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

ORLEÂNCIO GOMES RIPARDO DE AZEVEDO

MECANISMO ANTIINFLAMATÓRIO DO PEPTÍDEO MIMÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA E (COG 133) NA RECUPERAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUORURACIL EM CAMUNDONGOS SWISS.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Orientando: Orleâncio Gomes Ripardo de Azevedo

Fortaleza, 2010

ORLEÂNCIO GOMES RIPARDO DE AZEVEDO

MECANISMO ANTIINFLAMATÓRIO DO PEPTÍDEO MIMÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA E (COG 133) NA RECUPERAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUORURACIL EM CAMUNDONGOS SWISS

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

FORTALEZA, 2010

A989m Azevedo, Orleâncio Gomes Ripardo de

Mecanismo antiinflamatório do peptídeo mimético da apolipoproteína E (COG 133) na recuperação da mucosite intestinal induzida por 5-fluoruracil em camundungos Swiss / Orleâncio Gomes Ripardo de Azevedo. – Fortaleza-Ce, 2010.
106f.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

1. Mucosite 2. Citocinas 3. Antiinflamatório I. Oriá, Reinaldo Barreto (Orient.) II. Título.

CDD: 616.33

ORLEÂNCIO GOMES RIPARDO DE AZEVEDO

MECANISMO ANTIINFLAMATÓRIO DO PEPTÍDEO MIMÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA E (COG 133) NA RECUPERAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUORURACIL EM CAMUNDONGOS SWISS.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

_____
Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

_____
Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

À minha Mãe,

Maria do Socorro Gomes Ripardo, por ser essa mulher de caráter autêntico que sempre lutou com bravura e foi fundamental na minha formação como ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado o dom da vida.

A minha mãe, por ter sido sempre um exemplo de dedicação, força e entusiasmo e por sempre ter ensinado os caminhos mais frutíferos, bem como por ter sido exemplo de retidão de caráter.

Ao meu mestre e amigo Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pelos seus valiosos ensinamentos e suas palavras norteadoras no desenvolver desse trabalho e também pode ter mostrado a importância da pesquisa científica.

Ao meu mestre e amigo Prof. Dr. Paulo Roberto de Lavor Porto, pelas nossas conversas que sempre trouxeram valorosos ensinamentos, me possibilitando seguir esse caminho tão recompensador.

Ao Prof. Dr. Roberto César, pela sua ajuda nos inúmeros ensaios realizados no LAFICA.

À minha amiga Eunice Bobô de Carvalho, por suas palavras incentivadoras no meu início dessa empreitada.

À minha namorada Kiarelle Lourenço Penaforte, pela suas palavras de conforto, apoio irrefutável e por sempre me ajudar a me tornar um ser humano melhor.

Aos meus inseparáveis amigos Allan Rodrigo Soares Maia, Pedro Almeida Pereira, Magda Marinho Braga, Mônica Aline Parente, por partilhar momentos que ficarão gravados na minha história.

Aos meus amigos de laboratório Celina Araújo, Emmanuel Andrade, Davi Gonçalves, Fabrícia Campêlo, Rafael Reis, Rakel Castro e Camila Albuquerque, pela sua valiosa amizade e companheirismo.

À Prof.ª Dra. Renata Leitão, pela ajuda no preparo da imunohistoquímica.

Ao Prof.º Dr. Pedro Gomes Soares, pela sua ajuda nos ensaios de ELISA.

Ao Prof.ª Dr Aldo Ângelo Moreira Lima, pela sua estimada presença na banca avaliadora.

Ao Dr. Richard L. Guerrant, pela sua valorosa contribuição científica.

À Duke University, na pessoa do Dr. Michel Vitek, por ter cedido gentilmente o peptídeo COG 133 da ApoE para esses experimentos.

Aos técnicos que se empenharam auxiliando a realização deste trabalho, Antonio Ricardo Barreto e José Ivan Rodrigues.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia bem como aos do Instituto de Biomedicina.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo suporte financeiro desse projeto.

“Eu sou feito do mesmo material que são feitos os sonhos.”

(William Shakespeare)

RESUMO

Mecanismo antiinflamatório do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) na recuperação da mucosite intestinal induzida por 5-Fluoruracil em camundongos Swiss. Autor: Orleâncio Gomes Ripardo de Azevedo. Mestrado em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 22 de Setembro de 2010. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

O câncer é uma doença grave que atinge milhares de pessoas no mundo, possuindo altos índices de morbidade e mortalidade. Atualmente existem diversos alvos terapêuticos no tratamento do câncer, um deles reside no fato de inibir a replicação do DNA impossibilitando a célula tumoral de se duplicar como é o caso do 5-fluoruracil (5-FU). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito antiinflamatório do peptídeo mimético da ApoE (COG 133) em camundongos Swiss desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU. Utilizamos camundongos Swiss machos com peso de 25-30g, sendo desafiados com injeção (dose única) intraperitoneal de 5-FU (450 mg/kg). Alguns animais foram tratados com diferentes doses (0,3, 1,0 e 3,0 µM) do peptídeo mimético da apolipoproteína E (ApoE) COG133 por via intra-peritoneal, após o desafio com 5-FU. Animais tratados com PBS foram usados como controles. Os camundongos foram sacrificados com solução de eutanásia 4 dias após o desafio com 5-FU. Algumas amostras de duodeno foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e em seguida armazenadas em freezer a -80ºC para biologia molecular. Outras amostras foram fixadas em formaldeído para processamento histológico. Monitoramos o peso corporal dos animais e fizemos leucometria a partir de coleta de sangue do plexo retro-orbital para avaliação do efeito citotóxico mielosupressor do 5-FU nos grupos experimentais. Avaliamos os parâmetros morfométricos de altura de vilo e profundidade de cripta em segmentos do duodeno. Para a detecção de proteínas de interesse, utilizamos o Western blot com a utilização dos seguintes anticorpos IL-1β, TNF-α e iNOS. Para o RT-PCR, avaliamos os seguintes primers IL-1β, TNF-α e iNOS. No ensaio de citocinas por ELISA, utilizamos os seguintes anticorpos: IL-1β, IL-10, TNF-α. Nas análises morfométricas de duodeno, encontramos uma grande redução na altura de vilos e profundidade de criptas nos animais tratados com 5-FU, que foi melhorada com a utilização do peptídeo COG133 na dose 3,0 µM ($p<0,001$). Nas análises histopatológicas, observamos um intenso infiltrado inflamatório nos animais do grupo que foi injetado como 5-FU, que foi parcialmente revertido pela administração do peptídeo COG133. Os dados de ELISA evidenciaram um aumento da quantidade de citocinas pró-inflamatórias IL-1β ($p<0,05$), TNF-α ($p<0,05$) e uma redução da citocina antiinflamatória IL-10 ($p<0,05$), quando comparados ao controle salina, em duodenos de animais que foram injetados com 5-FU. A administração do peptídeo COG 133 reduziu os níveis de IL-1β de maneira estatisticamente significante ($p<0,05$ 1µM; $p<0,001$ 3µM), TNF-α ($p<0,001$ na dose de 1,0 µM); $p<0,001$ na dose de 3µM) e para IL-10 ($p<0,001$ na dose de 3µM). Dados de Western blot evidenciam que o peptídeo na dose de 3µM reduziu de maneira estatisticamente significante a expressão de citocinas como IL-1β ($p<0,001$), TNF-α ($p<0,05$) e do mediador inflamatório iNOS ($p<0,05$) no duodeno. Pelo protocolo de RT-PCR, encontramos um aumento na expressão do transcrito para TNF-α e iNOS nos animais injetados com 5-FU, o que foi parcialmente diminuído pela administração do peptídeo na dose de 3µM para TNF-α ($p<0,05$) e iNOS ($p<0,05$) pelo ANOVA. A partir dos nossos achados, podemos concluir que o peptídeo mimético da ApoE (COG 133) possui uma ação antiinflamatória, especialmente no segmento duodeno, visto que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias de animais desafiados, dessa forma sugerindo sua utilização em humanos com mucosite intestinal sob quimio/radioterapia.

Palavras-chaves: mucosite, apolipoproteína E, citocinas.

ABSTRACT

Anti-inflammatory mechanism of the Apolipoprotein E (COG 133) mimetic peptide on the recovery of intestinal mucositis induced by 5-fluoruracil in Swiss mice. Author: Orleancio Gomes Ripardo of Azevedo. Master in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara. Defense: September, 22th, 2010. Mentor: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oria.

Cancer is a serious disease that affects thousands of people in the worldwide with high rates of morbidity and mortality. Currently there are several therapeutic targets in cancer treatment, one of them is inhibiting the DNA replication thus preventing the tumor cell to replicate as in the case of 5-Fluoruracil (5-FU). We used male Swiss mice weighing between 25 and 30g, being challenged with injection (single dose) intra-peritoneal 5-FU (450 mg/kg). Some animals were treated with different doses (0.3, 1.0 and 3.0 μM) mimetic peptide of apolipoprotein E (ApoE) COG133 via intra-peritoneal, after challenge with 5-FU. Animals treated with PBS were used as controls. The mice were killed with euthanasia solution 3 days after challenge with 5-FU. Some samples of duodenum were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 C for molecular biology. Other samples were fixed in formaldehyde for histological processing. Monitor the animals' body weight and leukocyte counts form retro-orbital plexus blood draw in the experimental groups. We also evaluated morphometric parameters of the villus height and crypt depth in duodenum and ileum segments. For detection of proteins of interest, we used the Western blot using the following antibodies IL-1β, TNF-α and iNOS. For RT-PCR, we evaluated the following primers IL-1β, TNF-α and iNOS. In the assay of cytokines by ELISA, we used the following antibodies IL-1β, IL-10, TNF-α. In morphometric analysis of the duodenum, we found a large reduction in villus height and crypt depth in the animals treated with 5-FU, which was reversed with the use of peptide COG133 at 3.0 μM dose ($p < 0.001$). In the histopathological analysis, we observed an intense inflammatory infiltrate in group which was injected as 5-FU, which was partially reversed by the administration of the peptide COG133. The ELISA data revealed an increased amount of pro-inflammatory cytokines IL-1β ($p < 0.05$), TNF-α ($p < 0.05$) and a reduction of inflammatory cytokine IL-10 ($p < 0.05$) compared to saline control in the duodenum of animals that were injected with 5-FU. Administration of COG 133 peptide reduced the levels of IL-1β present a statistically significant ($p < 0.05$ 1μM, $p < 0.001$ 3μM), TNF-α ($p < 0.001$ at a dose of 1.0 mM), $p < 0.001$ at a dose of 3μM) and IL-10 ($p < 0.001$ at a dose of 3μM). Western blot data show that the peptide at a dose of 3μM reduced to a statistically significant expression of cytokines such as IL-1β ($p < 0.001$), TNF-α ($p < 0.05$) and iNOS ($p < 0, 05$) in the duodenum. By RT-PCR protocol, we found an increase in the expression of transcript for TNF-α and iNOS in animals injected with 5-FU, which was partially reduced by the administration of the peptide at a dose of 3μM TNF-α ($p < 0.05$) and iNOS ($p < 0.05$) by ANOVA. From our findings, we suggest that the ApoE mimetic peptide (COG 133) has an anti-inflammatory action, especially in the proximal segment of small intestine, since it reduces the expression of proinflammatory cytokines in challenged animals, thus suggesting their use in humans with intestinal mucositis under chemo / radiotherapy

Key Words: mucositis, apolipoprotein E, cytokine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 Modelo esquemático da molécula de 5-FU..... 21

FIGURA 02 Mecanismo de ação do 5-Fluoruracil 22

FIGURA 03 Estrutura molecular da Apolipoproteína E 27

FIGURA 04 Posição dos segmentos retirados para com as devidas posições para os protocolos experimentais 40

FIGURA 05 Método esquemático morfométrico usado na análise da altura de vilos e profundidade de cripta utilizando o programa Image J versão 1.44 42

FIGURA 06 Esquema de contagem de leucócitos 43

FIGURA 07 Esquema de metodologia do ensaio de mieloperoxidase 44

FIGURA 08 Esquema de metodologia do ensaio de ELISA 45

FIGURA 09 Aparato utilizado no Western blot 49

FIGURA 10 Aparato utilizado no RT-PCR 51

FIGURA 11 Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E em camundongos desafiados a mucosite intestinal induzida por 5-FU, no parâmetro peso 56

FIGURA 12 Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU, no parâmetro altura de vilos 58

FIGURA 13 Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU, no parâmetro profundidade de cripta 59

FIGURA 14 Fotomicrografias da avaliação histopatológica de duodeno de camundongos Swiss injetados com Salina 0,9% , 5-FU, COG133 (0,3µM), COG133 (1µM), COG133 (3µM) 60

FIGURA 15 Figura 15: Efeito da administração do peptideo mimético da Apolipoproteina E (COG 133) sobre a leucometria dos camundongos Swiss desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU 61

FIGURA 16 Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de MPO em amostras de duodeno de camundongos Swiss desafiados com 5-FU 62

FIGURA 17 Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina IL-1β em amostras de duodeno de camundongos Swiss desafiados com 5-FU 63

FIGURA 18 Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina TNF-α em amostras de duodeno de camundongos Swiss desafiados com 5-FU 64

FIGURA 19 Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina IL-10 em amostras de duodeno de camundongos Swiss desafiados com 5-FU 65

FIGURA 20 Efeito da administração do peptídeo COG 133 na dose de 3μM do peptídeo mimético da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU no Western blot para IL-1β em duodeno de camundongos Swiss 66

FIGURA 21 Efeito da administração do peptídeo COG 133 na dose de 3μM do peptídeo mimético da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU no Western blot para iNOS em duodeno de camundongos Swiss 67

FIGURA 22 Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E na dose de 3μM, em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU no RT-PCR para TNF-α em duodeno de camundongos Swiss 68

FIGURA 23 Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E na dose de 3μM, em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU no RT-PCR para iNOS em duodeno de camundongos Swiss 69

LISTA DE ABREVIATURAS

APOE- Gene da apolipoproteína E

ApoE – Proteína da apolipoproteína E

ATP – Adenosina trifosfato

ANOVA – Análise de Variância

BSA- Albumina sérica bovina

BCA- Ácido bicinconínico

COG - Cognosci

DAB – 3’3 peróxido de diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPD – Diidropiridina desidrogenase

dUTP – Deoxiuridina trifosfato

EAE- Encefalite autoimune experimental

ECL – Ensaio de Quimiluminescência melhorada

EGF – Fator de crescimento do endotélio

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EPM – Erro padrão da média

FdUTP – Flourdeoxiuridina difosfato

FUTP – Floururidina trifosfato

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

H&E – Hematoxilina e Eosina

HRP – Horseradish Peroxidase

IL- Interleucina

i.p – Intraperioteneal

Kg – Quilograma

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

M - Molar

MTP – Proteína Microssomal Transferidora

mg – Miligrama

MPO – Mieloperoxidase

NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear kappa B

NK – Natural Killer

NO – Óxido nítrico

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva

OMS – Organização mundial da saúde

PBS – Solução tamponada de fosfato

PVDF - Fluoreto de polivinilideno.

PVC – Polivinilcloreto

PBS – Tampão Fostato

pg – Picograma

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RNAi – RNA de interferência

RNAt – RNA transportador

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa

SNP – Polimorfismos de base única

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TS – Timidilato Sintase

UFT – Uracil + Ftorafur

VLDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

W. blot – Western blot

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
1.1 Câncer, Terapia Antineoplásica e 5-Fluoruracil..... 18
1.2 Farmacodinâmica do 5-Fluoruracil..... 20
1.2.1 Mecanismo de ação do 5-FU..... 21
1.2.2 Fisiopatologia da Mucosite induzida pelo 5-FU..... 23
1.2.3 Estratégias de manejo da mucosite..... 23
1.3 Apoliproteína E, aspectos Genéticos, Bioquímicos e Farmacológicos..... 24
1.3.1 Metabolismo do Colesterol..... 27
1.3.2 Peptídeo Mimético da ApoE (COG133) 28
1.3.2.1 Aspectos Químico-moleculares..... 28
1.3.2.2 Estudos em trauma e isquemia cerebral..... 28
1.3.2.3 Estudos em modelos de colite..... 29
1.3.2.4 Estudos na barreira intestinal..... 30
1.3.2.5 Apoliproteina E e distúrbios neurológicos..... 33
2 JUSTIFICATIVA..... 36
3 OBJETIVOS..... 38
3.1 OBJETIVOS GERAIS..... 38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 38
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 40
4.1 Ética e animais experimentais..... 40
4.2 Indução, Mucosite e obtenção de tecidos..... 40
4.3 Drogas, reagentes, primers e anticorpos..... 41
4.4 Tratamento..... 41
4.5 Morfometria..... 42
4.6 Contagem de Leucócitos..... 42
4.7 Ensaio de Mieloperoxidase..... 43
4.8 Ensaiode Citocinas..... 44
4.8.1 Procedimentos de ensaio..... 44
4.9 Western Blot..... 45
4.9.1 Procedimento experimental..... 45
4.9.2 Ensaio BCA..... 46
4.9.3 Preparo do gel e corrida das amostras..... 47

4.9.4 Transferência para Membrana..... 47
4.9.5 Bloqueio com leite em pó..... 47
4.9.6 Anticorpo Primário..... 47
4.9.7 Anticorpo Secundário..... 48
4.9.8 Revelação da Membrana..... 48
4.9.9 “Stripping” da Membrana..... 48
4.10 RT – PCR..... 49
4.10.1 Extração do RNA..... 49
4.10.2 Análise de Espectrografia..... 50
4.10.3 Transcrição Reversa..... 50
4.10.4 Primers utilizados..... 50
4.10.5 Amplificação..... 51
4.10.6 Eletroforese em Gel agarose..... 51
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 52
6 RESULTADOS..... 54
6.1 Avaliação do parâmetro peso dos animais desafiados pela mucosite intestinal 54
6.2 Avaliação dos achados morfométricos dos animais experimentais tratados com salina, 5-Fluoruracile COG 133..... 54
6.3 Avaliação do parâmetro contagem de leucócitos nos camundongos desafiados pela mucosite intestinal..... 55
6.4 Avaliação do parâmetro atividade de mieloperoxidase (MPO) em amostras de duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal..... 55
6.5 Avaliação da expressão de IL-1β, TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal..... 55
6.6 Avaliação da expressão de IL-1β, TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal através de Western blot..... 56
6.7 Avaliação da expressão de TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal através de RT-PCR..... 56
7 DISCUSSÃO..... 71
8 CONCLUSÃO..... 78
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 80
10 REFERÊNCIAS..... 82
11 ANEXOS..... 98

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer, Terapia Antineoplásica e 5-Fluoruracil.

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que afetam todos os órgãos do corpo, sendo causado por um mau funcionamento dos mecanismos bioquímicos de sinalização que dirigem o ciclo celular. Ao decorrer dos anos, as células vão acumulando mutações genéticas (não reparadas) que levam à transformação carcinogênica. (LEVITZKI, A , KLEIN,S., 2010). O estudo da genética do câncer propiciou grande avanço no diagnóstico e tratamento dos mais variados tipos de cânceres como a identificação de uma classe de genes que está ligada intimamente ao início dos processos neoplásicos, os oncogenes, termo esse que foi adotado após pesquisas na leucemia mielóide crônica (LMC) (WEINSTEIN, I. B, 2002).

Oncogenes são genes essenciais para o desenvolvimento do câncer e, normalmente, a alteração genética que transforma um proto-oncogene num oncogene leva à transcrição de genes-alvos envolvidos na patogênese do câncer e ativação de suas vias de sinalização. Células normais geralmente têm mecanismos para detectar essas alterações e ativar um ou mais processos endógenos antitumorais, como apoptose ou autofagia, para eliminar células com essas alterações. Quando ocorre uma interrupção dos processos antitumorais por uma mutação ou deleção de um gene supressor de tumor, as alterações produzidas pelo oncogenes se destacam (LENZ, G. 2010).

Um dos fenômenos indutores do surgimento de câncer é a instabilidade genômica o que pode ser resultado dos mais variados processos tais como: poliploidia, aneuploidia e outros rearranjos cromossômicos, como nas translocações e ainda outras mudanças, incluindo mutações nos proto-oncogenes e perda de função dos genes supressores (LEVITZKI, A , KLEIN,S., 2010).

Uma das grandes áreas de foco do tratamento do câncer é o alvo terapêutico a partir da pesquisa de sinais intracelulares gerados por hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, quimiocinas, citocinas e pequenas moléculas como o ATP. O

desenvolvimento mais revolucionário da biologia celular e molecular tem contribuído para a compreensão das vias moleculares nos processos oncogênicos. O câncer é um processo que se desenvolve com a participação de um evento principal, a perda da estabilidade genômica (WARDWELL, N R , MASSION,P.P., 2005). Durante a vida ocorre o acúmulo de eventos carcinogênicos que predispõem o surgimento de processos pré-malignos até o surgimento do processo maligno (KAMANGAR, F et al, 2006). A Tabela 01 esquematiza as principais classes de antineoplásicos e seus mecanismos de ação.

Tabela 01: Classes de antimetabólicos utilizados na terapia do câncer com respectivos mecanismos de ação e exemplares típicos.

CLASSE	NOME	AÇÃO
Alquilantes	Ciclofosfamida e bussulfam	Ligam-se ao DNA impedindo a separação dos dois filamentos na dupla hélice espiralar.
Atimetabólicos	5-Fluoruracil e metotrexato	Inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA
Antibióticos	Bleomicina e adriamicina	Interagem com o DNA , inibindo a síntese deste ácido ou de proteínas
Inibidores Mitóticos	Vincristina e vimblastina	Sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos
Outros Agentes	Procarbazina e L-asparaginase	Não determinada ou não esclarecida

Fonte: Instituto nacional do Câncer, 2010

A terapia antineoplásica atua reduzindo e controlando as populações de células tumorais, reduzindo sua capacidade de metástase e invasão tecidual. Contudo os regimes terapêuticos ainda causam importantes efeitos colaterais, algumas vezes requerendo descontinuidade do tratamento e reformulação do esquema posológico.

Diversas drogas têm sido testadas em ensaios clínicos reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais, incluindo drogas que atuam mais especificamente em células neoplásicas tais como inibidores de proteína quinase (Gleevec; Gefitinib), inibidores do receptor de EGF (Erlotinib), e ainda terapias mais modernas que utilizam iRNA (RNA de interferência), DNA antisenso e ainda técnicas com nanopartículas para inserir a droga na célula e com isso garantir uma melhor biodisponibilidade (LEVITZKI, A , KLEIN,S., 2010).

As drogas antimetabólicas atuam inibindo os processos biossintéticos ou se ligando ao DNA ou RNA, impedindo sua função normal (LONGLEY, D B et al, 2003). O 5-FU tem sido utilizado por muitos anos no tratamento do câncer colorretal, sendo administrado por via intravenosa em uma variedade de esquemas terapêuticos com o objetivo de determinar a dose ideal. A taxa de resposta global para o 5-FU como um agente único no câncer colorretal avançado é bastante limitada (cerca de 10-15%) (JOHNSTON, P G , KAYE,S., 2001), no entanto, nos últimos 20 anos, estratégias de modulação importantes têm sido desenvolvidas para aumentar a atividade anticâncer do 5 - FU e superar a resistência. Como resultado clínico, o 5-FU ficou sendo o principal agente para o tratamento de ambos os estágios do câncer avançado e em estágios iniciais.

1.2 Farmacodinâmica do 5-Fluoruracil

O 5-FU é análogo da uracila que possui um átomo de fluoreto na posição C-5 no lugar do hidrogênio (Figura 01), portanto sendo transportado através do transportador de uracila na célula. O 5-FU é convertido intracelularmente em alguns metabólitos incluindo o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP) (DIASIO, R. B., HARRIS, B. E., 1989). Mais de 80% do 5-FU é metabolizado primariamente no fígado no qual a diidropiridina desidrogenase (DPD) é abundantemente expressa (DIASIO, R B , HARRIS,B.E., 1989). Os metabólitos dUTP e FdUTP são incorporados ao DNA extensivamente, existindo uma relação entre a incorporação dos metabolitos tóxicos ao DNA e a perda da capacidade do potencial clonogênico nas linhagens celulares neoplásicas. A incorporação pode resultar em toxicidade ao RNA em diferentes níveis e não somente inibindo o processamento do pré-RNA a ser transformado em RNAm maduro, mas também modificações pós-transcricionais no RNAt (GHOSHAL, K , JACOB,S.T., 1994) bem como distorcendo as modificações pós-transcricionais, inibindo até mesmo o splicing do pré-RNAm. Outro evento que é

influenciado até mesmo por baixas concentrações de 5-FU é a poliadenilação do RNAm processamento importante na síntese do RNA. Estes estudos in vitro indicam que a incorporação do 5-FU tem potencialmente capacidade de distorcer o processamento do RNAm levando a profundos efeitos no metabolismo e viabilidade celular.

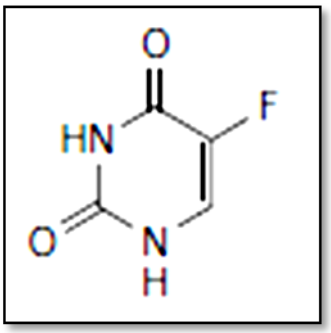


Figura 1: Modelo esquemático da molécula de 5-FU. Extraído de "5-fluoruracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Daniel B. Longley. 2003* (LONGLEY D. B. et al, 2003).

1.2.1 Mecanismo de ação do 5-FU

Diversas estratégias têm sido exploradas para modular a atividade anticâncer de 5-FU, que incluem diminuir a degradação de 5-FU, aumentando a ativação e aumentando a atividade da enzima timidilato sintase (TS). Estratégias utilizando a leucovorina, que promovem altos níveis intracelulares de folato reduzido, são necessárias para a ligação ideal de FdUMP a timidilato sintetase (TS). A leucovorina (LV, 5'-formiltetrahidrofolato) tem sido usada para aumentar a concentração intracelular de folato reduzido (CH_2THF), sendo demonstrado o aumento do folato *in vitro* com conseqüente diminuição da toxicidade do 5-FU em muitas linhagens de células.

A leucovorina entra na célula através do transportador de folato e é metabolizada para CH_2THF, e então incorpora uma série de radicais glutamatos pela ação da enzima folilpoliglutamato sintetase. A poliglutamação não só aumenta a retenção de complexos celulares de folatos reduzidos (CH_2THF), mas também melhora a estabilização de seu complexo ternário com TS e FdUMP. Em sistemas livres de células, a forma de pentaglutamato foi encontrada como sendo 40 vezes mais potente na promoção da formação do complexo ternário que o monoglutamato (RADPARVAR, S et al, 1989). Ainda existem os inibidores da diidropirimidina desidrogenase que funcionam diminuindo a degradação do 5-FU.

O 5-FU mostra uma baixa biodisponibilidade devido à sua rápida degradação de DHFU por DPD. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para inibir a degradação do DHFU. A formulação UFT (uracil + Ftorafur) utiliza uma combinação de uracil na proporção de 4:1 com uma pró-droga o Ftorafur®, o que melhora a biodisponibilidade do 5-FU, saturando a DPD com seu substrato. Douillard e colaboradores (DOUILLARD, J Y et al, 2002) relataram que a UFT/LV equivalente produziu melhores taxas de resposta para 5-FU/LV, tendo sido mais seguro, tornando o tratamento mais conveniente.

Além disso, os inibidores da DPD como eniluracil e 5-clorodihidropirimidina (CDHP) têm sido investigados. Um estudo interessante de Spector *et al*., constatou que a administração do eniluracil melhorou a taxa de resposta do tumor ao 5-FU de 13% para 94% em modelo animal em ratos (SPECTOR, T et al, 1995). Além disso, eles mostraram que a co-administração de DHFU com 5-FU e eniluracil reduziu a taxa de resposta em cerca de 38%. Estes resultados indicam que os metabólitos do 5-FU podem interferir com a eficácia antitumoral do 5-FU e fornecer uma base para a concepção de novas formulações que inibem DPD (**Figura 02**).

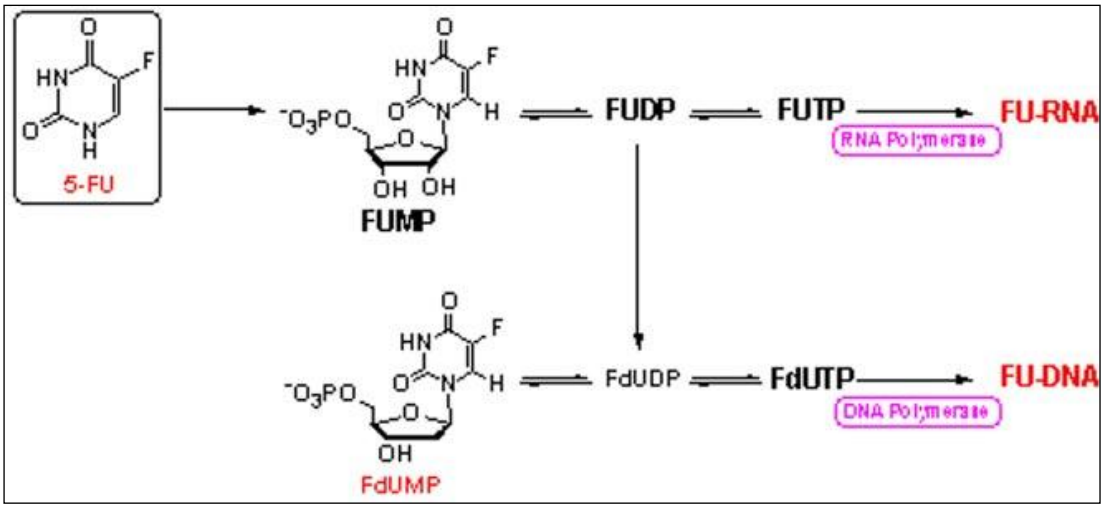


Figura 02: Mecanismo de ação do 5-Fluoruracil. Fonte: Do herbs, vitamins, and antioxidants adversely affect cancer therapies. Subhuti Dharmananda, Ph.D. Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon. 2002

1.2.2 Fisiopatologia da mucosite induzida pelo 5-FU

O intestino é um local muito susceptível às lesões ocasionadas por drogas anticâncer por causa da rápida taxa de "*turnover"* do epitélio de cerca de 3-4 dias (BOWEN, J M et al, 2006). A mucosite é um efeito colateral da quimioterapia podendo causar uma queda dramática na qualidade de vida dos pacientes, sendo definida como um evento que resulta de efeitos tóxicos provenientes da radiação ou quimioterapia nas células da camada basal, ocasionando uma perda da capacidade de regeneração tecidual, resultando em morte celular, adelgaçamento mural e conseqüente ulceração (SONIS, S T et al, 2000). O 5-FU tem sido utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres incluindo o colorretal, podendo induzir a um processo inflamatório gastrointestinal, referido como mucosite intestinal (LONGLEY, D B et al, 2003). Duncan e Grant propuseram que a mucosite está ligada a disfunção epitelial sendo dividida em algumas fases tais como: a fase inflamatória, a degradação epitelial e a fase de ulceração (DUNCAN, M , GRANT,G., 2003).

O 5-FU em combinação com outros quimioterápicos como o Irinotecan® e Oxaliplatina® melhora a resposta ao câncer em cerca de 40% a 50% dos casos (DOUILLARD, J Y et al, 2000). O mecanismo pelo qual o 5-FU causa a morte das células tumorais é um passo essencial no entendimento do processo inflamatório. Evidências da microscopia eletrônica demonstram que o tecido epitelial e o tecido conectivo sofrem um dano que precede as mudanças estruturais em outras partes do trato intestinal devido a radiação, sugerindo que a injúria epitelial é um evento precoce no desenvolvimento da mucosite induzida por radiação (SONIS, S T et al, 2000). Outro mecanismo que pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da mucosite é a injúria vascular. O achado de que o aumento da agregação plaquetária está associado com a toxicidade da mucosa, também sugere um possível papel do endotélio vascular e plaquetas na patogênese da mucosite (WANG, J et al, 2002).

1.2.3 Estratégias de manejo da mucosite

A mucosite é um importante problema clínico que surge durante o tratamento de processos neoplásicos, decorrentes da quimioterapia/radioterapia. É definida como sendo a

ocorrência de lesões inflamatórias e/ou ulcerativas no trato oral/gastrointestinal, usualmente causada pela utilização de terapias do câncer (PETERSON, D E et al, 2010).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da mucosite levam em conta a modalidade, intensidade e via de administração das drogas utilizadas na terapia de câncer. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 85% dos pacientes tratados com altas doses de radioterapia desenvolvem mucosite oral de graus 3 e 4, sendo a mucosite um dos fatores limitantes no avanço do tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço. O desenvolvimento de uma avaliação multidisciplinar do cuidado inclui o uso freqüente de enxaguatórios bucais não medicamentosos no caso da mucosite oral. O uso de protocolos de higiene oral também é recomendado, por exemplo, o uso de escovas dentais macias, controle da analgesia e crioterapia (PETERSON, D E et al, 2010).

Dentre os principais cuidados a serem tomados durante a mucosite intestinal incluem principalmente a manutenção de hidratação adequada. Dentre as principais ações terapêuticas destacam-se a sulfasalazina via oral por reduzir a incidência da enteropatia de pacientes que receberam radioterapia. A amifostina é indicada na prevenção da proctotite (inflamação do reto) por radioterapia de câncer colorretal. O sucralfato não é indicado, visto que, em estudos recentes não diminuiu de maneira significativa os eventos de diarréia em indivíduos que fizeram radioterapia em comparação ao placebo. Drogas como a ranitidina ou omeprazol são recomendadas na redução da dor epigástrica causada pelo tratamento com ciclofosfamida, metotrexato e 5-FU, tendo ainda outras drogas como a octreotida indicada para prevenção da diarréia induzida por altas doses de quimioterapia (PETERSON, D E et al, 2010).

1.3 Apoliproteína E, aspectos genéticos, bioquímicos e farmacológicos

O gene da Apolipoproteína E (ApoE = proteína; APOE = gene) possui 299-aminoácidos, codificados por um gene polimórfico em um único locus do cromossomo 19. A ApoE é responsável pelo transporte de colesterol das células para o fígado para ser metabolizado, portanto, desempenhando um papel crítico no metabolismo de lipídeos (MAHLEY, R W et al, 2006; MAHLEY, R W , JI,Z.S., 1999). O peptídeo da ApoE é produzido principalmente no fígado, no entanto, é também produzido em outros tecidos como o cérebro, de modo que cerca de 20-40% do total produzido é provindo de outras fontes extra-hepáticas (JOFRE-MONSENY, L et al, 2008). O locus estrutural da APOE tem três alelos (ALMEIDA, O P , SHIMOKOMAKI,C.M., 1997), em um único locus genético, a saber: os

alelos ε2, ε3 e ε4, ao longo do cromossomo 19, codificando três isoformas da proteína (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) (ALMEIDA, O P , SHIMOKOMAKI,C.M., 1997; STEWART, R et al, 2001). A ApoE 3 contém um resíduo cisteína na posição 112 e arginina na posição 158. ApoE 2 contém cisteína em ambas as posições e a ApoE 4 contém arginina em ambas as posições (WEISGRABER, K H et al, 1981), de maneira que os polimorfismo tem impacto nas características da proteínas. A expressão de ApoE no cérebro é um processo altamente regulado. Por exemplo, após uma injúria no tecido nervoso, a síntese de ApoE aumenta de sobremaneira nos astrócitos cerca de 150 vezes (IGNATIUS, M J et al, 1986; MAHLEY, R W, 1988). Em culturas de neurônios, a expressão dos níveis de RNAm aumentou cerca de 3 a 4 vezes e a de proteínas cerca de 4 a 10 vezes, a partir de uma linhagem de astrócitos isolados de camundongos *ApoE -/-*. As principais células que secretam ApoE no sistema nervosos central são os astrócitos e uma pequena expressão na microglia (MORI, K et al, 2004). A ApoE também pode ser sintetizada em pequenas quantidades pelos neurônios do hipocampo, córtex cerebral, mas não pelo cerebelo (XU, P T et al, 1999)

Camundongos deficientes de ApoE apresentam aumento da formação óssea, que foi atribuído a uma redução na captação de lipoproteínas ricas em triglicerídeos pelos osteoblastos (SCHILLING, A F et al, 2005). A densidade mineral óssea é o maior determinante do comprimento ósseo estando sob uma regulação genética. O polimorfismo da ApoE tem sido estudado como tendo um papel chave no desenvolvimento de riscos de fraturas. Alguns estudos encontraram associações entre uma baixa densidade mineral óssea e o aumento na ocorrência de fraturas em indivíduos sem o alelo *E4* (MACDONALD, H M et al, 2008), contudo ainda faltam evidências para definir o papel da ApoE no metabolismo ósseo.

O alelo *E4* que está presente em 25% da população caucasiana, sendo associado ao aumento no risco do desenvolvimento de doença vascular e ao aumento do risco para a Doença de Alzheimer, além disso, o ApoE4 tem sido indicado com modulador de algumas outras doenças como doenças coronarianas (JOFRE-MONSENY, L et al, 2008).

O mecanismo pelo qual o genótipo ApoE pode predispor a doença degenerativa e cardiovascular ainda não está completamente entendido, tradicionalmente cerca de 40-50% dos casos de doença vascular estão associados ao genótipo ApoE4 (SONG, Y et al, 2004). Sendo observados também aumentos nos níveis de colesterol e triglicerídeos nos indivíduos portadores do alelo E4. Mecanismos antioxidantes e antiinflamatórios parecem exercer papéis

chaves no risco aumentado do portador do gene da APOE4 para essas doenças (JOFRE-MONSENY, L et al, 2008).

As propriedades antioxidantes da ApoE foram primeiro identificadas em meados da última década. Estudos posteriores demonstraram que os genótipos da ApoE podem influenciar as propriedades antioxidantes, com impacto no progresso das doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer. A atividade antioxidante ocorre na seguinte ordem de potência: ApoE2>ApoE3>ApoE4 (KITAGAWA, K et al, 2002; TANGIRALA, R K et al, 2001).

No cérebro a ApoE tem mostrado um papel protetor contra a fosforilação da *tau*, proteína envolvida na patobiologia da doença de Alzheimer (HURTADO, D E et al, 2010), influenciando o metabolismo do amilóide β (LADU, M J et al, 2000), participando também do reparo neuronal (POIRIER, J, 1994). A ApoE derivada dos macrófagos é abundante no local da lesão, ocasionada por placas ateroscleróticas, participando também da agregação plaquetária, do efluxo de colesterol dos macrófagos, da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais e da inibição da migração e proliferação no músculo liso (ZELENY, M et al, 2002).

A estrutura molecular da proteína mãe está demonstrada na **Figura 04**. A apoE possui portanto dois distintos domínios estruturais e funcionais, um domínio hidrofóbico que confere afinidade às lipoproteínas plasmáticas e um domínio hidrofílico para o receptor. O domínio NH_2-terminal de 22 KDa contém a região de ligação da proteína com o receptor. Essa região foi identificada entre os resíduos 136 e 150 sendo essencialmente formada de aminoácidos básicos, especialmente constituída por lisina e arginina, que são essenciais para ligação ao receptor e à fração de heparina. Na ausência de lipídios, nem o domínio NH_2-terminal, nem a molécula de ApoE inteira é reconhecida pelo receptor LDL. O domínio NH_2-terminal possui menor afinidade pelas lipoproteínas plasmáticas em relação ao domínio COOH-terminal, contudo, o domínio NH_2-terminal é capaz de se unir às vesículas fosfolipídicas e de tranformá-las em complexos discóides, que se ligam ao receptor LDL, com uma eficiência similar à toda proteína. Os dois domínios estão unidos por uma região sensível à digestão por uma protease (MAHLEY & RALL, Jr., 2000).

Estudos em modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) mostraram que o peptídeo mimético da ApoE, COG133 reduziu significativamente os sintomas clínicos da EAE quando administrado antes ou após o início da doença. (LI, F Q et al, 2006a)

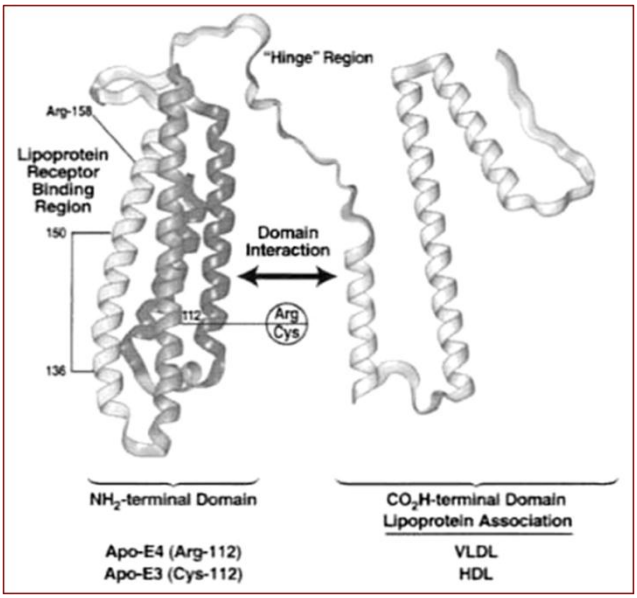


Figura 03. Estrutura molecular da apolipoproteína E, mostrando o sítio de ligação do receptor na extremidade amino-terminal e o domínio carboxi-terminal, que confere a afinidade às lipoproteínas plasmáticas. Arg = arginina; Cys = cisteína.

1.3.1 Metabolismo do Colesterol

O colesterol é um membro da família dos esteróides com papel essencial na manutenção da integridade celular, sendo um componente das membranas celulares, onde ocupa o espaço entre as cabeças polares das moléculas de fosfolipídios reduzindo sua fluidez (MYANT, N B, 1982). O colesterol é também uma molécula precursora da síntese de hormônios esteróides, vitamina D e sais biliares. É derivado a partir da dieta ou sintetizado no corpo. Uma dieta humana típica contém cerca de 200 a 500mg de colesterol (LEVY, E et al, 2007). As principais lipoproteínas que transportam colesterol no sangue são os quilomícrons, VLDL, LDL e HDL (DURRINGTON, P N, 2007). Os quilomícrons são secretados pelos enterócitos no interior do intestino entrando na corrente sanguínea, a partir do ducto linfático. Eles são ricos em triglicerídeos que são os principais ácidos graxos das gorduras. Os triglicerídeos são absorvidos a partir das micelas formadas no lúmen intestinal pelos ácidos graxos e monoglicerídeos, após a hidrólise pelas lipases pancreáticas. No

enterócito, os triglicérides são resintetizados e complexados com ApoB para formar os quilomícrons (OLOFSSON, S O et al, 2000).

1.3.2 Peptídeo Mimético da ApoE (COG133)

1.3.2.1 Aspectos Químico-moleculares

O peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E tem peso molecular de 2169,7 daltons e fórmula química de $C_{97}H_{181}N_{37}O_{19.}$ Sua sequência de aminoácidos inclui: Ac-Leu-Arg-Val-Arg-Leu-Ala-Ser-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-NH_2. O peptídeo da Apoliproteina do (apoE) COG 133, funciona através do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP). È aplicado em diversos modelos de distúrbios neurológicos tendo como efeitos a redução dos sintomas de encefalomielite autoimune experimental, um modelo de esclerose múltipla humana, suprime a desmielinização, inflamação e infiltração de células na medula espinhal, também atua como um antagonista não-competitivo em receptores α7 nicotínicos para acetilcolina (IC50 = 445 nm).

1.3.2.2 Estudos em trauma e isquemia cerebral

O traumatismo craniano pode predispor o surgimento de seqüelas neurológicas invisíveis. Estudos realizados nos EUA apontam que aproximadamente cinco milhões de pessoas estejam vivendo com seqüelas de traumas cerebrais, existe ainda a injúria secundária mediada pela excitotoxicidade do cálcio mediada pelo glutamato aumentando o estresse oxidativo os quais juntos podem ocasionar morte de células neuronais (WERNER, C , ENGELHARD,K., 2007). Variação nos níveis de ApoE é bem conhecida como sendo um contribuinte no risco do desenvolvimento da Doença de Alzheimer e que suas isoformas possuem atividade antioxidante distinta, estando associadas com respostas variáreis de estresse oxidativo incluindo o β-amilóide.

O alelo APOE4 tem sido associado com níveis reduzidos de atividade enzimática antioxidante nos pacientes com doença de Alzheimer (KHARRAZI, H et al, 2008) estando também associado com o aumento na produção de óxido nítrico nas plaquetas e macrófagos (MARCOURAKIS, T et al, 2008). Jordan e LYE em 2007 e 2000 respectivamente demonstraram que o genótipo da ApoE tem um papel significante na recuperação após a injúria cerebral, indivíduos com APOE4 possuem uma recuperação mais lenta comparados

com indivíduos com genótipo APOE3. Análises moleculares detectaram que genes chamados de antiinflamatórios estão pouco expressos em animais que foram submetidos a um protocolo de injuria cerebral, tais como SOD1 e 2 (superóxido dismutase) outras proteínas que indicam modificações oxidativas gerais foram encontradas em quantidades modificadas tais como carbonilas, 3NT e HNE estavam em altas concentrações indicando com isso a elevações dessas proteínas nos quadros de injúria cerebral, sendo que as maiores expressões foram nos animais com genótipo APOE4 (FERGUSON, S et al, 2010). Estudos prévios demonstram que o COG133 que corresponde aos resíduos de aminoácidos 133-149 apresenta alguns papéis como neuroprotetor, antioxidante e antiinflamatória, demonstradas através de experimentos *in vivo e in vitro* (LASKOWITZ, D T et al, 2007).

A atividade neuroprotetora *in vivo* do COG133 tem sido demonstrada através de diversos modelos clínicos de desordens neurológicas, incluindo o trauma por injúria craniano, esclerose múltipla e a injúria por isquemia/hipóxia (LI, F Q et al, 2006b; LYNCH, J R et al, 2001). O COG 133 possui em sua estrutura α-hélice uma região ligante do receptor da holoproteína nativa da qual foi derivada. Devido a essa propriedade, estudos sugerem que essa acentuação na região α-hélice talvez seja a causa de sua atividade antiinflamatória aumentada, o que levou ao desenvolvimento do COG1410 (GAY, E A et al, 2006; LASKOWITZ, D T et al, 2001). Estudos demonstram que o peptídeo COG 1410 foi benéfico quando administrado após o protocolo de trauma craniano por contusão, exibindo efeitos robustos na recuperação da função cortical e neuroproteção (HOANE, M R et al, 2006).

1.3.2.3 Estudos em modelos de colite

A colite ulcerativa é uma desordem do trato gastrointestinal caracterizada pela infiltração de leucócitos na mucosa intestinal (FIOCCHI, C, 1998). A colite ulcerativa é uma doença inflamatória crônica de etiologia ainda não totalmente esclarecida. Pacientes com colite ulcerativa tem risco aumentado de desenvolver câncer colorretal com incidência variável em diversas regiões do globo (KULAYLAT, M N , DAYTON,M.T., 2010). Nos EUA a incidência é de aproximadamente 4/1.000 e a prevalência gira em torno de 3,5% (EADEN, J A et al, 2001). Nos quadros de colite as citocinas tais como IL-1ß, TNF-α têm grande importância na migração dos leucócitos e no desenvolvimento da inflamação em si. Baseado no princípio que peptídeo mimético COG 133 da apolipoproteína E, como um

modulador importante no metabolismo do colesterol, tendo alguns estudos têm demonstrado que indivíduos com colite ulcerativa apresentam um distúrbio no metabolismo das lipoproteínas. Dessa forma, foi criado o peptídeo mimético COG 112, que possui uma melhor permeabilidade transmembrana (RIPOLLES, P B et al, 2006). Trabalhos demonstram que a adminstração do peptídeo mimético COG 112 diminuiu a expressão do RNAm para iNOS de maneira tempo dependente em modelos de colite ulcerativa.

1.3.2.4 Estudos na barreira intestinal

Foi demonstrado que estas isoformas influenciam os níveis séricos de lipídios e, portanto, doenças cardiovasculares, bem como o risco de desenvolver a doença de Alzheimer (AD) (ALVAREZ-ARCAYA, A et al, 2001; STRITTMATTER, W J , BOVA,H.C., 2002). Além das mais conhecidas funções da ApoE, novas linhas de investigação têm associado este peptídeo de 35 kDa na modulação imunológica e de liberação de citocinas pelo tecido adiposo e macrófagos (ZECHNER, R et al, 1991) (BACH-NGOHOU, K et al, 2001). Tem-se relacionado o peptídeo ApoE com outras funções alem do transporte de lipídeos. Apesar de extensos estudos em modelos de injúria cerebral, nenhum trabalho avaliou o papel da ApoE na recuperação da mucosa intestinal após mucosite inflamatória induzida por quimioterápico.

Trabalhos recentes seguem a linha de investigação sobre o papel da ApoE na maturação intestinal e adaptação após a desnutrição pós-natal em camundongos (ORIA, R B et al, 2007a). Nossos dados de ApoE com camundongos "*knock-out*" têm sugerido efeitos sinérgicos de ApoE e IGF-1 na recuperação da barreira intestinal. Os camundongos com deficiência de ApoE se mostraram profundamente afetados quando submetidos à desnutrição pós-natal precoce e não conseguiram recuperar o peso após retorno à dieta quando comparado com os controles *wild-types*. Trabalhos mostram que o RNAm para ApoE aumenta abruptamente no fígado de ratos ao nascimento e se eleva novamente durante o período de lactação, sugerindo que a ApoE desempenha um papel crítico no início desenvolvimento pós-natal. Além disso, a expressão do RNAm para ApoE no fígado aumenta após 10 horas de jejum em lactentes, sugerindo que a expressão do gene APOE em hepatócitos de ratos muda durante o desenvolvimento conforme variações nos níveis de insulina e glucagon (MANGENEY, M et al, 1989).

Além disso, o aumento da expressão gênica da ApoE acompanha a diferenciação de linhagens celulares intestinais *in vitro* (REISHER, S R et al, 1993). ApoE parece também ter

um papel no estabelecimento da integridade das *tight junctions* em linhagens celulares de intestino (NIEMI, M et al, 2002). Outras evidências mostram ruptura da barreira hemato-encefálica de camundongos com deficiência de ApoE, especialmente após injuria (FULLERTON, S M et al, 2001; METHIA, N et al, 2001). A barreira hemato-encefálica é composta principalmente de *tight junctions* entre células endoteliais, algo semelhante à barreira intestinal ao longo dos enterócitos.

Também é sugerido um papel dos complexos ApoE e colesterol no intestino durante o processo inflamatório pela constatação de que a ApoE é secretada em enterócitos em resposta à 25-OH colesterol em células Caco-2 polarizadas e esta secreção é reduzida pelo LPS (RIPOLLES, P B et al, 2004). Além disso, os polimorfismos no gene ApoE (E4) causa um aumento da expressão (*upregulation*) da proteína transportadora catiônica para L-Arginina (CAT-1), que tem sido associada com o aumento da captação da L-arginina por células da neuroglia (COLTON, C A et al, 2002; RIPOLLES, P B et al, 2004). Esse mesmo processo ocorre em enterócitos, ainda está para ser explorado. Aumento da captação de L-arginina preferencialmente por enterócitos (ou pelo intestino) poderia melhorar a função da barreira intestinal, o fluxo sanguíneo em mucosas e a resposta imunológica para reparo das mucosas (proliferação e migração celulares) após a lesão, possivelmente aumentando a síntese de poliaminas via óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS) (RHOADS, J M et al, 2004). Por outro lado, estimulando a produção excessiva de óxido nítrico a partir da isoforma NOS induzida (iNOS), durante o estresse oxidativo devido à quimioterapia, poderia gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e, em última análise a ruptura da barreira intestinal (NAGAHAMA, S et al, 2002).

O equilíbrio fisiopatológico entre ambas as isoformas de NOS durante a lesão do epitélio intestinal e reparo em relação à captação de L-arginina por parte da CAT-1 não é muito conhecida. A inibição da iNOS pode ser alcançada por análogos estruturais dos seus substratos, incluindo os não-seletivos N-G-nitro-L-arginina-metilesther (L-NAME) e aminoguanidina (inibidor mais seletivo para iNOS). O papel funcional do óxido nítrico no intestino inclui: integridade epitelial vascular, o fluxo sanguíneo e neurotransmissão relacionada com tônus muscular (TAKAHASHI, T, 2003; THOMAS, S et al, 2001). O papel da ApoE e suas isoformas no transporte de L-arginina em enterócitos na ativação/inibição da enzima óxido nítrico sintetase continua elusivo, especialmente durante os estados inflamatórios, mas a abordagem farmacológica com bloqueadores competitivos seletivos e não-seletivos contra as isoformas de NOS poderá ajudar a compreender sua função *in vivo*.

Recentemente, uma nova terapia farmacogenômica, a partir de um novo peptídeo ApoE (COG133), compreendendo os resíduos 133-149 da ApoE, está disponível. Esse peptídeo mimético concorre com a holoproteína para o receptor LDL, com potente propriedade antiinflamatória em modelos de lesão cerebral, contudo preservando o papel neuroprotetor da holoproteina ApoE (LASKOWITZ, D T et al, 2007; WANG, H et al, 2007).

O mecanismo exato em que o novo peptídeo ApoE age na redução do depósito amilóide pela microglia no SNC, preservando a função cognitiva de animais experimentais, não é bem conhecido. Curiosamente, este efeito protetor foi encontrado apenas em camundongos transgênicos ApoE para as isoformas recombinante humanas APOE2 e APOE3, mas não para APOE4, esta última tendo uma posição dominante e efeito mais forte com perda da plasticidade após lesão cerebral. Apesar dos efeitos deletérios da APOE4 em pacientes com lesão cerebral e acidente vascular cerebral (MCARRON, M O et al, 1998; MCCARRON, M O et al, 1999), recentemente, alguns estudos têm documentado proteção cognitiva mediada pela APOE4 em crianças e recém-nascidos (ALEXANDER, D M et al, 2007; WRIGHT, R O et al, 2003), mas não sobre os mais obesos com apnéia obstrutiva (GOZAL, D et al, 2007). Estes resultados sugerem que a quantidade de citocinas liberadas pelo tecido adiposo pode ser afetada pelas isoformas da ApoE, portanto, influenciando os resultados cognitivos em crianças.

Nossos estudos de coorte com crianças com diarréia, em comunidades carentes, sob vigilância epidemiológica desde o nascimento, têm demonstrado um inesperado papel protetor da APOE4 contra os déficits cognitivos observado em crianças com alta morbidade de doenças diarréicas nos dois primeiros anos de vida (mas não naqueles com menor ocorrência de diarréia) (ORIA, R B et al, 2005). Sugerimos que o efeito protetor da APOE4 em crianças com desnutrição e diarréia pode ser através do aumento da absorção de colesterol e do transporte da L-Arginina por enterócitos (ORIA, R B et al, 2007b). Este efeito protetor provavelmente também pode estar relacionado a melhor resposta imunológica contra patógenos intestinais (por respostas de proteção ao NO).

Com base nestes resultados, a terapêutica farmacogenômica com o novo peptídeo ApoE (LASKOWITZ, D T et al, 2007) poderia ser benéfica em crianças com severa morbidade de diarréia e não portadoras do alelo APOE4, e ao mesmo tempo preservando os resultados positivos em crianças com APOE4. Este projeto poderá também beneficiar, portanto, estudos pré-clínicos em modelos animais de doenças entéricas, com base nos dados

obtidos inicialmente no efeito do peptídeo da ApoE na mucosite induzida por quimioterapia, proposto aqui.

Além disso, o nosso plano de estudo inclui a avaliação do possível efeito complementar entre alanil-glutamina e o peptídeo ApoE COG133. O nosso grupo tem demonstrado o papel da glutamina e seus derivados na recuperação da mucosite intestinal induzida pelo 5-FU, principalmente devido a um aumento da proliferação celular ao nível da cripta intestinal (CARNEIRO-FILHO, B A et al, 2004). Outros estudos corroboram o efeito benéfico da glutamina em outros modelos de citotoxicidade epitelial (BRITO, G A et al, 2005; CARNEIRO, B A et al, 2006; LEITAO, R F et al, 2008; NASCIMENTO, S B et al, 2005). Além disso, em nossos estudos de coorte com crianças em comunidade carentes e em estudos com doentes infectados pelo HIV, a glutamina consistentemente melhora os sintomas da diarréia e doenças entéricas (BUSHEN, O Y et al, 2004; CARNEIRO-FILHO, B A et al, 2003; LIMA, A A et al, 2005). A terapia ApoE poderia ter a vantagem da propriedade anti-inflamatória da fração ApoE protetor no intestino e, por conseguinte, acelerar o reparo da barreira morfofuncional intestinal, após injúria induzida pelo 5-FU. Optamos dessa forma por explorar um modelo de desafio com 5-FU e o efeito deste novo peptídeo ApoE em relação a morfologia do epitélio intestinal, efeito na libertação citocinas pró-inflamatórias associadas com o desafio de 5-FU. O intestino é um local muito suscetível a lesões ocasionadas por drogas anticâncer (BOWEN, J M et al, 2006). A mucosite é um efeito colateral da quimioterapia no qual ocorre uma queda na dramática na qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma justifica-se a escolha do intestino como sendo o local de escolha no tratamento da mucosite

1.3.2.5 Apoliproteína E e distúrbios neurológicos

O peptídeo ApoE tem relações com diversas patologias que afetam o ser humano nos mais variados sistemas biológicos como por exemplo o sistema nervoso. Uma das doenças mais conhecidas da atualidade é a doença de Alzheimer a qual não possui sua etiopatogenia totalmente elucidada, no entanto estudos demonstram a relação que essa doença possui com os diferentes tipos de genótipos da ApoE (AYBEK, H et al, 2007; PEROUTKA, S J , DREON,D.M., 2000). Estudos demonstram de forma consistente a associação do alelo ε4 com o desenvolvimento de doença de Alzheimer enquanto, ao que tudo indica, o alelo ε2 parece ter um papel protetor no desenvolvimento da doença (RAYGANI, A V et al, 2006). Estudos também recentes demonstram que eventos celulares envolvendo stresse oxidativo

talvez seja o mecanismo básico para diversas doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (MAZUR-KOLECKA, B et al, 2006) tendo como principais substâncias atuantes os radicais livres os quais estão envolvidos em reações sejam elas enzimáticas ou não. Um dos sistemas de defesa enzimática é o sistema superóxido dismutase que converte radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio tendo a participação da glutationa peroxidase e catalase que convertem a molécula de H_2O_2 em água. Como exemplo do sistema não enzimático, existe o acido ascórbico (Vit. C), α-tocoferol, GSH e o β-caroteno que promovem um balanço intracelular dos níveis de antioxidantes essenciais a sobrevivência das células (PULIDO, R et al, 2005).

Estudos recentes apontam uma freqüência estatisticamente significativa menor do genótipo ε4 nos indivíduos que desenvolveram doença de Alzheimer quando comparados à população geral sugerindo uma relação íntima da ocorrência do genótipo com o desenvolvimento da doença. Estudos correlacionaram ainda o genótipo ε4 com a capacidade enzimática desses pacientes. Os pacientes portadores do alelo 4 possuíam baixos níveis de atividade de GSH e CAT (catalase), importantes para evitar o desenvolvimento da doença, visto que os radicais livres contribuem em grande parte para a patofisiologia da doença de Alzheimer.(KHARRAZI, H et al, 2008).

Outros estudos correlacionam o genótipo ApoE com outros fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer tais como os níveis da proteína *Tau*, os níveis do fluído cerebroespinhal e o imageamento através de ressonância nuclear magnética. Resultados recentemente publicados reforçam que o volume do fluído cerebroespinhal está intimamente ligado ao genótipo da ApoE, mas é menos associado coma deficiência cognitiva, demonstraram ainda que os níveis de amilióde beta foram significante maiores nos indivíduos que eram carreadores do alelo ε4 (VEMURI, P et al, 2010).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente não existe tratamento efetivo para os efeitos colaterais resultantes da quimioterapia, como por exemplo, a mucosite intestinal. Portanto, esse trabalho propõe investigar o papel do peptídeo mimético da apolipoproteína E (COG 133) no modelo de mucosite induzida por 5-FU em camundongo Swiss, baseado na literatura científica que demonstra o seu papel na redução do quadro inflamatório em modelos de injúria no SNC.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Verificar o efeito antiinflamatório do peptídeo mimético da Apolipoproteina E (COG 133) na mucosite induzida por 5-Fluoruracil em duodeno de camundongos Swiss.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) em diferentes doses, nos parâmetros morfométricos altura de vilos e profundidade de criptas.

3.2.2 Avaliar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) em diferentes doses, na leucometria dos animais desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-Fluoruracil.

3.2.3 Avaliar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) nas doses de 0,3;1 e 3μM, no ensaio de ELISA para as citocinas próinflamatórias IL-1β, TNF-α e o mediador inflamatório iNOS.

3.2.4 Avaliar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) nas doses de 0,3;1 e 3μM, no ensaio de ELISA para as citocina antiinflamatórias IL-10.

3.2.5 Avaliar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) em diferentes doses, no ensaio de mieloperoxidase em amostras de duodeno de animais desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-Fluoruracil.

3.2.6 Estudar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) na dose de 3μM na expressão de citocinas próinflamtórias IL-1β, TNF-α e do mediador inflamatório iNOS avaliadas pelo Western blot.

3.2.7 Estudar o efeito do peptídeo mimético da Apolipoproteína E (COG 133) na dose de 3μM na expressão de citocinas próinflamatória TNF-α e o mediador inflamatório iNOS avaliadas pelo RT-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética e animais experimentais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com pesos entre 25 e 30g, adquiridos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os protocolos experimentais seguiram as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho de Ética para Cuidado Animal da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas com ração Fri-Ribe® (São Paulo – SP) e água *ad libitum* até o dia do sacrifício, respeitando o ciclo circadiano dos animais. Foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12 horas.

4.2 Indução Mucosite e Obtenção dos Tecidos

O quadro de mucosite foi induzido pela administração de 5-fluoruracil (450mg/kg) via intraperitoneal nos camundongos Swiss. Os tratamentos foram administrados nos dias (1º ao 4º dia) com a eutanásia no 4º dia por overdose do anestésico cloridrato de cetamina (KONIG®) e cloridrato de xilazina (KONIG®). A verificação da ocorrência clínica de mucosite foi feita através de eventos diarréicos nos camundongos. Foi proposto o modelo de retirada dos segmentos de duodeno até 5,0 cm após a válvula pilórica com a seguinte ordem para cada protocolo experimental, vide **Figura 04**. Os segmentos possuíam cerca de 1,0 cm para cada um dos procedimentos listados abaixo.

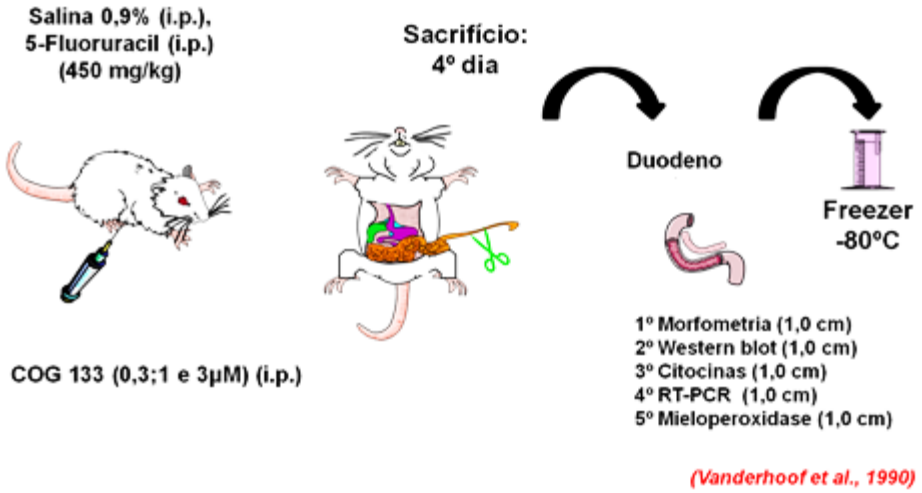


Figura 04: Posição dos segmentos de duodeno retirados para os protocolos experimentais,sendo o primeiro fragmento mais proximal e o quinto fragmento mais distal ao marco anatômico pilórico.

4.3 Drogas, reagentes, primers e anticorpos.

O 5-fluoruracil (Itapevi, Brasil) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Inflamação e Câncer (LAFICA) para indução do quadro de mucosite intestinal. O peptídeo ApoE (COG133) foi obtido através do professor Dr. Michael P. Vitek, PhD, da Duke University (Carolina do Norte, EUA). Foi feita uma solução concentrada a 691µM a partir da qual se preparava as doses experimentais de 0,3, 1 e 3 µM.

Os anticorpos foram adquiridos através da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA), listados abaixo:

- Anticorpo primário TNFα (N-19) IgG HRP aliquotado em 1000µl e com peso molecular de 17kDa.
- Anticorpo primário IL-1β (H-153) IgG HRP aliquotado em 1000µl e com peso molecular de 17 kDa.
- Anticorpo primário NOS2 (H-174) IgG HRP aliquotado em 1000µl e com peso molecular de 130 kDa.
- Anticorpo secundário Donkey Anti-rabbit IgG-HRP aliquotado em 0,5ml.
- Anticorpo secundário Rabbit anti-goat IgG HRP aliquotado em 0,5 ml.

No protocolo experimental de RT-PCR foram utilizados os seguintes primers solicitados pela Invitrogen (São Francisco, EUA).

- **β-Actina** 5'- AATAGTGATGACCTGGCCGT - 3'(Antisenso), 5'– AGAGGGAAATCGTGCTGCGTGAC – 3' (Senso);
- **TNF- α** 5' –GTCACTGTCCCAGCATCTT - 3' (Senso), 5'- CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3' (Antisenso) ;
- **iNOS** 5' – CAGCTGGGCTGTACACCCCTT – 3' (Senso), 5' – ACTTGGAAGTGAAGCGTTTCG – 3' (Antisenso);

4.4. Tratamento

O peptídeo mimético da apoE COG133 foi administrado diariamente (12h/12h) nas doses de 0,3, 1 e 3µM por via intraperitoneal, diluído em solução salina. A primeira injeção foi feita 1h antes da administração do 5FU (450 mg/Kg, dose única, i.p.) e em três dias

consecutivos, doravante. O controle positivo foi desafiado com 5-FU e recebia solução salina de acordo com as condições descritas acima.

4.5 Morfometria

A análise morfométrica foi feita utilizando o software Image J 1.4® (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Inicialmente, foi feito procedimento de calibração no software através de régua micrométrica para micrômetros. Após a calibração, foi feita análise morfométrica das microfotografias de cortes teciduais de duodeno. Os parâmetros analisados foram altura dos vilos e profundidade de criptas, que são marcadores de integridade do tecido intestinal. Descrição do método de medição da altura do vilo. A medição de profundidade de cripta foi feita através da base da cripta até seu ápice (**Figura 05**). Foram selecionados cortes longitudinais de criptas e vilos íntegros para efeito de análises.

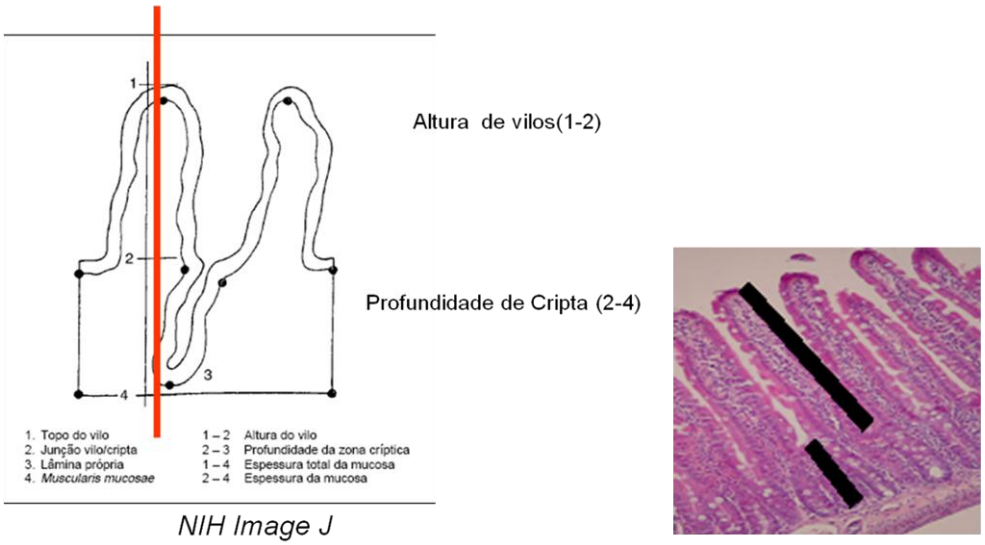


Figura 05. Método esquemático morfométrico usado na análise da altura de vilos e profundidade de cripta, utilizando o programa Image J versão 1.44 (NIH, Bethesda, MD, EUA)

4.6 Contagem de leucócitos

Para a avaliação da ação citotóxica do 5-fluoruracil foi feita contagem dos leucócitos em câmara de Newbauer. Os animais foram anestesiados em éter, posteriormente foi colhido sangue do plexo orbital, de onde, através de capilaridade foi extraído o sangue periférico que foi misturado com uma solução a 3% de ácido acético (solução de Turk) na proporção de 1:20. (**Figura 06**)

A contagem foi feita efetuando-se as correções numéricas devido à diluição. O valor final da contagem era dado em quantidade de células por mm^3 ou ml.

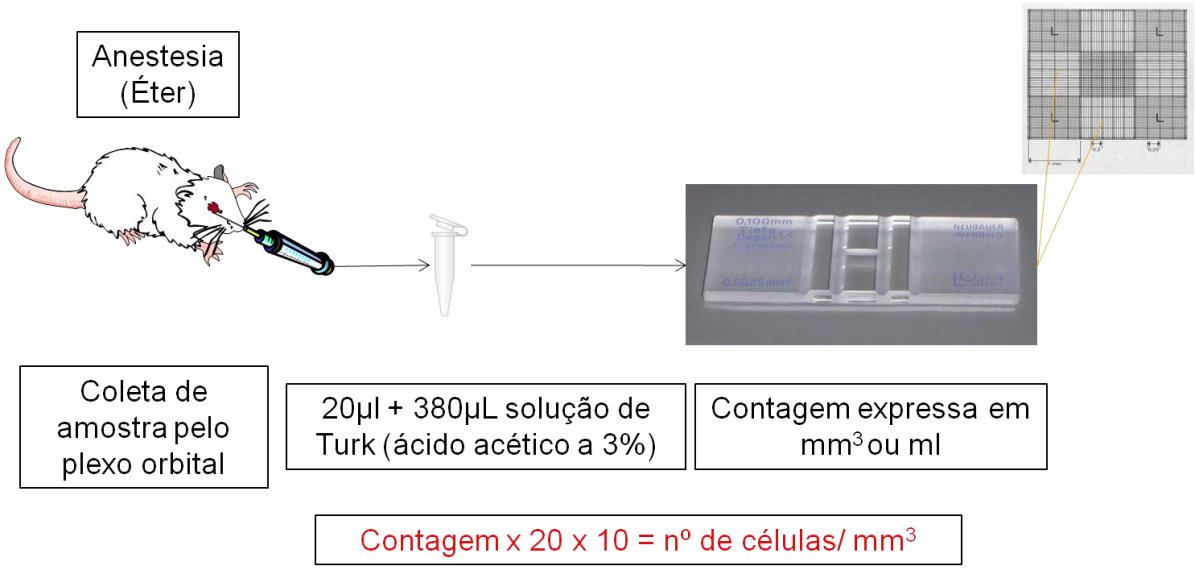


Figura 06. Desenho esquemático do protocolo de coleta e contagem de leucócitos

4.7 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, determinada por método colorimétrico e leitura final realizada em leitor de ELISA. Uma porção do duodeno foi coletada e incubada em solução de HTAB a 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500 g/15 min a 4ºC). O sobrenadante foi transferido para um Epperdorf® e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 poços), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H2O2 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H_2O) foram adicionados e lidos a 450nm (t_o=0 min e t_1=1 min). A mudança na absorbância foi obtida e expressa como MPO/mg de tecido (atividade de MPO).

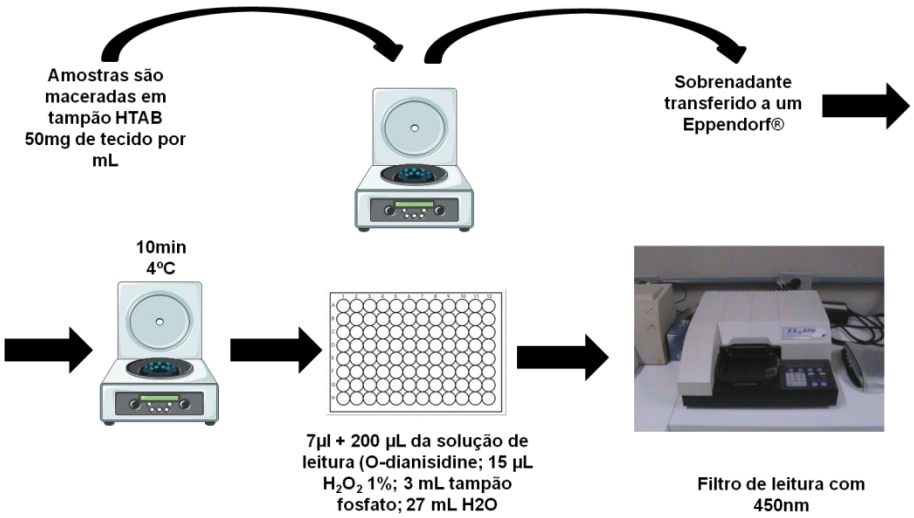


Figura 07. Desenho esquemático do protocolo de mieloperoxidase.

4.8 Ensaio de Citocinas

Dilui-se o anticorpo de trabalho em PBS sem proteínas. Essa solução de anticorpo diluída (100µl) é adicionada em cada poço e incubado "*overnight*". Cada poço foi aspirado e em seguida lavado com tampão de lavagem (400 µl), repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens. Em seguida, foi feito bloqueio das placas adicionando-se 300 µL de reagente diluente para cada poço, com incubação em temperatura ambiente por um período mínimo de 1 hora. O ciclo aspiração/lavagem foi repetido. Nesse passo as placas já estão prontas para a adição da amostra (Minneapolis, EUA).

4.8.1 Procedimentos de Ensaio

Adicionam-se 100µL de amostra ou padrão em reagente diluente por poço. A placa é coberta e incubada durante duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, o poço é aspirado e lavado. 100µL do anticorpo de detecção (diluídos em reagente diluente) é em seguida adicionados em cada poço. A placa é coberta (para se evitar a exposição da luz) e incubada por 2 horas em temperatura ambiente, seguida de aspiração e lavagem. 100µL de solução de trabalho com streptavidina-HRP é adicionada para cada poço. A placa é coberta e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo em seguida aspirada e lavada. Adicionam-se 100µL de substrato em cada poço, com incubação de 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse procedimento, 50µL de solução de parada é adicionada para cada poço. A leitura da densidade óptica é feita imediatamente usando uma leitora ELISA de microplacas ajustada para 450 nm. Se a correção de comprimento de onda estiver disponível, definimos 540 nm e 570 nm. Caso a correção de comprimento de onda não está disponível, subtraímos leituras em 540 nm e 570 nm a partir das leituras em 450 nm. Esta subtração

corrige as imperfeições ópticas na placa. Leituras feitas diretamente em 450 nm sem correção podem ser maiores e menos precisos. A leitura foi feita em duplicata.

Tampões contendo uma grande quantidade de proteína devem ser feitos sob condições estéreis e armazenadas a 2-8° C ou ser preparado diariamente.

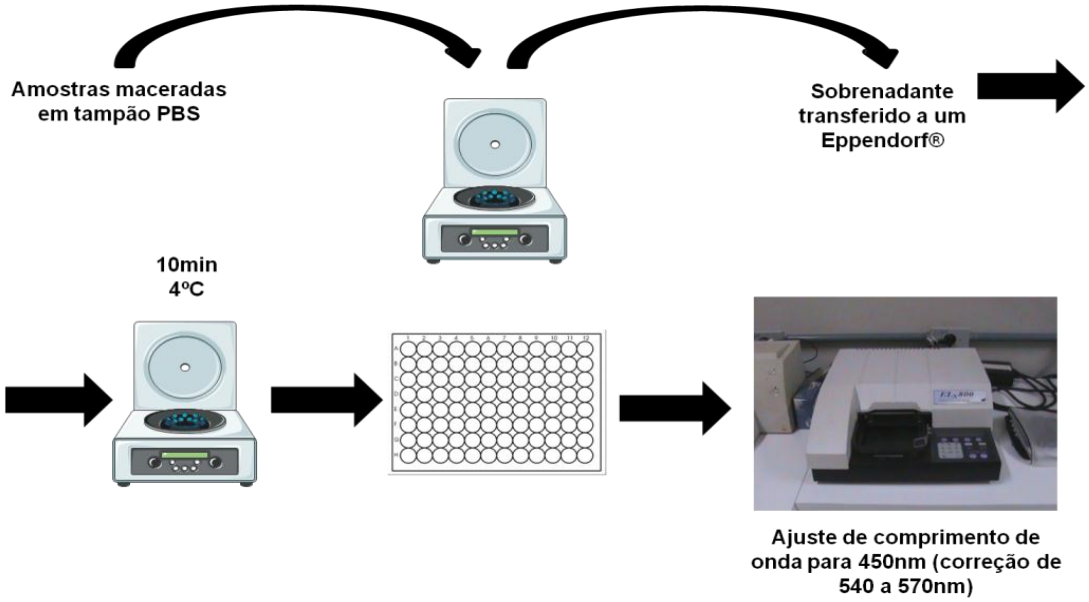


Figura 08. Desenho esquemático do protocolo de ELISA para citocinas.

4.9 Western blot

4.9.1 Procedimento experimental

Para as análises moleculares de Western blot e RT-PCR foram usados apenas o grupo tratado de 3,0 μM, devido à melhor resposta obtida nas análises de ELISA para IL-1β e TNF-α, e os controles. Os tecidos foram retirados do freezer a -80ºC, descongelados e transferidos para tubos de ensaio limpos com volume suficiente de solução contendo coquetel inibidor de protease (1:10; armazenado a -20 ºC) e tampão de lise (5mL Triton X–100%; 1mL Nonaetileno Glicol Octilfenil Éter (substituto Nonidet® P40; cát. # 11 332 473 001; Mannheim, Alemanha.) 0,2%; 1mL EDTA 2mM) na proporção de 1:100. As amostras foram homogeneizadas a uma rotação que variou entre 3000 – 5000 r.p.m, sendo o homogeneizador lavado, primeiramente em álcool a 70% e depois em dH_2O, antes de triturar cada amostra, com o intuito de evitar contaminação. Os homogenados foram centrifugados a 14.000 r.p.m por um tempo de 5-10 min em câmara fria. O sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf® (1,5 ml), descartando o *pellet*.

4.9.2 Ensaio BCA

Com as amostras lisadas, foi feita a padronização da quantidade de proteína nas respectivas amostras. No ensaio de BCA, usamos o kit (Pierce, IL, USA), que consiste em 2 reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio), reagente de detecção do BCA e tartarato de sódio em 0,1N de hidróxido de sódio) e B (4% de CuSO4). A solução foi preparada a uma proporção de 1:50 de CuSO4 a 4% em reagente BCA, com uma amostra controle negativa chamada de *blank*. Após o preparo das substâncias, as amostras foram incubadas a 37ºC no banho Maria por 30 min. Em seguida, foi feita a leitura com espectrofotômetro com leitura em comprimento de onda de 552 nm. Uma curva padrão foi definida previamente juntamente com as leituras experimentais de absorbância, calculando-se as concentrações de proteínas usando regressão linear (µg/ml) a partir do programa GraphPad Prism®. Os valores foram convertidos para µg/µl, dividindo-os por 10 (deve-se levar em consideração a diluição de 1:100 já feita no ensaio BCA). A **tabela 02** abaixo mostra o modelo de curva padrão utilizado no ensaio BCA.

Tabela 02. Modelo de curva padrão utilizada no ensaio BCA.

	Concentração (µg/mL)	**Absorbância**					
	X	**Y**	**Conc. Atual (µg/µL)**	**Vol. p/ 50µM de proteína (µL)**	**Vol. de dH_2O (µL)**	**0,1% Bromofenol Azul (µL)**	**5X Sample Buffer**
1	0,00000	0,035	-	-	-	-	-
2	5,00000	0,194	-	-	-	-	-
3	10,00000	0,306	-	-	-	-	-
4	20,00000	0,480	-	-	-	-	-
5	40,00000	0,680	-	-	-	-	-
6	80,00000	1,224	-	-	-	-	-
7*	84,54343	1,376	8,545	5,914	5,086	5	4

*dado de uma amostra experimental aleatória

4.9.3 Preparo do gel e Corrida das amostras

Foi utilizado o método de Western blot SDS-PAGE com eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 12,5%. Para preparar o mini-gel são necessários 50µg de proteína para cada poço. Portanto, foram usadas as concentrações das amostras padronizadas no ensaio BCA de proteína. As alíquotas após padronização foram transferidas para novos tubos contendo tampão de amostra (0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol, SDS a 10%, dH_2O, beta-mercaptoetanol) e água. As alíquotas foram aquecidas até fervura durante 5 minutos (para desnaturação). As amostras foram centrifugadas antes da corrida no gel. Montou-se o aparato completo, enchendo com tampão de corrida (50 mM de Tris, glicina a 385 mM e SDS a 0,1%). As amostras foram adicionadas com ponteiras apropriadas (Fisher-Brand®, 1-200µL) nos poços do gel. Um marcador ladder de proteína foi adicionado no gel num volume de 5µL (Invitrogen®, Califórnia, EUA) para referência do peso molecular. A eletroforese foi feita a 180V com o aparelho Power Pac Basic (Bio-Rad), até que as amostras atingissem o fim do gel (em média 20-30min).

4.9.4 Transferência para Membrana

Foi realizada em seguida a transferência do gel para membrana de nitrocelulose a partir de "sanduíche" contendo esponja, papel de filtro, gel e a membrana. Após o acoplamento do "sanduíche" ao aparato, foi adicionado o tampão de transferência (Tris Base, glicina e metanol) refrigerado. O aparato foi conectado na fonte de voltagem e submetido a uma voltagem de 100V durante 1h, a frio, dentro da cuba de transferência ou então *overnight* em voltagem constante de 35V em geladeira.

4.9.5 Bloqueio com leite em pó

Foi feito bloqueio com leite em pó a 5% diluído em tampão de lavagem (NaCl; Tris base; dH_2O) com o pH ajustado para 7,6 (com HCl, 1N), na plataforma de agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Algumas vezes, esse passo de bloqueio foi realizado *overnight*, a frio, possibilitando uma maior eliminação de background.

4.9.6 Anticorpo Primário

A membrana foi incubada por um período de 1h na plataforma de agitação em temperatura ambiente em uma solução contendo 10mL de solução a 5% de leite desnatado em pó (previamente explicitada) com o anticorpo primário de escolha. A diluição dos anticorpos

primários foi de: IL-1β (1:400), TNF-α (1:400), iNOS (1:800) e actina (1:1000). Após a incubação com o anticorpo primário, lavamos a membrana com o tampão de lavagem por 10 minutos.

4.9.7 Anticorpo Secundário

Logo após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com o anticorpo secundário para que houvesse a ligação específica antígeno–anticorpo primário-anticorpo secundário e posterior revelação do filme por quimioluminescência. Utilizamos um volume 10 ml da solução de leite em pó 5% e efetuamos a diluição do anticorpo secundário conjugado HRP. A membrana foi incubada com o anticorpo primário durante 1 hora, após esse tempo, a solução foi removida e a membrana foi lavada com tampão de lavagem (3 vezes, 10 min cada), na diluição de 1:1000.

4.9.8 Revelação da Membrana

Com o objetivo de revelar as bandas de proteínas contidas na membrana de nitrocelulose, foi realizado o protocolo de ECL no qual utilizamos uma solução de quimioluminescência contendo Tris, ácido cumárico, luminol e H_2O_2. A revelação foi feita em filme radiográfico em sala escura. Após a revelação, o filme foi escaneado com o objetivo de mensurar a densitometria das bandas de proteínas.

4.9.9 *"Stripping"* da Membrana

O protocolo de *stripping* da membrana foi realizado com o objetivo de detectar a presença de outras proteinas de interesse na mesma membrana sem necessitar a realização de um outro western blot (BCA e eletroforese). No *stripping* ocorre a remoção dos anticorpos incubados no blot anterior, após lavagem para remover o substrato de quimiluminescência e o anticorpo primário. Em seguida, incuba-se a membrana em uma solução chamada Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, IL, EUA) por 5-15 minutos em temperatura ambiente. Após lavagens com tampão de lavagem, um novo bloqueio e novas incubações foram feitas com o novo anticorpo primário de interesse.

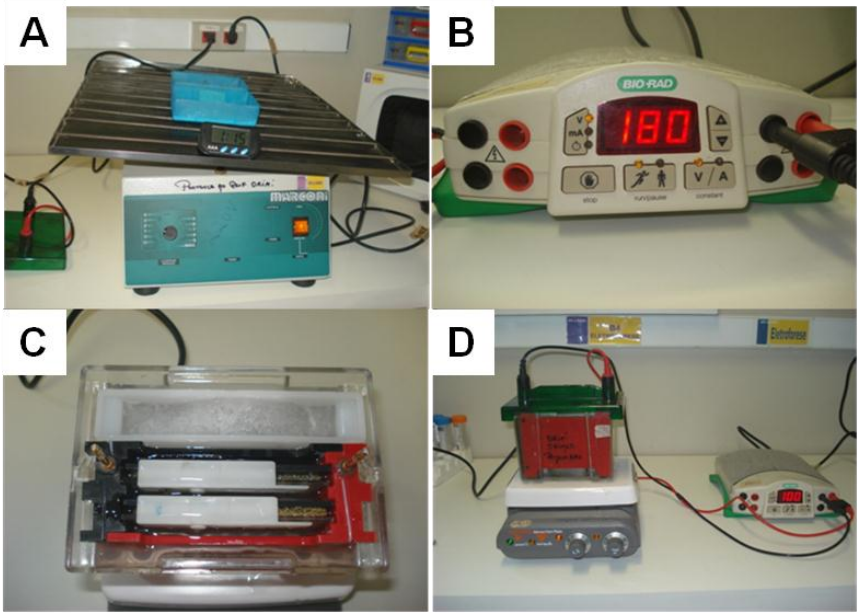


Figura 09. Aparato de western blot do laboratório de bioquímica. Em (A) mesa agitadora onde ficam as membranas a serem incubadas com os anticorpos e lavagens. (B) Fonte elétrica durante a eletroforese. (C) aparato de transferência do conteúdo do gel para a membrana de nitrocelulose. (D) procedimento de transferência.

4.10 RT-PCR

4.10.1 Extração do RNA

As bancadas de PCR foram preparadas com desinfecção prévia com álcool a 70%, e eliminador de nuclease (Amresco, Ohio, EUA). Os tecidos foram retirados do freezer -80ºC, descongelados e pesados para obter fração de 30mg em balança da precisão Bioprecisa®. As frações de tecidos foram trituradas em uma solução de 600µl de tampão RLT (Qiagen, Maryland, USA), sendo que para cada mudança de tecido o triturador era limpo com água destilada e álcool 70%. Após a maceração completa do tecido, foi realizada uma centrifugação da mistura e retirado o sobrenadante, sendo colocado em um novo tubo no qual se adicionou 600 µl de álcool a 70%. Dessa mistura se retirou uma alíquota de 700 µl para a mini-coluna (RNeasy Mini Spin Column, Qiagen, Maryland, EUA). Em seguida, a mini-coluna foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15s, descartando-se o filtrado. Adicionou-se 350µl de tampão RW1 (Qiagen, Maryland, EUA) diretamente na membrana da coluna e nova centrifugação a 10.000 rpm por 15s, reutilizando o tubo. Em seguida, foi adicionada solução de DNase I (Qiagen,Maryland, EUA) e tampão RDD (Qiagen, Maryland, USA), repousando a mini-coluna em temperatura ambiente por 45 min. Em seguida foi adicionado o tampão RW1, sendo a mini-coluna centrifugada com descarte do filtrado. Transferiu-se a coluna para um

novo tudo pipetando 500 µl de tampão RPE (Qiagen, Maryland, USA) diretamente na coluna, com nova centrifugação e descartando o filtrado. Para eluir, pipetou-se 30 µl de água livre de RNase centrifugando o tubo a 10.000 por 1 min para obter amostra com RNA

4.10.2 Análise de Espectrografia

Foi feita análise da quantidade do RNA extraído após padronização do controle (blank) em um Uvette® (Eppendorf, Alemanha) em espectrofotômetro (Biophotometer®, Eppendorf, Alemanha).

4.10.3 Transcrição Reversa

Adicionou-se o conteúdo de 2 µl de Oligo dT (Invitrogen, CA, EUA), 2 µl de dNTP mix a 10 µM (10 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP)(Invitrogen, CA, EUA) com 2 µg de RNA total previamente calculado em tubo de PCR. A mistura foi aquecida por 5min a uma temperatura de 65ºC. Adicionou-se 8µl de tampão FS 5X (Invitrogen CA, EUA), 4µL DTT 0.1M (Invitrogen CA, EUA), 2 µL RNaseOUT™ (Invitrogen, CA, EUA). O conteúdo foi misturado e incubado em banho Maria a 37ºC por 2 min. Adicionou-se 1µl de transcriptase reversa (SuperScript, BioRad, PA, EUA) na amostra. Os tubos de PCR foram levado ao termociclador para reação a 37ºC por 50 min, sendo a reação inativada a 70ºC durante 15min.

4.10.4 Primers Utilizados

- **β-Actina** 5'- AATAGTGATGACCTGGCCGT - 3'(Antisenso), 5'– AGAGGGAAATCGTGCTGCGTGAC – 3' (Senso);
- **TNF- α** 5' –GTCACTGTCCCAGCATCTT - 3' (Senso), 5'- CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3' (Antisenso) ;
- **iNOS** 5' – CAGCTGGGCTGTACACCCCTT – 3' (Senso), 5' – ACTTGGAAGTGAAGCGTTTCG – 3' (Antisenso);
- **IL-1β** 5' – GTGCAAGTGACTCAGGGTGA – 3' (Antisenso), 5' – GCTGAAGGAGTTGCCAGAAA - 3' (Senso)

4.10.5 Amplificação

Procedeu-se com a reação da cadeia de polimerase com cDNA, primer foward, primer reverso, água livre de RNase (13µl), Taq Polimerase (GoTaq Green Polimerase®,Promega, WI, EUA)(25µl) tendo um volume final de 50µl. Os tubos de PCR foram centrifugados e levados para o termociclador (Progene, OH, EUA) para os devidos ciclos térmicos.

4.10.6 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado em 100ml de tampão tris-acetato (TAE 1X, Tris-base, ácido acético glacial e EDTA) em uma béquer com 2g de agarose ultra-pura (solução a 2%) (Invitrogen, PA, EUA), com aquecimento em microondas em potência máxima por 2 min. Após a dissolução da agarose, adicionou-se 3µl de brometo de etídio (Sigma, MO, EUA). A agarose com brometo de etídio foi adicionada em aparato de eletroforese com pente até formar o gel. Após esse período, adicionou-se em cada poço um volume de 18µl do produto de amplificação com 2 µl do corante (azul de bromofenol a 0,1%). Em um dos poços, foi adicionado o DNA ladder de 100bp (Invitrogen). A corrida de eletroforese foi feita com fonte elétrica (Bio-Rad, PA, EUA) a 100V durante 40min. A análise dos géis foi feita através de um aparelho de fotodocumentação (Bio-Rad, PA, EUA), confirmando o produto de amplificação de acordo com a quantidade de pares de bases. A análise densitométrica foi feita pelo software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) após normatização com actina.

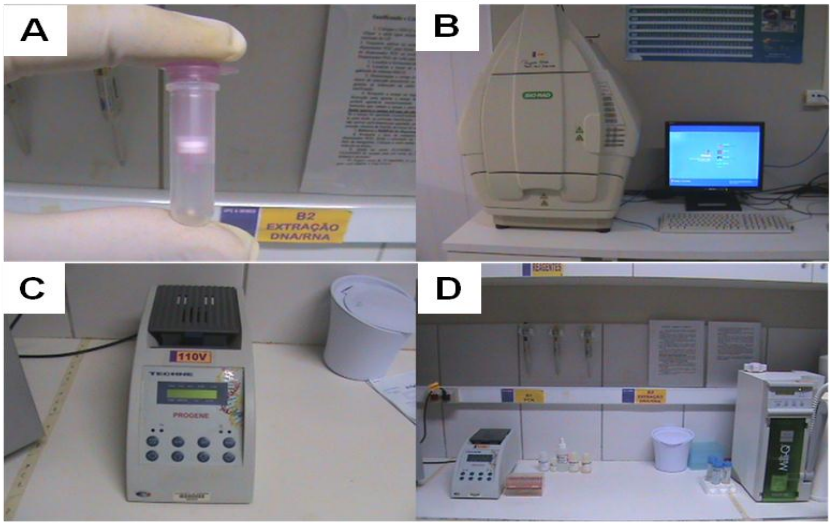


Figura 10: (A) Mini coluna de extração de RNA, (B) fotodocumentador (BIORAD®) e computador para processamento das imagens (C) termociclador (TECHNE®, Progene), estação de trabalho do RT-PCR .

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram mostrados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). O teste de variância ANOVA seguido pela correção por Bonferroni foi utilizado para comparar os grupos. O teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's estes foi utilizado para comparar as medianas, quando as medições não-paramétricas forem necessárias. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças significativas. Utilizou-se ainda o teste de T student não pareado para comparaçõa entre dois grupos.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do parâmetro peso dos animais desafiados pela mucosite intestinal.

A indução de mucosite intestinal adaptada pelo Laboratório de Farmacologia e Inflamação e Câncer (LAFICA) foi utilizada nesses protocolos. Foi avaliado o papel de três doses de peptídeo COG 133 da ApoE (0,3; 1 e 3μM) durante quatro dias após a administração de 450mg/kg de 5-Fluoruracil via i.p em camundongos Swiss. Os grupos experimentais que foram desafiados pelo 5-FU que seriam tratados com apoE e os controles não apresentaram diferença de peso no início do protocolo. Não houve diferença estatística entre os grupos que foram injetados nas diferentes doses do peptídeo após o desafio com 5-FU, em relação ao ganho de peso ponderal, onde se evidencia que todos os grupos perderam peso, inclusive os animais controles, bem como os animais tratados com o peptídeo COG 133. No entanto, houve diferença estatisticamente significante entre todos os grupos desafiados com 5-FU em comparação com o grupo salina no 3º e 4º dias ($p<0,001$) (**Figura 11**).

6.2 Avaliação dos achados morfométricos dos animais experimentais tratados com salina, 5-Fluoruracile COG 133.

Na avaliação dos parâmetros morfométricos, verificou-se que o tratamento com 5-Fluoruracil promoveu uma redução significativa no parâmetro altura de vilos, o qual foi melhorado com a administração do peptídeo COG 133 nas doses de 1 e 3μM ($p<0,001$), **Figura 12**. No parâmetro profundidade de cripta, os animais injetados com o 5-FU apresentaram uma redução da profundidade das criptas, achado que foi parcialmente revertido pela administração do peptídeo COG 133 nas doses de 1 e 3μM, com $p<0,02$ para a dose de 1μM e $p<0,001$ para a dose de 3μM (**Figura 13**).

Na análise histológica, **Figura 14,** observou-se que a mucosa dos animais que receberam solução salina está íntegra, com vilos e criptas preservadas **(Figura 14A)**. Há presença de células em mitose, indicadas por setas longas. Na mucosa dos animais que receberam 5-FU **(Figura 14B)**, os vilos se apresentam reduzidos, apresentando também intenso infiltrado inflamatório de mono e polimorfonucleares na mucosa (na lâmina própria dos vilos e na circunvizinhança das criptas) e submucosa e epitélio de revestimento comprometido, com achatamento do epitélio especialmente no topo do vilo. Já nos animais

que foram tratados com COG 133 **(Figuras 14 C, D e E),** verificou-se uma melhoria na arquitetura do epitélio, tendo como dose mais significativa a de 3μM, associada a menor resposta inflamatória.

6.3 Avaliação do parâmetro contagem de leucócitos nos camundongos desafiados pela mucosite intestinal

Foi observada redução significativa do número de leucócitos/mm^3 de sangue, obtido do plexo orbital, dos animais do grupo desafiado com 5-FU ($p<0,001$), em relação ao controle, o que comprova o papel citotóxico do 5-FU sobre a produção de leucócitos na medula óssea. Esse efeito mielossupressor foi melhorado com a administração de COG 133 na dose de 3μM com $p<0,001$.

6.4 Avaliação do parâmetro atividade de mieloperoxidase (MPO) em amostras de duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal

Após administração do 5-FU (450 mg/kg, via i.p.), encontramos aumento da atividade de mieloperoxidase no duodeno, detectado pelo método colorimétrico, corroborando o achado de infiltrado neutrofílico na mucosa desses animais. Com a administração do peptídeo COG 133 na dose de 3μM houve uma redução significativa nos níveis de MPO em relação ao grupo controle desafiado pelo 5-FU ($p<0,05$) (**Figura 16**).

6.5 Avaliação da expressão de IL-1β, TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal

Na **Figura 17**, evidenciou-se o aumento nos níveis de citocina IL-1β no quarto dia experimental após a administração de 5-FU (450mg/kg), o qual foi reduzido pela administração do peptídeo COG 133 nas doses de 1 e 3μM ($p<0,001$ e $p<0.05$, respectivamente).

Na **Figura 18** observou-se o aumento dos níveis de TNF-α após administração do 5-FU, o que foi parcialmente revertido após a administração do peptídeo nas doses de 0,3, 1,0 e 3μM ($p<0,001$), quando comparado aos animais injetados com 5-FU apenas.

Após a administração do 5-FU em camundongos Swiss, verificamos uma redução dramática nos níveis da citocina IL-10 no 4º dia experimental, achado esse estatisticamente significativo, quando comparado aos animais injetados com salina. Quando foi administrado o

peptídeo COG 133, obteve-se uma melhora significativa nos níveis dessa citocina anti-inflamatória na dose de 3μM ($p<0,001$).

6.6 Avaliação da expressão de IL-1β, TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal através de Western blot

Nas análises proteômicas com os protocolos de Western blot, **ver figura 20**, evidenciou-se um aumento significativo na expressão da citocina IL-1β ($p<0,05$) no grupo desafiado pelo 5-FU, achado esse que foi melhorado após a administração do peptídeo COG 133 na dose de 3μM, que levou a uma redução na expressão dessa citocina no duodeno de camundongos Swiss quando comparado ao grupo controle 5-FU, confirmada pela análise densitométrica ($p<0,001$).

Na **Figura 21-** observamos o aumento bastante significativo da expressão da enzima NOSi, detectada pelo Western blot, com $p<0,05$, em animais injetados com 5-FU. No grupo de animais tratados com o peptídeo COG 133 da ApoE na dose de 3μM, evidenciamos uma redução significativa, com $p<0,05$, sugerindo um papel antiinflamatório do peptídeo ApoE.

6.7 Avaliação da expressão de TNF-α e iNOS em amostras de duodenos dos animais desafiados pela mucosite intestinal através de RT-PCR

Através da técnica de RT-PCR, evidenciou-se também um aumento da expressão do transcrito (RNAm) do TNF-α, $p<0,001$, no duodeno de animais injetados com 5-FU quando comparado com o grupo salina. Os animais que receberam COG 133 via i.p, na dose de 3μM, apresentaram uma redução significativa da expressão do transcrito para TNF-α ($p<0,05$) (**Figura 22**).

Através da técnica de RT-PCR, evidenciou-se um aumento da expressão do transcrito do RNAm para enzima iNOS, com elevada significância estatística ($p<0,001$), no duodeno de animais injetados com 5-FU, quando comparado com o grupo salina. Já nos animais que receberam COG 133 via i.p, na dose de 3μM, apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) (**Figura 23**).

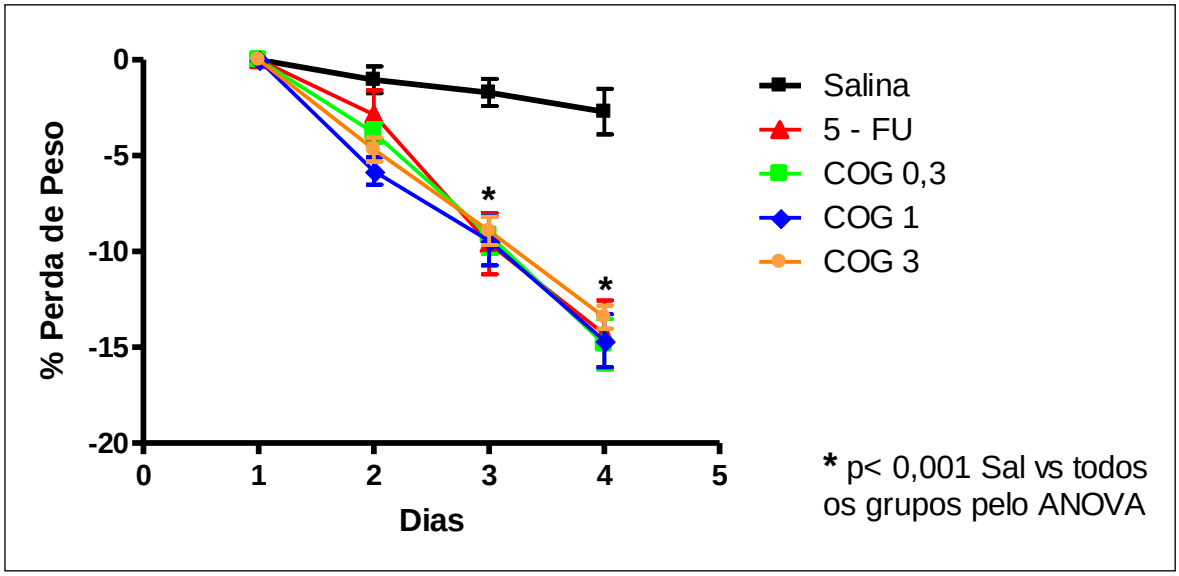


Figura 11: Efeito da administração de peptídeo mimético da (ApoE COG 133) sobre o peso corporal de camundongos *Swiss* desafiados pela mucosite induzida por 5-Fluoruracil.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina ($p<0,05$). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

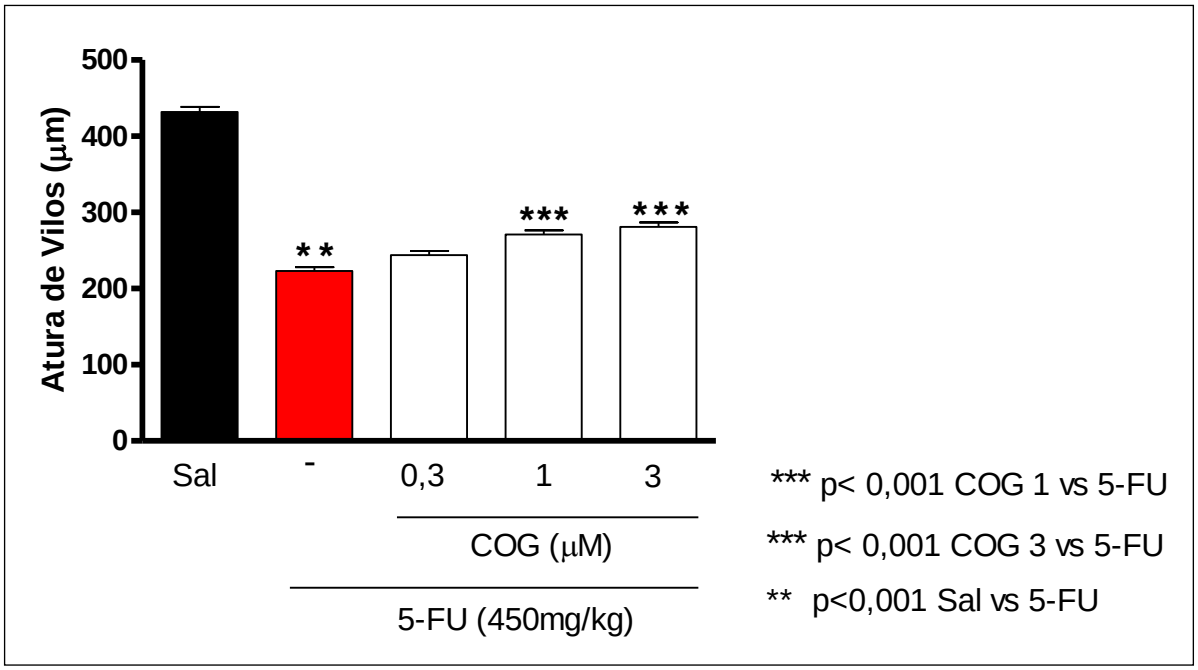


Figura 12: Efeito da administração do peptídeo COG 133 da apolipoproteína E em camundongos desafiados a mucosite intestinal induzida por 5-FU, no parâmetro altura de vilo do duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% (i.p.) ou peptídeo COG nas doses de 0,3, 1 e 3 μM, sendo sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e corados pelo método de coloração H&E. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA teste de Bonferroni . ** Diferença estatística, comparação entre os animais tratados com Sal e 5-FU ($p<0,05$) e *** 5-FU e COG 1 e 3 μM ($p<0,001$). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

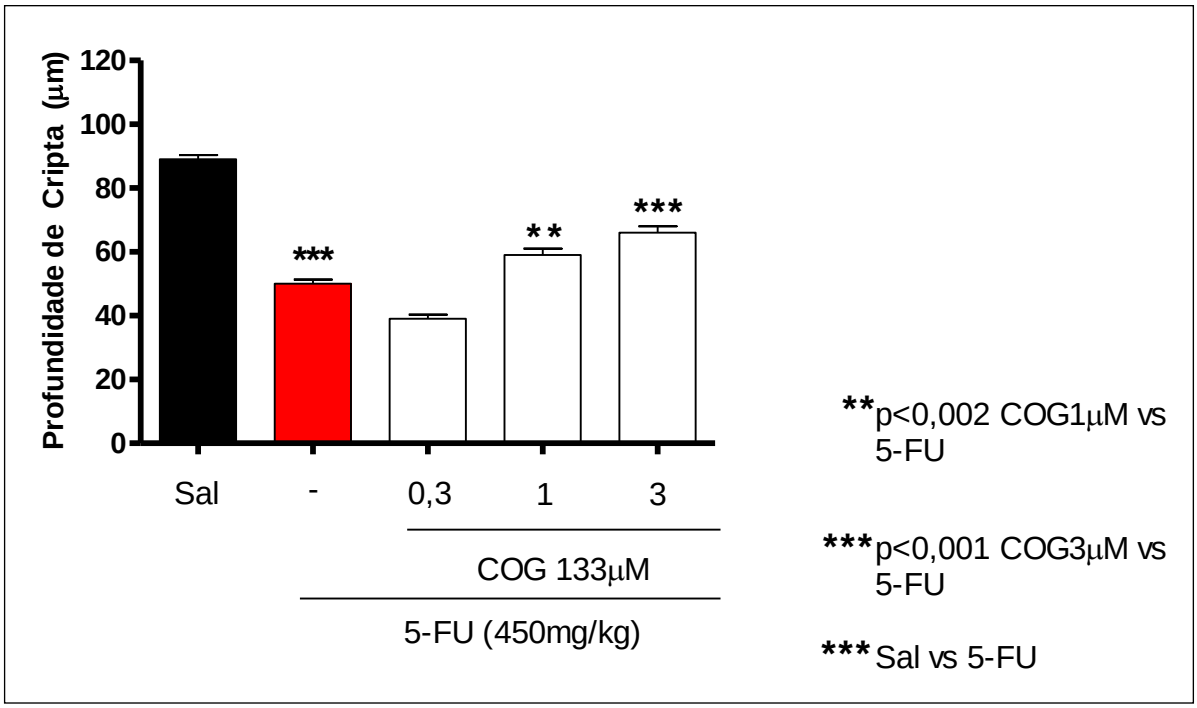


Figura 13: Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E em camundongos desafiados a mucosite intestinal induzida por 5-FU, no parâmetro profundidade de cripta proveniente de duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% (i.p.) ou peptídeo COG nas doses de 0,3, 1 e 3 µM, sendo sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e corados pelo método de coloração H&E. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA teste de Bonferroni. *** Diferença estatística, comparação entre os animais tratados com Sal e 5-FU, ** Diferença estatística entre os grupos 5-FU e COG 1 e 3 µM (p<0,001). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

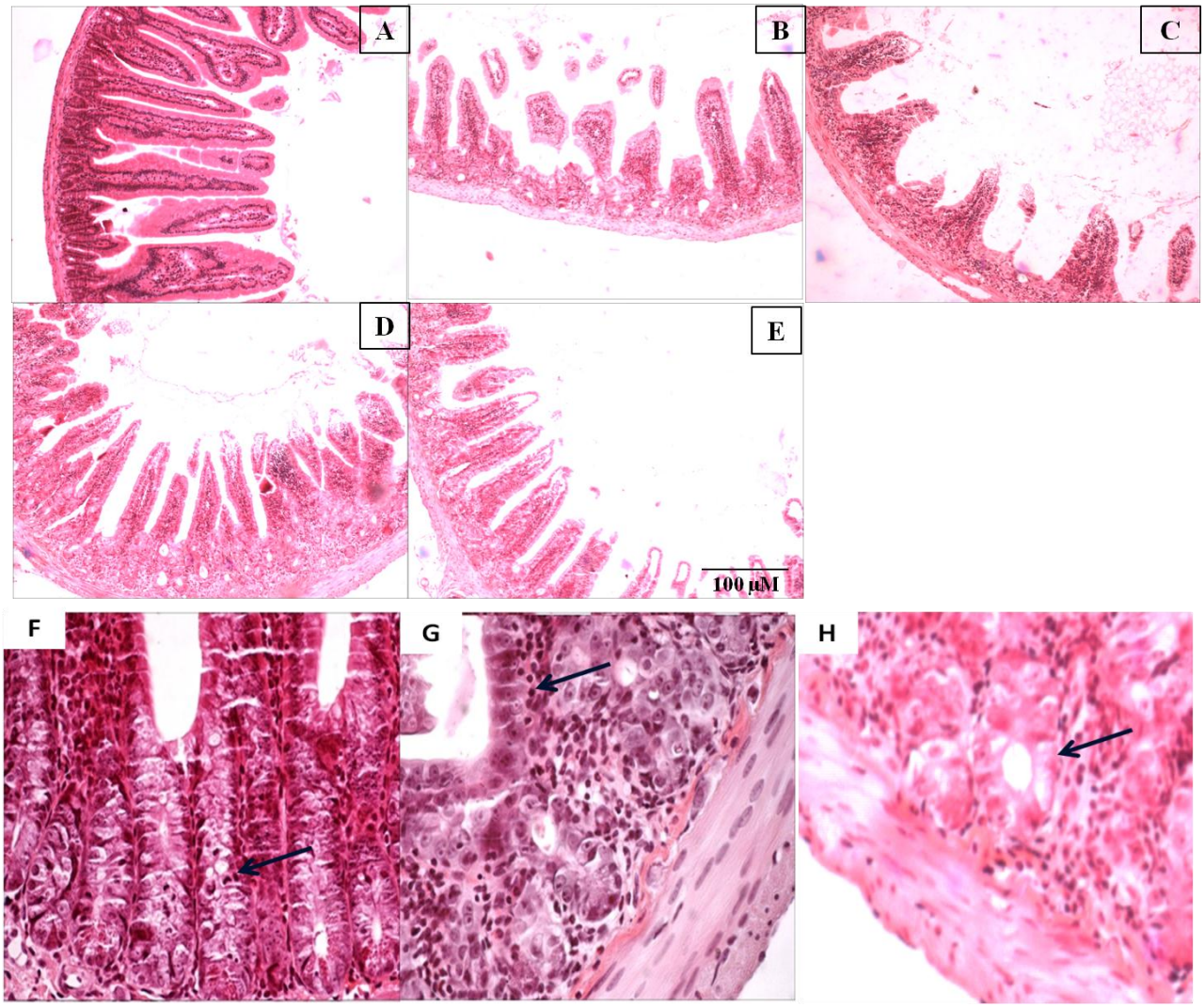


Figura 14: Fotomicrografias da avaliação histopatológica de duodeno de camundongos *Swiss* injetados com Salina 0,9% (A), 5-FU (B), COG133 (0,3µM) (C), COG133 (1µM) (D), COG133 (3µM) (E) (X100). F, G e H (X400). Escala 100µm.

Animais receberam 5-FU (450 mg/kg), solução salina 0,9% peptídeo COG 133 nas doses de 0,3; 1 e 3µM por três dias consecutivos (i.p.), sendo sacrificados no quarto dia de protocolo experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e corados pelo método de coloração H&E (A, B, C, D e E–100x). A mucosa dos animais que receberam salina está íntegra, com vilos e criptas preservadas. Há a presença de células em mitose representadas pela seta longa (F). Na mucosa dos animais que receberam 5-FU, os vilos se apresentam reduzidos. Apresentando também infiltrado inflamatório (seta), especialmente em torno da cripta (c) e epitélio da cripta comprometido (G). Já nos animais que foram tratados com COG 133, verifica-se uma melhoria na arquitetura da cripta (seta) e menos infiltrado inflamatório, tendo como dose mais significativa a de 3µM (H) (F, G e H - 400x pelo método de coloração H&E).

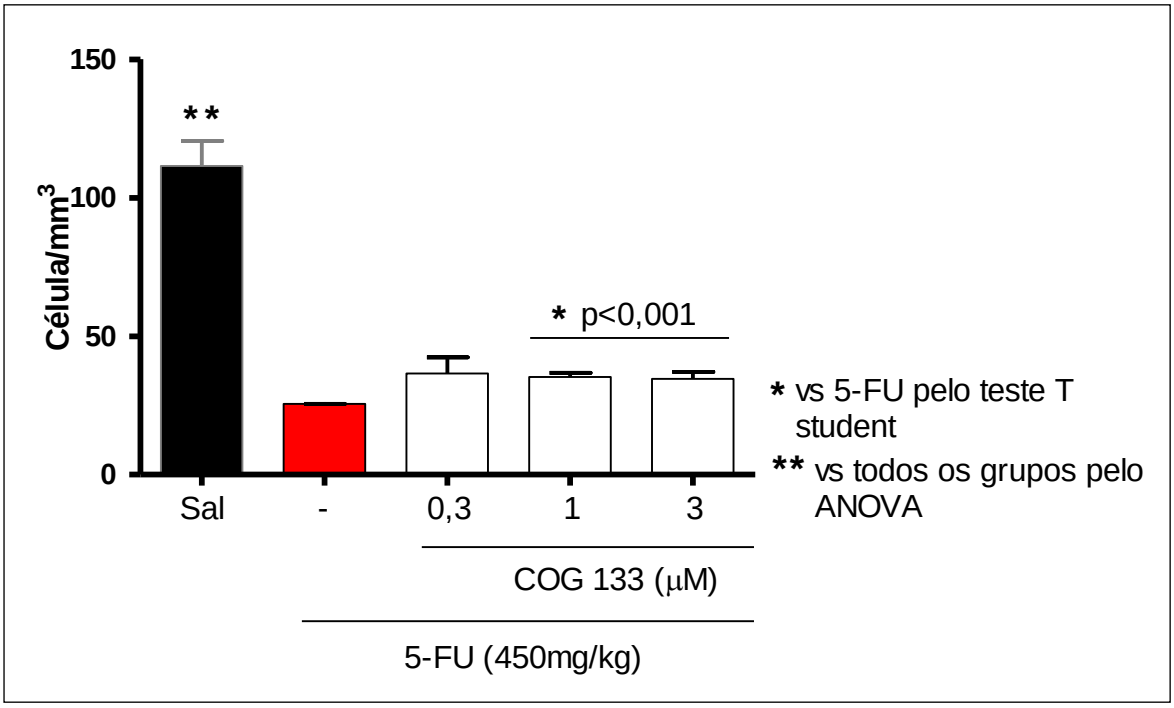


Figura 15: Efeito da administração do peptideo mimético da Apolipoproteina E (COG 133) sobre a leucometria dos camundongos Swiss desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 nas doses de 0,3, 1 e 3μM (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Amostras de sangue foram retiradas pelo plexo orbital , coletados e realizado o leucograma em camara de Newbauer. Os valores representam a média ± SEM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * e # Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,001). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

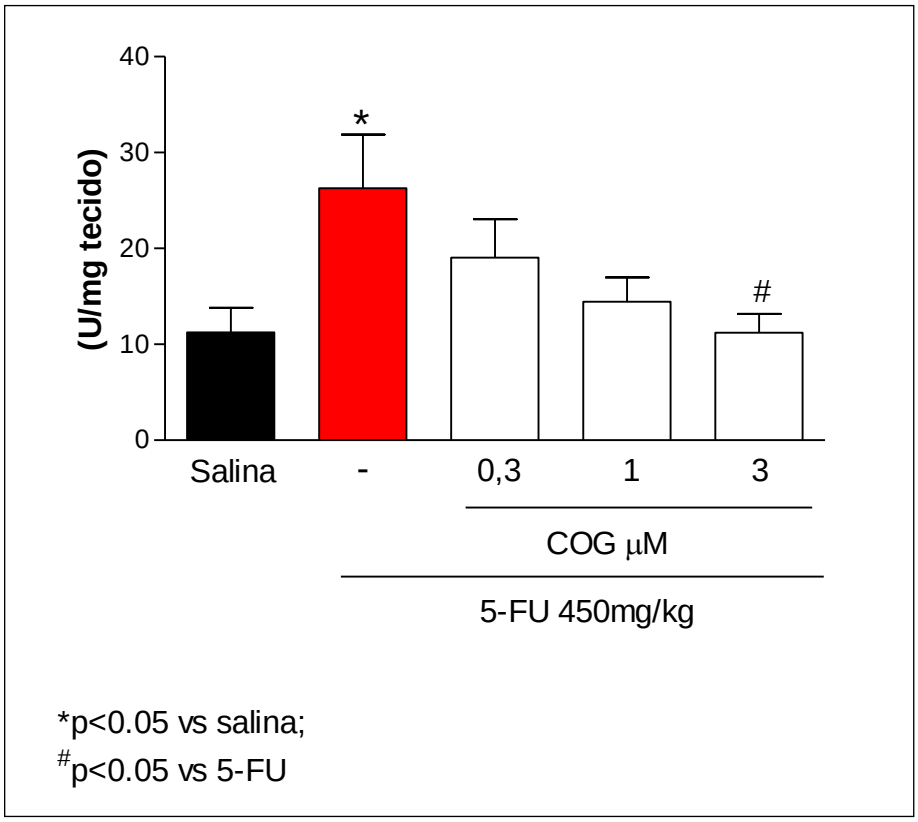


Figura 16: Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de Mieloperoxidase nas doses de 0,3, 1 e 3μM em amostras de duodeno de camundongos *Swiss* desafiados com 5-FU.

Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significante dos níveis de Mieloperoxidase em amostras de duodeno na dose de 3μmol/kg de COG133. Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. O ensaio foi realizado através do método de Bradley et al..(1982). Os valores representam a média ± SEM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * e # Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,05). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro. Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

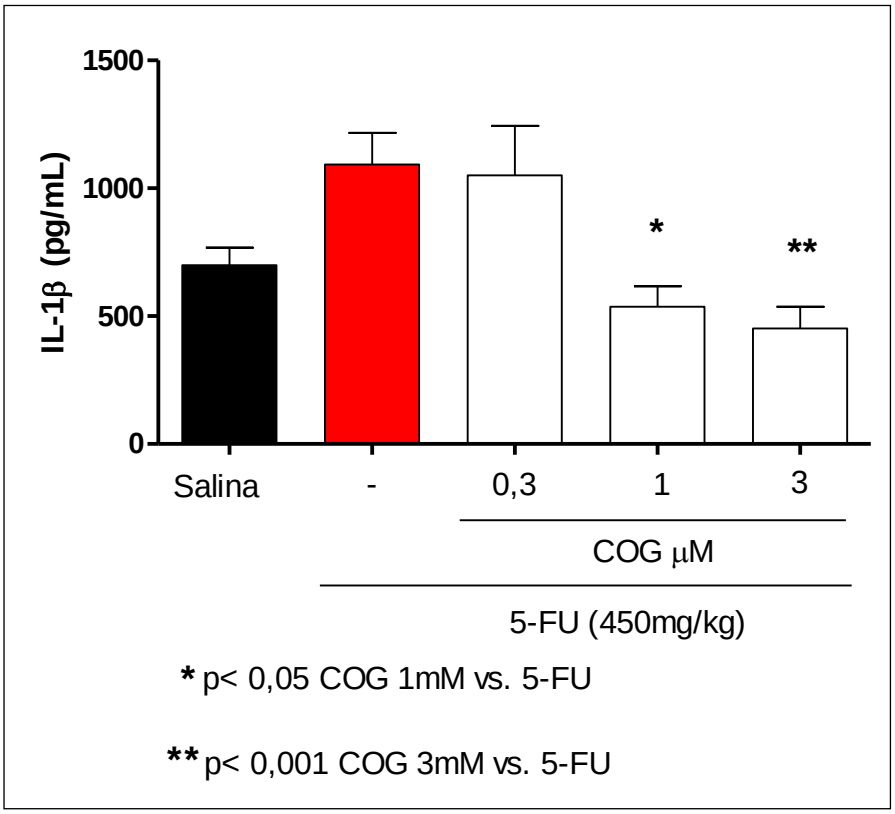


Figura 17: Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina IL-1β em amostras de duodeno de camundongos *Swiss* desafiados com 5-FU.

Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significante dos níveis de IL-1β em amostras de duodeno nas doses de 1 e 3μmol/kg de COG133. Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina ($p<0,05$).** Diferença estatística comparação com animais tratados na dose de 3μM com o grupo 5-FU ($p<0,001$). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

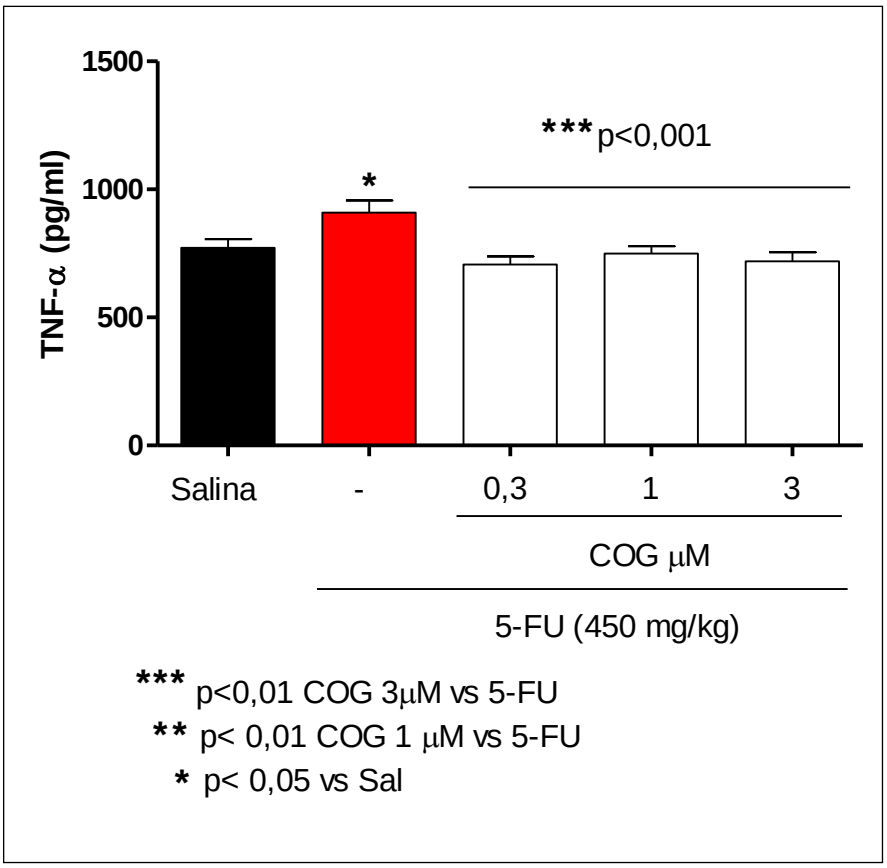


Figura 18: Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina TNF-α em amostras de duodeno de camundongos *Swiss* desafiados com 5-FU.

Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significante dos níveis de TNF-α em amostras de duodeno na dose de 1 e 3μmol/kg de COG133. Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,05). ** Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,001). # Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,001) . Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

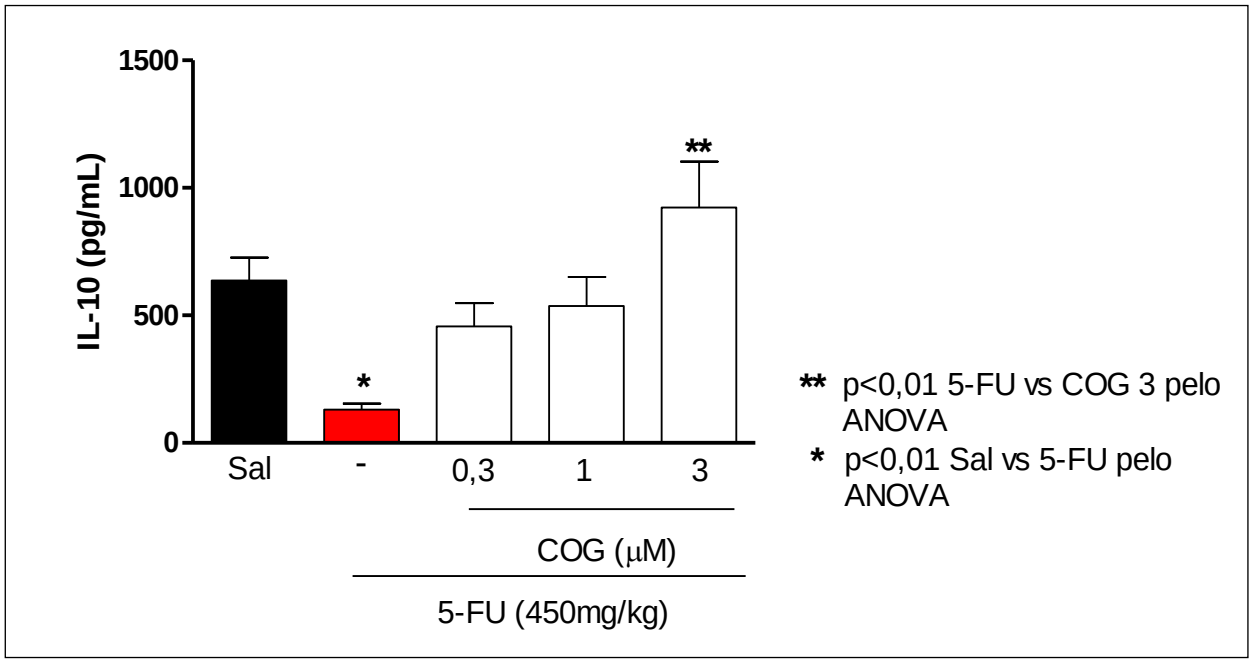


Figura. 19: Efeito da administração do COG 133 peptídeo mimético da Apolipoproteína E no ensaio de citocina IL-10 em amostras de duodeno de camundongos *Swiss* desafiados com 5-FU.

Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significante dos níveis de IL-10 em amostras de duodeno na dose de 1 e 3μmol/kg de COG133. Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. ** Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,001). *** Diferença estatística, comparação dos animais tratados na dose de 3μM com o grupo tratado com 5-FU (p<0,001). Número de animais por grupo igual ou superior a quatro.

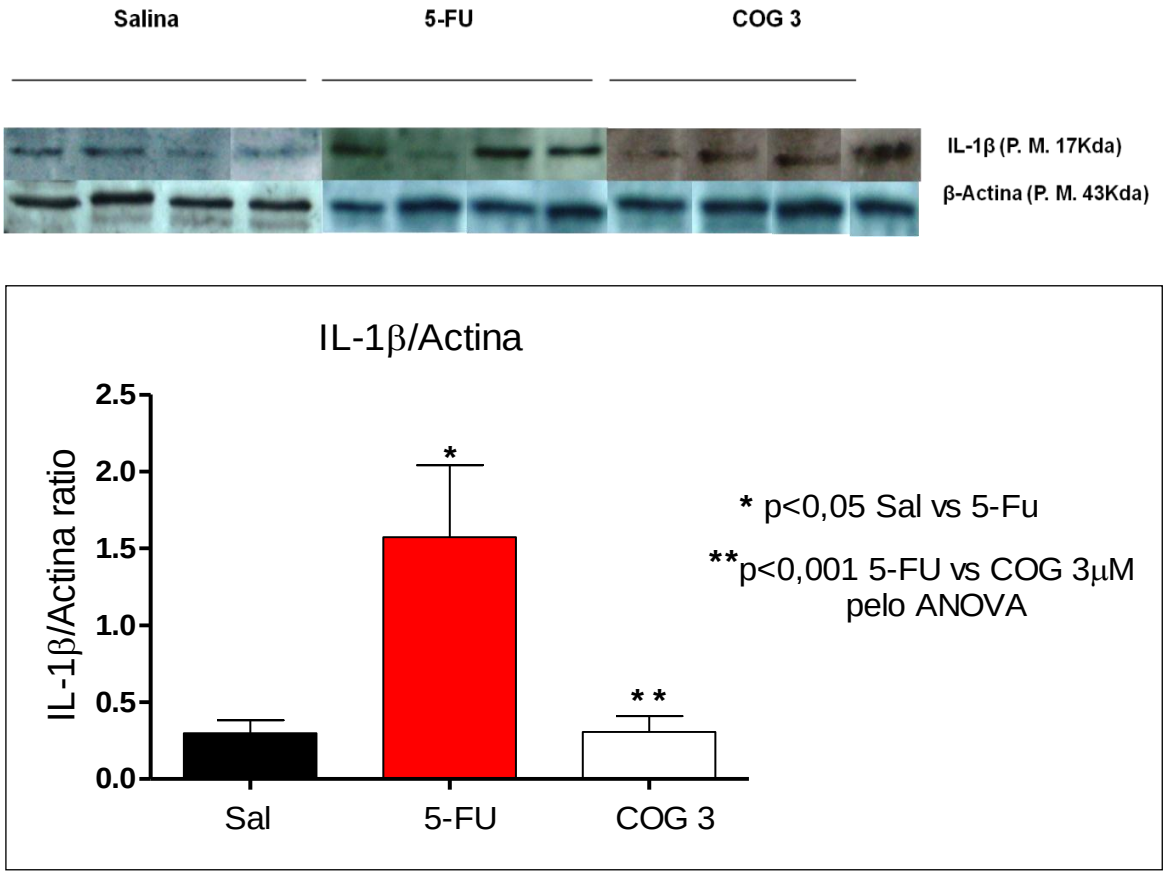


Figura 20. Efeito da administração do peptídeo COG 133 na dose de 3μM do peptídeo mimético da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU no Western blot para IL-1β em duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com salina (p<0,05). ** Diferença estatística, comparação com animais tratados com COG 133 na dose de 3μM com o grupo tratado com 5-FU (p<0,001). Número de bandas por grupo igual a quatro.

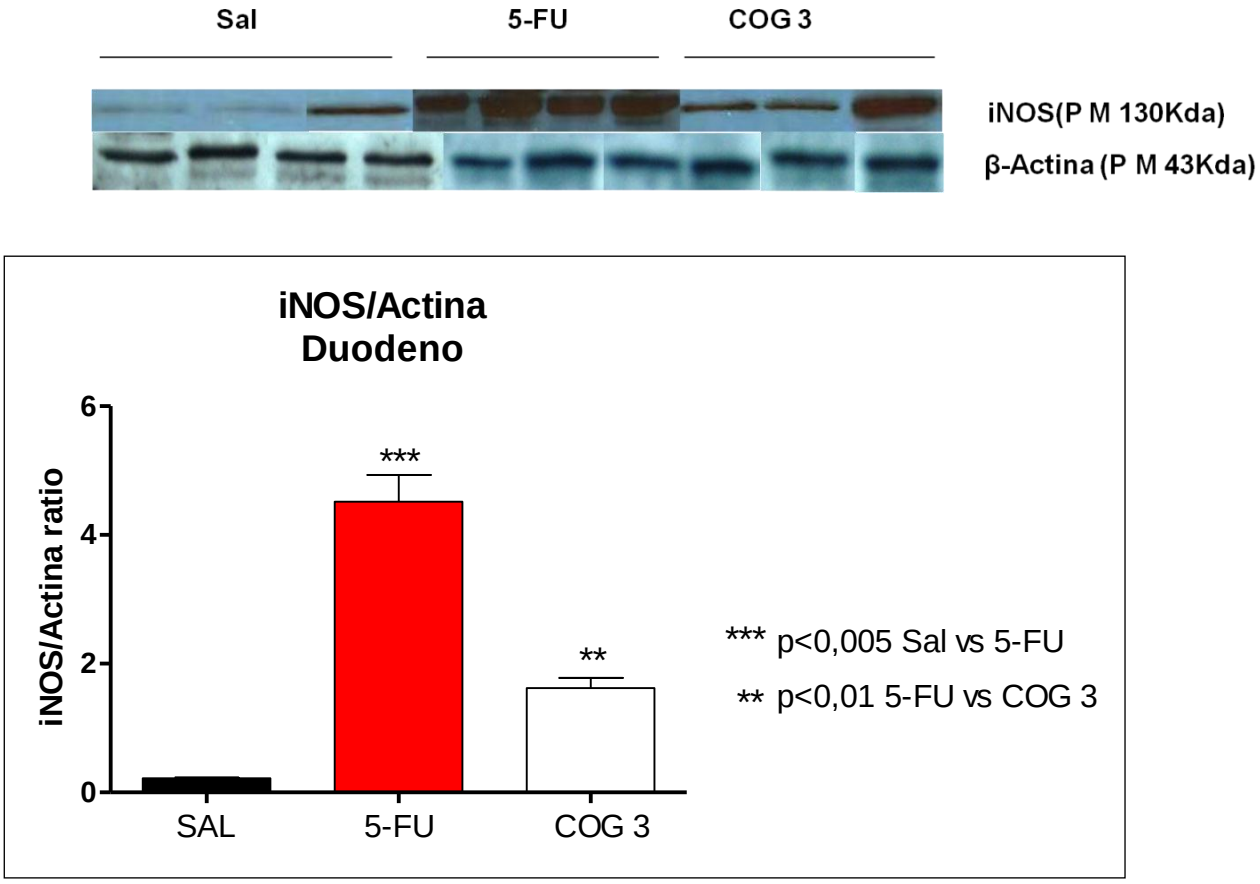
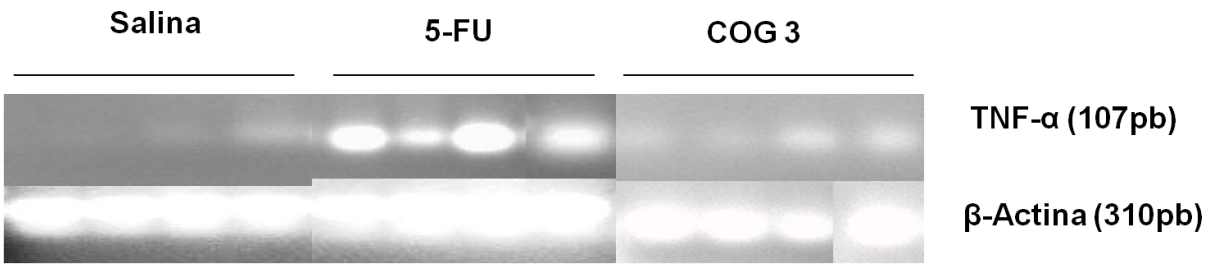


Figura 21. Efeito da administração do peptídeo COG 133 na dose de 3µM do peptídeo mimético da Apolipoproteína E em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU no Western blot para iNOS em duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com COG 133 na dose de 3µM com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,05$). ** Diferença estatística, comparação com animais tratados Salina com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,001$). Número de bandas por grupo igual a quatro.



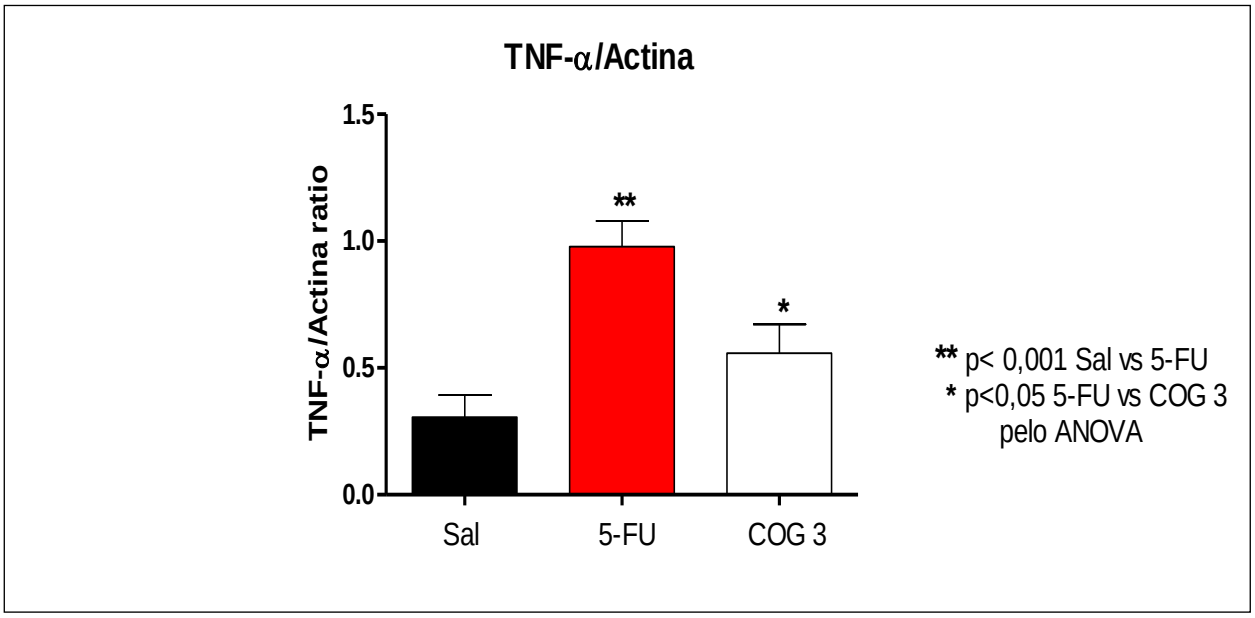


Figura 22. Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E na dose de 3μM, em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU no RT-PCR para TNF-α em duodeno de camundongos Swiss..

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média ± EPM e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com COG 133 na dose de 3μM com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,05$). ** Diferença estatística, comparação com animais tratados Salina com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,001$). Número de bandas por grupo igual a superior a quatro.

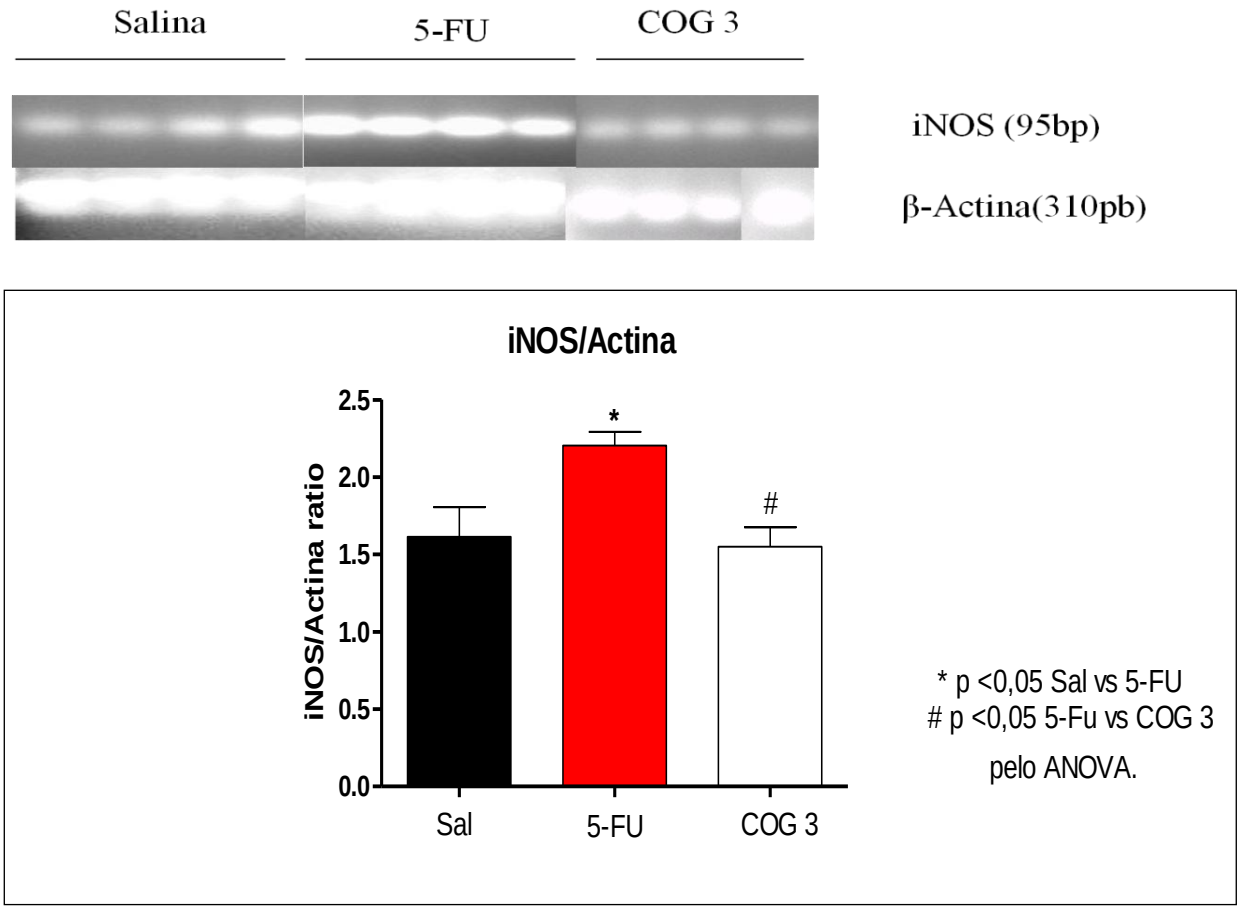


Figura 23. Efeito da administração do peptídeo COG 133 da Apolipoproteína E na dose de 3µM, em camundongos desafiados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU no RT-PCR para iNOS em duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam 5-FU (450 mg/kg) dose única, solução salina 0,9% ou tratamento com COG 133 (i.p.) e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do duodeno (1,0 cm) foram removidos e coletados em freezer a -80°C. Os valores representam a média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA e Bonferroni. * Diferença estatística, comparação com animais tratados com COG 133 na dose de 3µM com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,05$). # Diferença estatística, comparação com animais tratados COG 133 na dose de 3µM com o grupo tratado com 5-FU ($p<0,05$). Número de bandas por grupo igual a quatro.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O 5-FU é dos quimioterápicos mais prescritos na clínica sendo bastante utilizado no combate às doenças malignas, incluindo o carcinoma gastrointestinal, carcinoma de mama e os carcinomas de cabeça e pescoço (MOERTEL, C G et al, 1995). Um dos seus efeitos tóxicos comuns resulta da inibição da divisão celular, especialmente em lugares com elevado *turnover* como na medula óssea e no epitélio gastrointestinal, com efeitos colaterais bem descritos como: mielosupressão, estomatites, mucosite, náusea e diarréia. O trato alimentar sofre a ação citotóxica de fármacos utilizados na terapia anticâncer, tendo como principais achados inflamação, ulceração e sangramentos, que podem ocorrer em diversos trechos do trato gastrointestinal (DUNCAN, M , GRANT,G., 2003).

A arquitetura do tecido epitelial de revestimento no intestino delgado consiste em alguns tipos de células bem descritas que são os enterócitos e as células caliciformes. As células de absorção são as mais numerosas e a sua principal função é a digestão e absorção de nutrientes. As células caliciformes são depois dos enterócitos as células mais numerosas, eles sintetizam e secretam o muco que compõe o glicocálix que cobre a superfície epitelial (SKIPPER, M , LEWIS,J., 2000).

Nossos achados são semelhantes aos publicados na literatura em relação aos danos causados pela terapia com o 5-FU. Trabalhos anteriores (SOARES, P M et al, 2008) demonstraram que ratos tratados com 5-FU apresentaram redução significativa na altura dos vilos ao nível do duodeno, com aumento na vacuolização de células da mucosa intestinal. Foi observada infiltração de células inflamatórias na lâmina própria com perda da arquitetura normal dos vilos e das criptas, bem como a presença de neutrófilos na mucosa e submucosa do duodeno, reforçando os nossos achados nos grupos tratados com 5-FU.

Em contraste com nossos dados, Soares et al. apontaram para um aumento na profundidade das criptas no duodeno dos animais desafiados por 5-FU em ratos Wistar (SOARES, P M et al, 2008). Nossos achados histopatológicos no duodeno mostraram aumento qualitativo da largura da cripta, contudo uma diminuição na sua profundidade, bem como sua desorganização. A diferença entre esses resultados (em relação à profundidade de

cripta) pode ser explicada pela espécie diferente de animais e pela dose utilizada (150 mg/Kg em ratos) em comparação com 450 mg/Kg do 5-FU no nosso modelo.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o 5-FU na dose de 450mg/kg diminuiu a profundidade das criptas, o que foi melhorado de maneira significativa pelo tratamento com o peptídeo COG 133 nas doses de 0,3, 1 e 3μM, sugerindo que a atividade de renovação epitelial da cripta é mais ativa nos grupos experimentais com o peptídeo COG 133, que o grupo tratado apenas com 5-FU. Outros autores (SAEGUSA, Y et al, 2008), demonstraram a importância de substâncias como a mucina que protege a mucosa gastrointestinal contra o processo inflamatório da mucosite após o uso de substâncias como o 5-FU. A quantidade de mucina (que pode ser identificada pelo método do ácido periódico de Shiff, P.A.S) não foi avaliada por esse trabalho, mas é um aspecto que deve ser estudado em nossos próximos experimentos.

Estudos anteriores demonstraram que o mecanismo do 5-FU nas ulcerações e isquemia no intestino dos pacientes se deve a diversos fatores tais como efeitos locais no fluxo sanguíneo da mucosa, efeitos trombogênicos ou ainda efeitos no endotélio vascular (FATA, F et al, 1999). Trabalhos anteriores revelaram grandes áreas de ulceração com formação de tecido granular e quadro de inflamação aguda e crônica na mucosa (FATA, F et al, 1999), corroborando com nosso achado atual em duodeno de camundongos desafiados pela mucosite intestinal.

Trabalhos anteriores também demonstraram que após o 1º dia de tratamento com o 5-FU (150mg/kg via i.p.) houve um aumento na atividade de mieloperoxidase (MPO) em todos os segmentos intestinais de ratos Wistar. Nossos achados demonstraram também um aumento da atividade de mieloperoxidase mensurada após o 4º dia de tratamento com o 5-FU (na dose de 450mg/kg), atividade essa que foi reduzida de maneira estatisticamente significante nos animais tratados com a dose de 3μM do peptídeo da ApoE COG 133, sugerindo uma redução do infiltrado celular inflamatório (SOARES, P M et al, 2008).

Lindsay e colaboradores observaram um aumento em cerca de 75% na atividade de mieloperoxidase em jejuno de ratos após a administração de 5-FU (LINDSAY, R J et al, 2010). Nossos achados mostraram um aumento na atividade da mieloperoxidase em cerca de 3 vezes mais com relação ao controle, o que foi revertido de maneira significativa com a administração do peptídeo COG133 na dose de 3μM em amostras de duodeno de camundongos Swiss.

Trabalhos recentes realizados através de técnicas moleculares como RT-PCR caracterizam bem o papel do 5-Fluoruracil na mielosupressão em modelos animais, pela análise do gene chamado HO-1, que está envolvido no controle da síntese da enzima heme oxigenase que é responsável por degradar a hemobiliverdina em monóxido de carbono e ferro, sendo também um conhecido biomarcador de estresse oxidativo, sendo este fenômeno paralelo à mielotoxicidade, ocasionada pelo 5-FU. Soma-se a isso a depleção do GSH que é uma substância antioxidante, indicando com isso que talvez o mecanismo de mielosupressão do 5-FU seja pela redução do GSH e pelo aumento na expressão do gene HO-1 (NUMAZAWA, S et al, 2010). Em nossos protocolos experimentais, também avaliamos o parâmetro leucometria do sangue periférico, através de câmara de Newbauer, com o intuito de observar a ação mielossupressora do 5-FU, sendo encontrado uma redução significativa no número de leucócitos/mm^3 de sangue, quando comparado ao grupo controle. Avaliando os grupos tratados com o peptídeo ApoE (COG133), obtivemos uma melhora significativa nas doses 0,3, 1 e 3μM nos valores das médias.

Estudos anteriores demonstraram que a mucosite não é somente uma manifestação de alteração estrutural, mas envolve a liberação de citocinas pró-inflamatórias, conforme comprovado em estudos animais e humanos por células imunoinflamatórias. Análises laboratoriais de sangue de pacientes com mucosite encontraram uma elevação nos níveis de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6), que estão associadas à toxicidade da quimioterapia (HALL, P D et al, 1995).

A mucosite induzida por quimioterapia apresenta um quadro inflamatório com aumento na síntese de radicais livres, com inibição da mitose ao nível de cripta e ruptura do contato célula a célula o que ocasiona redução na integridade da barreira intestinal. No quadro de mucosite, os níveis de citocinas tais como IL-1β e TNF-α estão aumentados, promovendo também a sinalização e o conseqüente influxo de células inflamatórias para a mucosa e submucosa a partir dos vasos sanguíneos (SONIS, S T , FEY,E.G., 2002).

No nosso trabalho detectamos um aumento dos níveis das interleucinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α e do mediador inflamatório iNOS, através dos protocolos de Western blot, ELISA, que foi corroborado um aumento do transcrito através do RT-PCR para TNF-α e iNOS, no tecido duodenal após desafio por 5-FU. Além disso, encontramos redução dos níveis da IL-10, uma citocina antiinflamatória no duodeno de camundongos. Esses achados estão em consonância com Sonis et al, que mostraram que camundongos com

infiltrado celular inflamatório apresentam aumento de TNF-α e interleucina-1β em um período de 12-24 h após a administração do 5-Fluoruracil num modelo de mucosite oral (SONIS, S T, 1998).

Trabalhos publicados apontam a IL-1β como sendo uma citocina multifatorial que possui efeito em uma variedade de tipos celulares interagindo com outras citocinas (DINARELLO, C A, 1996). Faz parte também de uma família de citocinas que também incluem a IL-1α e o seu antagonista de receptor IL-1Ra. A IL-1β possui diversos efeitos que têm sido bem demonstrados tanto in vitro como in vivo em situações que incluem reações sistêmicas como febre e o aumento da expressão gênica de uma classe inteira de genes incluindo os mediadores de citocinas pró-inflamatórias tais como fatores microbiológicos e não microbiológicos. Junto da IL-1β, o TNF-α é uma importante citocina envolvida na via de ativação do NF-κβ. Ness sentido, um estudo recente demonstrou que o peptídeo mimético da apoE COG 112 inibiu o processo inflamatório na colite induzida por *Citrobacter rodentium*, prevenindo a ativação do fator NF-κβ (SINGH K et al, 2008).

Nossos resultados apontam uma diferença significativa nas análises dos grupos realizadas via Western blot dos segmentos intestinais de duodedo, no qual se obteve uma expressão basal da IL-1β no grupo controle salina e uma expressão exacerbada dessa citocina no grupo 5-FU (450mg/kg, via i.p., dose única), o que foi parcialmente, mas significativamente diminuída com a administração do peptídeo ApoE (COG133) na dose de 3μM, o que sugere uma ação antiinflamatória do peptídeo COG133, promovendo uma redução da expressão de IL-1β no tecido duodenal. Esse achado é reforçado pela menor infiltrado inflamatório observado na mucosa desses animais.

Nossos resultados apresentaram um aumento significativo nos níveis de citocinas pro inflamatórias tais como IL-1β, TNF-α e ainda a dosagem de mieloperoxidase no tecido duodenal. Trabalhos anteriores através de técnicas como a de RT-PCR demonstraram o aumento na expressão do transcrito para IL-1β em jejuno de camundongo (ONG, Z Y et al, 2010). O TNF-α foi inicialmente isolado de soro de camundongo após exposição a endotoxina bacteriana (CARSWELL, E A et al, 1975), subseqüente a esta descoberta surgiu a evidência de que esta proteína pertence a uma família de proteínas que promovem benefícios tendo um papel protetor imune e inflamatório na resposta contra infecções e na manutenção da resposta dos órgãos linfóides (HEHLGANS, T , PFEFFER,K., 2005). Outros trabalhos têm por outro lado demonstrado, que o TNF também tem um papel prejudicial ao hospedeiro no contexto da

sepse e doenças auto-imunes como a artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (DII) (HEHLGANS, T , PFEFFER,K., 2005; LORENZ, H M , KALDEN,J.R., 2002)

O fator de necrose tumoral é predominantemente expresso em macrófagos ativados, células NK e linfócitos T. Os dois receptores para TNF são expressos em todas as células (TNF-R1) ou em células imunes ou endoteliais (TNF-R2). O TNF através da interação com o receptor TNF-R1 causa vários eventos celulares, incluindo a ativação da cascata das caspases o que leva à apoptose. A interação do TNF com o TNF-R1 também leva à ativação de NF-κB e a sinalização de TNF-R2 está menos bem caracterizado, no entanto, é sabido que este receptor não possui um domínio de apoptose e não pode, portanto, deflagrar o processo de apoptose diretamente. Além de induzir a forma clássica da apoptose o TNF também pode induzir a necrose do tipo caspase independente. Clinicamente, tem sido demonstrado que o aumento dos níveis séricos de TNF ocorre em pacientes que se submeteram a transplante de medula óssea, estando este evento precedido as complicações possivelmente de reações inflamatórias decorrentes do transplante (BIANCO, J A et al, 1991). Outros trabalhos tem relacionado a elevação do TNF-α com toxicidades não hematológicas de onde a inibição da expressão de TNF-α como pelo uso da pentoxifilina reduzam essas manifestações não hematológicas (SLEIJFER, S et al, 1998).

Trabalhos atuais realizados em jejuno de ratos têm encontrado diferença significativa na expressão de IL1-β e TNF-α quando comparados aos animais controles. Quando o gene analisado foi a IL-1β obtiveram maiores níveis de expressão nos grupos de animais que desenvolveram mucosite intestinal através de radioterapia (ONG, Z Y et al, 2010).

Estudos de Lynch e colaboradores demonstraram que a administração do peptídeo COG 133 em animais desafiados pela inflamação causada pela injeção de LPS bacteriano intraperitoneal demonstraram uma significante redução nos níveis séricos de TNF-α após uma hora, nos tempos de 1 e 3 horas em animais camundongos selvagens C57b6/J (LYNCH, et al, 2003), o efeito antiinflamatório foi similar no cérebro quando foi administrada uma injeção de peptídeo COG 133 e obteve-se uma redução na expressão de RNAm do TNF-α após 3 horas da injeção de LPS. No caso da fase ulcerativa do processo de lesão tecidual, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e subsequente dano tecidual. Lima et al. demonstrou, utilizando um modelo animal em hamster que a administração de pentoxifilina e talidomida, os quais inibem a síntese de citocinas, diante da mucosite induzida por 5-FU, tem um efeito protetor. Estes autores concluíram que o TNF possui um papel importante na patofisiologia de

mucosite oral induzida por 5- FU. Nossos achados demonstraram que ocorreu um aumento significativo nos níveis de TNF-α detectados por ELISA, Western blot e RT-PCR quando foi administrado o 5-FU, o que foi diminuído nos grupos que foi administrado o peptídeo COG 133 na dose de 3μM, havendo uma redução estatisticamente significante na expressão dessa citocina em duodeno de camundongos desafiados pela mucosite induzida pelo 5-Fluoruracil.

Colton e cols. demonstraram que a presença do gene APOE4 promove um aumento na produção de NO por macrófagos isolados em modelos de Alzheimer em ratos pela ativação dos transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) de maneira que a produção de NO pela microglia pode confirmar o estado "upergulado" do sistema imune inato (COLTON, C. A. et al, 2002.), nosso resultados de Western blot, RT-PCR apontam para uma elevação nos níveis de iNOS quando foi administrado o 5-Fluoruracil o que foi diminuído após administração do peptídeo COG 133.

Estudos de Hoane et al. em modelos de injúria cerebral demonstraram uma melhora nos resultados dos testes cognitivos quando administrado o peptídeo em modelos de injúria cerebral em ratos, o peptídeo demonstrou de forma dose-dependente especialmente na dose de 0,8 mg/kg de COG 1410 uma melhora na recuperação dos animais após injúria cerebral (HOANE, et al., 2006).

Dessa forma sugerimos então que o peptídeo COG 133 tem potencial de reduzir a expressão das citocinas pró-inflamatórias em amostras de duodeno de camundongos submetidos ao desafio com 5-FU, no entanto mais estudos são necessários para corroborar com o nosso achado para que possibilite a geração de ensaios clínicos em humanos, como perspectiva de melhora dos efeitos colaterais da quimio/radioterapia tais como a mucosite.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

A administração do peptídeo mimético da apoE (COG133) reduziu a lesão induzida por 5-FU, melhorando de forma significativa a altura de vilos e profundidade de criptas.

A administração do peptídeo mimético COG133 da apoE reduziu significativamente os níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α, dosadas por ELISA no duodeno de animais desafiados pelo 5-FU.

A administração do peptídeo mimético COG 133 da apoE aumentou de maneira significativa os níveis teciduais da citocina antiinflamatória IL-10 no duodeno mensurada por ELISA.

A administração do peptídeo mimético COG133 da apoE reduziu de forma significativa os níveis de MPO no duodeno e íleo de animais desafiados pelo 5-FU.

A administração do peptídeo mimético COG 133 da apoE diminuiu de maneira significativa a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, iNOS e TNF-α no duodeno mensurada por Western blot.

A administração do peptídeo mimético COG 133 da apoE diminuiu de maneira significativa a expressão do transcrito primário (RNAm) das citocinas pró-inflamatórias iNOS e TNF-α no duodeno mensurada por RT-PCR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados sugerem o uso do peptídeo mimético da apoE (COG 133) no tratamento da mucosite intestinal em ensaios clínicos.

Mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos de ação e vias de sinalização envolvidas no efeito protetor anti-inflamatório do peptídeo ApoE na mucosite intestinal

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

ALEXANDER,D.M., WILLIAMS, L. M., GATT, J. M., DOBSON-STONE, C., KUAN, S. A., TODD, E. G., SCHOFIELD, P. R., COOPER, N. J., GORDON, E. The contribution of apolipoprotein E alleles on cognitive performance and dynamic neural activity over six decades. **Biol Psychol**. v. 75, n. 3, p. 229-238, 2007.

ALMEIDA,O.P. , SHIMOKOMAKI, C. M. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in Sao Paulo-Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 55, n. 1, p. 1-7, 1997.

ALVAREZ-ARCAYA,A., COMBARROS, O., LLORCA, J., SANCHEZ-GUERRA, M., BERCIANO, J., FERNANDEZ-LUNA, J. L. The --491 TT apolipoprotein E promoter polymorphism is associated with reduced risk for sporadic Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**. v. 304, n. 3, p. 204-208, 2001.

ATTIE,A.D., KASTELEIN, J. P., HAYDEN, M. R. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. **J Lipid Res**. v. 42, n. 11, p. 1717-1726, 2001.

AYBEK,H., ERCAN, F., ASLAN, D., SAHINER, T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. **Clin Biochem**. v. 40, n. 3-4, p. 172-176, 2007.

BACH-NGOHOU,K., NAZIH, H., NAZIH-SANDERSON, F., ZAIR, Y., LE, C. D., KREMPF, M., BARD, J. M. Negative and independent influence of apolipoprotein E on C-reactive protein (CRP) concentration in obese adults. Potential anti-inflammatory role of apoE in vivo. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 25, n. 12, p. 1752-1758, 2001.

BIANCO,J.A., APPELBAUM, F. R., NEMUNAITIS, J., ALMGREN, J., ANDREWS, F., KETTNER, P., SHIELDS, A., SINGER, J. W. Phase I-II trial of pentoxifylline for the

prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. **Blood**. v. 78, n. 5, p. 1205-1211, 1991.

BOWEN,J.M., GIBSON, R. J., CUMMINS, A. G., KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer**. v. 14, n. 7, p. 713-731, 2006.

BRITO,G.A., CARNEIRO-FILHO, B., ORIA, R. B., DESTURA, R. V., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig Dis Sci**. v. 50, n. 7, p. 1271-1278, 2005.

BUSHEN,O.Y., DAVENPORT, J. A., LIMA, A. B., PISCITELLI, S. C., UZGIRIS, A. J., SILVA, T. M., LEITE, R., KOSEK, M., DILLINGHAM, R. A., GIRAO, A., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Diarrhea and reduced levels of antiretroviral drugs: improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in northeast Brazil. **Clin Infect Dis**. v. 38, n. 12, p. 1764-1770, 2004.

CARNEIRO,B.A., FUJII, J., BRITO, G. A., ALCANTARA, C., ORIA, R. B., LIMA, A. A., OBRIG, T., GUERRANT, R. L. Caspase and bid involvement in Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infect Immun**. v. 74, n. 1, p. 81-87, 2006.

CARNEIRO-FILHO,B.A., BUSHEN, O. Y., BRITO, G. A., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Glutamine Analogues As Adjunctive Therapy for Infectious Diarrhea. **Curr Infect Dis Rep**. v. 5, n. 2, p. 114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO,B.A., ORIA, R. B., WOOD, R. K., BRITO, G. A., FUJII, J., OBRIG, T., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluoruracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**. v. 20, n. 10, p. 934-941, 2004.

CARSWELL,E.A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N., WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

COLTON,C.A., BROWN, C. M., COOK, D., NEEDHAM, L. K., XU, Q., CZAPIGA, M., SAUNDERS, A. M., SCHMECHEL, D. E., RASHEED, K., VITEK, M. P. APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. **Neurobiol Aging**. v. 23, n. 5, p. 777-785, 2002.

COOPER,A.D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **J Lipid Res**. v. 38, n. 11, p. 2173-2192, 1997.

DIASIO,R.B. , HARRIS, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluoruracil. **Clin Pharmacokinet**. v. 16, n. 4, p. 215-237, 1989.

DINARELLO,C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DOUILLARD,J.Y., CUNNINGHAM, D., ROTH, A. D., NAVARRO, M., JAMES, R. D., KARASEK, P., JANDIK, P., IVESON, T., CARMICHAEL, J., ALAKL, M., GRUIA, G., AWAD, L., ROUGIER, P. Irinotecan combined with fluoruracil compared with fluoruracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **Lancet**. v. 355, n. 9209, p. 1041-1047, 2000.

DOUILLARD,J.Y., HOFF, P. M., SKILLINGS, J. R., EISENBERG, P., DAVIDSON, N., HARPER, P., VINCENT, M. D., LEMBERSKY, B. C., THOMPSON, S., MANIERO, A., BENNER, S. E. Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluoruracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**. v. 20, n. 17, p. 3605-3616, 2002.

DUNCAN,M. , GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 18, n. 9, p. 853-874, 2003.

DURRINGTON,P.N. The future of coronary heart disease prevention. **Clin Med**. v. 7, n. 5, p. 525-526, 2007.

EADEN,J.A., ABRAMS, K. R., MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**. v. 48, n. 4, p. 526-535, 2001.

EICHNER,J.E., DUNN, S. T., PERVEEN, G., THOMPSON, D. M., STEWART, K. E., STROEHLA, B. C. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. **Am J Epidemiol**. v. 155, n. 6, p. 487-495, 2002.

FATA,F., RON, I. G., KEMENY, N., O'REILLY, E., KLIMSTRA, D., KELSEN, D. P. 5-fluoruracil-induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma. **Cancer**. v. 86, n. 7, p. 1129-1134, 1999.

FERGUSON,S., MOUZON, B., KAYIHAN, G., WOOD, M., POON, F., DOORE, S., MATHURA, V., HUMPHREY, J., O'STEEN, B., HAYES, R., ROSES, A., MULLAN, M., CRAWFORD, F. Apolipoprotein E genotype and oxidative stress response to traumatic brain injury. **Neuroscience**. v. 168, n. 3, p. 811-819, 2010.

FIOCCHI,C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**. v. 115, n. 1, p. 182-205, 1998.

FULLERTON,S.M., SHIRMAN, G. A., STRITTMATTER, W. J., MATTHEW, W. D. Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. **Exp Neurol**. v. 169, n. 1, p. 13-22, 2001.

GAY,E.A., KLEIN, R. C., YAKEL, J. L. Apolipoprotein E-derived peptides block alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in xenopus oocytes. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 316, n. 2, p. 835-842, 2006.

GHOSHAL,K. , JACOB, S. T. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluoruracil. **Cancer Res**. v. 54, n. 3, p. 632-636, 1994.

GOZAL,D., CAPDEVILA, O. S., KHEIRANDISH-GOZAL, L., CRABTREE, V. M. APOE epsilon 4 allele, cognitive dysfunction, and obstructive sleep apnea in children. **Neurology**. v. 69, n. 3, p. 243-249, 2007.

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

HEHLGANS,T. , PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**. v. 115, n. 1, p. 1-20, 2005.

HOANE,M.R., GILBERT, D. R., HOLLAND, M. A., PIERCE, J. L. Nicotinamide reduces acute cortical neuronal death and edema in the traumatically injured brain. **Neurosci Lett**. v. 408, n. 1, p. 35-39, 2006.

HOOPER,A.J., VAN BOCKXMEER, F. M., BURNETT, J. R. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v. 42, n. 5-6, p. 515-545, 2005.

HUFF,M.W., POLLEX, R. L., HEGELE, R. A. NPC1L1: evolution from pharmacological target to physiological sterol transporter. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 26, n. 11, p. 2433-2438, 2006.

HURTADO,D.E., MOLINA-PORCEL, L., IBA, M., ABOAGYE, A. K., PAUL, S. M., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. A{beta} Accelerates the Spatiotemporal Progression of Tau Pathology and Augments Tau Amyloidosis in an Alzheimer Mouse Model. **Am J Pathol**. 2010.

IGNATIUS,M.J., GEBICKE-HARTER, P. J., SKENE, J. H., SCHILLING, J. W., WEISGRABER, K. H., MAHLEY, R. W., SHOOTER, E. M. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 83, n. 4, p. 1125-1129, 1986.

JOFRE-MONSENY,L., MINIHANE, A. M., RIMBACH, G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. **Mol Nutr Food Res**. v. 52, n. 1, p. 131-145, 2008.

JOHNSTON,P.G. , KAYE, S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. **Anticancer Drugs**. v. 12, n. 8, p. 639-646, 2001.

KAMANGAR,F., DORES, G. M., ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol**. v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

KHARRAZI,H., VAISI-RAYGANI, A., RAHIMI, Z., TAVILANI, H., AMINIAN, M., POURMOTABBED, T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. **Clin Biochem**. v. 41, n. 12, p. 932-936, 2008.

KITAGAWA,K., MATSUMOTO, M., KUWABARA, K., TAKASAWA, K., TANAKA, S., SASAKI, T., MATSUSHITA, K., OHTSUKI, T., YANAGIHARA, T., HORI, M. Protective effect of apolipoprotein E against ischemic neuronal injury is mediated through antioxidant action. **J Neurosci Res**. v. 68, n. 2, p. 226-232, 2002.

KULAYLAT,M.N. , DAYTON, M. T. Ulcerative colitis and cancer. **J Surg Oncol**. v. 101, n. 8, p. 706-712, 2010.

KUSUHARA,H. , SUGIYAMA, Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). **Pflugers Arch**. v. 453, n. 5, p. 735-744, 2007.

LADU,M.J., REARDON, C., VAN, E. L., FAGAN, A. M., BU, G., HOLTZMAN, D., GETZ, G. S. Lipoproteins in the central nervous system. **Ann N Y Acad Sci**. v. 903, n.p. 167-175, 2000.

LASKOWITZ,D.T., MCKENNA, S. E., SONG, P., WANG, H., DURHAM, L., YEUNG, N., CHRISTENSEN, D., VITEK, M. P. COG1410, a novel apolipoprotein E-based peptide, improves functional recovery in a murine model of traumatic brain injury. **J Neurotrauma**. v. 24, n. 7, p. 1093-1107, 2007.

LASKOWITZ,D.T., THEKDI, A. D., THEKDI, S. D., HAN, S. K., MYERS, J. K., PIZZO, S. V., BENNETT, E. R. Downregulation of microglial activation by apolipoprotein E and apoE-mimetic peptides. **Exp Neurol**. v. 167, n. 1, p. 74-85, 2001.

LEITAO,R.F., RIBEIRO, R. A., LIRA, A. M., SILVA, L. R., BELLAGUARDA, E. A., MACEDO, F. D., SOUSA, R. B., BRITO, G. A. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluoruracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 61, n. 2, p. 215-222, 2008.

LENZ,G. Transient oncogenes. **Med Hypotheses**. 2010.

LEVITZKI,A. , KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Mol Aspects Med**. 2010a.

LEVITZKI,A. , KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Mol Aspects Med**. 2010b.

LEVY,E., SPAHIS, S., SINNETT, D., PERETTI, N., MAUPAS-SCHWALM, F., DELVIN, E., LAMBERT, M., LAVOIE, M. A. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. **Curr Opin Lipidol**. v. 18, n. 3, p. 310-318, 2007.

LI,F.Q., SEMPOWSKI, G. D., MCKENNA, S. E., LASKOWITZ, D. T., COLTON, C. A., VITEK, M. P. Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 318, n. 3, p. 956-965, 2006a.

LI,F.Q., SEMPOWSKI, G. D., MCKENNA, S. E., LASKOWITZ, D. T., COLTON, C. A., VITEK, M. P. Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 318, n. 3, p. 956-965, 2006b.

LIMA,A.A., BRITO, L. F., RIBEIRO, H. B., MARTINS, M. C., LUSTOSA, A. P., ROCHA, E. M., LIMA, N. L., MONTE, C. M., GUERRANT, R. L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 40, n. 1, p. 28-35, 2005.

LINDSAY,R.J., GEIER, M. S., YAZBECK, R., BUTLER, R. N., HOWARTH, G. S. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. **Br J Nutr**.p. 1-7, 2010.

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

LORENZ,H.M. , KALDEN, J. R. Perspectives for TNF-alpha-targeting therapies. **Arthritis Res**. v. 4 Suppl 3, n.p. S17-S24, 2002.

LYNCH,J.R., MORGAN, D., MANCE, J., MATTHEW, W. D., LASKOWITZ, D. T. Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response. **J Neuroimmunol**. v. 114, n. 1-2, p. 107-113, 2001.

MACDONALD,H.M., MCGUIGAN, F. E., LANHAM-NEW, S. A., FRASER, W. D., RALSTON, S. H., REID, D. M. Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. **Am J Clin Nutr**. v. 87, n. 5, p. 1513-1520, 2008.

MAHLEY,R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**. v. 240, n. 4852, p. 622-630, 1988.

MAHLEY,R.W., HUANG, Y., WEISGRABER, K. H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. **J Clin Invest**. v. 116, n. 5, p. 1226-1229, 2006.

MAHLEY,R.W. , JI, Z. S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. **J Lipid Res**. v. 40, n. 1, p. 1-16, 1999.

MANGENEY,M., CARDOT, P., LYONNET, S., COUPE, C., BENAROUS, R., MUNNICH, A., GIRARD, J., CHAMBAZ, J., BEREZIAT, G. Apolipoprotein-E-gene expression in rat liver during development in relation to insulin and glucagon. **Eur J Biochem**. v. 181, n. 1, p. 225-230, 1989.

MARCOURAKIS,T., BAHIA, V. S., KAWAMOTO, E. M., MUNHOZ, C. D., GORJAO, R., ARTES, R., KOK, F., CARAMELLI, P., NITRINI, R., CURI, R., SCAVONE, C. Apolipoprotein E genotype is related to nitric oxide production in platelets. **Cell Biochem Funct**. v. 26, n. 8, p. 852-858, 2008.

MAZUR-KOLECKA,B., DICKSON, D., FRACKOWIAK, J. Induction of vascular amyloidosis-beta by oxidative stress depends on APOE genotype. **Neurobiol Aging**. v. 27, n. 6, p. 804-814, 2006.

MCARRON,M.O., MUIR, K. W., WEIR, C. J., DYKER, A. G., BONE, I., NICOLL, J. A., LEES, K. R. The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. **Stroke**. v. 29, n. 9, p. 1882-1887, 1998.

MCCARRON,M.O., HOFFMANN, K. L., DELONG, D. M., GRAY, L., SAUNDERS, A. M., ALBERTS, M. J. Intracerebral hemorrhage outcome: apolipoprotein E genotype, hematoma, and edema volumes. **Neurology**. v. 53, n. 9, p. 2176-2179, 1999.

METHIA,N., ANDRE, P., HAFEZI-MOGHADAM, A., ECONOMOPOULOS, M., THOMAS, K. L., WAGNER, D. D. ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. **Mol Med**. v. 7, n. 12, p. 810-815, 2001.

MOERTEL,C.G., FLEMING, T. R., MACDONALD, J. S., HALLER, D. G., LAURIE, J. A., TANGEN, C. M., UNGERLEIDER, J. S., EMERSON, W. A., TORMEY, D. C., GLICK, J. H., VEEDER, M. H., MAILLIARD, J. A. Fluoruracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. **Ann Intern Med**. v. 122, n. 5, p. 321-326, 1995.

MORI,K., YOKOYAMA, A., YANG, L., YANG, L., MAEDA, N., MITSUDA, N., TANAKA, J. L-serine-mediated release of apolipoprotein E and lipids from microglial cells. **Exp Neurol**. v. 185, n. 2, p. 220-231, 2004.

MYANT,N.B. Cholesterol transport through the plasma. **Clin Sci (Lond)**. v. 62, n. 3, p. 261-271, 1982.

NAGAHAMA,S., KORENAGA, D., HONDA, M., INUTSUKA, S., SUGIMACHI, K. Assessment of the intestinal permeability after a gastrectomy and the oral administration of anticancer drugs in rats: nitric oxide release in response to gut injury. **Surgery**. v. 131, n. 1 Suppl, p. S92-S97, 2002.

NASCIMENTO,S.B., SOUSA, R. B., MARTINS, M. J., SOUZA, G. A., SOUZA, M. H., GUERRANT, R. L., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A., BRITO, G. A. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or Clostridium difficile toxin A in rats. **Immunology**. v. 116, n. 3, p. 328-336, 2005.

NIEMI,M., HAKKINEN, T., KARTTUNEN, T. J., ESKELINEN, S., KERVINEN, K., SAVOLAINEN, M. J., LEHTOLA, J., MAKELA, J., YLA-HERTTUALA, S., KESANIEMI, Y. A. Apolipoprotein E and colon cancer. Expression in normal and malignant human intestine and effect on cultured human colonic adenocarcinoma cells. **Eur J Intern Med**. v. 13, n. 1, p. 37-43, 2002.

NISHIMOTO,N. , KISHIMOTO, T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Curr Opin Pharmacol**. v. 4, n. 4, p. 386-391, 2004.

NUMAZAWA,S., SUGIHARA, K., MIYAKE, S., TOMIYAMA, H., HIDA, A., HATSUNO, M., YAMAMOTO, M., YOSHIDA, T. Possible Involvement of Oxidative Stress in 5-Fluoruracil-Mediated Myelosuppression in Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2010.

OLOFSSON,S.O., STILLEMARK-BILLTON, P., ASP, L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. **Trends Cardiovasc Med**. v. 10, n. 8, p. 338-345, 2000.

ONG,Z.Y., GIBSON, R. J., BOWEN, J. M., STRINGER, A. M., DARBY, J. M., LOGAN, R. M., YEOH, A. S., KEEFE, D. M. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Radiat Oncol**. v. 5, n.p. 22-2010.

ORIA,R.B., PATRICK, P. D., BLACKMAN, J. A., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. **Med Hypotheses**. v. 68, n. 5, p. 1099-1107, 2007a.

ORIA,R.B., PATRICK, P. D., BLACKMAN, J. A., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. **Med Hypotheses**. v. 68, n. 5, p. 1099-1107, 2007b.

ORIA,R.B., PATRICK, P. D., ZHANG, H., LORNTZ, B., DE CASTRO COSTA, C. M., BRITO, G. A., BARRETT, L. J., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. **Pediatr Res**. v. 57, n. 2, p. 310-316, 2005.

PEROUTKA,S.J. , DREON, D. M. The value of genotyping for apolipoprotein E alleles in relation to vitamin E supplementation. **Eur J Pharmacol**. v. 410, n. 2-3, p. 161-163, 2000.

PETERSON,D.E., BENSADOUN, R. J., ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Ann Oncol**. v. 21 Suppl 5, n.p. v261-v265, 2010.

POIRIER,J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. **Trends Neurosci**. v. 17, n. 12, p. 525-530, 1994.

PULIDO,R., JIMENEZ-ESCRIG, A., ORENSANZ, L., SAURA-CALIXTO, F., JIMENEZ-ESCRIG, A. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. **Eur J Neurol**. v. 12, n. 7, p. 531-535, 2005.

RADPARVAR,S., HOUGHTON, P. J., HOUGHTON, J. A. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. **Biochem Pharmacol**. v. 38, n. 2, p. 335-342, 1989.

RAYGANI,A.V., RAHIMI, Z., KHARAZI, H., TAVILANI, H., POURMOTABBED, T. Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**. v. 408, n. 1, p. 68-72, 2006.

REISHER,S.R., HUGHES, T. E., ORDOVAS, J. M., SCHAEFER, E. J., FEINSTEIN, S. I. Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 90, n. 12, p. 5757-5761, 1993.

RHOADS,J.M., CHEN, W., GOOKIN, J., WU, G. Y., FU, Q., BLIKSLAGER, A. T., RIPPE, R. A., ARGENZIO, R. A., CANCE, W. G., WEAVER, E. M., ROMER, L. H. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. **Gut**. v. 53, n. 4, p. 514-522, 2004.

RIPOLLES,P.B., NAZIH, H., BOURREILLE, A., SEGAIN, J. P., HUVELIN, J. M., GALMICHE, J. P., BARD, J. M. Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. **Metabolism**. v. 55, n. 7, p. 980-988, 2006.

RIPOLLES,P.B., NAZIH, H., NEUNLIST, M., HUVELIN, J. M., BARD, J. M. Effect of LPS on basal and induced apo E secretion by 25-OH chol and 9cRA in differentiated CaCo-2. **J Cell Biochem**. v. 91, n. 4, p. 786-795, 2004.

SAEGUSA,Y., ICHIKAWA, T., IWAI, T., GOSO, Y., IKEZAWA, T., NAKANO, M., SHIKAMA, N., SAIGENJI, K., ISHIHARA, K. Effects of acid antisecretory drugs on mucus barrier of the rat against 5-fluoruracil-induced gastrointestinal mucositis. **Scand J Gastroenterol**. v. 43, n. 5, p. 531-537, 2008.

SCHILLING,A.F., SCHINKE, T., MUNCH, C., GEBAUER, M., NIEMEIER, A., PRIEMEL, M., STREICHERT, T., RUEGER, J. M., AMLING, M. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. **J Bone Miner Res**. v. 20, n. 2, p. 274-282, 2005.

SKIPPER,M. , LEWIS, J. Getting to the guts of enteroendocrine differentiation. **Nat Genet**. v. 24, n. 1, p. 3-4, 2000.

SLEIJFER,S., VUJASKOVIC, Z., LIMBURG, P. C., SCHRAFFORDT, K. H., MULDER, N. H. Induction of tumor necrosis factor-alpha as a cause of bleomycin-related toxicity. **Cancer**. v. 82, n. 5, p. 970-974, 1998.

SOARES,P.M., MOTA, J. M., GOMES, A. S., OLIVEIRA, R. B., ASSREUY, A. M., BRITO, G. A., SANTOS, A. A., RIBEIRO, R. A., SOUZA, M. H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluoruracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.

SONG,Y., STAMPFER, M. J., LIU, S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. **Ann Intern Med**. v. 141, n. 2, p. 137-147, 2004.

SONIS,S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol**. v. 34, n. 1, p. 39-43, 1998.

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

SONIS,S.T., PETERSON, R. L., EDWARDS, L. J., LUCEY, C. A., WANG, L., MASON, L., LOGIN, G., YMAMKAWA, M., MOSES, G., BOUCHARD, P., HAYES, L. L.,

BEDROSIAN, C., DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol**. v. 36, n. 4, p. 373-381, 2000.

SPECTOR,T., CAO, S., RUSTUM, Y. M., HARRINGTON, J. A., PORTER, D. J. Attenuation of the antitumor activity of 5-fluoruracil by (R)-5-fluoro-5,6-dihydrouracil. **Cancer Res**. v. 55, n. 6, p. 1239-1241, 1995.

STEWART,R., RUSS, C., RICHARDS, M., BRAYNE, C., LOVESTONE, S., MANN, A. Depression, APOE genotype and subjective memory impairment: a cross-sectional study in an African-Caribbean population. **Psychol Med**. v. 31, n. 3, p. 431-440, 2001.

STRITTMATTER,W.J. , BOVA, H. C. Molecular biology of apolipoprotein E. **Curr Opin Lipidol**. v. 13, n. 2, p. 119-123, 2002.

TAKAHASHI,T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. **J Gastroenterol**. v. 38, n. 5, p. 421-430, 2003.

TANGIRALA,R.K., PRATICO, D., FITZGERALD, G. A., CHUN, S., TSUKAMOTO, K., MAUGEAIS, C., USHER, D. C., PURE, E., RADER, D. J. Reduction of isoprostanes and regression of advanced atherosclerosis by apolipoprotein E. **J Biol Chem**. v. 276, n. 1, p. 261-266, 2001.

THOMAS,S., RAMACHANDRAN, A., PATRA, S., VIDYASAGAR, S., BALASUBRAMANIAN, K. A. Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. **J Surg Res**. v. 99, n. 1, p. 25-32, 2001.

VEMURI,P., WISTE, H. J., WEIGAND, S. D., KNOPMAN, D. S., SHAW, L. M., TROJANOWSKI, J. Q., AISEN, P. S., WEINER, M., PETERSEN, R. C., JACK, C. R., Jr. Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease. **Ann Neurol**. v. 67, n. 3, p. 308-316, 2010.

WANG,D.Q. Regulation of intestinal cholesterol absorption. **Annu Rev Physiol**. v. 69, n.p. 221-248, 2007.

WANG,H., DURHAM, L., DAWSON, H., SONG, P., WARNER, D. S., SULLIVAN, P. M., VITEK, M. P., LASKOWITZ, D. T. An apolipoprotein E-based therapeutic improves outcome and reduces Alzheimer's disease pathology following closed head injury: evidence of pharmacogenomic interaction. **Neuroscience**. v. 144, n. 4, p. 1324-1333, 2007.

WANG,J., ALBERTSON, C. M., ZHENG, H., FINK, L. M., HERBERT, J. M., HAUER-JENSEN, M. Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. **Thromb Haemost**. v. 87, n. 1, p. 122-128, 2002.

WARDWELL,N.R. , MASSION, P. P. Novel strategies for the early detection and prevention of lung cancer. **Semin Oncol**. v. 32, n. 3, p. 259-268, 2005.

WEINSTEIN,I.B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. **Science**. v. 297, n. 5578, p. 63-64, 2002.

WEISGRABER,K.H., RALL, S. C., Jr., MAHLEY, R. W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. **J Biol Chem**. v. 256, n. 17, p. 9077-9083, 1981.

WERNER,C. , ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth**. v. 99, n. 1, p. 4-9, 2007.

WRIGHT,R.O., HU, H., SILVERMAN, E. K., TSAIH, S. W., SCHWARTZ, J., BELLINGER, D., PALAZUELOS, E., WEISS, S. T., HERNANDEZ-AVILA, M. Apolipoprotein E genotype predicts 24-month bayley scales infant development score. **Pediatr Res**. v. 54, n. 6, p. 819-825, 2003.

XU,P.T., GILBERT, J. R., QIU, H. L., ERVIN, J., ROTHROCK-CHRISTIAN, T. R., HULETTE, C., SCHMECHEL, D. E. Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. **Am J Pathol**. v. 154, n. 2, p. 601-611, 1999.

ZECHNER,R., MOSER, R., NEWMAN, T. C., FRIED, S. K., BRESLOW, J. L. Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. **J Biol Chem**. v. 266, n. 16, p. 10583-10588, 1991.

ZELENY,M., SWERTFEGER, D. K., WEISGRABER, K. H., HUI, D. Y. Distinct apolipoprotein E isoform preference for inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation. **Biochemistry**. v. 41, n. 39, p. 11820-11823, 2002.

ANEXOS

PUBLICAÇÃO

BRAZILIAN JOURNAL
OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH
www.bjournal.com.br

ISSN 0100-879X
Volume 43 (03) 226-324 March 2010

BIOMEDICAL SCIENCES
AND
CLINICAL INVESTIGATION

Braz J Med Biol Res, March 2010, Volume 43(3) 249-256

ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children

R.B. Oriá, P.D. Patrick, M.O.B. Oriá, B. Lorntz, M.R. Thompson, O.G.R. Azevedo, R.N.B. Lobo, R.F. Pinkerton, R.L. Guerrant and A.A.M. Lima

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is partially financed by

CNPq Ministério da Ciência e Tecnologia CAPES Ministério da Educação BRASIL UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL FAPESP

Institutional Sponsors

SciELO USP USP Campus Ribeirão Preto Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FAEPA HCFMRP AFIP UNICAMP SHIMADZU GE Healthcare

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2010) 43: 249-256
ISSN 0100-879X

ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children

R.B. Oriá[3,4], P.D. Patrick[2], M.O.B. Oriá[5], B. Lorntz[4], M.R. Thompson[1], O.G.R. Azevedo[4], R.N.B. Lobo[6], R.F. Pinkerton[1], R.L. Guerrant[1,4] and A.A.M. Lima[1,4]

[1]Center for Global Health, School of Medicine, [2]Kluge Children's Rehabilitation and Research Center, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA
[3]Departamento de Morfologia, [4]Instituto de Biomedicina do Semi-árido Brasileiro (IBISAB), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil
[5]Departamento de Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil
[6]Centro de Pesquisa da EMPRAPA, Sobral, CE, Brasil

Abstract

A series of studies have shown that the heavy burdens of diarrheal diseases in the first 2 formative years of life in children living in urban shanty towns have negative effects on physical and cognitive development lasting into later childhood. We have shown that APOE4 is relatively common in shanty town children living in Brazil (13.4%) and suggest that APOE4 has a protective role in cognitive development as well as weight-for-height in children with heavy burdens of diarrhea in early childhood (64/123; 52%), despite being a marker for cognitive decline with Alzheimer's and cardiovascular diseases later in life. APOE2 frequency was higher among children with heaviest diarrhea burdens during the first 2 years of life, as detected by PCR using the restriction fragment length polymorphism method, raising the possibility that ApoE-cholesterol balance might be critical for growth and cognitive development under the stress of heavy diarrhea burdens and when an enriched fat diet is insufficient. These findings provide a potential explanation for the survival advantage in evolution of genes, which might raise cholesterol levels during heavy stress of diarrhea burdens and malnutrition early in life.

Key words: Apolipoprotein E; Malnutrition; Diarrhea; Children

Introduction

The vicious cycle between diarrhea and malnutrition is well known and may even occur with enteric infections without overt diarrhea (1). Furthermore, recent data from studies in Brazil and Peru have documented a lasting impact of diarrhea (as with malnutrition and intestinal helminthic infections) on child development with ill effects on cognition, growth, and educational performance (2,3).

Apolipoprotein E (Apoe) is a critical carrier protein, which delivers cholesterol to somatic cells and to the liver to be metabolized, therefore playing a crucial role in lipid homeostasis (4). The single structural locus of the human APOE gene has three alleles on chromosome 19: APOE2, APOE3, the most frequent allele in populations studied to date (4), and APOE4, which has been found to increase the risk for developing late-onset Alzheimer's disease (5). APOE4 bearers are more likely to have a poor prognosis following cerebrovascular disease (6) and other forms of brain injury (7). However, the role of APOE alleles in cognitive development in pediatric populations is poorly explored.

Recent findings suggest that early cognitive development under the stresses of environmental toxins (8), early childhood diarrhea and malnutrition (9) may be protected by the APOE4 alleles, although not in healthy children in resource-rich countries (10), or even in shanty town children with low diarrhea burdens (11). Nevertheless, some studies have found an association of the APOE4 allele with better school performance and motor activity in children from developed countries (12), although some of these findings were not reproduced by others (13).

In the present study, we have updated our ongoing cohort project with new APOE polymorphism data focusing on the effect of APOE alleles during early development in

Correspondence: R.B. Oriá, Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, CE, Brasil. Fax: +55-85-3366-8445. E-mail: oria@ufc.br

Received September 10, 2009. Accepted January 21, 2010. Available online January 29, 2010. Published March 12, 2010.

children afflicted with the stress of heavy diarrhea burdens and enteric infections, with a novel association with cognitive scores. Based on these findings, we suggest that genes that potentially raise cholesterol levels among non-exclusively breast-fed children receiving poor-fat diets might benefit adaptations and recovery from early childhood infection and malnutrition towards improved growth and cognition, despite the negative correlates with Alzheimer's and cardiovascular diseases later in life.

Material and Methods

Population

The study was conducted in the Gonçalves Dias community, a shanty town ("favela") located in Fortaleza (population estimated at 2.3 million), the capital city of the State of Ceará (population approximately 8 million), one of the poorest states in the Northeast of Brazil (Brazilian Institute of Geography and Statistics, refer to www.ibge.gov.br). The Gonçalves Dias community has been described in greater detail elsewhere (14). The children's population of this urban slum (<5 years old) has a history of endemic diarrhea rates, which have been associated with seasonal rainfall and discontinuation of exclusive breast-feeding.

Enteric infection and diarrhea survey

During the study period, cups for the collection of stool specimens were distributed to the households of children with diarrhea. We used World Health Organization (WHO) guidelines to recognize an episode of diarrhea, as described in former cohort studies (15). One episode of diarrhea was defined as the excretion of three or more liquid or semiliquid stools during a 24-h period. A new episode was defined as diarrhea after a ≥48-h interval not meeting the diarrhea definition. Active surveillance for diarrhea episodes was performed three times a week by the field team visiting the community households. Recurrent and persistent episodes of diarrhea in this setting have been most significantly associated with *Cryposporidium*, *Giardia*, and enteroaggregative *Escherichia coli* infections (14). Human Investigation Committees at both the University of Virginia and at the Federal University of Ceará approved the study protocol. The parent/legal guardian of the eligible study children agreed to read and signed the approved consent form. A questionnaire was provided to assess socioeconomic and demographic data.

Anthropometric measurements

The field team consisting of a local nurse and 3 health workers conducted the anthropometric measurements. Height was measured with the child in the supine position to the nearest 0.1 cm with a measuring board. Height-per-age z score (HAZ), weight-per-age z score (WAZ), and weight-per-height z score (WHZ), were calculated using the anthropometric Epi-Info software (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA), as markers of physical development and nutritional status. These anthropometric z scores are the number of SD above or below the median values for the National Center for Health Statistics (NCHS) and International Reference Population (16). Each child was also screened for head circumference, since this parameter has been correlated with early postnatal cognitive development in other studies (16).

Buccal cell collection and DNA extraction

The buccal cell collection was conducted as described in Ref. 9. Briefly, the health worker asked the subject to brush the buccal surface 10 times on one side and then to expectorate the saliva into a 50-mL sterile polypropylene centrifuge tube, repeating the process on the opposite side of the cheek. The subject then swished 10 mL water for 45 s, with the health worker timing, and expectorated into the same 50-mL tube, which was properly stored and delivered to the laboratory for processing. On the following day, the DNA from buccal cell samples was purified using a Gendra Puregene kit according to manufacturer instructions (Gendra System, USA).

APOE genotyping

The experimental protocol involved the amplification of APOE sequences from genomic DNA and digestion with the *Hha*I restriction enzyme (18). DNA from buccal cells was amplified by PCR in a thermal cycler using oligonucleotide primers F4 (5'-GCACGGCTGCCAAGGAGCTG CAGGC-3') and F6 (5'-GGCGCTCGCGGATGGCGCTG AG-3'), as described elsewhere (19). The PCR master mix with *Taq* polymerase and nucleotide components was obtained from Roche Molecular Biochemicals, USA. Each amplification reaction contained about 1 µg buccal cell DNA, 1-2 µM of each primer, and 10% DMSO in a final volume of 50 µL. The PCR conditions included an initial step at 95°C for 4 min, 62°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by 39 cycles (95°C, 15 s; 62°C, 15 s; 70°C, 15 s), and by a final extension at 72°C for 3 min with a 4°C hold. The uncut amplification products, 10 µL of the 50 µL PCR product, were electrophoresed onto 2% Ultrapure agarose gel (Invitrogen, USA), containing 0.4 µg/mL ethidium bromide and 1.0X Tris-acetate-EDTA (TAE). After PCR amplification, 5 units *Hha*I (New England BioLabs, USA) were added directly to each reaction mixture for digestion of APOE sequences (3 h at 37°C). Each reaction mixture was loaded onto a 4% agarose gel (3% Nursuive GTG gel + 1% Ultrapure gel), containing ethidium bromide in 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) and electrophoresed for 1 h under constant voltage (100 V). The gel was cast on a 10- x 15-cm tray. After electrophoresis, digested fragments were visualized by UV illumination. The sizes of *Hha*I fragments were estimated by comparison with known DNA ladders. Ambiguous APOE genotypes were further differentiated by either repeating the former protocol, after a series of

Table 1. Demographic and anthropometric data of the study population according to APOE alleles (N = 123).

Cohort characteristics	APOE4	APOE3	APOE2
Mean age (months)	104.81 ± 20.52 (31)	98.04 ± 18.22 (77)	107.72 ± 22.12 (14)
Head circumference (cm)	54.24 ± 1.89 (21)	53.41 ± 2.04 (37)	53.41 ± 2.43 (11)
Birth weight (kg)	3.31 ± 0.48 (30)	3.17 ± 0.44 (74)	3.16 ± 0.48 (14)
Birth length (cm)	49.40 ± 3.49 (30)	49.35 ± 2.26 (74)	49.63 ± 2.68 (13)
Gender			
Male	10 (32.2%)	32 (41.5%)	6 (42.9%)
Female	21 (67.8%)	45 (58.5%)	8 (57.1%)
Nutritional status			
HAZ 0	-0.18 ± 1.92 (30)	-0.11 ± 0.89 (74)	-0.04 ± 1.02 (13)
WAZ 0	-0.22 ± 0.93 (30)	-0.51 ± 0.80 (74)	-0.53 ± 0.90 (14)
WHZ 0	-0.14 ± 0.75 (29)	-0.25 ± 0.93 (72)	-0.49 ± 1.13 (13)
HAZ 12	-1.63 ± 3.09 (28)	-1.35 ± 2.77 (70)	-0.85 ± 0.82 (13)
WAZ 12	-0.27 ± 3.41 (28)	-0.15 ± 3.05 (70)	-0.28 ± 1.28 (13)
WHZ 12	0.39 ± 1.09 (27)	0.50 ± 1.36 (68)	0.89 ± 1.15 (13)
HAZ 24	-0.97 ± 1.28 (23)	-0.79 ± 1.10 (58)	-0.96 ± 0.74 (10)
WAZ 24	-1.14 ± 1.22 (23)	-0.65 ± 1.22 (58)	-0.54 ± 1.23 (10)
WHZ 24	-0.41 ± 1.17 (22)	0.07 ± 1.17 (56)	0.36 ± 1.04 (10)
Days breast-fed	65.04 ± 62.09 (27)	73.53 ± 61.52 (72)	76.36 ± 66.34 (14)
Disease burden			
Episodes of diarrhea	6.84 ± 7.36 (31)	7.68 ± 5.97 (77)	9.64 ± 5.33 (14)
Days of observation	754.11 ± 236.47 (28)	812.35 ± 326.70 (71)	913.14 ± 505.98 (14)
Mean epis/obs ratio	3.64 ± 3.95 (28)	3.81 ± 3.16 (71)	4.20 ± 2.25 (14)
Maternal education level			
Below primary school	19 (76%)	36 (69.2%)	9 (69.2%)
Primary school or above	6 (24%)	12 (23.1%)	2 (15.4%)
Unknown	0 (0%)	4 (7.7%)	2 (15.4%)
Socioeconomic status			
Rooms per household	2.24 ± 1.50 (29)	2.07 ± 0.91 (72)	2.14 ± 0.95 (14)
Income, in minimum wages[a]	5.44 ± 2.03 (25)	5.58 ± 2.03 (52)	4.38 ± 2.33 (13)
<2	2 (8%)	2 (3.8%)	2 (15.4%)
≥2	23 (92%)	50 (96.2%)	11 (84.6%)

Cohort data, when available, are reported as means ± SD (N). Gender, maternal education level, and income data are reported as N (%). HAZ = height-per-age z score; WAZ = weight-per-age z score; WHZ = weight-per-height z score (0 = at birth, 12 = at 12 months; 24 = at 24 months). Z scores represent standard deviations above or below the reference population mean. Epis/Obs ratio = number of episodes/observed days. [a]Number of minimum wages per month: 1 minimum wage = US$102/month (at the time of the study). APOE4 = children carrying one or more E4 allele (genotypes: 2/4, 3/4, 4/4); APOE2 = children carrying one or more E2 allele (genotypes: 2/3, 2/4, 2/2). APOE3 = children carrying one or more E3 allele (genotypes: 2/3, 3/4, 3/3).

Table 2. ApoE genotype and allele frequencies (f) of cohort children (6-12 years old) with different diarrhea burdens in the Gonçalves Dias shanty town, Fortaleza, Northeastern Brazil (N = 123).

APOE	Genotypes						Alleles		
	2/2	2/3	3/3	2/4	3/4	4/4	2	3	4
Group 1, N (f%)	1 (1.56)	**8 (12.50)**	41 (64.06)	2 (3.13)	**11 (17.19)**	1 (1.56)	**12 (9.38)***	101 (78.90)	15 (11.72)
Group 2, N (f%)	0 (0.0)	**3 (5.09)**	37 (62.71)	0 (0.0)	**19 (32.20)**	0 (0.0)	3 (2.54)	97 (82.21)	18 (15.25)
Total, N (f%)	1 (0.81)	11 (8.94)	78 (63.41)	2 (1.63)	30 (24.39)	1 (0.81)	15 (6.10)	198 (80.49)	33 (13.41)

Group 1 = cohort children with ≥ the median number of diarrheal episodes (N = 64); group 2 = cohort children with < the median number of diarrheal episodes (N = 59). Median episodes of diarrhea in the first 2 years of life = 2.77. See 2nd paragraph of Results for explanation of bold type. *P = 0.033, χ^2 = 4.861, OR = 3.897, 95%CI = 1.071 to 14.17 (Fisher exact test).

Table 3. Independent Hardy-Weinberg equilibrium analyses of the study groups according to burdens of diarrheal episodes in their first two years of life.

Group 1 - Children with ≥ the median of diarrheal episodes (N = 64)		
Allele E2 (f)	Alelle E3 (f)	Allele E4 (f)
0.093	0.789	0.117
Genotypes	Expected values	Observed values
2/2	0.562	1
2/3	9.468	8
2/4	1.406	2
3/3	39.847	41
3/4	11.835	11
4/4	0.878	1
χ^2 = 0.927 (P > 0.05)		
Group 2 - Children with < the median of diarrheal episodes (N = 59)		
Allele E2 (f)	Alelle E3 (f)	Allele E4 (f)
0.025	0.822	0.152
Genotypes	Expected values	Observed values
2/2	0.038	0
2/3	2.466	3
2/4	0.457	0
3/3	39.868	37
3/4	14.796	19
4/4	1.372	0
χ^2 = 3.384 (P > 0.05)		

Neither group 1 nor group 2 showed Hardy-Weinberg disequilibrium, therefore there were no significant differences between observed and expected frequencies regarding the APOE gene. Thus, it was possible to perform genetic comparisons between them since both groups showed genetic similarities for this gene locus.

Progressive reductions in diarrhea burdens (according to diarrhea quartiles) were seen with APOE alleles 2, 3, and 4 by linear-by-linear association (P = 0.03), further confirming this relationship according to the following order: E2 > E3 > E4 (Figure 1).

When we examined the children who experienced the heaviest diarrhea burdens (≥ the median number of 2.77 diarrheal episodes/cohort observed days, during the first 2 years of life), we found a higher frequency of the E4 allele among children with better coding scores (higher than the median of the coding scores for the study cohort children), as shown in Table 4. Children with heavy diarrhea burdens in the first two years of life had a 5-fold higher chance to perform better in the WISC-III coding test. A trend towards a higher frequency of the APOE4 allele was seen among the group of higher TONI-III, albeit without reaching statistical significance.

Discussion

ApoE, a 35-kDa plasma protein synthesized mainly in the liver, is involved in cholesterol transport and metabolism. ApoE is also expressed in other tissues, notably the brain, which is the second most prolific tissue in terms of ApoE production (20-22).

ApoE isoforms influence serum lipid levels, cardiovascular disease, and neuronal repair (20). Individuals with the APOE4 allele have a markedly increased risk to develop early- and late-onset Alzheimer's disease and poor recovery after brain injury in adults (5). Defects in brain plasticity and neuronal death have been associated with increased rates of *tau* phosphorylation, neurofibrillary tangle and senile amyloid deposit (21). However, to date few studies have addressed the role of APOE polymor-

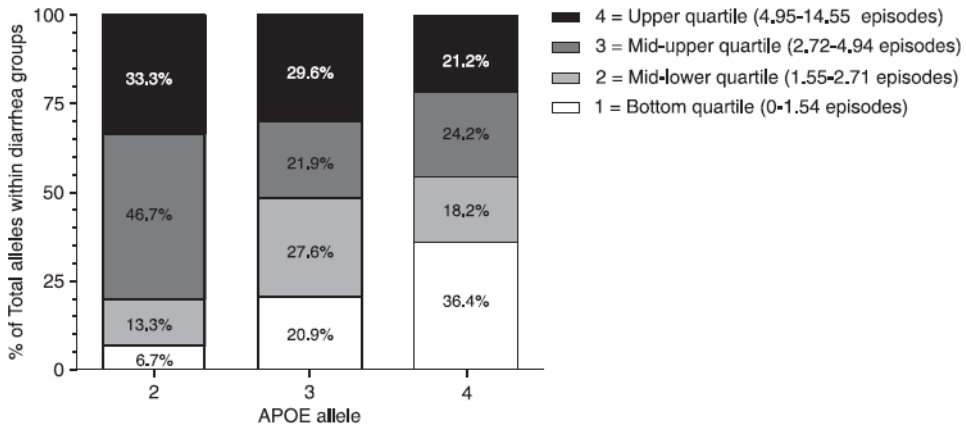


Figure 1. Progressive reductions in diarrhea with APOE alleles 2, 3, and 4 (P = 0.03), linear-by-linear association. N = 246 alleles in 123 cohort children.

Table 4. Cognitive and anthropometric scores and allele 4 frequency in Gonçalves Dias children, Northeastern Brazil.

	Total study population						Children with heavy diarrhea burdens						Children with low diarrhea burdens					
	APOE4(+) N (f%)	APOE4(-) N (f%)	OR	95%CI	χ^2	P	APOE4(+) N (f%)	APOE4(-) N (f%)	OR	95%CI	χ^2	P	APOE4(+) N (f%)	APOE4(-) N (f%)	OR	95%CI	χ^2	P
Cognitive profile																		
TONI III > median	18 (17.31)	86 (82.69)	2.16	0.92 to 5.07	3.25	0.098	9 (19.6)	37 (80.4)	2.96	0.92 to 9.53	3.56	0.082	9 (15.5)	49 (84.5)	1.469	0.41 to 5.17	0.36	0.76
TONI III ≤ median	9 (8.82)	93 (91.18)					5 (7.6)	61 (92.4)					4 (11.1)	32 (88.9)				
Fluency > median	23 (16.20)	119 (83.80)	1.86	0.82 to 4.23	2.29	0.130	10 (15.2)	56 (84.8)	2.41	0.71 to 8.15	2.10	0.121	13 (17.1)	63 (82.9)	1.362	0.44 to 4.14	0.29	0.78
Fluency ≤ median	9 (9.38)	87 (90.62)					4 (6.9)	54 (93.2)					5 (13.2)	33 (86.8)				
Coding > median	18 (19.15)	76 (80.85)	2.48	1.02 to 6.04	4.22	0.056	9 (21.4)	33 (78.6)	5.18	1.31 to 20.49	6.424	0.025*	9 (17.3)	43 (82.7)	1.24	0.34 to 3.73	0.04	1.0
Coding ≤ median	8 (8.70)	84 (91.30)					3 (5.0)	57 (95.0)					5 (15.6)	27 (84.4)				
Anthropometrics																		
HAZ 24 > median	12 (10.53)	102 (89.47)	0.60	0.27 to 1.30	1.68	0.247	5 (9.62)	47 (90.38)	0.638	0.20 to 1.99	0.60	0.580	7 (11.29)	55 (88.71)	0.604	0.17 to 1.52	1.43	0.27
HAZ 24 ≤ median	19 (16.38)	97 (83.62)					10 (14.29)	60 (85.71)					9 (19.57)	37 (80.43)				
WAZ 24 > median	12 (10.71)	100 (89.29)	0.64	0.29 to 1.39	1.26	0.328	5 (9.26)	49 (90.74)	0.624	0.19 to 1.97	0.64	0.570	7 (12.07)	51 (87.93)	0.625	0.21 to 1.82	0.74	0.42
WAZ 24 ≤ median	18 (15.79)	96 (84.21)					9 (14.06)	55 (85.94)					9 (18.00)	41 (82.00)				
WHZ 24 > median	21 (18.75)	91 (81.3)	2.66	1.16 to 6.11	5.66	0.019*	11 (19.64)	45 (80.36)	5.05	1.33 to 19.16	6.64	0.020*	10 (17.86)	46 (82.14)	1.522	0.50 to 4.54	0.57	0.58
WHZ 24 ≤ median	9 (7.96)	104 (92.04)					3 (4.62)	62 (95.38)					6 (12.50)	42 (87.50)				

Median number of diarrheal episodes = 2.77. OR = odds ratio; 95%CI = 95% confidence interval, by χ^2 analyses. TONI III = test of nonverbal intelligence III; fluency = total fluency includes scaled scores for both semantic and phonetic fluency cognitive tests; coding = children under 8 mark rows of shapes with different lines according to a code number; HAZ = height-per-age z score; WAZ = weight-per-age z score; WHZ = weight-per-height z score.

phism early in life, especially following an environmental challenge.

In our studies of shanty town children in Northeast Brazil, we found that early childhood diarrhea and enteric parasitic infections are associated with significant, long-term cognitive deficits in certain higher executive function, such as verbal fluency and coding, and that the APOE4 allele is associated with protection against these deficits (9,23). In a recent study, Wright et al. (8) found that APOE4 in Mexico City children associates with >4.4 points better Bayley Mental Developmental Index scores at 24 months of age and with a 4-fold protection from the adverse effects of lead, supporting the hypothesis that APOE polymorphisms may influence early developmental milestones in an opposite direction than seen during adulthood and aging (11).

Recently, it was shown that levels of ApoE-HDL in the cerebrospinal fluid (CSF), which are believed to play a role in brain plasticity, are similar among E2, E3, and E4 during childhood but higher in adulthood. CSF-ApoE4 then later declines more than the other isoforms (24). These findings suggest a different role of ApoE4 in the brain during early development other than only being deleterious.

Studies by Prentice and Paul (25) have attributed a critical role to fat-enriched diets during the anabolic stage required for physical recovery following enteric infections and malnutrition. In a cohort study in Gambia, they reported that oxidative fat processes are indispensable for production of energy by muscle, which is needed for growth catch-up (26). Furthermore, cholesterol is considered to be a glial-born synaptogenic factor (27) and might play a critical role during synapse remodeling following the brain injury posed by the severe vicious cycle between diarrhea and malnutrition early in life.

Therefore, it is possible to speculate that increased blood levels of LDL-cholesterol obtained from fat-enriched diets, when available, such as breast-milk, and possibly the enhanced cholesterol absorption from the small intestine (28) likely seen in APOE4 carriers (29), and especially in underweight children (30), would support a rapid developmental catch-up required for optimal development and survival. On the other hand, APOE2 carriers (when not contributing to type III hyperlipidemia) would exhibit lower total cholesterol and LDL-cholesterol levels compared to E3 and E4 bearers (31) and would be at high risk of growth faltering.

Furthermore, some investigators have found a protective effect of the APOE4 allele in infectious diseases like severe hepatitis C (32), although most findings show that APOE4 is detrimental when viral infections are present. Conversely, pressure forces of more parasitic and bacterial-born infectious diseases on human population settings (such the

Great Plague) may have strongly driven the APOE4 allele into the genomic pool (33).

Of note, the time of transition from mixed breast-feeding to weaning, which occurs unusually early in Brazilian shanty town children (34,35), is considered to be a vulnerable window for enteric diseases and recurrent diarrhea.

Therefore, we suggest that APOE4 carriers would show an advantage by increasing cholesterol levels when fat-enriched diets are insufficient, i.e., during breast-feeding decline, facilitating physical recovery following enteric infections. On the other hand, APOE2 carriers would exhibit lower cholesterol levels and, as demonstrated by our studies, would be at high risk of poor diarrhea and enteric infection outcomes.

Hence the association of APOE2 and increasing diarrhea outcomes demonstrated in our studies would have implications for effective micronutrient intervention, emphasizing the critical importance of direct experimental documentation of these relationships, their causality, and the ability of specific micronutrients to ameliorate the lasting effects of malnutrition and diarrhea.

One potential mechanism involving APOE4 might be the oxidative stress balance during parasitic infection, possibly involving arginine transport. Since the arginine selective cationic transporter is up-regulated in the brain neuroglia of APOE4 knock-in mice (36), increased arginine uptake by enterocytes could provide sufficient NO production during enteric infections caused by *Giardia lamblia* (37), which we and others have found to be mostly correlated with cognitive deficits following diarrhea (9,38), thus enhancing host defenses against enteric infections and diarrhea. Additionally, increased cholesterol availability in the intestinal milieu may enhance innate mucosal immunity by raising the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β (39). These potential mechanisms are current topics of our ongoing studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank the health workers and the children involved in this project and their families for participating in this study. Research supported in part by the USA National Institutes of Health ICIDR (#5-UOI AI 26512-14), ABC (#5D43 TW01136-04), TMRC (#5 P50 AI30369-09), and FIC (#TW006713-01) grants, and the Brazilian CNPq support.

References

1. Checkley W, Gilman RH, Epstein LD, Suarez M, Diaz JF, Cabrera L, et al. Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 156-163.
2. Guerrant RL, Kosek M, Moore S, Lorntz B, Brantley R, Lima AA. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res* 2002; 33: 351-355.
3. Lorntz B, Soares AM, Moore SR, Pinkerton R, Gansneder B, Bovbjerg VE, et al. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 513-520.
4. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 507-537.
5. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 333-344.
6. MCarron MO, Muir KW, Weir CJ, Dyker AG, Bone I, Nicoll JA, et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke* 1998; 29: 1882-1887.
7. Graham DI, Horsburgh K, Nicoll JA, Teasdale GM. Apolipoprotein E and the response of the brain to injury. *Acta Neurochir Suppl* 1999; 73: 89-92.
8. Wright RO, Hu H, Silverman EK, Tsaih SW, Schwartz J, Bellinger D, et al. Apolipoprotein E genotype predicts 24-month bayley scales infant development score. *Pediatr Res* 2003; 54: 819-825.
9. Oria RB, Patrick PD, Zhang H, Lorntz B, de Castro Costa CM, Brito GA, et al. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. *Pediatr Res* 2005; 57: 310-316.
10. Turic D, Fisher PJ, Plomin R, Owen MJ. No association between apolipoprotein E polymorphisms and general cognitive ability in children. *Neurosci Lett* 2001; 299: 97-100.
11. Oria RB, Patrick PD, Blackman JA, Lima AA, Guerrant RL. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1099-1107.
12. Hubacek JA, Pitha J, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. A possible role of apolipoprotein E polymorphism in predisposition to higher education. *Neuropsychobiology* 2001; 43: 200-203.
13. Jorm AF, Prior M, Sanson A, Smart D, Zhang Y, Easteal S. Apolipoprotein E genotype and temperament: a longitudinal study from infancy to the late teens. *Psychosom Med* 2003; 65: 662-664.
14. Lima AA, Moore SR, Barboza MS Jr, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2000; 181: 1643-1651.
15. Moore SR, Lima AA, Conaway MR, Schorling JB, Soares AM, Guerrant RL. Early childhood diarrhoea and helminthiases associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1457-1464.
16. Zemel BS, Riley EM, Stallings VA. Evaluation of methodology for nutritional assessment in children: anthropometry, body composition, and energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 211-235.
17. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.

18. Oria RB, Costa CM, Lima AA, Patrick PD, Guerrant RL. Semantic fluency: a sensitive marker for cognitive impairment in children with heavy diarrhea burdens? *Med Hypotheses* 2009; 73: 682-686.
19. Patrick PD, Oria RB, Madhavan V, Pinkerton RC, Lorntz B, Lima AA, et al. Limitations in verbal fluency following heavy burdens of early childhood diarrhea in Brazilian shantytown children. *Child Neuropsychol* 2005; 11: 233-244.
20. Strittmatter WJ, Bova HC. Molecular biology of apolipoprotein E. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 119-123.
21. Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 15-27.
22. Yamauchi K, Tozuka M, Nakabayashi T, Sugano M, Hidaka H, Kondo Y, et al. Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid: relation to phenotype and plasma apolipoprotein E concentrations. *Clin Chem* 1999; 45: 497-504.
23. Guerrant RL, Oria R, Bushen OY, Patrick PD, Houpt E, Lima AA. Global impact of diarrheal diseases that are sampled by travelers: the rest of the hippopotamus. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 8): S524-S530.
24. Hirayama S, Miida T, Obayashi K, Yamazaki F, Yamazaki-Sakurai M, Ito M, et al. Effect of apolipoprotein E (apoE) phenotype on the apoE content of CSF-HDL in children. *Clin Chim Acta* 2005; 356: 110-116.
25. Prentice AM, Paul AA. Fat and energy needs of children in developing countries. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1253S-1265S.
26. Prentice AM. Early influences on human energy regulation: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Physiol Behav* 2005; 86: 640-645.
27. Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieger FW. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris* 2002; 96: 257-263.
28. Kallio MJ, Salmenpera L, Siimes MA, Perheentupa J, Gylling H, Miettinen TA. Apoprotein E phenotype determines serum cholesterol in infants during both high-cholesterol breast feeding and low-cholesterol formula feeding. *J Lipid Res* 1997; 38: 759-764.
29. Tammi A, Ronnemaa T, Viikari J, Jokinen E, Lapinleimu H, Ehnholm C, et al. Apolipoprotein E4 phenotype increases non-fasting serum triglyceride concentration in infants - the STRIP study. *Atherosclerosis* 2000; 152: 135-141.
30. Garces C, Benavente M, Ortega H, Rubio R, Lasuncion MA, Rodriguez AF, et al. Influence of birth weight on the apo E genetic determinants of plasma lipid levels in children. *Pediatr Res* 2002; 52: 873-878.
31. Srinivasan SR, Ehnholm C, Elkasabany A, Berenson G. Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipids and lipoprotein changes from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1999; 143: 435-443.
32. Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* 2002; 36: 456-463.
33. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 2009; 50 (Suppl): S183-S188.
34. Lima AA, Fang G, Schorling JB, De Albuquerque L, Mcauliffe JF, Mota S, et al. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Paediatr* 1992; 81 (Suppl) 381: 39-44.
35. Guerrant RL, Oria RB, Moore SR, Oria MO, Lima AA. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev* 2008; 66: 487-505.
36. Czapiga M, Colton CA. Microglial function in human APOE3 and APOE4 transgenic mice: altered arginine transport. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 44-51.
37. Li E, Zhou P, Singer SM. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol* 2006; 176: 516-521.
38. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* 2002; 359: 564-571.
39. Bai B, Yamamoto K, Sato H, Sugiura H, Tanaka T. Combined effect of 25-hydroxycholesterol and IL-1beta on IL-8 production in human colon carcinoma cell line (Caco-2). *Inflammation* 2005; 29: 141-146.