

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**Efeito do fullerol nas alterações inflamatórias associadas à mucosite e
isquemia e reperfusão intestinal em camundongos**

Raquel Duque do Nascimento Arifa

Belo Horizonte

2011

Arifa, Raquel Duque do Nascimento

A696e Efeito do fulerol nas alterações inflamatórias associadas à mucosite e isquemia e reperfusão intestinal em camundongos [dissertação] / Raquel Duque do Nascimento Arifa. – 2011.
67 f.,enc.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

Bibliografia : f. 54-62

1. Inflamação gastrointestinal. – Mucosite. 2. Isquemia e reperfusão. – Intestino. 3. Farmacologia. - Fulerol.
I. Danielle da Glória de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. - Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

Ficha catalográfica elaborada por Sérgio Arifa dos Santos - Bibliotecário CRB 6^a/2580

Raquel Duque do Nascimento

**Efeito do fullerol nas alterações inflamatórias associadas à mucosite e
isquemia e reperfusão intestinal em camundongos**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como Requisito parcial para obtenção do título de mestre.
Área de concentração: Fisiologia
Orientadora: Profa Dra Danielle da Glória de Souza

UFMG
Belo Horizonte
Outubro – 2011

Ao Sérgio, grande amor da minha vida, que sempre acreditou em mim e apoiou os meus sonhos, mesmo quando pareciam distantes. Você possibilitou esse momento, amo você demais. Aos meus familiares e amigos, por me apoiar e entender os momentos em que estive ausente.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que possibilitou o conhecimento humano e me capacitou a desenvolver esse trabalho.

Em especial a minha amiga Zélia, pois foi através dela que eu tive acesso ao mundo da pesquisa. Obrigada Zel pela confiança, pelas discussões científicas e pela amizade.

A professora Danielle (Dani ou chefe), que me recebeu de braços abertos e me ensinou e tem me ensinado a ser uma pesquisadora e, mais do que isso, a amar a pesquisa científica. Obrigada pelas críticas, que são sempre positivas, por ser verdadeira e por ser amiga.

Ao meu amigo Talles, que esteve comigo em todos os experimentos, sempre com muita paciência, não é por acaso que você é o T-helper do laboratório. Esse trabalho também é seu.

A Mila e ao Caio, que me ajudaram nos meus primeiros passos e aguentaram muitos questionamentos meus.

Aos amigos de bancada e bandeirão, Renata, Milene, Lucas, Thiago, Pat, Ludmila, que tantas vezes trabalhamos juntos e rimos juntos, vocês são muito especiais.

A Gil que sempre me auxiliou quando precisei e a todo grupo de imunofarmacologia que sabe o que é trabalhar em equipe.

A todos os amigos e familiares que desde sempre fazem parte da minha vida. Obrigada a todos.

Resumo

A incidência de inflamação intestinal aumentou nas últimas décadas, principalmente nos países ocidentais. Vários estímulos podem levar a esse processo, no entanto, a inflamação resultante, quase sempre, converge para uma via final comum, na qual há resposta excessiva de célula T, infiltrado de neutrófilos e aumento da produção de citocinas e ROS. Visto que ROS participam da cascata inflamatória intestinal, grande atenção tem sido dada ao uso de compostos antioxidantes como forma de controlar a inflamação intestinal. Nesse contexto, analisamos como estratégia terapêutica, o fulerol, um nanocomposto com propriedades antioxidantes, em dois modelos: a mucosite induzida por Irinotecano e a isquemia e reperfusão intestinal (IRI) induzida por oclusão da artéria mesentérica superior. A mucosite é uma reação tóxica associada ao uso de quimioterápicos e é caracterizada por intenso processo inflamatório. Já a isquemia intestinal é uma emergência abdominal grave e a reperfusão sanguínea é a opção terapêutica necessária para restaurar as funções intestinais após isquemia. No entanto a reperfusão resulta em uma intensa resposta inflamatória. O fulerol protegeu contra neutropenia, atenuou a perda de peso e o encurtamento do intestino e diminuiu as lesões teciduais no modelo de mucosite. Essa melhora foi associada a um menor influxo de neutrófilos e eosinófilos, manutenção nos níveis de GSH e catalase e menor produção de IL-1 β . Já no modelo de IRI, o fulerol diminuiu o número de neutrófilos tanto no sangue quanto no intestino, diminuiu a permeabilidade vascular e as lesões teciduais e retardou a mortalidade. Essa melhora foi associada à menor concentração de CXCL-1 e, conseqüentemente, ao menor influxo de neutrófilos, que resultou em um processo inflamatório menos intenso com diminuição de citocinas pró-inflamatória, especialmente TNF- α . Esses resultados nos permite concluir que o fulerol possui ação anti-inflamatória nos modelos de mucosite e IRI.

Palavras chaves: Isquemia, reperfusão, mucosite, Irinotecano, inflamação, fulerol, ROS, anti-inflamatório

Abstract

The incidence of intestinal inflammation has increased in the last decades, especially in Western countries. Various stimuli may lead to this process, although the resulting inflammation usually converges to a final common pathway, characterized by excessive T cell activation, neutrophil infiltration and increased production of cytokines and ROS. Taking into account that ROS participate in the intestinal inflammatory cascade, considerable attention has been given to the use of antioxidants as an approach to control intestinal inflammation. In this context, we analyzed the fullerol (a nanocomposite with antioxidant properties) as a therapeutic strategy in two models: Irinotecan-induced mucositis and intestinal ischemia-reperfusion injury (IRI) induced by occlusion of the superior mesenteric artery. Mucositis is a toxic response associated with chemotherapeutic use and is characterized by intense inflammatory process. The intestinal ischemia and reperfusion is a severe abdominal emergency and restoration of blood supply is therapeutic option to replenish bowel function after ischemia. However the reperfusion results in intense inflammatory response. The fullerol protected against neutropenia, attenuated weight loss and intestine shortening and decreased tissue damage in the mucositis model. This improvement was associated with decreased neutrophils and eosinophil influx, maintenance of GSH and catalase levels and decreased IL-1 β production. In the IRI model, fullerol decreased neutrophil number in blood and in intestine, reduced vascular permeability, tissue damage and delayed mortality. This improvement was associated with diminished concentrations of CXCL-1 and, consequently, lower neutrophil influx, resulting in a less intense inflammatory process with reduction of proinflammatory cytokines, especially TNF- α . These results led us to conclude that fullerol exerts anti-inflammatory activity in mucositis and IRI models.

Keywords: ischemia, reperfusion, mucositis, Irinotecan, inflammation, fullerol, ROS, anti-inflammatory

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| AE | Azul de Evans |
| APC | Célula Apresentadora de Antígenos |
| BHT | Hidroxitolueno Butilado |
| DC | Célula Dendrítica |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DTI | DNA Topoisomerase I |
| DTNB | 5,5-ditiobis-2-2 ácido nitrobenzóico |
| EPO | Eosinófilo Peroxidase |
| ER | Retículo Endoplasmático |
| γ -GCS | <i>γ-glutamylcysteine synthetase</i> |
| GSH | Glutationa |
| H&E | Hematoxilina e Eosina |
| ICAM-1 | Molécula de Adesão Intercelular |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-17 | Interleucina 17 |
| IL-18 | Interleucina 18 |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IRI | Isquemia e Reperfusão Intestinal |
| MPO | Mieloperoxidase |
| NF- κ B | Fator Nuclear κ B |

| | |
|---------------|--|
| NRL | Receptor do tipo NOD |
| PBS | Tampão Fosfato Salina |
| PMN | Polomorfonucleados |
| PRR | Receptor de Reconhecimento Padrão |
| ROS | Espécie Reativa de oxigênio |
| SMA | Artéria Mesentérica Superior |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| TBARS | Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido Tricloracético |
| Th1 | Célula T auxiliadora 1 |
| Th17 | Célula T auxiliadora 17 |
| TLR | Receptor do Tipo Toll |
| TNB | Ânion Tiolato |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral |
| Treg | Célula T regulatória |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 12 |
| 1.1. Arquitetura intestinal e o desenvolvimento do processo inflamatório..... | 12 |
| 1.2. Mucosite..... | 20 |
| 1.3. Isquemia e Reperfusão Intestinal..... | 23 |
| 1.4. Fullerenos | 26 |
| 1.5. Justificativa para a utilização dos fulleróis, nos modelos propostos: | 27 |
| 2. Objetivo Geral | 27 |
| 2.1. Objetivos específicos | 28 |
| 3. Metodologia | 29 |
| 3.1. Animais | 29 |
| 3.2. Drogas | 29 |
| 3.3. Indução de mucosite intestinal experimental | 30 |
| 3.4. Modelo de Isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos | 30 |
| 3.5. Tratamento com fullerol | 30 |
| 3.6. Cumprimento do intestino para avaliação de lesão intestinal | 32 |
| 3.7. Histologia | 32 |
| 3.8. Contagem total de Leucócitos..... | 33 |
| 3.9. Contagem diferencial de Leucócitos circulantes..... | 33 |
| 3.10. Microhematócrito para indicação de extravasamento plasmático | 34 |
| 3.11. MPO para quantificação de influxo de neutrófilos | 34 |
| 3.12. EPO..... | 35 |
| 3.13. TBARS para quantificação de peroxidação lipídica..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.14. GSH para avaliação das defesas antioxidantes | 36 |
| 3.15. Determinação da catalase (CAT) | 37 |
| 3.16. ELISA para mediadores inflamatórios | 37 |
| 3.17. Azul de Evans para avaliação da permeabilidade vascular | 37 |
| 3.18. Análise Estatística: | 38 |
| 4.Resultados | 38 |
| 4.1. O Irinotecano causa inflamação no intestino de camundongos C57BL/6 | 38 |
| 4.2. O tratamento com fulerol diminuiu, de forma dose dependente, o influxo de neutrófilos para o íleo..... | 40 |
| 4.3. O uso de Fulerol exerce efeito protetor e diminui as lesões intestinais.... | 40 |
| 4.4. O fulerol não diminui a peroxidação lipídica em mucosite | 42 |
| 4.5. O fulerol diminui infiltrado inflamatório no íleo e efeitos adversos provocados pelo irinotecano..... | 42 |
| 4.6. A isquemia e reperfusão intestinal estão associadas à letalidade e a um Intenso processo inflamatório..... | 43 |
| 4.7. O fulerol retarda a letalidade e diminui lesões provocadas por isquemia e reperfusão intestinal | 44 |
| 4.8. O fulerol não diminui a peroxidação lipídica no modelo de isquemia e reperfusão intestinal | 46 |
| 4.9. O tratamento com fulerol está associado à diminuição de recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas induzidos por IR..... | 46 |
| 5. Discussão | 48 |
| 6. Referências Bibliográficas | 54 |

1. Introdução

1.1. Arquitetura intestinal e o desenvolvimento do processo inflamatório

O intestino é uma região do trato gastrointestinal de extrema importância para organismo, pois nele ocorre a maior parte da digestão e absorção de nutrientes. Esse órgão possui uma grande área de superfície e um epitélio fino, que tornam eficiente esse processo absorptivo (Ganz, 2003; Macdonald and Monteleone, 2005). Além disso, o trato gastrointestinal, e em especial o intestino, tem importante participação no sistema imune. Cerca de 25% desse trato é composto por tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal (GALT). Isso representa o maior órgão imunológico do organismo (Wiest and Rath 2003; Acheson and Luccioli 2004). Há no intestino uma rígida regulação entre as necessidades de absorção de nutrientes e manutenção da integridade da barreira epitelial. Essa regulação é essencial para o organismo, visto que o intestino é altamente colonizado por diversos microrganismos comensais. Além disso, microrganismos patogênicos podem ter acesso à mucosa intestinal. Nesse contexto, a perda da integridade da barreira epitelial pode resultar em invasão do tecido intestinal por microrganismos, tanto comensais quanto patogênicos, que podem levar a um processo patológico (Backhed et al., 2005; Slack et al., 2009; Eberl, 2010; Ismail et al., 2011).

A mucosa intestinal fornece uma barreira física separando da lâmina própria subjacente e camadas intestinais mais profundas os muitos trilhões de bactérias comensais que colonizam o lúmen intestinal. Ela possui uma camada única de epitélio, na qual cada uma das células mantém uma associação íntima

com as células vizinhas. Além disso, essas células possuem junções rígidas que limitam, mas não impedem a passagem de antígenos entre as células. Contudo, as células epiteliais intestinais formam mais do que uma simples barreira física, elas possuem várias outras funções que são cruciais para homeostase do intestino (Artis, 2008; Hooper and Macpherson, 2010).

O epitélio intestinal é composto de quatro linhagens de células originadas de células-tronco progenitoras pluripotentes (Figura 1): os enterócitos de absorção, que são a maioria das células epiteliais; as células caliciformes, produtoras de muco; as células enteroendócrinas, produtoras de hormônios; e as células Paneth, produtoras de peptídeos antimicrobianos ou lectinas. Entre outras ações, essas células atuam influenciando a colonização microbiana, além de induzir e modular a resposta imune (Artis, 2008; Hooper and Macpherson, 2010). Além disso, há subtipos especializados de células T (linfócitos T intraepiteliais) e células dendríticas, estrategicamente localizadas entre as células epiteliais intestinais. Essa posição permite que estas células tenham acesso ao conteúdo luminal e eliciem uma rápida resposta imunológica frente a um patógeno ou a um estímulo potencialmente lesivo (Spiller et al., 2008).

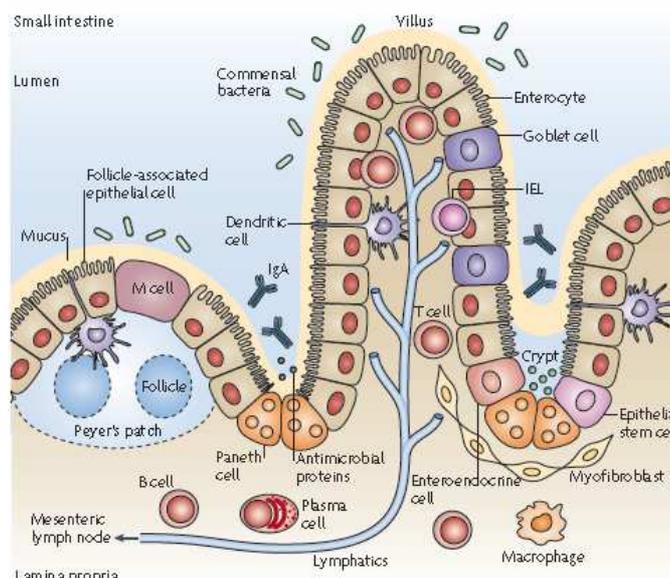


Figura 1- Representação da mucosa Intestinal (Abreu, 2010)

Os antígenos podem atravessar à mucosa através de quebras nas junções rígidas ou através do epitélio folicular associado, principalmente células M (Neutra et al., 2001). Quando os microrganismos rompem a barreira epitelial do intestino, eles são fagocitados e apresentados aos linfócitos T através das células apresentadoras de antígeno (APCs). No intestino, as células dendríticas são as principais APCs, mas os linfócitos B, os macrófagos, as células epiteliais ativadas, os plasmócitos, além de outras APCs, também possuem essa atividade. Esses eventos e a ação dessas diferentes células resultam em ativação dos linfócitos T (Niess et al., 2005; Mizoguchi and Mizoguchi, 2008). Isso ocorre continuamente no intestino, porém quando a mucosa está danificada esse processo é exacerbado. Essa exacerbação é associada a um prejuízo na permeabilidade epitelial e à perda da integridade da barreira imunológica (Hooper and Macpherson, 2010). Com isso, as células T, células dendríticas, macrófagos e outras células que foram ativadas, secretam várias citocinas que podem danificar ou amplificar o dano à mucosa. Em adição, essas citocinas podem ativar outros leucócitos e promover apoptose de células epiteliais intestinais.

Esses diferentes eventos e o fato do intestino possuir uma grande área de superfície, um epitélio fino, colonização por microrganismos comensais e uma alta atividade imunológica tornam o intestino altamente susceptível ao desenvolvimento de processos inflamatórios. É importante salientar, que mesmo que a causa que leva a uma inflamação intestinal não seja infecciosa, há perturbação no equilíbrio entre bactérias comensais e sistema imune da mucosa. (Platt and Mowat, 2008).

As doenças e desordens inflamatórias intestinais têm aumentado nas últimas décadas, principalmente nos países ocidentais. A inflamação intestinal

ocorre em resposta a diferentes estímulos, que podem ser: antígenos alimentares, como caracterizado na doença celíaca (Green and Jabri, 2006) hipóxia, observada na isquemia e reperfusão; quimioterápicos, que causam mucosite (Melo et al., 2008); além de estímulo microbianos associado à fatores genéticos, como ocorre na Doença de Cronh (Kobayashi et al., 2005). Nessas e em outras patologias intestinais, esses diversos estímulos levam a disrupção da barreira epitelial, ulceração e consequente inflamação (Fantini et al., 2007). Muitos componentes celulares e teciduais estão envolvidos nesse processo. Dentre eles estão os macrófagos, os neutrófilos e os eosinófilos. Essas células produzem, liberam e respondem a vários mediadores envolvidos na inflamação intestinal. Exemplos desses mediadores são as espécies reativas de oxigênio (ROS), as citocinas, as quimiocinas, os mediadores lipídicos, entre outros (Platt and Mowat, 2008).

As ROS são um grupo de moléculas reativas que contém oxigênio. Esse grupo inclui o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil, além de outras espécies reativas (Droge, 2002). Essas moléculas são essenciais para eliminação de microrganismos patogênicos. Além disso, interferem com várias vias de sinalização, modulando a expressão de diferentes genes e atividade de várias enzimas (Hancock et al., 2001). No entanto, os radicais livres podem causar danos ao organismo se os seus níveis estiverem exacerbados.

Para minimizar esses danos, o organismo dispõe de vários sistemas antioxidantes, como a glutathiona (GSH), SOD e catalase. O GSH é um tripeptídeo não enzimático, sobre condições normais, ele encontra-se em sua maior parte na forma reduzida (GSH). Porém, mediante produção excessiva de ROS, ele é oxidado e convertido a GSSG. Nessa reação ocorre a metabolização de ROS em

espécies menos tóxicas. O superóxido e o radical hidroxil são exemplos de moléculas metabolizadas nesse processo (Droge, 2002). Outro sistema antioxidante é o complexo de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), a SOD convertendo superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio e a CAT convertendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Nijveldt et al., 2001). Essas reações estão resumidamente descritas na figura 2.

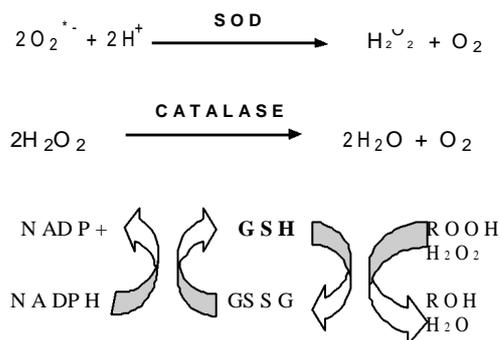


Figura 2- Sistemas antioxidantes endógenos

O desequilíbrio entre a produção de ROS e a remoção dessas moléculas pelos sistemas antioxidantes do organismo é caracterizado como estresse oxidativo (Adler et al., 1999). Em diferentes patologias caracterizadas por inflamação intestinal o estresse oxidativo contribui para disfunção da barreira epitelial intestinal (Katsube et al., 2007a). Além disso, as ROS são essenciais para a indução da migração de neutrófilos para o tecido lesado, além de contribuir fortemente para a amplificação da resposta inflamatória (Ryter et al., 2007; Gill et al., 2010). Nesse contexto, as lesões induzidas por radicais livres podem ser explicadas por vários mecanismos: eles desencadeiam uma rápida adesão de neutrófilos a células endoteliais, através da indução de moléculas de adesão, como as selectinas ou ICAM-1 (Sellak et al., 1994; Akgur et al., 2000; Zweier et al., 2005; Santen et al., 2009) e participam da cascata de estimulação de liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e mediadores

lipídicos. Adicionalmente, os radicais livres podem reagir diretamente com componentes da membrana plasmática levando a lesão celular, caracterizando assim a peroxidação lipídica (Al-Dasooqi et al., 2009; Sonis, 2004).

Além das ROS, as citocinas também são importantes mediadores da inflamação no intestino. Essas pequenas proteínas não estruturais possuem peso molecular de 8 a 40 kDa. (Dinarello, 2000). Elas ativam células envolvidas na defesa do hospedeiro contra infecções e inflamação crônica e aguda, além de possuírem importante função na hematopoiese, maturação e proliferação celular (Mossman, 1994). As citocinas também são importantes mediadores das interações entre células imunes ativadas e células não imunes, incluindo as células epiteliais e mesentéricas (Fantini et al., 2007). Uma ampla faixa dessas proteínas tem sido implicada na patogênese de doenças relacionadas ao processo inflamatório no trato gastrointestinal, Isso inclui citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, além do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), e citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Praticamente todas as células nucleadas são capazes de sintetizar e responde à citocinas (Dinarello, 2000).

Várias células atuam na defesa do intestino, neutralizando os antígenos que conseguem romper a mucosa intestinal. Essas podem ter uma ação direta (ex. fagocitose de patógenos) ou indireta (ex. produção e liberação de mediadores inflamatórios) ou ambas as ações. As células residentes, que incluem macrófagos e células dendríticas, são as primeiras células a atuarem na manutenção da integridade mesenquimal (Sansonetti and Medzhitov, 2009). Posteriormente, outros leucócitos, como os polimorfonucleados (PMN), migram para o tecido lesado para eliminar o agente agressor e restaurar a homeostase intestinal (Mumy

and McCormick, 2009).

Os macrófagos estão estrategicamente localizados na lâmina própria subepitelial. Quando há crescimento microbiano descontrolado, seja por lesão da mucosa ou por infecção, os macrófagos residentes são ativados através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Outras células imunes, como células dendríticas e neutrófilos, também possuem PRRs, como receptores do tipo toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). A ativação basal desses receptores mantém as funções da barreira epitelial e a composição comensal. Porém, quando essa ativação é exacerbada pode ocorrer desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Uma vez ativados, através do PRRs, os macrófagos fagocitam os patógenos, atuando como células apresentadoras de antígenos. Eles secretam várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que induzirá influxo de monócitos e macrófagos para o tecido lesado. Essas citocinas agravam o dano mucosal, além de ativar outras células inflamatórias (Platt and Mowat 2008; Koch, Kucharzik et al. 2010; Smith, Smythies et al. 2011). Por outro lado, há macrófagos residentes da lâmina própria do intestino delgado e grosso que possuem fenótipo anti-inflamatório. Embora permaneçam com a atividade bactericida (Smythies, Sellers et al. 2005), eles podem também atuar nas interações reguladoras, principalmente através da produção de IL-10 (Platt and Mowat, 2008). As células dendríticas também podem atuar tanto com o perfil pró-inflamatório quanto anti-inflamatório.

As células dendríticas são células imunes derivadas de células hematopoiéticas da medula óssea. No intestino, essas células são abundantes na lâmina própria e são caracterizadas por alta atividade endocítica. Nesse órgão, elas atuam principalmente como células pró-inflamatórias. Esse perfil pró-

inflamatório se dá tanto pela ativação de linfócitos T quanto pela indução do desenvolvimento de linfócitos Th17 e Th1 (Atarashi et al., 2008; Khamri et al., 2010). No entanto, há mais de uma subpopulação de células dendríticas na região intestinal e, dependendo do estímulo, elas podem desenvolver um perfil anti-inflamatório. Sendo assim, as DC podem levar a diferenciação de células T imaturas em células Treg, que possui atividade regulatória. Nesse caso, as DC contribuem para uma complexa relação de regulação negativa da resposta imune no intestino, que é denominada tolerância intestinal I (MacDonald et al., 2011). No entanto, a desregulação tolerogênica das DC diminui a população das células Treg e aumenta a população das células Th1 e Th17. Essa alteração contribui para o desenvolvimento e manutenção da inflamação intestinal (Abraham and Medzhitov, 2011). Além disso, foi demonstrado que DC e macrófagos presentes na lâmina própria de pacientes com doenças inflamatórias intestinais produzem maiores quantidades de citocinas inflamatórias (Weber et al., 2009; Kamada et al., 2008).

Já os PMN, são as primeiras células a migrarem do sangue para o tecido lesado ou que foi invadido por microrganismos. Esses leucócitos são guiados por várias moléculas quimiotáticas, como CXCL-1. Uma vez ativados, os PMN secretam enzimas proteolíticas (mieloperoxidases, elastases, proteases), produzem e liberam ROS, exercendo assim importante papel na contenção e erradicação de patógenos (Segal, Leto et al. 2000; Kucharzik, Hudson et al. 2005). Contudo, a ativação e o recrutamento exacerbados de neutrófilos têm sido relacionados a dano tecidual em desordens inflamatórias intestinais crônicas, tanto em humanos (Mumy and McCormick, 2009) quanto em animais (Kaneda et al., 2011). Além disso, esse recrutamento também está relacionado com

desordens inflamatórias agudas, como observado em Isquemia e Reperfusão Intestinal (IRI). Nessa patologia, o influxo de neutrófilos, a produção de ROS e de citocinas, que ocorre após reperfusão, agrava o dano tecidual iniciado durante a etapa de isquemia (Ryter et al., 2007; Willerson, 1997; Souza et al., 2000; Souza et al., 2005).

Vários modelos existentes de inflamação intestinal refletem uma grande e notável variedade de causas. No entanto, a inflamação resultante quase sempre converge para uma via final comum de inflamação. Essa via é caracterizada por dano à mucosa, que leva a ativação excessiva de célula T, aumento do influxo de células inflamatórias do sangue para o intestino, aumento de citocinas e de ROS. Nesse trabalho focaremos em dois modelos de inflamação intestinal; a mucosite e a isquemia e reperfusão intestinal.

1.2. Mucosite

A mucosite é uma inflamação das membranas da mucosa provocada por quimioterápicos ou radioterápicos. Ela é considerada como um fenômeno complexo em que há a participação de muitos componentes celulares e teciduais da mucosa (Sonis, 2004). Essa inflamação, juntamente com as lesões intestinais que acompanham a quimioterapia, é uma das principais causas de morbidade para muitos pacientes que estão em tratamento de câncer (Williams, 2001).

A quimioterapia é um tratamento de câncer com uso de drogas antineoplásicas. Esse tratamento visa primariamente destruir as células neoplásicas. No entanto, a maioria dos agentes antineoplásicos age de forma inespecífica, lesando tanto células neoplásicas quanto as células normais. Isso ocorre porque a maioria desses agentes atua no processo de divisão celular,

interferindo na duplicação do DNA (Lake and Robinson, 2005). Como várias células do organismo possuem altas taxa mitótica, a quimioterapia atinge também essas células, levando a lesão tecidual e, conseqüentemente, à inflamação. Um dos sistemas mais afetados por esse efeito adverso é o trato gastrointestinal, pois as células basais da mucosa do tubo digestivo possuem altas taxas de divisão celular (Lheureux et al., 2011).

O uso de quimioterápicos gera vários efeitos adversos, como alterações funcionais do intestino, leucopenia, neutropenia e mucosite (Ikuno et al., 1995). Segundo SONIS (2004), O dano ao DNA e a formação de ROS, induzidos pela ação da quimioterapia ou radioterapia, ativam vias de sinalização, além de fatores de transcrição que medeiam à expressão de genes alvos, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Essas citocinas irão atuar em uma cascata de eventos, ligados ao processo inflamatório. As diferentes ações dessas proteínas, principalmente das pró-inflamatórias, prejudicam a integridade da mucosa. Além disso, a fragmentação do DNA também leva a ativação de fatores transcricionais, como p53 e NF- κ B. Esses fatores estão envolvidos na ativação da transcrição de genes ligados a produção de citocinas pró-inflamatórias (Al-Dasooqi et al., 2009; Sonis, 2004). Vários quimioterápicos têm potencial para provocar mucosite, como 5-fluorouracil e Irinotecano.

O irinotecano (CPT-11), utilizado em nossa pesquisa, é o quimioterápico de escolha no tratamento de diversos tumores sólidos. Ele age inibindo a ação da enzima DNA topoisomerase I (DTI). Para que o irinotecano se ligue a essa enzima, é necessária sua conversão em um metabólito ativo, o SN-38 (figura 3A). Essa conversão é feita por ação de uma carboxilesterase presente no fígado (figura 3B) (Gibson et al., 2003). Uma vez convertido na sua forma ativa,

o Irinotecano se liga ao complexo DTI, levando a quebra da dupla fita e morte celular (figura 4) (Takasuna et al., 1996; Takasuna et al., 2006). A inibição da enzima DTI é importante para morte das células tumorais, porém o uso de Irinotecano está ligado a efeitos adversos, como leucopenia, neutropenia e mucosite (Reardon et al., 2011a). No fígado, o metabólito SN-38 é glucorinado e convertido em uma forma menos tóxica SN-38G (Takasuna et al., 1996). Entretanto, ele é secretado na bile e lançado novamente no trato gastrointestinal. Nessa região, o SN-38G é reconvertido na sua forma ativa por ação da enzima β -glucuronidase. Essa enzima está presente em várias bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Bacteroides*. Uma vez reconvertido em sua forma ativa, o Irinotecano causa dano direto ao epitélio da mucosa intestinal (Logan et al., 2008; Tryland et al., 1998). Esse dano ocorre porque o Irinotecano causa apoptose das células basais do epitélio intestinal. Sendo assim, essas células tornam-se incapazes de substituir adequadamente as células epiteliais que, fisiologicamente, são perdidas por esfoliação. Isso resulta em atrofia epitelial e colapso da mucosa (Symonds, 1998; Parulekar et al., 1998).

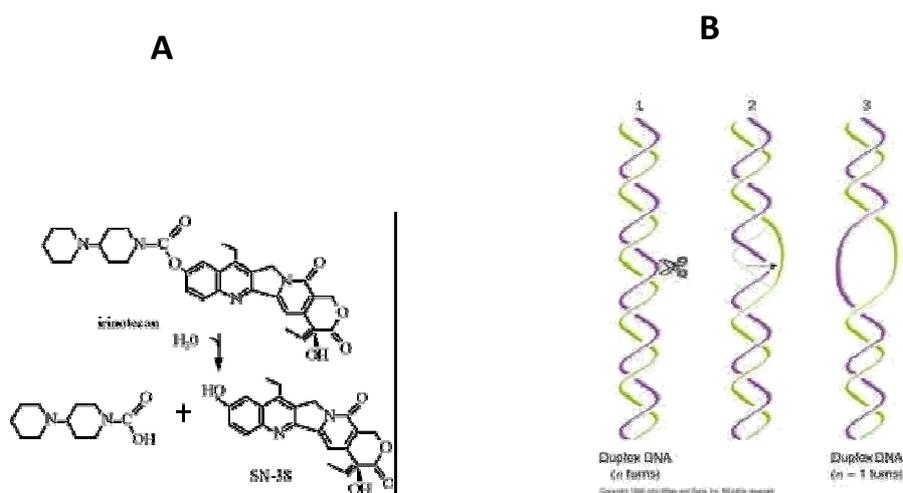


Figura 3: Conversão do Irinotecano a SN-38 por desesterificação (A). (SLICHENMYER, WJ, 1993). Ação da enzima do DNA Topoismerase I (B)

Duncan and Grant (2003), propuseram quatro fases para mucosite intestinal: Resumidamente, na fase inicial, a quimioterapia leva a dano ao DNA, que afeta as células da cripta, e induz a formação de ROS. Isso resulta em morte celular, perda da barreira epitelial, ativação e influxo de células inflamatórias e aumento na produção de mediadores inflamatórios; Na segunda fase, aumenta o processo de apoptose e ocorre perda progressiva de células da cripta e da superfície de absorção; Na terceira fase, ou fase de ablação, ocorre um colapso da profundidade das criptas e ulceração. Isso pode resultar em invasão microbiana e exacerbação do processo inflamatório; A última fase é a de recuperação, onde, após cessar a aplicação do quimioterápico, ocorre a restauração das criptas, estruturação e funcionalização dos vilos e recuperação das superfícies absorptivas do intestino.

1.3. Isquemia e Reperfusão Intestinal

A redução prolongada do fluxo sanguíneo (isquemia) que irriga um tecido ou um órgão pode levar a uma significativa morte celular e lesão tecidual. A isquemia e subsequente restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão) são componentes de doenças, como ataque cardíaco, infarto do miocárdio, choque, falência respiratória, acidente vascular encefálico, entre outros (Ryter et al., 2007; Zweier and Talukder, 2006; Engelhorn et al., 2011). A opção terapêutica para revitalizar o tecido isquêmico é a restauração do fluxo sanguíneo, seja por método cirúrgico (ex. revascularização miocárdica de urgência) ou clínico (ex. uso de agentes trombolíticos). Entretanto, a reperfusão de uma região isquêmica, embora necessária para a restauração da função e mecanismos de reparação do tecido,

pode resultar tanto em uma reperfusão insuficiente (chamado fenômeno do fluxo reduzido) prolongando a hipóxia, quanto em restauração do fluxo sanguíneo com reoxigenação do tecido atingido. Neste segundo caso, paradoxalmente, pode haver liberação de mediadores do processo inflamatório, recrutamento e ativação de leucócitos (Souza et al., 2009). A reperfusão aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio. Esse aumento pode levar a morte celular programada e infiltração de neutrófilos, que acabam por agravar o dano tecidual iniciado durante a etapa de isquemia (Souza et al., 2005; Vandenabeele et al., 2010). Vários mecanismos podem ser responsáveis pelos danos de reperfusão: a geração de radicais livres de oxigênio, como na isquemia cardíaca (Swaminathan et al., 2010); perda de enzimas antioxidantes, que ocorre na isquemia cerebral (Bora and Sharma, 2011; Dong and Kaunitz, 2006); grande infiltrado de neutrófilos e hemorragia, observado em isquemia e reperfusão intestinal (IRI) (Souza et al., 2005); além de anormalidades do fluxo de cálcio, perda da concentração normal de adenosina trifosfato e edema tecidual (Teke et al., 2007; Chang et al., 2010; Boys et al., 2010).

A isquemia intestinal é uma emergência abdominal grave, a demora no diagnóstico e tratamento pode levar a infarto intestinal e a morte. A incidência de isquemia intestinal tem aumentado nas últimas décadas e as taxas de mortalidade continuam altas, entre 60 a 80% (Yasuhara, 2005; Acosta et al., 2010). Uma das formas mais grave de isquemia intestinal é por oclusão da artéria mesentérica superior (SMA) e quanto maior for o grau de obstrução (parcial ou total) maior é a gravidade. (Souza et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Fagundes et al., 2007)(Zhang et al., 2010). O processo isquêmico intestinal pode causar desarranjos metabólicos graves, que levarão a uma série de eventos que

podem resultar em disfunções em múltiplos órgãos. Sendo assim, a restauração do fluxo sanguíneo com reoxigenação do tecido isquêmico é necessária para restauração das funções intestinais, porém, a reperfusão pode agravar o dano tecidual (Acosta et al., 2010). Após a restauração do fluxo sanguíneo, ocorre a ativação e subsequente infiltração de leucócitos na mucosa e microvasculatura, resultando em perda da barreira seletiva do intestino, que culmina em aumento da permeabilidade intestinal, necrose e morte (Souza et al., 2009; Amaral et al., 2007; Sun et al., 2007) . Das células epiteliais intestinais, as células Paneth são as mais susceptíveis a lesão de isquemia e reperfusão. A hipóxia e posterior produção de ROS levam ao estresse do retículo endoplasmático (ER) e morte programada dessas células. Grootjans e colaboradores (2011) demonstraram que a perda de células Paneth está associada ao aumento da translocação bacteriana para os linfonodos, baço e fígado. Além disso, a disrupção de células epiteliais dos vilos, sem afetar as células Paneth, está associada à bacteremia. No entanto, a bacteremia é substancialmente aumentada sobre depleção funcional adicional das células Paneth (Grootjans et al., 2011).

Vários eventos contribuem para a inflamação intestinal após IRI, como ativação de fatores que resultam em translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, aumento da síntese de citocinas e quimiocinas, como TNF- α e CXCL-1, além de recrutamento de neutrófilos. Trabalhos desenvolvidos no nosso grupo demonstraram que o bloqueio de NF- κ B ou a inibição de TNF- α aumenta taxa de sobrevivência, diminui o influxo de neutrófilos e as lesões teciduais provocadas por IRI (Souza et al., 2005; Souza et al., 2009; Suzuki et al., 2008; Amaral et al., 2007). Esses resultados confirmam que a inflamação está diretamente envolvida nas lesões e gravidade da IRI.

1.4. Fulerenos

Os fulerenos são uma vasta família de nanocomposto superaromáticos, altamente simétricos, compostos de dezenas de átomos de carbono sp²-hibridizados. Sua estrutura é em geral esférica formada por hexágonos interligados por pentágonos, sendo estes últimos responsáveis pela curvatura da molécula e, conseqüentemente, por sua forma tridimensional (Kroto, et al. 1985). O representante mais conhecido da família dos fulerenos é o C₆₀ (com 60 carbonos), um icosaedro truncado de simetria ih, e um diâmetro de aproximadamente 1nm. Devido à sua forma tridimensional, suas ligações insaturadas e sua estrutura eletrônica, os fulerenos apresentam propriedades físicas e químicas únicas que podem ser exploradas em várias áreas da bioquímica e da medicina. Dentre a vasta gama de aplicações biomédicas dos fulerenos destacamos: a atividade antiviral, antimicrobiana, antioxidante e de *scavenger* de radicais livres (Bakry et al., 2007; Bosi et al., 2003).

Avanços recentes na química orgânica (veja e.g. Hirsh, 1994) permitiram funcionalizar e adaptar estas moléculas para aplicações médicas, vencendo sua maior desvantagem: seu caráter apolar e sua repulsão natural por água. A hidrossolubilidade dos fulerenos foi um marco para a pesquisa e o desenvolvimento de aplicações biomédicas destas moléculas. Neste projeto nos concentraremos na investigação das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos derivados hidrossolúveis dos fulerenos, os fuleróis.

O fullerol (C₆₀OH_n), também conhecido como fulerenol ou fulereno (C60) polihidroxiado, é um nanocomposto que possui hidrossolubilidade devido aos radicais hidroxilas (OH) que foram adicionados a nanomolécula original de fulereno (figura 4).

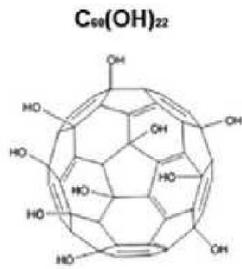


Figura 4: Imagem representativa do fulerol

Vários trabalhos demonstram que o fulerol exerce efeito protetor em diversos modelos devido a sua ação antioxidante, como atenuar lesões associadas à isquemia pulmonar e reduzir apoptose em cultura de neurônios corticais (Dugan et al., 1996; Chen et al., 2004).

1.5. Justificativa para a utilização dos fuleróis nos modelos propostos:

As ROS são conhecidas nos modelos proposto por induzir instabilidade celular e uma cascata de eventos que leva a morte celular programada, lesão tecidual, exacerbação da resposta inflamatória, atração e ativação de neutrófilos.

(Al-Dasooqi et al., 2009; Sonis, 2004). Os fuleróis são conhecidos por sua capacidade de reagir com ROS, agindo como uma *scavenger* de radicais em doenças causadas por hiperprodução de radicais livres (Bosi et al., 2003). A ação antioxidante dos fuleróis é um componente importante para sua utilização nos modelos propostos.

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos fuleróis na resposta inflamatória associada aos modelos experimentais de mucosite e isquemia e reperfusão intestinal.

3. Metodologia

3.1. Animais

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA- protocolo 113/11). Foram utilizados camundongos (8 semanas), das linhagens C57BL/6, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB , UFMG. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração.

3.2. Drogas

As drogas utilizadas foram Cloridrato de Irinotecano (CPT-11), ampola de 5mL, sendo 20mg/mL, do laboratório Eurofarma

3.3. Indução de mucosite intestinal experimental

A mucosite experimental em camundongos foi baseada em modelo previamente descrito por Melo et al. (2007). Os animais receberam injeção de cloridrato de irinotecano (75mg/kg) ou PBS intraperitonealmente (ip), a cada 24 horas, por quatro dias consecutivos. Diariamente, os camundongos foram pesados. No sexto dias após a primeira injeção, um grupo de animais foi sacrificado por deslocamento cervical e os tecidos removidos para análises posteriores.

3.4. Modelo de Isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos

Os camundongos foram anestesiados com ketamina e xilasina e submetidos à laparotomia mediana com posterior exposição da arcada mesentérica. Para oclusão vascular, a artéria foi isolada e submetida a uma ligadura através de fio de seda com auxílio de um polietileno (PE-50) como suporte. Para a reperfusão o fio foi cortado e o fluxo sanguíneo restabelecido. Foi feito um estudo de mortalidade para definir o tempo ideal de isquemia e reperfusão. Após a reperfusão, o intestino e o sangue foram coletados e processados para as dosagens descritas abaixo.

3.6. Comprimento do intestino para avaliação de lesão intestinal

O intestino delgado foi removido e determinado o seu comprimento (distância entre o piloro até a válvula ileocecal) com auxílio de uma régua.

3.7. Histologia

Em tempos adequados, após indução de IRI e mucosite intestinal, o intestino foi removido e fixado em formol 10%. Em seguida, foi desidratado gradualmente em etanol, embebido em parafina, cortado, fixado em lâminas histológicas e corado com H&E. A análise histológica (morfometria e escore histológico) nesses tecidos foi feita após exame das lâminas em microscópio. A altura das vilosidades da mucosa de cada amostra foi medida utilizando imagens digitalizadas obtidas com um objetivo 10X a partir de um microscópio de luz (Olympus) adaptado com uma câmera digital câmera (Moticon). A avaliação

histológica foi baseada em a intensidade de mononucleares e polimorfonucleares infiltrados na lâmina própria, nas mudanças na arquitetura da mucosa, diminuição da altura das vilosidades intestinais e ulceração. Para cada parâmetro as alterações foram classificadas de acordo com a seguinte escala: ausente (0), leve (1), moderada (2) e intenso (3). O número representou o SCORE inflamatório de 0 (normal) a 12 (muito alteradas). Os resultados foram expressos como valores médios de \pm SEM para cada grupo experimental (adaptado de Usselmann, 2001)

3.8. Contagem total de Leucócitos

Para contagem total de leucócitos circulantes foi coletado 10 μ L de sangue de cada animal, colocado em um tubo de plástico e acrescentado 90 μ L do corante Turkey (Sigma, St. Louis, MO, USA).. Com auxílio de uma pipeta, as amostras foram homogeneizadas e a câmara Neubauer foi preenchida com 10 μ L do homogenato. Em seguida, foi feita a contagem total dos leucócitos de cada amostra no microscópio.

3.9. Contagem diferencial de Leucócitos circulantes

Foram coletados 10 µL do sangue de cada animal e colocado em lâmina de vidro.

Em seguida, foi realizado o esfregaço para contagem diferencial de leucócitos circulantes. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e coradas com panótico. A contagem diferencial foi feita em microscópio com objetiva de 100X.

3.10. Microhematócrito para indicação de extravasamento plasmático

Durante o sacrifício, foram utilizados tubos capilares para coletar amostras de sangue dos animais sacrificados. Os capilares foram centrifugados a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. Após centrifugação, com auxílio de uma régua, o hematócrito foi determinado através do cálculo do percentual da parte vermelha do sangue.

3.11. MPO para quantificação de influxo de neutrófilos

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no intestino foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase (Ivey et al., 1995; De Matos et al., 1999). Fragmentos de intestino foram pesados e picados, suspensos a 5% em salina EDTA, submetido à homogeneização e centrifugação (3000g, 15 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em solução salina/EDTA (2mL) gelada, sendo adicionados 1,5mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada. Realizou-se nova centrifugação 3000g por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet

ressuspendido em tampão fosfato com HTAB a 5% e re-homogenizado por 30 segundos. Uma amostra de 1mL foi transferida para o eppendorf. Em nitrogênio líquido as amostras foram congeladas e descongeladas três vezes, seguidamente, foram submetidas novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. Amostras de intestino foram diluídas (1:5) antes do ensaio. Estas diluições foram determinadas em experimentos preliminares. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando tetramethylbenzine (1.6mM) e H2O2 (0.5mM). Resultados foram expressos unidades relativas (MPO) da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de ratos processados da mesma maneira. Para este fim, neutrófilos foram induzidos no peritônio de ratos por injeção de 3mL de caseína 5%. A curva padrão do número de neutrófilos (>95% de neutrófilos) versus O.D. foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados da maneira descrita para o ensaio de atividade de MPO.

3.12. EPO

O ensaio do EPO foi feito conforme descrito por STRATH, 1985.

Resumidamente, para cada 100 mg de íleo foi utilizado 1,9 ml de PBS para homogeneizar o tecido, em seguida o homogenato foi centrifugado em 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células foram lisadas e foi feita nova centrifugação, descartado e o precipitado foi suspenso em 1,9 ml de 0,5% de brometo de amônio hexadeciltrimetil em PBS. Posteriormente esse homogenato final foi congelado três vezes em nitrogênio líquido, e centrifugados 4 ° C, 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado em o ensaio

enzimático com a adição de um montante igual de substrato (1,5 mmol / L o-fenilenodiamina e 6,6 mmol/L de H₂O₂ em 0.075 mmol / L Tris-HCl (pH 8). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 m e lido na absorvância de 492 nm.

3.13. TBARS para quantificação de peroxidação lipídica

Os tecidos foram homogeneizados e, posteriormente, foi utilizado 100 µL do homogenato para 25 µL da solução gelada de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1%; NaOH a 50 mM; hidroxitolueno butilado (BHT) a 0,1 mM e 50 µL de ácido fosfórico a 7 %. Depois, cada amostra foi incubada a 100 °C por 15 min. em banho-seco. As amostras e o branco foram levados então ao freezer por 10 min. e acrescentado 375 µL de butanol em todos os tubos, em seguida eles foram agitados vigorosamente em vórtex por 10s e centrifugados (2000 g, 5 min.). Alíquotas do sobrenadante foram lidas no leitor de ELISA e a 532 e a 600 nm.

3.14. GSH para avaliação das defesas antioxidantes

A glutathiona reduzida (GSH) foi quantificada conforme método descrito por SEDLAK. Resumidamente os tecidos foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) 12 % e homogeneizados, Posteriormente, as amostras foram centrifugadas

(5000 g, 5 min.). A GSH foi determinada nos sobrenadantes obtidos através da adição de 0,2 mL de 5,5-ditiobis-2-2 ácido nitrobenzóico (DTNB) (2,5 mM) em cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio PH 8,0 e 0,1 mL do

3.15. Determinação da Catalase (CAT)

extrato e após a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm em duplicata, foram lidas no leitor de ELISA os valores expressos em GSH $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de tecido (BEUTLER et al ,1963).

A atividade da CAT foi medida utilizando amostras do intestino homogeneizadas em solução tampão fosfato (0,1 M e 0,1 M K_2HPO_4 KH_2PO_4) PH 6,5 na proporção de 1:10 (100 miligramas de intestino para 0,9 mL de tampão fosfato) e centrifugados a 9700g por 20 min a 4 ° C. A atividade da CAT foi medida de acordo com método previamente descrito por AEBI. Resumidamente a reação foi monitorada por 60 segundos a 240 nm em um espectrofotômetro modelo Ultrospec 4300 pro (Amersham Biosciences).

3.16. ELISA para mediadores inflamatórios

A quantificação da concentração de IL-1 β , IL-6, IL-10 TNF- α e KC foram realizadas em sobrenadante de tecidos homogeneizados (intestino) e centrifugados utilizando anticorpos comercialmente disponíveis. Os mediadores foram avaliados de acordo com as instruções dos Kits utilizados (R&D Systems).

3.17. Azul de Evans para avaliação da permeabilidade vascular

O extravasamento de Azul de Evans para o tecido foi usado como índice de aumento de permeabilidade vascular (De Matos et al., 1999). Azul de Evans (2%) foi administrado na veia caudal (1ml/kg) 30 min. antes da reperusão do leito isquêmico. Após o sacrifício, um fragmento do intestino foi cortado e colocado em.

placa de petri para secagem por 24 horas em estufa a 36^oC, sendo após este tempo incubado com 1mL de formamida por 24 horas para extração do corante. O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor de ELISA (comprimento de onda de 620nm) e a concentração determinada através de curva padrão de 0.375 a 10µg/mL de Azul de Evans. Os resultados foram expressos como quantidade de Azul de Evans por 100mg de tecido.

3.18. Análise Estatística:

Todos os valores foram expressos como médias ± SEM. Os dados foram comparados por ANOVA usando teste paramétrico com Student-Newman-Keuls teste T. $P \leq 0.05$ foi considerado significativo.

Referência Bibliográfica

- Abraham, C. and Medzhitov, R. (2011). "Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* 140(6): 1729-1737.
- Acosta, S., Wadman, M., Syk, I., Elmstahl, S. and Ekberg, O. (2010). "Epidemiology and prognostic factors in acute superior mesenteric artery occlusion." *J Gastrointest Surg* 14(4): 628-635.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D. and Ronai, Z. (1999). "Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling." *Oncogene* 18(45): 6104-6111.
- Akgur, F. M., Brown, M. F., Zibari, G. B., McDonald, J. C., Epstein, C. J., Ross, C. R. and Granger, D. N. (2000). "Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(2): H791-797.
- Al-Dasooqi, N., Gibson, R. J., Bowen, J. M. and Keefe, D. M. (2009). "Matrix metalloproteinases: key regulators in the pathogenesis of chemotherapy-induced mucositis?" *Cancer Chemother Pharmacol* 64(1): 1-9.

- Amaral, F. A., Fagundes, C. T., Guabiraba, R., Vieira, A. T., Souza, A. L., Russo, R. C., Soares, M. P., Teixeira, M. M. and Souza, D. G. (2007). "The role of macrophage migration inhibitory factor in the cascade of events leading to reperfusion-induced inflammatory injury and lethality." *Am J Pathol* 171(6): 1887-1893.
- Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." *Nat Rev Immunol* 8(6): 411-420.
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K. and Takeda, K. (2008). "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation." *Nature* 455(7214): 808-812.
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. and Gordon, J. I. (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science* 307(5717): 1915-1920.
- Bakry, R., Vallant, R. M., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Szabo, Z., Huck, C. W. and Bonn, G. K. (2007). "Medicinal applications of fullerenes." *Int J Nanomedicine* 2(4): 639-649.
- Bora, K. S. and Sharma, A. (2011). "Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult." *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 792167.

- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G. and Prato, M. (2003). "Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications." *Eur J Med Chem* 38(11-12): 913-923.
- Botta, D., Franklin, C. C., White, C. C., Krejsa, C. M., Dabrowski, M. J., Pierce, R. H., Fausto, N. and Kavanagh, T. J. (2004). "Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis." *Free Radic Biol Med* 37(5): 632-642.
- Boys, J. A., Toledo, A. H., Anaya-Prado, R., Lopez-Neblina, F. and Toledo-Pereyra, L. H. (2010). "Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney." *J Investig Med* 58(7): 875-882.
- Chang, W. J., Chehab, M., Kink, S. and Toledo-Pereyra, L. H. (2010). "Intracellular calcium signaling pathways during liver ischemia and reperfusion." *J Invest Surg* 23(4): 228-238.
- Cool, J. C., Dyer, J. L., Xian, C. J., Butler, R. N., Geier, M. S. and Howarth, G. S. (2005). "Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats." *Growth Horm IGF Res* 15(1): 72-82.
- Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." *Chest* 118(2): 503-508.
- Dong, M. H. and Kaunitz, J. D. (2006). "Gastroduodenal mucosal defense." *Curr Opin Gastroenterol* 22(6): 599-606.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Duncan, M. and Grant, G. (2003). "Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments." *Aliment Pharmacol Ther* 18(9): 853-874.
- Eberl, G. (2010). "A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism." *Mucosal Immunol* 3(5): 450-460.
- Engelhorn, T., Schwarz, M. A., Heusch, G., Doerfler, A. and Schulz, R. (2011). "Reduction of Cerebral Infarct Size by Dronedarone." *Cardiovasc Drugs Ther.*
- Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Souza, A. L., Vieira, A. T., Xu, D., Liew, F. Y., Souza, D. G. and Teixeira, M. M. (2007). "ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion." *J Leukoc Biol* 81(2): 492-499.
- Fantini, M. C., Monteleone, G. and Macdonald, T. T. (2007). "New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis*

13(11): 1419-1423.

- Franco, R. and Cidlowski, J. A. (2009). "Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant." *Cell Death Differ* 16(10): 1303-1314.
- Franco, R., DeHaven, W. I., Sifre, M. I., Bortner, C. D. and Cidlowski, J. A. (2008). "Glutathione depletion and disruption of intracellular ionic homeostasis regulate lymphoid cell apoptosis." *J Biol Chem* 283(52): 36071-36087.
- Franco, R., Panayiotidis, M. I. and Cidlowski, J. A. (2007). "Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation." *J Biol Chem* 282(42): 30452-30465.
- Ganz, T. (2003). "Microbiology: Gut defence." *Nature* 422(6931): 478-479.
- Garipardic, M., Bakan, V., Davutoglu, M., Sayar, H. and Kurutas, E. B. (2010). "Oxidative stress and protective effect of erythropoietin on methotrexate-induced esophageal damage." *J Pediatr Hematol Oncol* 32(2): 108-112.
- Gibson, R. J., Bowen, J. M., Inglis, M. R., Cummins, A. G. and Keefe, D. M. (2003). "Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer." *J Gastroenterol Hepatol* 18(9): 1095-1100.
- Gill, R., Tsung, A. and Billiar, T. (2010). "Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors." *Free Radic Biol Med* 48(9): 1121-1132.
- Green, P. H. and Jabri, B. (2006). "Celiac disease." *Annu Rev Med* 57: 207-221.
- Grootjans, J., Hodin, C. M., de Haan, J. J., Derikx, J. P., Rouschop, K. M., Verheijen, F. K., van Dam, R. M., Dejong, C. H., Buurman, W. A. and Lenaerts, K. (2011). "Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion." *Gastroenterology* 140(2): 529-539 e523.
- Hancock, J. T., Desikan, R. and Neill, S. J. (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 345-350.
- Hooper, L. V. and Macpherson, A. J. (2010). "Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota." *Nat Rev Immunol* 10(3): 159-169.
- Ikuno, N., Soda, H., Watanabe, M. and Oka, M. (1995). "Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum." *J Natl Cancer Inst* 87(24): 1876-1883.
- Ismail, A. S., Severson, K. M., Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Yu, X., Benjamin, J. L., Ruhn, K. A., Hou, B., DeFranco, A. L., Yarovinsky, F. and Hooper, L. V. (2011). "Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(21): 8743-8748.

- Jomova, K. and Valko, M. (2011). "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease." *Toxicology* 283(2-3): 65-87.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M. T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K. S. and Hibi, T. (2008). "Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis." *J Clin Invest* 118(6): 2269-2280.
- Kaneda, K., Saitoh, F., Shibusawa, H., Maegawa, H., Saniabadi, A. R., Kashiwagi, N. and Matsukawa, A. (2011). "Correlation of neutrophil and monocyte derived interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 with colitis severity in the rabbit." *Cytokine*.
- Katsube, T., Ogawa, K., Ichikawa, W., Fujii, M., Tokunaga, A., Takagi, Y., Kochi, M., Hayashi, K., Kubota, T., Aiba, K., Arai, K., Terashima, M. and Kitajima, M. (2007b). "Phase I/II study of irinotecan (CPT-11) and S-1 in the treatment of advanced gastric cancer." *Anticancer Drugs* 18(5): 605-610.
- Katsube, T., Tsuji, H. and Onoda, M. (2007a). "Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell." *Biochim Biophys Acta* 1773(6): 794-803.
- Khamri, W., Walker, M. M., Clark, P., Atherton, J. C., Thursz, M. R., Bamford, K. B., Lechler, R. I. and Lombardi, G. (2010). "Helicobacter pylori stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes." *Infect Immun* 78(2): 845-853.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell, R. A. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." *Science* 307(5710): 731-734.
- Lake, R. A. and Robinson, B. W. (2005). "Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership." *Nat Rev Cancer* 5(5): 397-405.
- Lao, F., Li, W., Han, D., Qu, Y., Liu, Y., Zhao, Y. and Chen, C. (2009). "Fullerene derivatives protect endothelial cells against NO-induced damage." *Nanotechnology* 20(22): 225103.
- Lheureux, S., Clarisse, B., Launay-Vacher, V., Gunzer, K., Delcambre-Lair, C., Bouhier-Leporrier, K., Kaluzinski, L., Maron, D., Ngo, M. D., Grossi, S., Dubois, B., Zalcman, G. and Joly, F. (2011). "Evaluation of current practice: management of chemotherapy-related toxicities." *Anticancer Drugs* 22(9): 919-925.
- Logan, R. M., Gibson, R. J., Bowen, J. M., Stringer, A. M., Sonis, S. T. and Keefe, D. M. (2008). "Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis." *Cancer Chemother Pharmacol* 62(1): 33-41.

- Macdonald, T. T. and Monteleone, G. (2005). "Immunity, inflammation, and allergy in the gut." *Science* 307(5717): 1920-1925.
- MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C. and Monteleone, G. (2011). "Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine." *Gastroenterology* 140(6): 1768-1775.
- Melo, M. L., Brito, G. A., Soares, R. C., Carvalho, S. B., Silva, J. V., Soares, P. M., Vale, M. L., Souza, M. H., Cunha, F. Q. and Ribeiro, R. A. (2008). "Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide." *Cancer Chemother Pharmacol* 61(5): 775-784.
- Mizoguchi, A. and Mizoguchi, E. (2008). "Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models." *J Gastroenterol* 43(1): 1-17.
- Mossman, B. T. (1994). "Carcinogenesis and related cell and tissue responses to asbestos: a review." *Ann Occup Hyg* 38(4): 617-624, 423.
- Mumy, K. L. and McCormick, B. A. (2009). "The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation." *Curr Opin Pharmacol* 9(6): 697-701.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J. and Kraehenbuhl, J. P. (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." *Nat Immunol* 2(11): 1004-1009.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R. and Reinecker, H. C. (2005). "CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance." *Science* 307(5707): 254-258.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K. and van Leeuwen, P. A. (2001). "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications." *Am J Clin Nutr* 74(4): 418-425.
- Parulekar, W., Mackenzie, R., Bjarnason, G. and Jordan, R. C. (1998). "Scoring oral mucositis." *Oral Oncol* 34(1): 63-71.
- Platt, A. M. and Mowat, A. M. (2008). "Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine." *Immunol Lett* 119(1-2): 22-31.
- Reardon, D. A., Desjardins, A., Peters, K. B., Vredenburgh, J. J., Gururangan, S., Sampson, J. H., McLendon, R. E., Herndon, J. E., 2nd, Coan, A., Threatt, S., Friedman, A. H. and Friedman, H. S. (2011a). "Phase 2 study of carboplatin, irinotecan, and bevacizumab for recurrent glioblastoma after progression on bevacizumab therapy." *Cancer*.
- Reardon, D. A., Vredenburgh, J. J., Coan, A., Desjardins, A., Peters, K. B., Gururangan, S., Sathornsumetee, S., Rich, J. N., Herndon, J. E. and Friedman, H. S. (2011b). "Phase I study of sunitinib and irinotecan for

patients with recurrent malignant glioma." J Neurooncol.

Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X. and Choi, A. M. (2007). "Mechanisms of cell death in oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 9(1): 49-89.

Sands, B. E. (2007). "Inflammatory bowel disease: past, present, and future." *J Gastroenterol* 42(1): 16-25.

