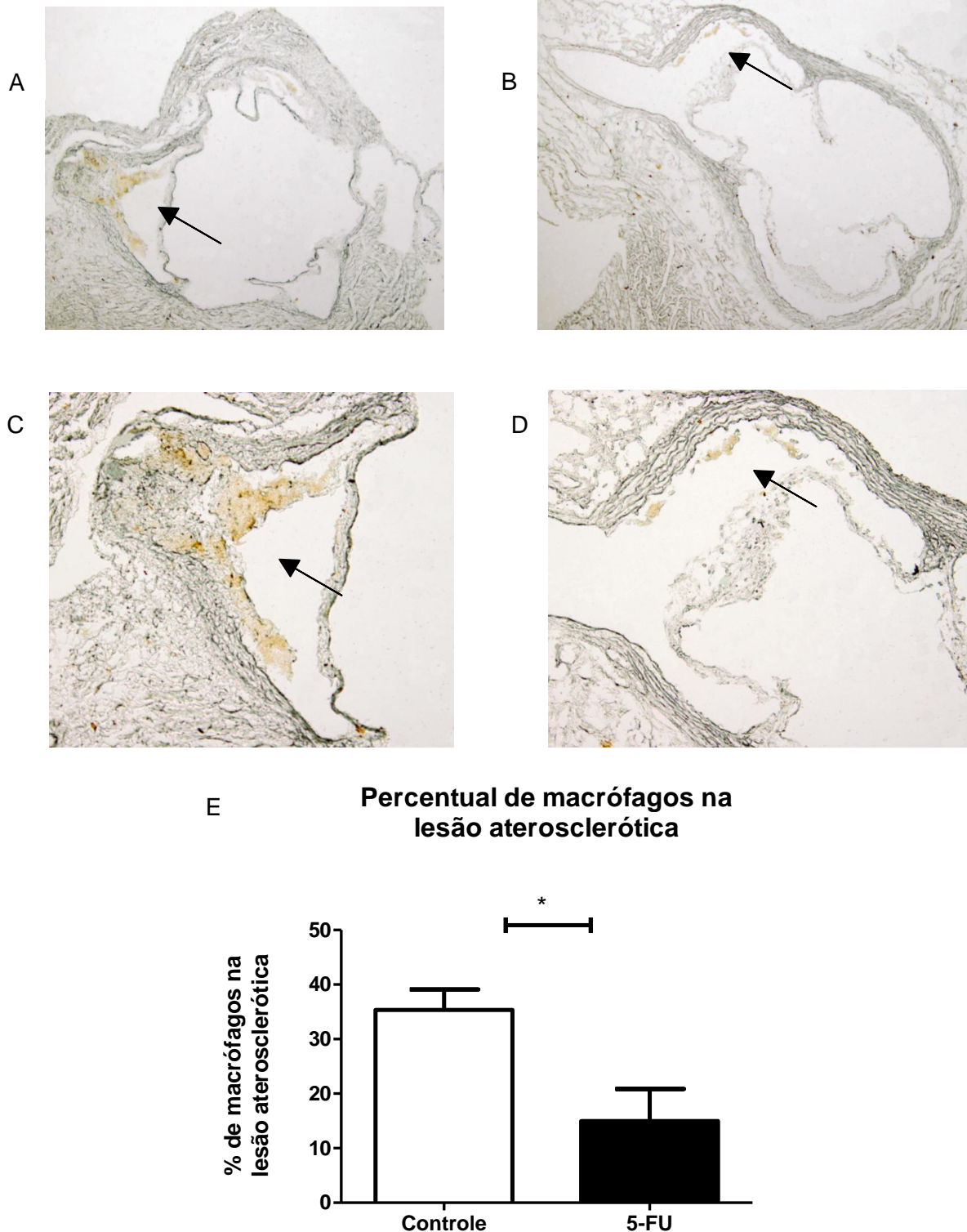


**Figura 27: Avaliação do percentual de obstrução da válvula aórtica de animais deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=9. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T *Student*,  $p=0,006$ .

### 6.8.4 Quantificação de macrófagos na lesão aterosclerótica

A quantificação de macrófagos presentes na lesão aterosclerótica dos animais foi avaliada por imunohistoquímica. Os animais tratados com 5-FU apresentam menor quantidade de macrófagos na lesão aterosclerótica, comparados aos animais do grupo controle (figura 28).





**Figura 28: Quantificação de macrófagos na placa aterosclerótica de camundongos deficientes do receptor de LDL.** Animais tratados com placebo ou 5-FU, recebendo dieta ocidental e água filtrada. n=4-6. Coloração marrom indicada por seta representa macrófagos presentes na placa aterosclerótica. A – figura da válvula aórtica de animal do grupo controle; aumento 40x; B – figura da válvula aórtica de animal do grupo 5-FU; aumento 40x; C – imagem representando um folheto da válvula aórtica de animal do grupo controle; aumento 100x; D – imagem representando um folheto da válvula aórtica de animal do grupo 5-FU; aumento 100x. E – representação gráfica do percentual de macrófagos presentes na lesão aterosclerótica. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão; Teste T Student,  $p=0,01$ .

## 7 DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a verificar os efeitos tardios de duas aplicações do quimioterápico 5-FU no perfil lipídico, no tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta ocidental.

Em nosso trabalho, os animais tratados com o quimioterápico 5-FU, sofreram perda de peso após duas aplicações do quimioterápico 5-FU com intervalo de 21 dias entre elas. Na primeira semana pós-tratamento quimioterápico, foi observada grande perda de peso nos animais tratados com o 5-FU enquanto o grupo placebo ganhou peso normalmente. Na segunda semana de experimento os animais tratados com 5-FU iniciaram uma recuperação no peso corporal, porém, apresentaram valores de peso inferiores ao grupo que recebeu o placebo. O mesmo foi observado na terceira semana experimental, onde os animais que receberam o quimioterápico continuaram ganhando peso, porém ainda apresentaram valores estatisticamente inferiores, comparados ao seu controle. Na quarta semana de experimento, após a segunda aplicação de 5-FU ou do placebo, os animais que receberam o quimioterápico voltaram a sofrer redução ponderal. Entretanto, na quinta semana de experimento, o grupo 5-FU apresentou um ganho de peso superior ao do grupo placebo, o que contribuiu para estes animais atingirem um peso corporal estatisticamente semelhante ao grupo controle no final do experimento. Na última semana experimental os animais apresentaram ganho de peso e evolução ponderal similares. No entanto, é importante ressaltar que o ganho de peso dos animais tratados com 5-FU nas duas últimas semanas de experimento pode estar relacionado com a presença de edema no trato intestinal uma vez que a ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos e os animais do grupo 5-FU apresentaram depleção do tecido adiposo.

Os dados observados quanto a evolução ponderal, mostraram que após a aplicação do quimioterápico é comum a ocorrência de perda de peso, sugerindo que esta pode ser causada por fatores como: diminuição na ingestão alimentar; alterações na digestão e/ou absorção intestinal devido a presença de mucosite; aumento do metabolismo energético decorrente do intenso catabolismo ocasionado pelo fármaco ou mesmo pela presença de outros efeitos colaterais da droga como dores e náusea reduzindo a procura por alimentos.

A hipótese da perda de peso estar associada a alterações alimentares é descartada em nosso trabalho, uma vez que não encontramos diferença estatística entre os grupos quanto a ingestão alimentar.

A presença de ulcerações no trato gastrintestinal, comum em tratamentos com antineoplásicos como o 5-FU e outros agentes citotóxicos, pode interferir na digestão e/ou absorção dos nutrientes e conseqüentemente influenciar no peso corporal e nas funções vitais. Avaliamos a excreção de lipídios, em especial de triglicerídeos no conteúdo do cólon e não encontramos diferença entre os dois grupos. Estes dados, associados à ingestão dietética adequada, indicam que os animais do grupo 5-FU estavam absorvendo normalmente os lipídios provenientes da dieta. Porém, no momento da eutanásia, a arquitetura da mucosa intestinal já estava recuperada mesmo com a redução no tamanho dos vilos e a presença de uma mucosite leve. Assim, a absorção de nutrientes provavelmente não estaria sendo afetada neste momento. No entanto, é importante destacar que a absorção dos macronutrientes como os lipídios não foi avaliada logo após as aplicações de quimioterápico, momento em que os animais sofrem perda de peso e a mucosite é intensa com aumento de neutrófilos (Soares, 2008) e modificações na morfologia do intestino delgado. Desta forma, não é possível afirmar que os animais absorveram adequadamente os nutrientes durante todo o período experimental e que este fator não tenha contribuído para as alterações no peso e na concentração de triglicerídeos, influenciando na menor captação destes pelos adipócitos.

A ação citotóxica do 5-FU gera um quadro de estresse e intenso catabolismo, uma vez que o fármaco não destrói apenas as células tumorais, mas também as células normais, especialmente aquelas de rápida proliferação, como as células mieloides e da mucosa gastrintestinal, desencadeando repercussões sistêmicas como a mielossupressão e a mucosite, conforme descrito por Craig e Stitzel (2005) e Savva-Bordalo et al (2010). A deleção das células saudáveis induz a dois quadros, um associado ao catabolismo e outro relacionado com a necessidade de regeneração celular, em busca da reposição das perdas e manutenção da homeostase corporal. Isto gera um estado de hipercatabolismo que culmina no aumento da necessidade energética e nutricional, levando à maior degradação de reservas como do tecido adiposo e maior captação dos triglicerídeos plasmáticos para produção de energia e suprimento das necessidades corporais, como visto em nosso estudo.

A diminuição da concentração plasmática de triglicerídeos no grupo tratado com 5-FU é explicada por nós pela maior captação e utilização destes para produção de energia e manutenção das funções vitais, podendo contribuir ainda para a redução do tecido adiposo devido a menor deposição de triglicerídeos.

No trabalho de Stathopoulos et al (1995), coelhos foram tratados com duas doses de 12 mg/kg ou 18 mg/kg de 5-FU em dois dias consecutivos e sacrificados 15 dias após a aplicação. Assim como em nosso trabalho, os autores observaram redução dos triglicerídeos circulantes nos animais que receberam 5-FU. Os autores não observaram alterações na ingestão alimentar nem sintomas gastrintestinais evidentes, porém, o efeito tóxico do quimioterápico pode gerar uma modificação alimentar no ápice da mucosite contribuindo para a alteração da concentração de triglicérides circulantes. Outra hipótese proposta por este investigador e seu grupo (1995) está associada a uma possível ação tóxica do 5-FU no fígado uma vez que grande parte da droga é metabolizada neste órgão. A ocorrência de uma toxicidade hepática pós-quimioterapia pode refletir em alterações na concentração de triglicérides circulantes.

A concentração de lipídios totais e de triglicérides no fígado também foi avaliada e não houve diferença entre os grupos, descartando a possibilidade de acúmulo de gordura hepática (esteatose) ou alterações no metabolismo do fígado, no momento em que a eutanásia foi realizada. Desta forma, sugerimos que as alterações no peso corporal estão relacionadas com o processo catabólico, desencadeando modificações nas reservas energéticas, diminuição do tecido adiposo e também da concentração de triglicerídeos plasmáticos.

Estudos mostraram que o tratamento com o 5-FU, resulta em uma diversidade de eventos como perda de peso; toxicidade endotelial, causando injúria e mucosite gastrintestinal, além de mielossupressão e modificações no estilo de vida (DIKKEN, SITZIA, 1998; SONIS, 2004). Soares (2008) observou em seu trabalho que ratos tratados com uma dose única de 150 mg/kg de 5-FU apresentaram peso inferior ao controle que recebe salina, desde o dia 3 até o dia 30, após a aplicação. Este dado indica que mesmo após 30 dias da aplicação do 5-FU os animais continuaram em um estado catabólico que refletiu em seu peso.

O estudo de Dikken e Sitzia (1998) investigou os principais efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes portadores de câncer coloretal tratados com 5-FU. A perda de peso foi relatada em 57% dos pacientes avaliados e sua intensidade foi

maior à medida que os ciclos de quimioterapia eram realizados. Estes dados confirmam que a perda de peso é um efeito colateral comum decorrente da quimioterapia.

A ingestão alimentar e hídrica foram semelhantes entre os grupos estudados mostrando que o 5-FU não interferiu no consumo alimentar. O aumento da demanda energética devido ao catabolismo e a necessidade de regeneração celular podem ter contribuído para a busca por alimentos com o intuito de suprir necessidades nutricionais dos animais, não refletindo em modificações no consumo alimentar.

Neste estudo, os animais receberam a dieta ocidental, que oferece em sua composição todos os macro e micronutrientes necessários. Os lipídios são ofertados por meio da manteiga, uma importante fonte de ácidos graxos saturados além da suplementação feita com colesterol. A composição desta dieta se assemelha à alimentação de grande parte da população brasileira, especialmente quanto ao consumo diário de ácidos graxos saturados e colesterol. A oferta desta dieta induziu ao aumento da concentração plasmática de colesterol total comparado ao início do experimento e possibilitou o desenvolvimento de placas de aterosclerose. De acordo com Aued-Pimentel et al (2003) e Vaz et al (2006), os ácidos graxos saturados estão relacionados com o aumento do colesterol plasmático, em especial da fração LDL, repercutindo em risco de doença cardiovascular. Lima et al (2000) cita que a ingestão de gordura saturada e colesterol são os principais fatores para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Quando avaliamos o colesterol plasmático, observamos que a concentração de colesterol total entre os grupos aumentou com o decorrer do experimento, comparados aos níveis iniciais, mas esta elevação foi semelhante entre os grupos, uma vez que ambos receberam a mesma dieta, mostrando que o tratamento com 5-FU não foi capaz de interferir no perfil plasmático do colesterol. A dosagem de HDLc, realizada somente ao fim do período experimental também não foi diferente entre o grupo 5-FU e o grupo controle. A fração referente ao colesterol não-HDL também não foi diferente entre os grupos. Estes dados mostram que a administração de dois ciclos de 5-FU não foi capaz de alterar o perfil de lipoproteínas plasmáticas. No fígado, a concentração de colesterol, após o período experimental foi semelhante entre os grupos, sugerindo metabolização normal do colesterol. A excreção do colesterol no conteúdo do cólon também não foi diferente. Os dados sugerem que a absorção, excreção e metabolismo do colesterol não foram

influenciados pelos ciclos de 5-FU. No entanto, é preciso ressaltar que modificações no metabolismo do colesterol não foram avaliadas imediatamente após as administrações de 5-FU.

Estudamos alguns parâmetros relacionados ao tecido adiposo, um importante órgão associado à patogênese de várias doenças, dentre elas as doenças cardiovasculares como a aterosclerose. Conforme mostrado acima, o grupo tratado com 5-FU apresentou menor proporção de tecido adiposo comparado ao seu controle. Embora o grupo controle apresente maior quantidade de tecido adiposo, ambos os grupos são compostos por animais magros, conforme pode ser verificado pelo peso corporal final e pelo volume de tecido adiposo extraído.

A mensuração da área de adipócitos permitiu verificar o tamanho dessas células e conseqüentemente sua capacidade de armazenar triglicérides. Os adipócitos apresentaram uma área média oscilando entre 600 e 800  $\mu\text{m}^2$ . Este dado também confirma que os animais são magros, uma vez que camundongos obesos, de acordo com Teixeira (2010), apresentam adipócitos com uma área média de 10000  $\mu\text{m}^2$ , bastante superior à encontrada em nossos animais.

A avaliação de macrófagos presentes no tecido adiposo foi realizada de duas formas: por meio da determinação da atividade da enzima NAG e da contagem de estruturas em forma de coroa (EFC). Os resultados da atividade de NAG indicam que a infiltração de macrófagos no grupo tratado com 5-FU foi menor comparado ao grupo controle. Animais tratados com quimioterápicos citotóxicos como o 5-FU sofrem efeitos colaterais como a mielossupressão. A mielossupressão leva à diminuição da produção de células mieloides e conseqüentemente, menor migração destas células para os diversos sítios corporais. Por outro lado, a ocorrência de mucosite poderia favorecer o deslocamento de células como os macrófagos para a região gastrintestinal em busca do combate à injúria tecidual e posterior restauração da mucosa. Como não encontramos diferenças na atividade da NAG na mucosa intestinal, a redução de macrófagos no tecido adiposo por ser decorrente da mielossupressão por ação do 5-FU, descrita por Savva-Bordalo et al (2010), Katzung (2007) e Craig e Stitzel (2005).

A contagem das EFC por campo não apresentou diferença entre os grupos 5-FU e placebo. No entanto, esta contagem por campo foi baixa em ambos os grupos, uma vez que as EFC são encontradas principalmente no tecido adiposo de animais obesos (WEISBERG et al, 2003; CINTI et al, 2005). O tecido adiposo é um órgão

composto por adipócitos e outras células, dentre elas macrófagos (FONSECA-ALANIZ et al, 2007; GALKINA; LEY, 2009). No tecido adiposo de indivíduos ou animais obesos é observado um grande infiltrado de macrófagos, disposto principalmente como EFC. A concentração de macrófagos no tecido adiposo é diretamente proporcional ao tamanho dos adipócitos e ao índice de massa corporal. Por sua vez, a liberação de mediadores inflamatórios no tecido adiposo está associada com a concentração de macrófagos neste tecido, determinando o nível de influência no desenvolvimento de outras doenças ou em processos inflamatórios (MALAVAZOS et al, 2005; MURANO et al, 2008).

Devido à expansão dos adipócitos, é comum a ocorrência de hipóxia, levando à morte ou apoptose destas células. Assim, os macrófagos migram para o tecido adiposo e circundam as células mortas para promover sua fagocitose e degradação de lipídios remanescentes. Em animais magros, com adipócitos eutróficos, a hipóxia e a consequente morte dos adipócitos não ocorrem de forma constante como visto nos obesos, caracterizando baixa presença de EFC nestes animais. Como os adipócitos não são células de renovação rápida nem possuem alta taxa metabólica, o tecido adiposo é menos afetado pelas alterações decorrentes da incorporação do 5-FU na célula. Isto mostra que não ocorre um processo inflamatório no tecido adiposo em decorrência da ação tóxica do quimioterápico.

Os macrófagos, produzidos pela medula óssea, são importantes constituintes do tecido adiposo. Estas células são mais susceptíveis a ação do 5-FU devido ao mecanismo de mielossupressão desencadeado pelo fármaco. Isto reflete em menor produção e migração de macrófagos para o tecido adiposo.

Assim, os resultados de NAG, EFC e área do adipócito mostraram que o tecido adiposo em si não é afetado pelo tratamento com 5-FU, embora os macrófagos sejam.

O peso do intestino delgado foi mensurado e expresso com relação ao peso corporal dos animais. Não foi observada diferença estatística entre os grupos. O comprimento do intestino também não foi diferente. Ferreira (2010) descreve uma diminuição no comprimento do intestino delgado três dias após a aplicação do 5-FU (150 mg/kg). Este resultado está relacionado com o encurtamento ou ausência das vilosidades intestinais e presença de ulcerações na mucosa decorrentes da ação citotóxica do quimioterápico. Ramos (1999) também observou encurtamento do intestino e diminuição do seu peso após aplicações de citarabina, um antineoplásico

citotóxico, em uma dose de 1,8 mg/animal, duas vezes ao dia por dois ou quatro dias consecutivos, onde a intensidade das alterações de peso e comprimento se mostraram dose-dependente.

As alterações relacionadas ao peso e comprimento do intestino delgado não foram observadas em nosso estudo, uma vez que os animais foram sacrificados três semanas após a segunda aplicação do 5-FU. Neste período, os animais passaram por uma regeneração da mucosa intestinal afetada pela ação do quimioterápico e restabelecimento de sua arquitetura o que contribuiu para a normalidade destes parâmetros.

A atividade da enzima MPO, marcador indireto da atividade de neutrófilos foi avaliada no intestino delgado e foi semelhante entre os grupos. No início da mucosite é comum ocorrer um aumento na atividade de MPO uma vez que os neutrófilos são as primeiras células de combate imunológico a atingir o sítio onde está ocorrendo a injúria. Este evento foi detectado por Ferreira (2010) e Soares (2008), onde a atividade de neutrófilos foi maior no grupo tratado com o 5-FU no terceiro dia pós-quimioterapia. No início do desenvolvimento da mucosite os neutrófilos estão aumentados e logo após o desaparecimento do processo inflamatório e restauração da mucosa gastrintestinal eles atingem níveis fisiológicos (SOARES, 2008). Como a mucosa de nossos animais estava praticamente normalizada, não é surpresa que a infiltração de neutrófilos também esteja dentro dos parâmetros fisiológicos.

Avaliamos a atividade de macrófagos em toda a extensão do intestino delgado, por meio da atividade da enzima NAG e não encontramos diferença entre os grupos estudados. Segundo Gillitzer e Goebeler (2001) e Broughton (2006) os macrófagos são células essenciais na resposta inflamatória e no reparo de tecidos. Possuem ação tardia, comparados aos neutrófilos, sendo recrutados para o sítio de inflamação no período de 48 a 96 horas após a injúria. Sonis (2004) descreve que os macrófagos estão presentes durante o desenvolvimento da mucosite, produzindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 que podem contribuir para a injúria tecidual e influenciar no desenvolvimento de outras doenças (SONIS, 2004). No entanto, espera-se que os níveis desta célula retornem aos valores basais após desaparecimento da injúria e regeneração do tecido afetado.

A atividade da enzima EPO, inesperadamente foi menor no grupo tratado com 5-FU. Já é descrito que a atividade de eosinófilos encontra-se aumentada quando



ocorre alguma reação adversa a um fármaco, infecção parasitária, doenças alérgicas ou algum processo inflamatório (ROTHENBERG; HOGAN, 2006) e após resolução do quadro, a concentração de EPO é reduzida a níveis basais, como ocorre com todas as células do sistema imune frente ao combate a antígenos e após sua eliminação. Ferreira (2010) observou a atividade de eosinófilos aumentada na fase aguda da mucosite, que corresponde ao terceiro dia pós-quimioterapia com 5-FU (150 mg/kg), em toda a extensão do intestino delgado. No entanto, como a mucosa de nossos animais estava praticamente normalizada, apresentando apenas um quadro de mucosite leve, esperava-se que o infiltrado de eosinófilos, assim como os neutrófilos e macrófagos, estivesse conforme os parâmetros fisiológicos. Confrontando os dados encontrados no mielograma também não é possível explicar a redução na atividade de eosinófilos no intestino delgado dos animais tratados com duas aplicações de 5-FU, uma vez que a produção destas células pela medula óssea foi similar entre os grupos no momento do sacrifício.

Nosso trabalho demonstra que a atividade das enzimas MPO e NAG já se encontrava em níveis basais mesmo após duas aplicações do quimioterápico com intervalo de vinte e um dias entre eles e com a presença de um quadro de mucosite leve no grupo 5-FU. Como dito anteriormente, uma vez que a mucosa intestinal já se encontrava regenerada e a produção das células mieloides está normalizada, é esperada uma atividade de macrófagos e neutrófilos em níveis fisiológicos neste órgão. Este resultado também era esperado quanto a atividade de eosinófilos, mas surpreendentemente não foi observado.

A avaliação morfológica do intestino delgado mostrou que os animais tratados com 5-FU apresentaram lesões intestinais classificadas como leves, com a presença de congestão vascular na mucosa, pontos de edema na submucosa e um discreto infiltrado inflamatório, que pode ser constituído por linfócitos, na base dos vilos. Essas discretas alterações morfológicas mostraram que os animais ainda não apresentavam recuperação completa do processo de mucosite no momento do sacrifício. Outra alteração observada na extensão do intestino delgado é a intensa presença de células caliciformes. Estas células são responsáveis pela produção de muco, um importante fator protetor da camada mucosa. O aumento das células caliciformes nos animais tratados com 5-FU reflete uma tentativa de proteção do trato intestinal à ação de agentes tóxicos, contribuindo assim para o completo restabelecimento das camadas afetadas pelo quimioterápico. O estudo morfológico

sugere que a droga possui ação potencialmente tóxica à mucosa intestinal e que sua toxicidade pode ser ampliada, conforme a dose administrada e sua frequência.

Soares (2008) mostrou em seu trabalho, que ratos tratados com uma dose de 5-FU de 150 mg/kg apresentaram mucosite intensa no terceiro dia, com encurtamento das vilosidades intestinais, achatamento e vacuolização de enterócitos, presença de infiltrado inflamatório e redução de células caliciformes em toda a extensão do intestino delgado. Porém, no décimo quinto dia de experimento, o autor observou uma recuperação dos parâmetros morfológicos descritos em todos os segmentos do intestino.

Comparando nossos resultados morfológicos com aqueles encontrados por Soares (2008) sugerimos que a frequência de administração do 5-FU pode ampliar a toxicidade intestinal causada pelo fármaco, intensificando a mucosite e aumentando seu período de duração.

A medula óssea é um órgão linfoide primário responsável pela produção e maturação de leucócitos e de células vermelhas. Como a medula é um órgão com intensa e rápida replicação celular, ela e o intestino, são os órgãos mais afetados pela ação citotóxica de quimioterápicos como o 5-FU. A intensa formação celular permite grande incorporação da droga ao DNA ou RNA das células e apoptose, diminuindo o número de células presentes gerando um quadro de hipoplasia de medula e causando ainda lesões e alterações na arquitetura da mucosa.

Após seis semanas de experimento e duas aplicações de 5-FU, realizamos uma contagem total dos leucócitos e células da linhagem vermelha presentes na medula óssea e não encontramos diferença entre os grupos. Para a contagem diferencial as células mieloides pertencentes à linhagem branca foram distribuídas em série granulocítica, monocitária, linfocitária e plasmocitária e nenhuma diferença estatística entre os grupos foi encontrada. Estes dados mostram que a medula óssea já se recuperou do quadro de hipoplasia celular, comum durante terapias com antineoplásicos, sem haver alterações na produção de alguma linhagem de leucócitos. De acordo com Craig e Stitzel (2005) a mielossupressão por 5-FU ocorre entre o sétimo e o décimo quarto dia pós-quimioterapia, com posterior recuperação da função mielóide após este período. Na série vermelha, encontramos uma produção reduzida de eritrócitos. A diminuição da produção destas células pode estar associada não somente com a toxicidade causada pelo 5-FU, mas também com o aumento da demanda de ferro para reestabelecer os níveis das células

eritrocíticas ou ainda em decorrência da ingestão insuficiente de ferro ou alterações na sua absorção, visto que este micronutriente é um constituinte fundamental dos eritrócitos. Alterações na série eritrocitária podem refletir em anemia e maior risco de hemorragias.

Da mesma forma que ocorreu na medula óssea, a contagem total de leucócitos circulantes não foi diferente entre os grupos estudados, mostrando que o período de intervalo entre a segunda aplicação do quimioterápico e o sacrifício dos animais possibilitou o restabelecimento da produção dos leucócitos. A contagem diferencial de leucócitos circulantes também foi igual entre os grupos.

No trabalho de Soares (2008) onde ratos foram tratados com uma aplicação única de 5-FU, na dose de 150 mg/kg a contagem total de leucócitos circulantes foi realizada em diversos momentos. O autor observou que nos dias 1, 3 e 5 após a aplicação do quimioterápico, os animais apresentaram importante leucopenia, que foi máxima no terceiro dia pós-quimioterapia. Estes resultados sugerem que uma aplicação única de 5-FU é capaz de causar diminuição da concentração de leucócitos circulantes. No décimo quinto dia de experimento, os animais tratados com 5-FU apresentaram um restabelecimento da contagem total de leucócitos plasmáticos (SOARES, 2008). Nosso trabalho foi realizado com camundongos que receberam duas aplicações de 5-FU com intervalo de 21 dias entre elas e até o sacrifício. No entanto, nossos dados são compatíveis àqueles observados por Soares (2008) no décimo quinto do dia do experimento, onde encontramos, num intervalo de vinte e um dias e após duas aplicações de 5-FU, níveis normais de leucócitos circulantes.

Este resultado indica que as células de defesa do organismo tiveram sua proliferação restabelecida no período de vinte e um dias após a administração de 5-FU.

O estudo do desenvolvimento da aterosclerose nos animais englobou aspectos relacionados com a extensão da válvula aórtica, o tamanho da placa aterosclerótica, a quantidade de macrófagos presentes na placa além da obstrução da luz do vaso, a qual está associada com diversas complicações clínicas tais como a estenose e a hipertensão arterial. É importante destacar que este é o primeiro trabalho que correlaciona a administração de ciclos de 5-FU e a formação da placa aterosclerótica.

Neste trabalho, observamos que a área da válvula aórtica foi igual nos dois grupos estudados. A avaliação da área da válvula aórtica permite observar a ocorrência de distensão devido à presença das placas de aterosclerose. Em relação à lesão aterosclerótica, os animais que recebem o quimioterápico apresentam menor lesão e conseqüentemente, menor obstrução da luz da artéria, comparados ao grupo placebo. Como não foram observadas alterações na concentração de colesterol, na excreção do colesterol nem na sua concentração no fígado estes dados sugerem que a menor formação de lesão no grupo tratado com o quimioterápico é decorrente de uma possível diminuição na formação e migração de macrófagos desencadeada pela ação citotóxica do 5-FU. Nossa hipótese é reforçada pelo teste de imunohistoquímica para macrófagos realizado na válvula aórtica. Os resultados mostraram que os animais tratados com 5-FU possuem menor quantidade de macrófagos na lesão, contribuindo com a hipótese de que a menor formação de placa no grupo submetido à quimioterapia é em decorrência da redução na produção de macrófagos pela medula óssea. A ação citotóxica da droga pode promover mielossupressão, reduzindo a produção de macrófagos e conseqüentemente, diminuir a migração destas células para a aorta.

Entretanto, deve-se ressaltar que o desenvolvimento de mucosite pós-quimioterapia no trato gastrointestinal pode estimular o desvio de macrófagos para este sítio resultando em menor migração dos macrófagos para outras regiões do organismo nesta fase, tais como o tecido adiposo e a aorta. No entanto, é necessário avaliar a cinética de produção de células mieloides em especial de macrófagos e a atividade destas células em diferentes órgãos e momentos, permitindo assim um melhor conhecimento da atuação dos macrófagos durante e após os ciclos de quimioterapia.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o 5-FU é capaz de alterar a concentração de triglicérides plasmáticos, modificar parâmetros do tecido adiposo, diminuir a migração de macrófagos para este tecido e para a aorta, resultando em mudanças no perfil do tecido adiposo e redução do desenvolvimento da aterosclerose em modelo LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta ocidental.

O tratamento crônico com 5-FU reduz a formação de aterosclerose sugerindo que a inflamação (mucosite) associada ao tratamento não é capaz de aumentar a aterogênese, como ocorre em outras inflamações, possivelmente pela ocorrência da mielotoxicidade e consequente diminuição da disponibilidade e deslocamento de monócitos/macrófagos para o sítio de aterosclerose.

## **9 PERSPECTIVAS**

Para resultados mais conclusivos sobre a causa da redução da placa e migração de macrófagos para o tecido adiposo estudaremos a mielotoxicidade e a mucosite uma semana após as aplicações, como forma de avaliar os possíveis mecanismos. A atividade de enzimas lipolíticas ou lipogênicas como a lipase e a lipase lipoproteica também devem ser investigadas.

## 10 REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v.20, p.470-475. 1974.

ALVAREZ-LEITE, J. I.; PELUZIO, M. C. G. Lípidos. In: NETO, F. **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ALVAREZ-LEITE, J. I.; OLIVEIRA, D. R.; PELUZIO, M. C. G. Dislipidemias. In: NETO, F. **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ANTONIADES, C. et al. Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease. **Obesity**, p.269-279. 2009.

AUED-PIMENTEL, Sabria et al. Ácidos graxos saturados versus ácidos graxos trans em biscoitos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.131-137. 2003.

BASTARD, Jean-Philippe et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. **Eur. Cytokine Netw.**, v.17, n.1. March. 2006.

BASTARD, Jean-Philippe et al. Adipose tissue IL-6 content correlatos with resistance to insulin activation of glucosa uptake both in vivo and in vitro. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2002.

BASTARD, Jean-Philippe et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2000.

BINDER, Christoph et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nature Medicine**, v.8, n.11, nov. 2002.

BJARNASON, Nina H. et al. Adverse bone effects during pharmacological breast cancer therapy. **Acta Oncologica**. n.47, p.747-754. 2008.

BLIJLEVENS, Nicole M. A.; LOGAN, Richard M.; NETEA, Mihai G. Mucositis: from febrile neutropenia to febrile mucositis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, suppl.1, p.36-40. 2009.

BRASILEIRO-FILHO, Geraldo. **Bogliolo, patologia geral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BREVETTI, Gregório et al. Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. **European Heart Journal**, v.29, p.224-230. 2008.

CHIAPPELLI, Francesco. The molecular immunology of mucositis: implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments. **eCAM, Journal and Oxford University Press**, v.2, n.4. p.489-494.

CINTI, Saverio et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v.46, p.2347-2355. 2005.

CRAIG, Charles R.; STITZEL, Robert E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CURI, Rui et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002.

DEANS, DAC et al. The influence of systemic inflammation, dietary intake and stage of disease on rate of weight loss in patients with gastro-oesophageal cancer. **British Journal of Cancer**, 2009, p.63-69.

DIKKEN, Clare; SITZIA, John. Patients' experiences of chemotherapy: side-effects associated with 5-fluorouracil + folinic acid in the treatment of colorectal cancer. **Journal of Clinical Nursing**, n.7, 1998. p.371-379.



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

FARMER, Stephen R. Be cool, lose weight. **News & Views**, v.458, n.16, april. 2009.

FAZIO, S. et al. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, n.9, p.4647-4652. 1997.

FERRARIS, R. P.; KUFÉ, D. W.; DIAMOND, J. Regulation of brush border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. **Am. J. Physiol.**, 262: 1047-1059. 1992.

FERREIRA, Talita Mayra Resende. **Efeitos da administração oral de ácidos graxos de cadeia curta sobre a mucosa intestinal em modelo murinho de mucosite**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

FISCHBACH, Frances; DUNNING, Marshall B. **Manual de enfermagem: exames laboratoriais e diagnósticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FONSECA-ALANIZ, Miriam Helena et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.5(suppl.). 2007.

FONSECA, Selma Montosa et al. **Manual de quimioterapia antineoplásica**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Ed., 2000.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v.28, n.10, p.2077-2080. 1982.

GALKINA, Elena; LEY, Klaus. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.27, p.165-197. 2009.

GILLITZER, Reinhard; GOEBELER, Matthias. Chemokines in cutaneous wound healing. **J. Leuk. Biol.**, v.69, p.513-521. 2001.

GIOVANNINI, Silvia et al. Myeloperoxidase levels and mortality in frail community-living elderly individuals. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v.65A, n.4, p.369-376. 2010.

GOLDSTEIN, Joseph L.; Brown, Michael S. The LDL receptor. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.29, p.431-438. 2009.

GREENBERG, Andrew S.; OBIN, Martin. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.** 83(suppl.). 2006.

GUIMARÃES, Daniella Esteves Duque et al. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.20, n.5, set./out. 2007.

HAJER, Gideon R. et al. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. **American Heart Journal**, v.154, n.4, oct. 2007.

HANSEN, T. et al. Visceral adipose tissue, adiponectin levels and insulin resistance are related to atherosclerosis as assessed by whole-body magnetic resonance angiography in an elderly population. **Atherosclerosis**, v.205, p.163-167. 2009.

HANSSON, Göran K. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p.1876-1890. 2001.

HANSSON, Göran K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, apr., p.1685-1695. 2005.

HANSSON, Göran K.; LIBBY, Peter. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature reviews – Immunology**, v.6, jul. 2006.

HERMSDORFF, Helen H. M.; MONTEIRO, Josefina B. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.48, n.6. Dec. 2004.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity**, v.11, p.11-18. 2010.

INSULL, William. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **The American Journal of Medicine**, v.122, n.1A, jan. 2009.

JANEWAY, Charles A. et al. **Imunobiologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JENSEN, Soren Astrup et al. Fluorouracil induces myocardial ischemia with increases of plasma brain natriuretic peptide and lactic acid but without dysfunction of left ventricle. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, n.36, dec. 2010.

JENSEN, Soren Astrup; SORENSEN, Jens Benn. Risk factors and prevention of cardiotoxicity induced by 5-Fluorouracil or capecitabine. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.58, p.487-493. 2006.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia estrutural dos tecidos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KARMIRIS, Konstantinos et al. Circulating levels of leptina, adiponectina, resistin, and ghrelin in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.12, n.2, February. 2006.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**. 10.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinions in Oncology**, v.19, p.323-327. 2007.

LALLA, R. V. et al. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. **Support. Care Cancer**, v.14, p.558-565. 2006.

LEE, Chih-Hao; OLSON, Peter; EVANS, Ronald M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology**, v.144, n.6, p.2201-2207. 2003.

LIBBY, Peter. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, dec. 2002.

LIBBY, Peter et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circulation Journal**, v.74, feb. 2010.

LIBBY, Peter; RIDKER, Paul M; MASERI, Attilio. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, mar. p.1135-1143. 2002.

LIMA, Flávia Emília Leite de et al. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.13, n.2, maio/ago. 2000.

LONGLEY, Daniel B. et al. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Cancer**, v.3, May. 2003.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275. 1951.

LUSIS, Aldons J. Atherosclerosis. **Nature**, v.407, sep. 2000.

MALAVAZOS, Alexis E. et al. Monocyte chemoattractant protein 1: a possible link between visceral adipose tissue-associated inflammation and subclinical echocardiographic abnormalities in uncomplicated obesity. **European Journal of Endocrinology**, v.153, p.871-877. 2005.

MAWHORTER, Steven D.; LAUER, Michael A. Is atherosclerosis an infectious disease? **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.68, n.5. May. 2001.

McGLINCHEY, Paul G. et al. 5-Fluorouracil-induced cardiotoxicity mimicking myocardial infarction: a case report. **BMC Cardiovascular Disorders**, v.1, n.3. 2001.

MONSUEZ, Jean-Jacques et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International Journal of Cardiology**, v.144, p.3-15. 2010.

MOULIN, Cristiane Martins et al. Impact of adiposity on immunological parameters. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.53, n.2, p.183-189. 2009.

MURANO, I. et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **Journal of Lipid Research**, v.49, p.1562-1568. 2008.

O'BRIEN, Peter J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113-139. 2000.

PARSLOW, Tristram G. **Imunologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2004.

RAMOS, Mariana Gontijo. **Proteção pela administração oral de ácidos graxos de cadeia curta contra lesões causadas por citarabina em camundongos**. 1999. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

REAVES, Titus A.; CHIN, Alex C.; PARKOS, Charles A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100 (suppl. 1). p.191-198. 2005.

ROGACEV, Kyrill S. et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. **European Heart Journal**, v.31, p3369-376. 2010.

ROGERO, Marcelo Macedo. **Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, 2007.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.315-328, 1947.

ROTHENBERG, Marc E.; HOGAN, Simon P. The eosinophil. **Annu. Rev. Immunol.** v.24, p.147-174. 2006.

SAVVA-BORDALO, Joana et al. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. **BMC Cancer**, 10:420. 2010.

SENKUS, Elzbieta; JASSEM, Jacek. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**. 2010.

SCHÄFFLER, A. et al. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. **Endocrine Reviews**, v.27, n.5, p.449-467. 2006.

SHI, Huan-Zhong. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.76, september. 2004.

SILVA, Paulo Henrique de; HASHIMOTO, Yoshio; ALVES, Hemerson Bertassoni. **Hematologia laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

SOARES, Pedro Marcos Gomes. **Mucosite intestinal experimental induzida por 5-Fluorouracil: papel de IL-1 $\beta$ , IL-4, PAF e avaliação das alterações de motilidade digestiva**. 2008. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, 2008.

SOARES, Pedro M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.63, p.91-98. 2008.

SONIS, Stephen T. The pathobiology of mucositis. **Cancer**, v.4, april. p.277-284. 2004.

STATHOPOULOS, Georgios P. et al. Influence of 5-Fluorouracil on serum lipids. **Acta Oncologica**, v.34, n.2, p.253-256. 1995.

STOLL, Guido; BENDSZUS, Martin. Inflammation and atherosclerosis novel insights into plaque formation and destabilization. **Journal of the American Heart Association**, jul., p.1923-1932. 2006.

STRINGER, Andrea M. et al. Chemoterapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications of change. **Current Drug Metabolism**, v.10, p.79-83. 2009a.

STRINGER, Andrea M. et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Bio Med.**, v.234, p.430-441. 2009b.

TEIXEIRA, Lílian Gonçalves. **Chá branco (*Camellia sinensis*) diminui estresse oxidativo e trigliceridemia em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.** 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

TIAN, Ling et al. Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells. **Atherosclerosis**, v.202, p.152-161. 2009.

TRAYHURN, Paul. Adipose tissue in Obesity – An inflammatory issue. **Endocrinology**, v.146, n.3. mar. 2005.

VADHAN-RAJ, Saroj et al. Single-dose palifermin prevents severe oral mucositis during multicycle chemotherapy in patients with cancer. **Annals of Internal Medicine**, v.153, n.6, Sep. 2010.

VAZ, Juliana dos Santos et al. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.19, n.4, jul./ago. 2006.

VLIET, Michel J. Van et al. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLOS Pathogens**, v.6, n.5, May. 2010.

XIAN, C. J. et al. Temporal changes in TFF3 expression and jejunal morphology during methotrexate-induced damage and repair. **Am. J. Physiol.**, v.277, p.785-795. 1999.

WAITZBERG, Dan Linetzky. **Dieta, nutrição e câncer.** São Paulo: Atheneu, 2006. IK

WAITZBERG, Dan L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. v.1.

WAJCHENBERG, Bernardo Léo et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, p.145-150. 2009.

WANG, Jianguo; SLUNGAARD, Arne. Role of eosinophils peroxidase in host defense and disease pathology. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.445. 2006.

WANG, S. H. et al. High-density lipoprotein affects antigen presentation by interfering with lipid raft: a promising anti-atherogenic strategy. **Clinical and Experimental Immunology**, v.160, p.137-142. 2009.

WEISBERG, Stuart P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v.112, p.1796-1808. 2003.

WELLEN, Kathryn; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.12, dec. 2003.



**ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 176/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Correlação entre processos inflamatórios do intestino delgado e cólon, produção de adipocinas e aterogênese em animais deficientes do receptor LDL (LDLr -/-)**", que tem como responsável(is) **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 10/2009**.

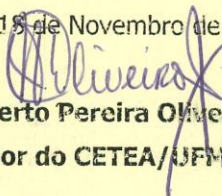
Este certificado expira-se em **28/ 10/ 2014**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 176/2009**, related to the project entitled "**Correlation among inflammation of the small intestine and colon, adipokine production and atherogenesis in LDL receptor knockout (LDLr -/-) mice**", under the supervisors of **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 28, 2009**.

This certificate expires in **October 28, 2014**.

Belo Horizonte, 15 de Novembro de 2009.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpg.ufmg.br](mailto:cetea@prpg.ufmg.br)

