



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA PAULA FRAGOSO DE FREITAS

**EFEITO DE SUBFRAÇÕES DA PROTEÍNA DO LÁTEX DA *Calotropis procera* NA
MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Fortaleza

2016

ANA PAULA FRAGOSO DE FREITAS

**EFEITO DE SUBFRAÇÕES DA PROTEÍNA DO LÁTEX DA *Calotropis procera* NA
MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

Fortaleza

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F936e Freitas, Ana Paula Fragoso de.
Efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil / Ana Paula Fragoso de Freitas. – 2016.
114 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Doutorado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.
1. Estomatite. 2. Fluoruracila. 3. Calotropis. 4. Inflamação. I. Título.

ANA PAULA FRAGOSO DE FREITAS

**EFEITO DE SUBFRAÇÕES DA PROTEÍNA DO LÁTEX DA *Calotropis procera* NA
MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Renata Carvalho de Leitão
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira-UNILAB

À Deus, por ser minha fonte de inspiração e por ter permitido a realização desse sonho.

Aos meus pais Raimundo e Maria, pelo exemplo de luta e determinação.

A minha filha Giovanna, pelo amor que fez nascer em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, agradeço a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Giovanna Maria, minha filha amada, que com seus dez anos cheios de vida e de graça, ensina-me a ser mãe e lutar pelos nossos sonhos. Filha, perdão pelos momentos de ausência exigidos para minha formação no doutorado. Agora a tese chegou ao fim. Prometo ser muito mais sua. Você que tanto me ensinou e que esteve comigo em todas as etapas, nos congressos, no laboratório, ajudando com tanto entusiasmo, minha eterna gratidão.

Aos meus pais (Raimundo Fragoso e Maria Freitas) pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho para me proteger e me ensinar os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre para melhor. Vocês são presença marcante em minha vida. Obrigada por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas.

Ao Gilberto Cerqueira, meu esposo, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me e fazendo-me acreditar que posso mais que imagino. Obrigada pela sua força, ajuda, por sua dedicação, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.

À Professora Dra. Gerly Anne Castro Brito agradeço profundamente por ter assumido a orientação desta tese, tendo-me brindado com importante colaboração na discussão do trabalho, dosando as críticas com comentários de incentivo, que muito me ajudaram a superar as situações-limite de prazo. A quem admiro por seu carisma, sua simplicidade.

Ao Professor Dr. Marcio Viana Ramos, sou imensamente grata pelo incentivo e fortalecimento, meus agradecimentos por sua permanente solicitude em todas as fases, bem como pelo cuidado e amplas sugestões a esse trabalho. Pelas ricas lições sobre persistência e superação.

À professora Renata Carvalho Leitão que para minha alegria e honra aceitou ser membro da minha banca. Tenho muito respeito e admiração pela sua ética, seu conhecimento, pela maneira simples e humilde com que a senhora se relaciona com todos.

À professora Dra. Glauce Socorro de Barros Viana pela disposição em participar da banca, bem como por seus questionamentos e contribuições valorosos, agradeço também pelas ricas sugestões a esse trabalho.

Agradeço à professora Ana Beatriz Graça Duarte pelas suas preciosas considerações ao presente trabalho e generosas sugestões de aprimoramento.

Às Professoras Paula Goes Pinheiro Dutra e Deysi Viviana Tenazoa Wong, que na etapa da Qualificação geraram grandes contribuições nesta configuração final da tese. Agradeço as suas preciosas considerações ao presente trabalho e generosas sugestões de aprimoramento.

À professora Dra. Mariana Vale pelos ensinamentos que passaram desde o mestrado, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional.

Ao Professor Dr. Ronaldo Ribeiro Albuquerque (*In memoriam*), meus agradecimentos pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições.

Sou profundamente grata à amiga Deiziane Viana, pela indescritível solidariedade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em entusiasmadas respostas, continuado estímulo e valiosa parceria. Agradeço também pelo incentivo que sempre dedicou às minhas empreitadas e pela atenção zelosa comigo e com o término da tese.

À minha família e amigos, aos quais amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos Amigos e Colegas do laboratório NEMPI (Núcleo de Estudos e Processamento de Imagens), em especial a Conceição Martins (Josyane), Daniely Silva, Daynesi e aos técnicos do laboratório (Socorro França, Flávia de Araújo e Adalberto Júnior) que participaram diretamente deste trabalho e ajudaram-me em todos os momentos.

Aos alunos de iniciação científica Gultierres Freitas, Isabelle Meneses e Bárbara Ponte.

Gratidão aos colegas da Pós-Graduação em Bioquímica, em especial a Carol Viana, pela paciência, carinho e respeito com que me trataram sempre.

Agradeço também a contribuição, em alegria e afeto, de Ivone Mary e Rita quando à frente da secretaria da Pós-Graduação, por ter tornado mais leve esta fase.

Aos colegas de trabalho e a todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

Ninguém vence sozinho!

Meu Muito Obrigado!

“Antes de ser borboleta:
Fique no casulo o tempo necessário.
Resista à metamorfose.
Elimine os vestígios que te aprisionam...
E prepare-se para alçar voo.”

Yara Alves

RESUMO

Efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

A mucosite oral é um dos efeitos colaterais mais comuns em pacientes submetidos ao tratamento com 5-fluorouracil (5-FU). Nesse contexto, foi demonstrado que a fração Proteica do Látex (PL) da *Calotropis procera*, com apenas duas doses, preveniu os danos causados pelo 5-FU na mucosa oral. Devido a isso, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de subfrações da proteína do látex (PL) da *Calotropis procera* na prevenção da mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. As subfrações (PI, PII e PIII) da PL da *Calotropis Procera* foram obtidas por cromatografia. Hamsters receberam salina 0,9%, i.p., (Controle ou Trauma Mecânico, TM) ou 5-FU (60mg/kg e 40mg/kg, i.p., respectivamente) no 1º e 2º dia do protocolo experimental. Após 24h e 72h da última dose do quimioterápico, administraram-se PL 5mg/kg (PL+5-FU) ou suas subfrações: PI 5mg/kg (PI+ 5-FU); PII 5mg/kg (PII + 5-FU); PIII 5mg/kg (PIII +5-FU) e PII IAA 5mg/kg (PII IAA+ 5-FU). No 4º dia, todos os grupos, exceto o grupo controle, foram submetidos ao TM. Os animais foram observados diariamente até o 10º dia do protocolo experimental para avaliar a sobrevivência e a perda ponderal. Após a última análise, os animais foram anestesiados e suas mucosas jugais foram expostas para a análise macroscópica e em seguida, foram eutanasiados e suas mucosas jugais foram coletadas para avaliar os seguintes parâmetros: análise histopatológica, recrutamento de neutrófilos (dosagem de mieloperoxidase, MPO), estresse oxidativo (níveis de GSH e MDA), inflamação (níveis de TNF α e IL-1 β por ELISA, incluindo expressão proteica de IL-1 β , ICAM-1 e Iba-1 por imunohistoquímica) e integridade das fibras colágenas (coloração de PicroSirius Red). A partir da fração PL da *Calotropis procera*, foram identificadas 3 subfrações PI, PII e PIII bem distintas. Foi realizado um Zimograma e as frações PII e PIII demonstraram intensa atividade proteolítica. Devido a porcentagem de sobrevivência, a atividade proteolítica de PII foi inibida com iodoacetamida, originando PII IAA. 5-FU reduziu a sobrevivência, causou intensa perda ponderal, ocasionou formação de úlceras extensas, desenvolvimento de abscessos, de eritema acentuado, de hemorragia e de edema. Além disso, também promoveu formação de úlceras, caracterizado pela perda da integridade do epitélio da mucosa jugal e intenso infiltrado de células inflamatórias. Adicionalmente, 5-FU aumentou os níveis de MPO, MDA, IL-1 β e TNF- α , incluindo a expressão de ICAM-1 e Iba-1, bem como, diminuiu os níveis de GSH e reduziu as fibras colágenas nas mucosas jugais comparado ao grupo controle. Por outro lado, apenas PL ou PII IAA foram capazes de prevenir essas alterações promovidas por 5-FU. Conclui-se que PII com sua atividade proteolítica inibida pelo IAA é a subfração responsável pelos efeitos benéficos observados anteriormente da PL na mucosite oral induzida por 5-FU. Adicionalmente, PII IAA atenua a mucosite oral induzida por 5-FU por reduzir o estresse oxidativo, a inflamação (por diminuir a expressão de moléculas de adesão, o recrutamento de neutrófilos e a ativação de macrófagos com consequente diminuição de IL-1 β e TNF- α). Além disso, a subfração PII IAA possui efeito antioxidante e anti-inflamatório, previne a degradação das fibras colágenas, incluindo a perda de peso, e aumento da sobrevivência em animais submetidos à mucosite oral experimental.

Palavras-chaves: Mucosite Oral. 5-Fluorouracil. *Calotropis procera*. Inflamação.

ABSTRACT

Effect of subfractions of *Calotropis procera* latex protein on oral mucositis induced by 5-fluorouracil

Oral mucositis is one of the most common collateral effects in patients undergoing treatment with 5-fluorouracil (5-FU). In this context, It has been previously shown that with only two doses of the protein from the latex fraction of *Calotropis procera* it was possible to prevent damage caused by 5-FU in the oral mucosa. Thus, the aim of this study was investigate the effect of subfractions of the latex protein (PL) of *Calotropis procera* in the prevention of oral mucositis induced by 5-FU in hamsters. At first, the subfractions (PI, PII and PIII) of the PL of *Calotropis procera* were identified by chromatography. Hamsters received 0.9% saline, i.p., (Control) or Mechanical Trauma (TM) or 5-FU (60mg / kg and 40mg / kg, i.p., respectively, on the 1st and 2nd day of the experimental protocol). 24h and 72h after of the last dose of the chemotherapeutic, PL 5mg / kg (PL + 5-FU) or its subfractions were administered: PI 5mg / kg (PI + 5-FU); PII 5mg / kg (PII + 5-FU); PIII 5mg / kg (PIII + 5-FU) and PII IAA 5mg / kg (PII IAA + 5-FU). On the 4th day, all experimental groups, except the control, were submitted to TM. The animals were observed daily until the tenth day of the experimental protocol to evaluate survival and weight loss. Then, the animals were anesthetized and their jugal mucosas were exposed for the macroscopic analysis. Hamsters were euthanized and their jugal mucosa were collected to evaluate the following parameters: histopathological analysis, neutrophil recruitment (myeloperoxidase dosage, MPO), oxidative stress (GSH and MDA levels), inflammation (levels of TNF α and IL- ELISA, including protein expression of IL-1 β , ICAM-1 and Iba-1 by immunohistochemistry) and integrity of collagen fibers (PicroSirius Red staining). From the PL fraction of *Calotropis procera*, the subfractions PI, PII and PIII were identified and showed to be quite distinct. In addition, PII and PIII showed intense proteolytic activity. The proteolytic activity of PII was inhibited with iodoacetamide, leading to PII IAA. 5-FU reduced survival, caused intense weight loss, caused extensive ulcer formation, development of abscesses, marked erythema, haemorrhage and edema. In addition, it also promoted formation of ulcers, characterized by loss of integrity of the jugal epithelium and intense infiltration of inflammatory cells. In addition, 5-FU increased the levels of MPO, MDA, IL-1 β and TNF- α , including the expression of ICAM-1 and Iba-1, as well as decreased GSH levels and reduced collagen fibers in the oral mucosa compared to the control group. Whereas only PL or IAA PII were able to prevent these 5-FU promoted alterations. It is concluded that PII with its proteolytic activity inhibited by IAA is the subfraction responsible for the previously observed beneficial effects of PL on oral mucositis induced by 5-FU. Therefore, PII IAA attenuates 5-FU induced oral mucositis by reducing oxidative stress, inflammation (by decreasing the expression of adhesion molecules, neutrophil recruitment and macrophage activation with consequent decrease of IL-1 β and TNF- A). Thus, it prevents degradation of collagen fibers, including weight loss and increased survival in animals submitted to experimental oral mucositis.

Key-words: Mucositis Oral. 5-Fluorouracil. *Calotropis procera*. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural da molécula de Uracil e 5-Fluorouracil (5-FU).....	21
Figura 2	Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.....	22
Figura 3	Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil na inibição da enzima timidilato sintase.....	23
Figura 4	Fases do desenvolvimento da mucosite oral.....	26
Figura 5	Desenho esquemático da patogênese da mucosite oral ressaltando os estudos realizados no Laboratório de Farmacologia de Inflamação e do Câncer (LAFICA).....	29
Figura 6	Características e aspectos botânicos da planta <i>Calotropis procera</i> (AIT.) R. Br.	32
Figura 7	Desenho esquemático do modelo de mucosite oral por 5-FU em hamsters.....	43
Figura 8	Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>	51
Figura 9	Efeito de subfrações da <i>Calotropis procera</i> na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	54
Figura 10	Efeito de subfrações da <i>Calotropis procera</i> nas alterações macroscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	56
Figura 11	Efeito de subfrações da <i>Calotropis procera</i> nas alterações microscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	59
Figura 12	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre a perda de peso em Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	62
Figura 13	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre os níveis de MPO na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	64
Figura 14	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre os níveis de GSH na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida	

	por 5-FU.	66
Figura 15	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre os níveis de MDA na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	68
Figura 16	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre os níveis de IL-1 β e TNF- α na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	70
Figura 17	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre a imunomarcção de IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	72
Figura 18	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre o número de células marcadas para IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	73
Figura 19	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre a imunomarcção de ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	75
Figura 20	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre o número de células marcadas para ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	76
Figura 21	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre a imunomarcção de Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	78
Figura 22	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre o número de células marcadas para Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	79
Figura 23	Efeito da subfração PII IAA da <i>Calotropis procera</i> sobre as fibras colágenas na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> e suas subfrações.....	53
Tabela 2	Escores baseados nas análises macroscópicas das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental e tratados com proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> e suas subfrações.....	57
Tabela 3	Escores baseados nas análises microscópicas das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental e tratados com proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> e suas subfrações.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro (s)
5-FU	5-Fluorouracil
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
CE	Ceará
Cm	Centímetro (s)
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Dexoyribonucleic acid)
DP	Desvio-Padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al</i>	e colaboradores
g	Gramas
h	Hora (s)
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
i.p.	Intraperitoneal
Iba-1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
JNK	C-JUN quinase aminoterminal
kDa	Kilodaltons
Kg	Quilograma (s)
Md	Mediana
Mg	Miligramas
mL	Mililitro

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator nuclear kB
NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
CpOsm	Osmotina
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
Pg	Picograma (s)
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Proteínas do Látex de <i>Calotropis procera</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Radioterapia
TM	Trauma mecânico
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
SH	Grupo sulfidril
UFC	Universidade Federal do Ceará
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
γ	Gama
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Câncer e suas complicações.....	19
1.2	5-Fluorouracil.....	20
1.3	Mucosite Oral.....	24
1.4	Produtos Naturais.....	30
1.5	<i>Calotropis Procera</i>	31
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	37
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Material botânico.....	39
4.2	Coleta e fracionamento do látex.....	39
4.3	Obtenção das subfrações da PL por cromatografia de troca iônica em coluna de cm-sepharose.....	40
4.4	Análise do perfil proteico através de eletroforese unidimensional.....	40
4.5	Zimograma.....	41
4.6	Aspectos éticos.....	41
4.7	Animais.....	41
4.8	Modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	42
4.9	Grupos experimentais.....	43
4.10	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizadas no estudo.....	44
4.11	Parâmetros avaliados.....	44
4.11.1	Avaliação da taxa de Sobrevida.....	44
4.11.2	Análise macroscópica da mucosa jugal.....	44
4.11.3	Análise histopatológica das mucosas jugais.....	45
4.11.4	Análise ponderal.....	46
4.11.5	Dosagem de Mieloperoxidase.....	46
4.11.6	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	47
4.11.7	Dosagem de Malondialdeido.....	47
4.11.8	Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-1 β).....	48

4.11.9	Imunohistoquímica.....	48
4.11.10	Coloração de fibras colágenas com Picro Sirius red.....	49
4.12	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex da Calotropis procera....	51
5.2	Efeito de subfrações da Calotropis procera na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	52
5.3	Efeito de subfrações da Calotropis procera nas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.....	55
5.4	Efeito de subfrações da Calotropis procera nas alterações histológicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.....	58
5.5	Efeito de subfrações da Calotropis procera na perda ponderal induzida por 5-FU em hamsters.....	61
5.6	Efeitos das subfrações das proteínas do látex da Calotropis procera (PL) sobre a atividade de MPO na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	63
5.7	Efeito da subfração da Calotropis procera nos níveis de GSH na mucosa jugal de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	65
5.8	Efeito da subfração da Calotropis procera nos níveis teciduais de MDA na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	67
5.9	Efeitos da Subfração PII IAA da Calotropis procera sobre a dosagem de citocinas IL-1 β e TNF- α na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	69
5.10	Efeito da subfração PII IAA da Calotropis procera na imunomarcagem de IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	71
5.11	Efeito da subfração PII IAA da Calotropis procera na imunomarcagem de ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	74
5.12	Efeito da subfração PII IAA da Calotropis procera na imunomarcagem de Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	77
5.13	Efeito da subfração PII IAA da Calotropis procera nas fibras colágenas da	

	mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	80
6	DISCUSSÃO.....	82
7	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXOS.....	110
	APÊNDICE.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e suas complicações

O câncer ou neoplasia maligna são termos usados para descrever um grupo de doenças que envolvem o crescimento desordenado de células. O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo por apresentar alta taxa de incidência e de mortalidade (SIEGEL *et al.*, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2030, haverá 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer, e 75 milhões de pessoas a cada ano vivendo com câncer. Países em desenvolvimento são um dos mais afetados por estes aumentos (INCA, 2012; SIEGEL *et al.*, 2016).

Em 2012, foram diagnosticados cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Além disso, a Organização Mundial da Saúde tem estimado que o número de novos casos aumente por volta de 70% nos próximos 20 anos (WHO, 2014). No Brasil, foram registradas 189.454 mortes por câncer em 2013. Em 2016, estima-se a ocorrência de mais de 596 mil casos da doença no País (INCA, 2015).

Os diversos tipos de câncer podem ser causados por diferentes fatores de risco, como os fatores ambientais, culturais, socioeconômicos, estilos de vida (com destaque para o tabagismo e alimentação) e genéticos (BRAY *et al.*, 2012; JEMAL *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O câncer é uma doença caracterizada por apresentar proliferação celular desordenada, perda de função, incluindo capacidade de metastizar-se, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (COOPER, 2000; FERREIRA *et al.*, 2012; WHO, 2015). O câncer promove diversas consequências na vida dos pacientes e seus familiares. Muitos pacientes têm suas vidas alteradas nas diferentes fases de combate à doença, com perdas significativas em sua qualidade de vida, causado pela própria doença ou pelos efeitos colaterais do tratamento (BOING *et al.*, 2016).

Além da morbidade associada ao câncer, o seu tratamento produz inúmeros efeitos colaterais, como Mielossupressão, Cistite hemorrágica, Cardiotoxicidade e Neurotoxicidade (BRASIL, 2005; CHILDERS *et al.*, 1993; MENDONÇA *et al.*, 2005; SAPOLNIK, 2003; VOLPATO, 2007). Os pacientes que são submetidos ao tratamento radioterápico (RT) e quimioterápico (QT) em região de cabeça e pescoço, frequentemente, desenvolvem alterações e sequelas de interesse da estomatologia (FREITAS *et al.*, 2011),

como: xerostomia, eritema, ulceração e até necrose que caracterizam a mucosite oral. A xerostomia é a sensação de boca seca, que pode ser causada por uma diminuição ou não da função das glândulas salivares, com alteração na quantidade e na qualidade da saliva (BOING *et al.*, 2016). Também pode apresentar-se em qualquer área do trato gastrintestinal (TGI), manifestando-se por disfagia, odinofagia, pirose, diarreia e dor abdominal (SAPOLNIK, 2003). Desses efeitos colaterais, a mucosite oral é um dos mais preocupantes por ser um dos fatores que levam a importante perda ponderal devido a ingestão alimentar reduzida.

A mucosite é caracterizada por inflamação da mucosa oral, que acomete primariamente os pacientes submetidos ao tratamento oncológico com determinados tipos de quimioterápicos e provoca picos de dor (SONIS *et al.*, 1996). A gravidade da mucosite decorrente da mielossupressão advém da destruição da barreira epitelial, tornando a cavidade oral uma importante porta de entrada para microrganismos patogênicos (SONIS *et al.*, 1990). Nesse sentido, a cavidade oral tem sido reconhecida como uma das principais fontes de sepse em pacientes granulocitopênicos, como os pacientes submetidos a regimes quimioterápicos (GABRILOVE *et al.*, 1988). Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria microbiota oral como bactérias gram negativas, além de fungos como a *Candida albicans* (HESPANHOL *et al.*, 2010).

A frequência com que os pacientes submetidos à quimioterapia apresentam manifestações orais é afetada por diversas variáveis. Estas podem ser divididas em variáveis relacionadas com o paciente e aquelas relacionadas à terapia. Os fatores relacionados ao paciente incluem idade, diagnóstico e higiene da cavidade oral antes e durante a terapia. E as variáveis relacionadas à terapia incluem o tipo de fármaco, a dose e a frequência do tratamento, além do uso de terapias concomitante (SONIS *et al.*, 1989).

Dentre os fármacos mais utilizados em pacientes que estão submetidos ao tratamento com agentes quimioterápicos diversos, os antimetabólitos como o 5-fluorouracil e o metrotexato promovem mucosite oral. Há também outros quimioterápicos que produzem efeitos semelhantes como cisplatina, doxorubicina e ifosfamida (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

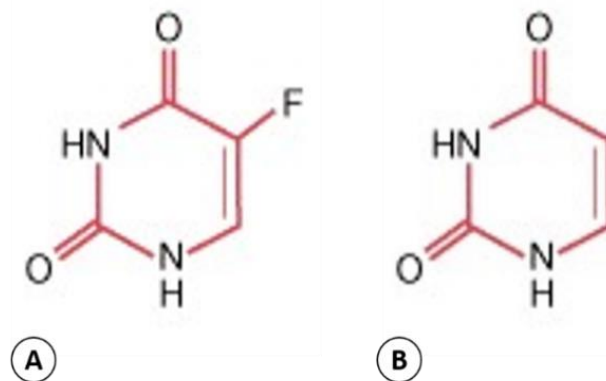
1.2 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil, de fórmula química $C_4H_3FN_2O_2$, foi introduzido como um potente quimioterápico e continua a ser amplamente utilizado no tratamento de várias neoplasias comuns como câncer de mama, de colorretal, de cabeça e pescoço, de pele, incluindo carcinoma periocular e displasia da córnea (BATISTA, 2010). Recentemente essa

droga está sendo utilizada como tratamento tópico do condiloma acuminado (DIASIO; HARRIS, 1989; FERRAZ *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2007; METTERLE *et al.*, 2016). Além disso, é o agente quimioterápico de primeira linha no tratamento de câncer de mama, além de ser considerado o mais efetivo nos casos de câncer colorretal avançado e tumores de cabeça e pescoço (KIM *et al.*, 2015).

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um fármaco antimetabólico da classe das fluoropirimidinas que foi desenvolvido a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de um fluoronucleotídeo na molécula de DNA e/ou RNA, processo essencial para a proliferação e metabolismo celular (PASCHKIS, 1954). Este fármaco é um análogo da pirimidina uracil que ocorre naturalmente, é metabolizado por meio das mesmas vias metabólicas do uracil (Figura 1) (DIASIO; HARRIS, 1989).

Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula de Uracil e 5-Fluorouracil (5-FU).



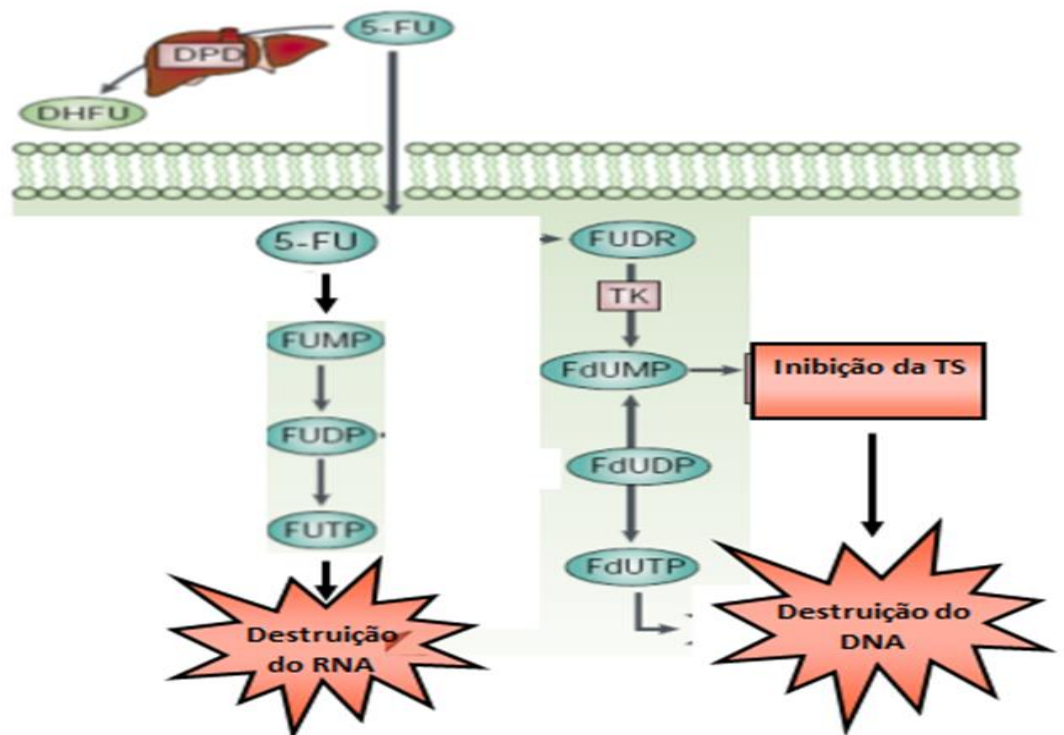
Fonte: Adaptado de Pizzorno *et al.* (2003). A: 5-Fluorouracil; B: Uracila. O 5-FU é um análogo da uracila e contém um átomo de fluorina na posição C5.

Na célula o 5-FU pode ser convertido em três metabólitos ativos, são eles: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O mecanismo de ativação do 5-FU se dá pela conversão em monofosfato de fluorouridina (FUMP), que é então fosforilada em difosfato de fluorouridina (FUDP), que pode ser fosforilada no metabólito ativo, o trifosfato de fluorouridina (FUTP), ou pode ser convertido em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP). Esse composto intermediário do metabolismo de 5-FU pode ser fosforilado ou defosforilado dando origem aos metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Um caminho alternativo é catalisado pela timidina fosforilase (TP) que converte 5-FU em

fluorodeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilado em FdUMP pela timidina quinase. A conversão do 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU) pela diidropirimidina desidrogenase (DPD) é a etapa limitante do catabolismo de 5-FU, tanto em células normais como em células tumorais. Em torno de 80% do 5-FU é metabolizado no fígado (Figura 2) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O mecanismo de citotoxicidade atribuído ao 5-FU está na sua capacidade de incorporar fluoronucleotídeo na molécula de DNA e/ou RNA, bem como pela inibição da enzima timidilato sintase (TS). A timidilato sintase é importante no processo de fornecimento de grupos timidilatos para o reparo e síntese de DNA (SILVA, 2010).

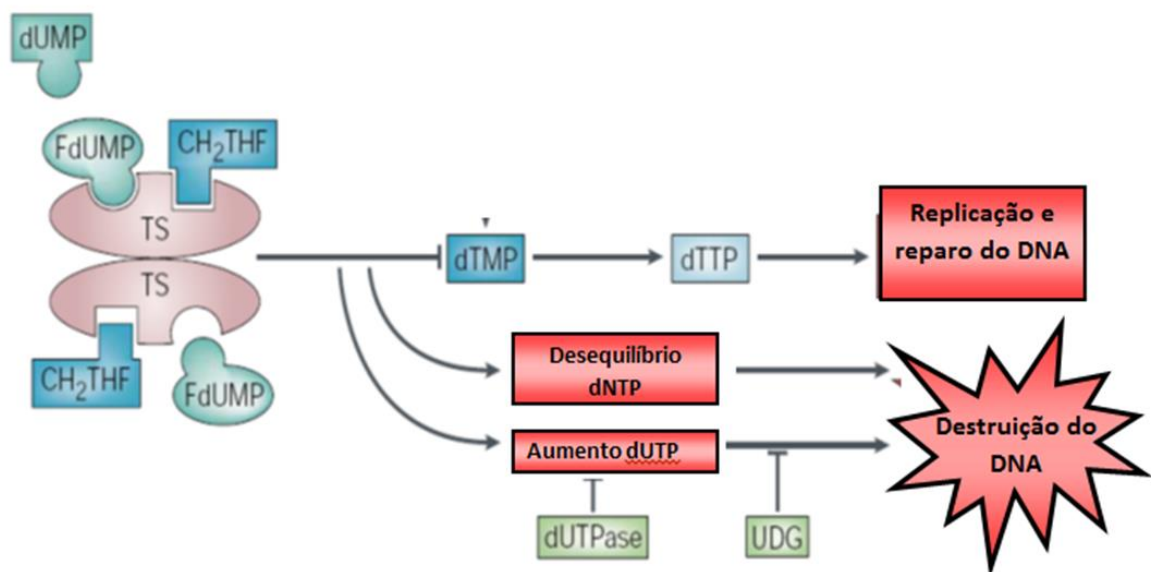
Figura 2 - Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.



Fonte: adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003). O 5-FU entra nas células por meio de transporte facilitado. No meio intracelular, é convertido em três metabólitos ativos principais: (monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). A conversão de 5-FU em monofosfato de fluorouridina (FUMP) pode ser direta (por meio da enzima fosforibosiltransferase orotato-OPRT- e o co-fator 5-fosforibosil-1-pirofosfato-PRPP) ou indireta (por meio da via fluorouridina-FUR- pela ação sequencial da uridina fosforilase-UP- e uridina quinase-UK). FUMP é convertido sequencialmente em difosfato fluorouridina (FUDP) e no metabólito ativo FUTP ou, por ação da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), em difosfato fluorodeoxiuridina (FdUDP). Este último é convertido em FdUTP ou FdUMP. A conversão de 5-FU em FdUMP ocorre de forma indireta por meio da fluorodeoxiuridina (FUDR) pela ação sequencial de timidina fosforilase (TP) e timidina quinase (TK). FUTP se incorpora ao RNA, FdUTP ao DNA e FdUMP inibe a enzima timidilato sintetase (TS), levando respectivamente a danos ao RNA e ao DNA.

Timidilato sintase catalisa a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-metileno tetraidrofolato (CH_2THF) como um doador de grupos metil. O metabólito ativo do 5-FU que é o monofosfato de fluorodeoxiuridina liga-se no sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS e CH_2THF . Esse complexo é capaz de bloquear o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo inibindo a síntese de dTMP. Isso resulta em um desequilíbrio nas concentrações de deoxinucleotídeos (dNTP) e também um aumento dos níveis de deoxiuridina trifosfato (dUTP), ambos podem causar destruição do DNA. A extensão ao dano do DNA causado pela dUTP é dependente dos níveis das enzimas pirofosfato dUTPase e uracil-DNA glicosilase (UDG) (Figura 3) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Figura 3 - Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil na inibição da enzima timidilato sintase.



Fonte: adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003). Monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) se liga à enzima timidilato sintetase (TS), competindo pelo sítio de ligação da monofosfato de deoxiuridina (dUMP), formando um complexo FdUMP-5,10-metilenatetra-hidrofolato (CH_2THF)-TS que impede a ação dessa enzima na conversão de dUMP em monofosfato de deoxitimidina (dTMP) e trifosfato de deoxitimidina (dTTP), resultando em danos ao DNA e inibição da replicação e do reparo.

Dessa forma, com essas características, 5-FU também age em células normais, incluindo as células basais, responsáveis pela formação das demais camadas do epitélio oral, inibindo os ciclos celulares normais (GLIMELIUS *et al.*, 1997; MING *et al.*, 2010). Para

potencializar o uso clínico de 5-FU, uma série de combinações de fármacos têm sido investigadas (YANG *et al.*, 2008), como os regimes FOLFOX (5-FU, leucovorin e oxaliplatina) e FOLFIRI (5-FU, leucovorin e irinotecano) (LOGAN *et al.*, 2007).

Os efeitos colaterais do 5-FU podem variar principalmente de acordo com o tratamento, o tipo de câncer, a dose utilizada, a via de administração e a nutrição do paciente. Eles são mais evidentes em células com grande índice de mitose, como tecidos de rápida proliferação, como é o caso do epitélio da mucosa oral (VANHOECKE *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado com 880 pacientes da França e 153 da Finlândia com câncer colorretal e em uso de 5-FU evidenciou que a mucosite, a diarreia e as náuseas e vômitos atingiram respectivamente 42%, 53% e 54% desses pacientes (SOVERI *et al.*, 2014). Esses dados revelam que a mucosite é uma das complicações mais prevalentes em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico por 5-FU.

Estudos demonstram que o 5-FU é um fármaco capaz de inibir a proliferação de fibroblastos *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a síntese de colágeno e a formação da cicatriz (GOLDENFELD *et al.*, 1994; YAMAMOTO *et al.*, 1990; NORRIS *et al.*, 2002). Este representa um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da mucosite oral ocasionada pelo 5-FU.

1.3 Mucosite Oral

A mucosite oral é considerada um dos efeitos colaterais mais comuns associados a tratamentos com altas doses de 5-FU (CHAUDHRY *et al.*, 2015).

A mucosite oral é caracterizada por intensa inflamação, que pode ser acompanhada ou não pela formação de úlceras na mucosa oral, que se torna edemaciada, eritematosa e friável, resultando em dor, disfagia, podendo causar complicações graves, como infecção sistêmica (ARAUJO *et al.*, 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2013; HESPANHOL *et al.*, 2010). A sua manifestação inicial é o eritema, seguido do desenvolvimento de placas brancas descamativas, que são dolorosas ao contato.

Crostas epiteliais e exsudato fibrinoso levam à formação de uma pseudomembrana e ulceração, representando a forma mais pronunciada da mucosite. Os pacientes invariavelmente apresentam sintomatologia dolorosa. A forma mais grave da mucosite é representada pela exposição do estroma do tecido conjuntivo subjacente ricamente innervado devido à perda de células epiteliais, o que geralmente ocorre entre 5 e 7 dias após a primeira administração do fármaco (RABER-DURLACHER, 1999).

A mucosite oral ocasiona dificuldade de deglutição que pode levar a perda acentuada de peso e consequente desnutrição. A lesão na mucosa oral também pode propiciar a translocação de bactérias, uma vez que lesões nos tecidos orais podem servir como meio de entrada para bactérias ou fungos que podem contribuir para a inflamação na mucosa oral e para a ocorrência de sepse. Essas infecções podem acontecer devido à neutropenia decorrente do tratamento, como as infecções por micro-organismos oportunistas (*Candida albicans*, Herpes Simples Vírus - HSV- citomegalovírus, varicela zoster) (HESPANHOL *et al.*, 2010; VOLPATO *et al.*, 2007).

De acordo com Haagen *et al.*, (2009), praticamente todos os pacientes com câncer de cabeça e pescoço desenvolvem algum grau de mucosite durante o tratamento. Em pacientes que utilizam o protocolo FOLFIRI (5-FU, leucovorin e irinotecano), apresentam um risco de 5% de desenvolver mucosite oral, já em pacientes submetidos à quimioterapia convencional o risco é de 15-40%.

A ocorrência de mucosite pode levar a interrupção não planejada do tratamento. Essa interrupção do tratamento pode ocasionar uma redução da probabilidade de controle do tumor. Sabe-se também que a existência da mucosite oral leva ao aumento de custos das unidades de saúde que lidam com o tratamento do câncer (RIBEIRO *et al.*, 2015).

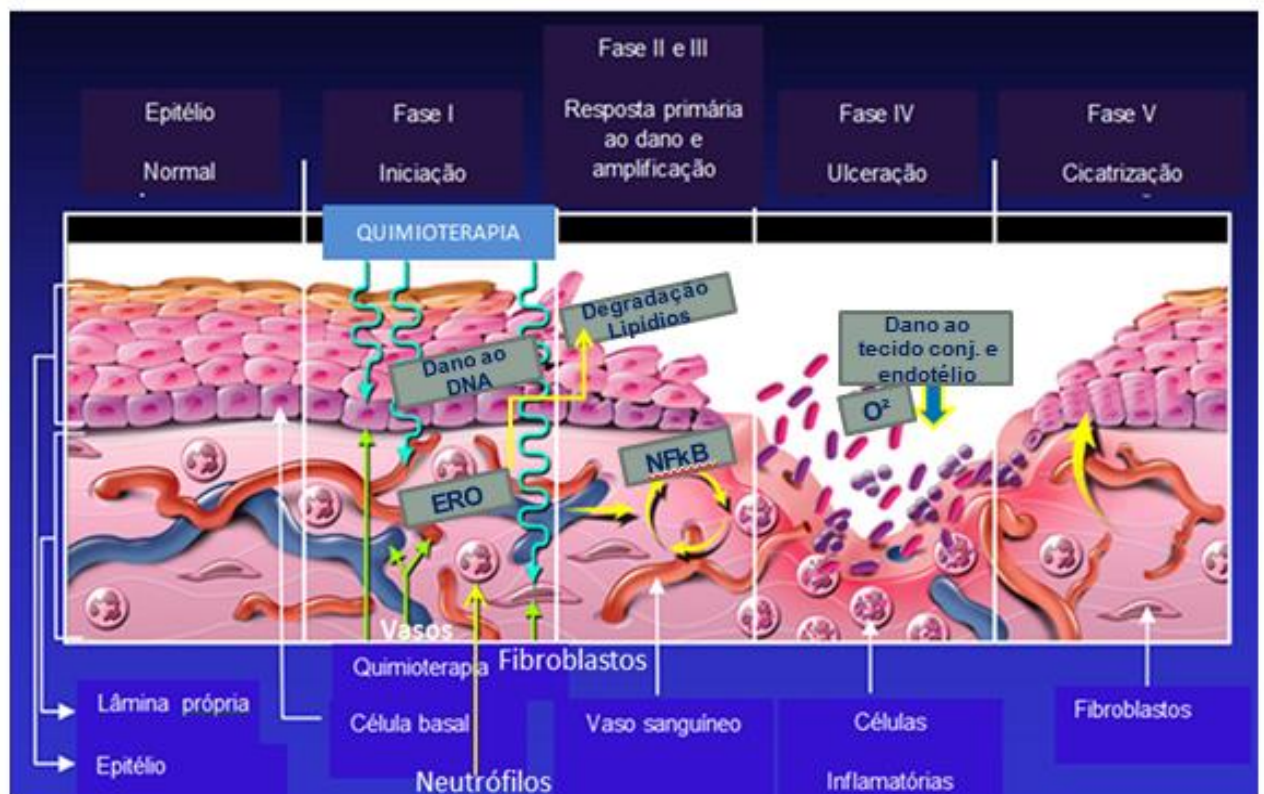
De acordo com o sistema de graduação da Organização Mundial de Saúde (OMS), a mucosite oral é classificada em cinco graus, são eles: grau 0 - indica ausência de mucosite; grau I - presença de úlcera indolor, eritema ou sensibilidade leve; grau II - presença de eritema doloroso, edema ou úlceras que não interferem na habilidade do paciente em alimentar-se; grau III - úlceras confluentes que interferem na capacidade do paciente em ingerir alimentos sólidos; grau IV - sintomas tão severos que o paciente requer suporte enteral ou parenteral (BENSADOUN *et al.*, 2001).

Existem algumas intervenções consideradas potencialmente efetivas para a prevenção da mucosite oral, entre elas estão: (1) reforçar melhoria da higiene oral ao longo do tratamento. Para os pacientes que se recusam a utilizar a escova dentária convencional, deve-se sugerir, o uso de esponjas ou escovas de espuma, e sempre que possível devem ser recomendados cremes dentais fluoretados pouco abrasivos, como também o uso de clorexidina, tem mostrado eficácia no controle da mucosite, sendo considerado um potente agente antimicrobiano e antisséptico; (2) eliminação dos focos de inflamação e/ou infecção preexistentes na cavidade bucal (3) manipulação farmacológica do metabolismo de drogas citotóxicas, tal como a modulação do metabolismo do 5-FU com alopurinol; (4)

administração de citoprotetores diretos tais como sucralfato, prostaglandina E2, nitrato de prata, beta caroteno, ou os indiretos como fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e pentoxifilina; (5) uso de antimicrobianos tópicos como clorexidina ou anestésicos tópicos como xilocaína e benzidamida; (6) métodos não farmacológicos incluindo crioterapia oral e irradiação com laser (7) laser em baixa intensidade (HESPANHOL *et al.*, 2010; PETERSON, 1999; VOLPATO *et al.*, 2007).

A mucosite oral caracteriza-se por apresentar cinco fases: (1) fase de iniciação, (2) resposta primária ao dano, (3) amplificação, (4) ulceração e (5) cicatrização (figura 4) (SONIS, 2004).

Figura 4 – Fases do desenvolvimento da mucosite oral.



Fonte: Adaptado de Sonis (2004).

Na fase de iniciação, o DNA das células basais é lesado e, simultaneamente, há formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são mediadores cruciais nos eventos biológicos subsequentes. Nessa fase não há alteração visível na camada mucosa, porém há o início de uma cascata de eventos na camada submucosa (SONIS, 2004).

Na fase seguinte, a qual é denominada resposta primária ao dano, o DNA lesado e as ERO iniciam uma cascata de eventos complexos que ainda não é bem compreendido. Porém, já é bem estabelecido que o dano ao DNA resulta na estimulação de várias vias de transdução que ativam fatores de transcrição como p53 e fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B). Este pode ser estimulado em resposta às ERO (SONIS, 2002). A degradação dos lipídios da membrana celular pelas ERO geram produtos que suprarregulam genes de resposta imediata, como os codificados por C-JUN e C-JUN kinase aminoterminal (JNK) (CRISWELL *et al.*, 2003; DAVIS, 2000). Nessa fase ocorrem mudanças em grande parte das células da mucosa, não se limitando às células epiteliais da mucosa oral. Dentre os fatores transcripcionais que são ativados pelas ERO, NF κ B tem sido considerado um dos mais importantes devido a sua relação com a toxicidade e resistência a terapia antitumoral (SONIS, 2002).

Além disso, a ativação de NF κ B pode resultar na suprarregulação de mais de 200 genes, muitos dos quais apresentam potencial efeito tóxico sobre a mucosa. As citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) encontram-se elevadas na mucosite induzida por 5-FU e são suprarreguladas por NF κ B. Geralmente, os níveis elevados dessas citocinas são correlacionados ao dano precoce ao tecido conjuntivo e ao endotélio, resultando na redução da oxigenação epitelial e morte das células epiteliais basais. Concomitantemente, fibroblastos, via ativação de proteína ativadora-1 (AP-1), são estimulados a secretar metaloproteinases (MMP) que promovem a destruição de colágeno da matriz subepitelial e da membrana basal respectivamente por MMP-1 e MMP-3 (BAMBA *et al.*, 2003).

A fase de amplificação ocorre como consequência da suprarregulação gênica que é influenciada pela ativação inicial de fatores de transcrição. Uma grande quantidade de moléculas biologicamente ativas se acumulam e atingem o tecido da submucosa. Algumas dessas, como a citocina pró-inflamatória TNF- α , ativam NF κ B, gerando uma retroalimentação positiva. Em adição, agindo por meio de membros da família do receptor TNF- α , ela inicia a sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) levando a ativação de C-JUN quinase aminoterminal (JNK), que por sua vez regula a ativação transcripcional de AP-1, resultando na ativação de caspase-3 e morte celular (DAVIS, 2000). Além disso, TNF- α e IL-1 β induzem a ativação de MMP-1 e MMP-3 (BAMBA *et al.*, 2003; SESAKI *et al.*, 2000). Esses eventos em conjunto contribuem para as alterações na camada submucosa e no epitélio oral.

A fase de ulceração da mucosite é considerada a mais impactante em pacientes e modelos murinos. A perda da integridade da mucosa propicia a invasão de produtos da parede celular de bactérias que colonizam a cavidade oral, os quais estimulam células mononucleares a liberarem e produzirem citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez promovem indiretamente a transcrição de genes pró-apoptóticos e potencializam os danos teciduais (ALIKHANI *et al.*, 2003; ENGELS-DEUTSH *et al.*, 2003). Nessa fase, há intensa migração de células inflamatórias para a base da lesão mediada por fatores quimiotáticos. Por fim, na fase de cicatrização ocorre a resolução da lesão induzida pelo quimioterápico (SONIS, 2004). A participação de mediadores inflamatórios, bem como o desenvolvimento de fármacos que sejam capazes de inibir esse efeito colateral, que é a mucosite oral, vem sendo estudado.

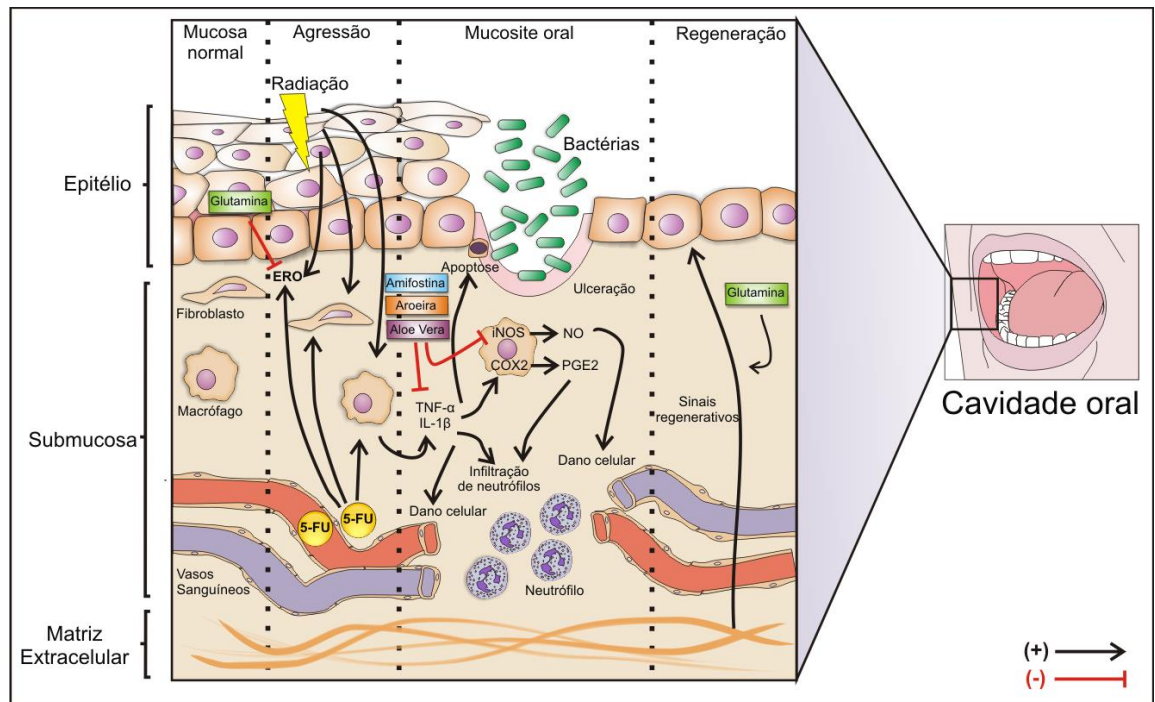
No que concerne a participação do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite oral, inibidores seletivos da iNOS, aminoguanidina e 1400W preveniram a mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters (LEITÃO *et al.*, 2007).

Em outros estudos foi demonstrada que a atorvastatina, uma estatina inibidora da HMG redutase, preveniu a lesão na mucosa oral induzida por 5-FU por diminuir os níveis de nitrito na mucosa jugal dos animais submetidos a mucosite oral (MEDEIROS *et al.*, 2010).

A participação de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) também foi evidenciada na mucosite oral induzida por 5-FU. Na mucosite induzida por quimioterápicos ocorre aumento da expressão de COX-2, a inibição dessa enzima com celecoxibe preveniu a ocorrência da lesão na mucosa induzida por 5-FU (LIMA *et al.*, 2005).

De acordo com estudos do nosso grupo (Figura 5), os mediadores inflamatórios iNOS, ciclo-oxigenase (COX-2), prostaglandina E2 (PGE2), TNF- α e IL-1 β , estão envolvidos no dano celular, na infiltração de neutrófilos e apoptose, o que contribui para ulceração e necrose da mucosa (LEITÃO *et al.*, 2008; LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005).

Figura 5 - Desenho esquemático da patogênese da mucosite oral ressaltando os estudos realizados no Laboratório de Farmacologia de Inflamação e do Câncer (LAFICA).



EROs: espécies reativas do oxigênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; COX-2: ciclooxigenase-2; PGE2: Prostaglandina E2; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β : interleucina 1 beta; 5-FU: 5 fluorouracil.
Fonte: Memorial de estudos realizados pelo LAFICA.

A terapêutica da mucosite oral geralmente envolve uma boa higiene oral, analgésicos sistêmicos, e cuidados preventivos, como benzidamina. Vários agentes tópicos contendo L-glutamina e PGE2 (dinoprostona) são utilizados (LEITÃO *et al.*, 2008; PETERSON *et al.*, 2007).

Estudos clínicos controlados demonstraram a eficácia de pastilhas *Lactobacillus brevis* na redução da incidência de mucosite oral grave em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, submetidos à radiação e quimioterapia. *Lactobacillus brevis* produz elevados níveis de arginina desaminase que em células humanas eucarióticas pode converter arginina em óxido nítrico e poliaminas que promovem redução dos níveis de mediadores inflamatórios (citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , PGE₂, MMP da matriz e PAF) (SHARMA *et al.*, 2012).

Plantas medicinais e outros compostos com ações anti-inflamatórias como *Aloe arborescens* (*Aloe vera*), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (*Aroeira*), Amifostina (droga com alto poder antioxidante, usado clinicamente para tratar a xerostomia) (MOTA *et*

al., 2007) e Glutamina (também tem efeito antioxidante -NO), demonstraram prevenir as lesões induzidas por 5-FU na mucosa oral (LEITÃO *et al.*, 2007).

Com apenas duas doses, Freitas *et al.*, (2012) observaram forte efeito anti-inflamatório de proteínas do látex (PL) da *Calotropis procera* sobre a inflamação induzida por 5-FU em modelo de mucosite oral. A PL da *Calotropis procera* inibiu significativamente as alterações macroscópicas (como edema e formação de úlceras danosas) e histológicas (como infiltrado de células inflamatórias e perda da integridade do epitélio oral) induzidas por 5-FU.

1.4 Produtos Naturais

A flora brasileira é considerada a mais rica do mundo, com cerca de 56.000 espécies de plantas (BRASIL, 2007). Diversos metabólitos secundários produzidos pelas plantas possuem funções de defesa contra herbívoros, pragas e patógenos (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Moléculas complexas como terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/microrganismo fitopatogênico. Tais substâncias são consideradas como produtos naturais e representam uma fonte alternativa quase inesgotável de novas moléculas, com potencial para serem utilizados no controle químico de doenças (DOMINGUES *et al.*, 2011).

Em um contexto geral, a utilização de extratos de plantas para propósitos medicinais tem suscitado maior interesse nos últimos anos. No Brasil, encontram-se registrados na ANVISA diversos medicamentos fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Devido ao intenso uso das plantas na medicina popular, desde as épocas mais remotas, estas têm sido valorizadas como produtos naturais importantes para a manutenção da saúde humana, especialmente na última década, com a realização de muitos estudos sobre terapias naturais (CORRÊA *et al.*, 2001). As propriedades terapêuticas dos princípios e medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento de doenças. Profissionais usuários da fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses, enfermidades infecciosas e doenças inflamatórias (COSTA *et al.*, 1985; BEZERRA *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2011).

Os produtos naturais têm sido a fonte da maior parte dos ingredientes ativos dos medicamentos (HARVEY, 2008). Embora nos últimos 15 anos, a indústria farmacêutica tenha

reduzido significativamente a pesquisa, os produtos naturais são ainda uma fonte importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Pesquisa realizada entre os anos 1981 a 2007 mostrou que quase metade dos fármacos aprovados nos EUA desde 1994, foi obtida direta ou indiretamente de produtos naturais. Treze novas drogas derivadas de produtos naturais têm sido aprovadas no período de 2005 a 2007 (HARVEY, 2008; LI; VEDERAS, 2009).

Tendo em conta a despesa de purificação e isolamento de produtos naturais, a utilização de ervas se expande em todo o mundo. No entanto, o uso de ervas para aplicações terapêuticas exige a garantia de segurança, qualidade e eficácia destes produtos (SANTANA *et al.*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2007).

1.5 *Calotropis procera*

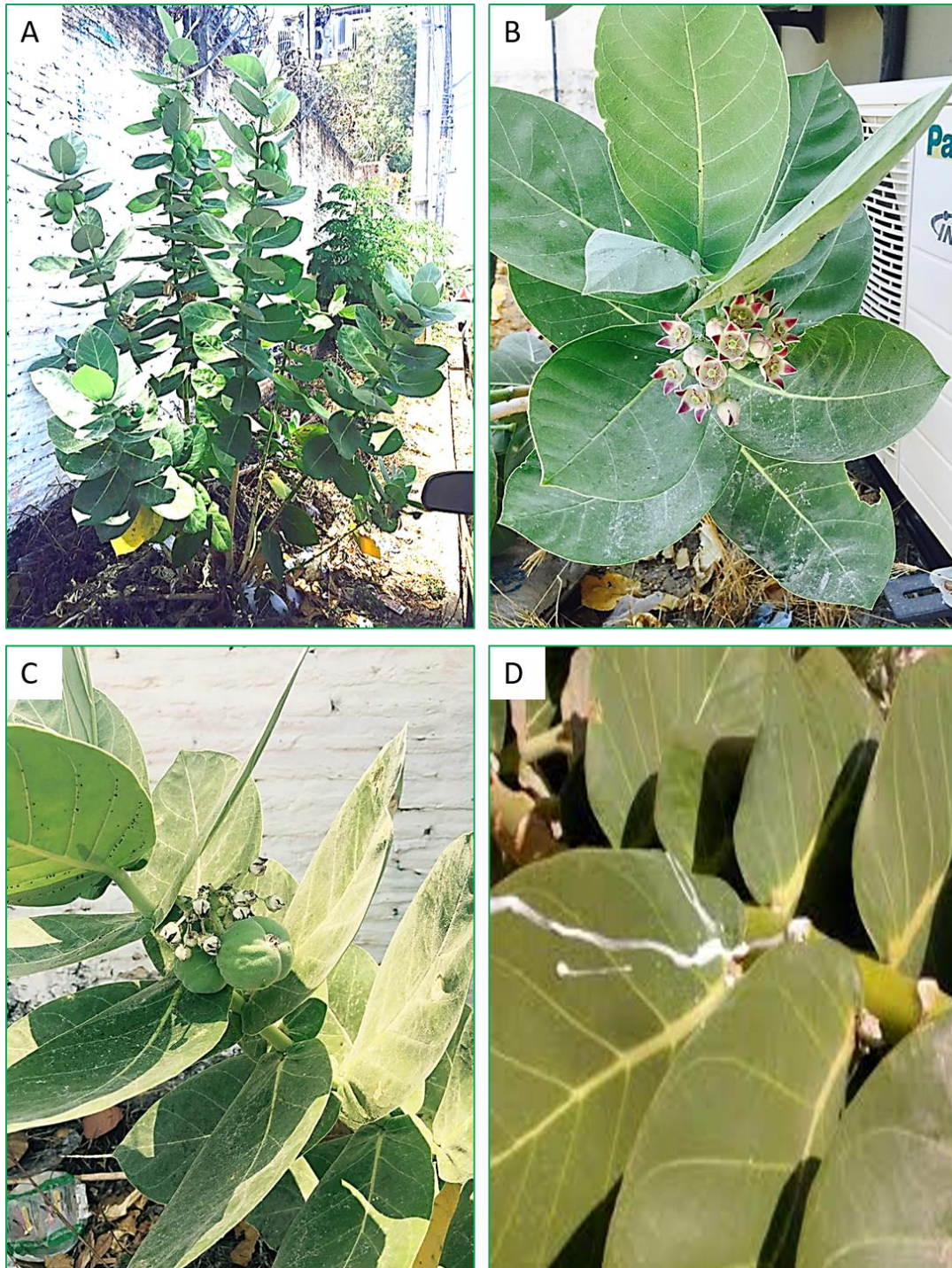
A *Calotropis procera* (Ait.), é da família Apocynaceae, é uma planta laticífera e arbustivas, nativas da África tropical e da Índia e tem recebido atenção especial devido ao seu uso na medicina popular na Índia e, em menor medida, no Brasil (RAMOS *et al.*, 2013).

Calotropis procera é um arbusto que é popularmente conhecido como “bombardeira”, “ciumeira” e de “algodoeiro-de-seda”. É comum em condições climáticas adversas e solos pobres explicando sua boa adaptação para o Nordeste do Brasil, onde foi introduzido no início do século XIX, espalhando-se dentro de diferentes biomas, como "Caatinga" e "Cerrado". No Nordeste brasileiro é conhecido popularmente como "ciúme" (BARROS *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2011).

O látex desta espécie tem sido usada na medicina tradicional em países africanos e em países asiáticos para diversas finalidades, como expectorante, anti-inflamatórios, laxantes, anti-asmático, anti-sifilítico, fungicida, moluscicida e até mesmo anti-helmíntico (AL-QARAWI *et al.*, 2001; IQBAL *et al.*, 2005). Diferentes compostos ativos, incluindo cardenolídeos, triterpenóides, antocianinas, taninos, alcalóides, resinas e enzimas proteolíticas, entre outros, fazem parte da composição de látex *C. procera* (AL-QARAWI *et al.*, 2001 CAVALCANTE *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2011;).

Segundo Moreira *et al.*,(2005), a planta pode atingir de 2,5 a 6,0 metros de altura, possuindo uma ou poucas hastes e poucos galhos. O florescimento e a frutificação ocorrem durante o ano todo, onde centenas a milhares de sementes podem ser produzidas por planta (Figura 6).

Figura 6- Características e aspectos botânicos da planta *Calotropis procera* (AIT.) R. Br.



Fonte: Elaborada pela autora. A figura está representando as partes aéreas da *Calotropis procera* (A), as flores (B), os frutos (C) e o látex (D).

No Brasil, esta planta passou a se comportar como invasora de áreas de pastagens, devido à grande disseminação de suas sementes pelo vento, sendo encontrado nos estados da região Nordeste (semi-árido), Centro-Oeste e Sudeste, especialmente, nos estados de Minas

Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso, Goiás, e Distrito Federal (FERREIRA; GOMES, 1974/76; MELO *et al.*, 2001).

Entre as plantas que compõem o potencial vegetativo do bioma Caatinga, *Calotropis procera* tem alta digestibilidade e teor de proteína, que vai 13,6-19,4% sendo utilizada na alimentação de animais (ABBAS *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 2011).

Vários compostos foram isolados a partir de látex de *C. procera*: Calotropin, Calotoxin, Calactin, uscharina, Procerain, β -amirina, lupeol, quercetina-3-rutinoside, etilo calotropenyl, β -sitosterol, estigmasterol, multiflorenol, e Urs-19 (29) -en-3- β -ol, 2 triterpenos e entre outros (CAVALCANTE *et al.*, 2016; CHUNDATTU *et al.*, 2011; RANJIT *et al.*, 2012).

Diferentes partes da árvore têm sido usadas para tratar e prevenir doenças. Na Índia, as folhas são utilizadas como analgésicas (SANGRAULA *et al.*, 2002). Elas possuem atividade anti-helmíntica (IQBAL *et al.*, 2005;), antipirética e antiespasmódica (BARROS *et al.*, 2004) e anti-inflamatórias (FRETIAS *et al.*, 2012; KUMAR e BASU, 1994; RAMOS *et al.*, 2013), anti-ulcerosa (TOUR *et al.*, 2011), cicatrizante (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). É também notória a sua atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* (SHARMA; SHARMA, 2000) e sua ação hepatoprotetora, um efeito provavelmente devido à presença de flavonóides com potencialidade antioxidante semelhante à vitamina C (SETTY *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

As frações acetato de etila, acetona e metanólica das folhas de *C. procera* possuem promissoras atividades antiproliferativas em linhagem de câncer *in vitro*. Além disso, os extratos da fração acetato de etila e acetona são capazes de reduzir o crescimento do tumor *in vivo* de Sarcoma no fígado e rins de ratos transplantados na presença de toxicidade reversíveis (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

O extrato etanólico das folhas *C. procera*, apresentou significativa atividade antipirética, analgésica e bloqueadora neuromuscular. A análise fitoquímica deste extrato revelou a presença de alcalóides, glicosídeos cardíacos, taninos, flavonóides, esteróides e/ou triterpenos agindo de forma sinérgica para promover o efeito anti-inflamatório (MOSSA *et al.*, 1991).

A raiz é usada popularmente em doenças de pele e como anti-helmíntico. Os extratos metanólicos da raiz da *C. procera* simulam ações estrogênicas, alterando o endométrio uterino e interfere na implantação do blastocisto (KAMATH e RANA, 2002), enquanto os extratos da casca e do caule reduzem a inflamação dos brônquios, demonstrando

atividade antitussígena pela administração oral (DIEYE *et al.*, 1993). As flores são usadas na inapetência (KIRTIKAR e BASU, 2006).

Sharma *et al.*, (1934) relatam que o látex da planta é muito irritante e corrosivo, usado com fins criminais (abortivo e infanticida) e Hussein *et al.*, (1994) descrevem o poder moluscicida que a planta apresenta. Esses diversos efeitos associados aos compostos presentes no látex da *Calotropis procera* demonstram que há uma diversidade de atividades biológicas.

O látex da *C. procera* mostrou ser efetivo em modelos experimentais no tratamento da epilepsia, inflamação, dor articular e edemas (KUMAR *et al.*, 2011). Segundo Kumar (2004), o termo látex é frequentemente utilizado para descrever uma secreção de aspecto leitoso, liberada pelas plantas quando estas sofrem algum tipo de dano mecânico.

O látex encontrado na parte aérea dessa planta (folhas jovens, predominantemente) é utilizado para tratar a diarreia (SATYAVATI *et al.*, 1976), possivelmente por efeito direto em células musculares lisas do trato gastrointestinal (KUMAR e SHIVKAR, 2004) e ação antimicrobiana (MOHAMED *et al.*, 2014). Além disso, o látex possui atividade biológica contra os protozoários coccídios *Eimeria ovinoidalis* (KUMAR *et al.*, 2005) e larvas de *Aedes aegypti* (RAMOS *et al.*, 2006). Adicionalmente, apresenta efeito hipoglicemiante (NETO *et al.*, 2013).

As proteínas presentes no látex da *C. procera* vêm sendo amplamente estudadas. Uma fração protéica do látex de *C. procera* (PL) mostrou atividade anti-inflamatória em modelo de peritonite, onde inibiu a adesão e rolamento de leucócitos por um mecanismo dependente de óxido nítrico (RAMOS *et al.*, 2009), e de mucosite oral onde inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (FREITAS *et al.*, 2012). O mesmo látex também demonstrou efeito gastroprotetor em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol, ligação do piloro ou por aspirina, e foi capaz de reduzir a hemorragia gástrica além de manter a integridade da mucosa e diminuição do estresse oxidativo (TOUR *et al.*, 2011).

Alencar e colaboradores (2004) mostraram que a atividade anti-inflamatória presente no látex de *C. procera* é observada em uma fração solúvel em água, rica em proteínas. Esta fração proteica do látex foi capaz de reverter a inflamação em diferentes modelos animais.

O extrato metanólico de *C. procera* na dose 0,5 g/kg, via oral reduziu o edema de pata induzido por carragenina após 1, 2, 3, 4 e 5 horas em 55,1%; 43,5%; 43,7%; 62,2%; 63,6%, respectivamente. No experimento de peritonite, o extrato metanólico reduziu o número de leucócitos do exsudato da cavidade peritoneal agredida pela carragenina (BARROS *et al.*, 2000). Kumar e colaboradores (2011) também observaram um forte

efeito anti- inflamatório na fração não dialisável do látex de *C. procera*, associando este efeito à redução significativa do edema de pata em ratos.

O látex de *C. procera* apresentou atividade anti-inflamatória (KUMAR; BASU, 1994) e analgésica cuja potência foi comparada ao ácido acetilsalicílico (DEWAN *et al.*, 2000). Além disso, o látex melhorou a cicatrização de feridas pelo aumento de colágeno e epitelização, reduzindo a área do ferimento (RASIKA *et al.*, 1999; DEWAN *et al.*, 2000). Figueiredo e colaboradores (2014), observaram que membranas de polivinil álcool contendo proteínas do látex aceleraram de forma significativa a cicatrização de feridas, efeito este acompanhado por fibroplasia e deposição de colágeno. Mohamed *et al.*, 2014 verificaram que o látex do soro de *Calotropis procera* demonstrou uma forte atividade antimicrobiana por meio de uma rápida redução dos ions de prata.

O Látex de *C. procera* apresenta múltiplas isoformas de quitinases, com massas moleculares de cerca de 30 kDa valores e PI que variam de 4,6 a 6,0. Essas quitinases do látex *C. procera* foram mais ativas em insetos do que em fungos, o que indica que o aparelho de defesa química encontrado nos fluidos de látex envolve proteínas com alvos e funções específicas. Em conjunto com outras proteínas, tais como as peptidases e osmotinas, quitinases pode conferir um efeito sinérgico de proteção contra diferentes agressores, resultando em um eficiente mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas de látex ao longo da evolução (FREITAS *et al.*, 2016).

Dados da literatura demonstram que as proteínas extraídas do látex de *C. procera* previnem o choque séptico induzido pela infecção letal por Salmonela (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Outros autores demonstraram que a proteínas do látex também têm atividade antitumoral e antiproliferativa (MAGALHÃES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Mais recentemente foi demonstrado que proteínas extraídas do látex de *C. procera* possuem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelo de monoartrite em ratos, inibindo o edema, a nocicepção e o estresse oxidativo (KUMAR *et al.*, 2011). Estudo prévio realizado em nosso laboratório verificou que as proteínas extraídas do látex de *C. procera* previnem a mucosite oral em hamsters (FREITAS *et al.*, 2012).

Ramos *et al.* (2009) estudando a fração proteica do látex de *C. procera* realizou o fracionamento por cromatografia de troca iônica, em três subfrações denominadas PI, PII e PIII. Quando estas subfrações foram avaliadas quanto ao efeito anti-inflamatório, foi observado que PI foi a mais efetiva em inibir a migração de neutrófilos e a que mais elevou os níveis séricos de óxido nítrico, apresentando desta

forma o mais potente efeito anti-inflamatório dentre as três subfrações proteicas de *C. procera* (VIANA *et al.*, 2015).

Posteriormente, Oliveira *et al.* (2012) demonstram que a subfração PI (via intraperitoneal) foi capaz de aumentar a infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal neste modelo. PL-PI também aumentou a fagocitose e balanceou a liberação de óxido nítrico liberado no sangue, prevenindo o choque séptico em modelos experimentais

Estes dados nos levaram a investigar em qual subfração está o efeito de PL da *Calotropis procera* na mucosite oral induzida por 5-FU.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A mucosite oral é um dos efeitos colaterais mais comuns do 5-FU em pacientes com câncer em uso de 5-FU, podendo afetar mais de 40% dos pacientes com câncer em uso desse agente quimioterápico (BALIS *et al.*, 1985; BISHOP *et al.*, 1986; CABALLERO *et al.*, 1985; MAGRATH *et al.*, 1984; ROTH *et al.*, 1991). De acordo com Haagen *et al.*, (2009), praticamente todos os pacientes com câncer de cabeça e pescoço desenvolvem algum grau de mucosite durante o tratamento. Pacientes que utilizam o protocolo FOLFIRI (5-FU, leucovorin e irinotecano) apresentam risco de 5% de desenvolver mucosite oral, já em pacientes submetidos à quimioterapia convencional FOLFOX (5-FU, leucovorin e oxaliplatina) o risco é de 15-40% (KEEFE *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2007). A mucosite oral compromete a ingestão de alimentos que geralmente é acompanhada por desnutrição, perda de peso e infecção sistêmica (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). Este último pode apresentar correlação com o rompimento da barreira epitelial oral.

Estudos da patogênese da mucosite oral têm sido desenvolvidos, incluindo o efeito de produtos naturais, com o intuito de minimizar os sinais e sintomas clínicos e seus riscos. Nesse contexto, a fração PL da *Calotropis procera* demonstrou previamente, com apenas duas doses, prevenir os danos causados pelo 5-FU na mucosa oral de hamsters (FREITAS *et al.*, 2012). Devido ao potente efeito anti-inflamatório desse composto na mucosite oral experimental evidenciado no estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, buscou-se no presente estudo elucidar qual subfração era a responsável por este efeito e o possível mecanismo subjacente.

O isolamento de seu composto ativo vem sendo o objeto de estudo do grupo de pesquisa do professor Marcio Viana Ramos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará. Uma vez descoberta a subfração protéica, será mais fácil à identificação do composto ativo responsável por seus efeitos benéficos e a sua implementação terapêutica futura no tratamento da mucosite oral induzida por quimioterápicos em seres humanos.

Portanto, almeja-se elucidar novos manejos para esse efeito colateral que limita o tratamento de pacientes oncológicos e causa aumento de custos, incluindo risco de morte aos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* (PL) na prevenção da mucosite oral experimental induzida por 5-FU em hamsters.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito de subfrações da *Calotropis procera* na perda ponderal e sobrevida de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU;
- ✓ Identificar o efeito de subfrações da *Calotropis procera* nas alterações macroscópicas e histológicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters;
- ✓ Mensurar o efeito de subfrações da *Calotropis procera* na redução da inflamação (mensurando os níveis de mieloperoxidase, IL-1 β e TNF- α) e do estresse oxidativo (mensurando os níveis de GSH e MDA) induzidos por 5-FU na mucosa oral de hamsters;
- ✓ Verificar o efeito de subfrações da *Calotropis procera* na prevenção da expressão de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) induzida por 5-FU na mucosa oral de hamsters;
- ✓ Investigar o efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* na ativação de macrófagos (imunohistoquímica de molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1, Iba-1) em hamsters submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU;
- ✓ Analisar o efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* na produção fibras colágenas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

A planta *Calotropis procera* apresenta como característica peculiar uma intensa produção de látex branco, quando se rompe os tecidos dessa planta (OLIVEIRA, 2009). Partes aéreas da planta *C. procera* (Ait.) R.Br. foram coletadas na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. Um exemplar da planta seca foi depositado sob número 32663, no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

4.2 Coleta e fracionamento do látex

As proteínas do látex da *Calotropis procera* e suas subfrações foram cedidas pelo prof. Dr. Márcio Viana Ramos, do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará. A planta, por ser rica em proteínas, teve seu látex retirado e fracionado para obtenção de uma fração protéica e suas subfrações (PI, PII, PIII e PII IAA).

A coleta do látex da *C. procera* procedeu-se sempre no período da manhã entre 7 e 9 horas, a partir de plantas sadias que cresciam espontaneamente à beira de estradas da zona urbana de Fortaleza, seguindo uma estratégia descrita por Ramos *et al.* (2010).

Após a quebra do ápice caulinar da planta, coletou-se o exsudado do látex, em tubos de Falcon, contendo um volume de água destilada para finalizar numa proporção de 1:1 (v:v). A coleta do látex em água minimiza o efeito natural da coagulação que ocorre neste fluido, logo após sua exsudação, evitando o aprisionamento de substâncias solúveis.

Em seguida, centrifugaram-se as amostras (4°C, 10 minutos, 5.000 x *g*). Coletou-se o sobrenadante que foi submetido à diálise contra água destilada, em membranas com capacidade de retenção de moléculas superior a 8.000 Da, durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas). Em seguida, o líquido retido no interior das membranas foi novamente centrifugado, sob as mesmas condições anteriores e o sobrenadante liofilizado, obtendo-se um material rico em proteínas e destituído de borracha.

As frações proteicas, obtidas por meio deste protocolo, foram denominadas de proteínas do látex (PL).

4.3 Obtenção das subfrações da PL por Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose

As proteínas totais do látex foram submetidas à cromatografia de troca iônica, em coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* (14 x 2,5 cm) segundo metodologia descrita por Ramos *et al.*, (2006). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM (pH 5,0). PL (80 mg) foram dissolvidos em 8 mL da solução de equilíbrio. Centrifugou-se a 10.000 x g, numa temperatura de 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante obtido aplicado à coluna.

Após aplicação da amostra, as proteínas não retidas foram inicialmente eluídas com a mesma solução de equilíbrio, obtendo-se desta forma o pico I (PI). As proteínas retidas foram eluídas após aplicação de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) acrescido de NaCl 0,2 M para obtenção do pico II (PII). O pico III (PIII) foi obtido após a aplicação da solução de equilíbrio acrescida de NaCl 0,3 M. Frações de 5 mL/tubo foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e o conteúdo proteico determinado em 280 nm. O material obtido de cada fração foi reunido, dialisado e liofilizado. A subfração PII foi tratada com iodoacetamida (IAA), um inibidor específico de proteases cisteínicas, gerando a subfração PII IAA, conforme descrito anteriormente (VIANA *et al.*, 2015).

4.4 Análise do perfil proteico através de eletroforese unidimensional

As eletroforeses deste estudo foram feitas em gel de poliacrilamida 12,5%, em condições desnaturantes, na presença de β -mercaptoetanol 5%. A técnica foi conduzida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas.

Foram utilizados géis de poliacrilamida (5%), em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 1%. Os géis de separação foram feitos com tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9, SDS 1% e 12,5% de poliacrilamida. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo SDS 1%, aquecidas por 5 minutos a 100 °C, submetidas à centrifugação por 5 min a 25°C em uma centrífuga de bancada e aos sobrenadantes obtidos foram adicionados traços de azul de bromofenol 0,02% e cristais de sacarose, para a marcação da frente de corrida eletroforética.

Para a estimativa da massa molecular das proteínas em análise, foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica

bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

As corridas foram realizadas sob as condições de 15 mA por placa e 120 V, por um período médio de 2 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração dos géis com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) contendo o corante *Coomassie Brilhante Blue R-250* (PhastGel Blue R) e revelação com uma solução contendo os mesmos componentes, porém, sem o corante.

4.5 Zimograma

Para detectar a atividade proteolítica em gel, as amostras liofilizadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) tal como descrito anteriormente, contudo o gel estava composto por gelatina 0,1%. Após a corrida o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5% em água a 25 °C, sob agitação constante por 40 minutos. Em seguida o gel foi incubado em tampão de ativação (tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo DTT 3 mM). A atividade proteolítica ocorreu durante 30 minutos a 37 °C e ao final o gel foi corado com uma solução de *Comassie Brilliant Blue R-250* 0,2%. A atividade enzimática foi detectada como bandas transparentes nos géis.

4.6 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará- UFC, protocolo processo nº 028/13 (ANEXO 1). Em todos os experimentos foram observados os princípios éticos da experimentação animal normatizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.7 Animais

Foram utilizados durante os experimentos, hamsters *Golden sírius* machos (80 a 140g), no total de 150 animais, fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. A escolha desses animais foi devido à facilidade de observação de suas mucosas jugais e habilidade em tolerar doses de

quimioterápicos capazes de induzir mucosite oral sem mortalidade significativa (SONIS *et al.*, 1990).

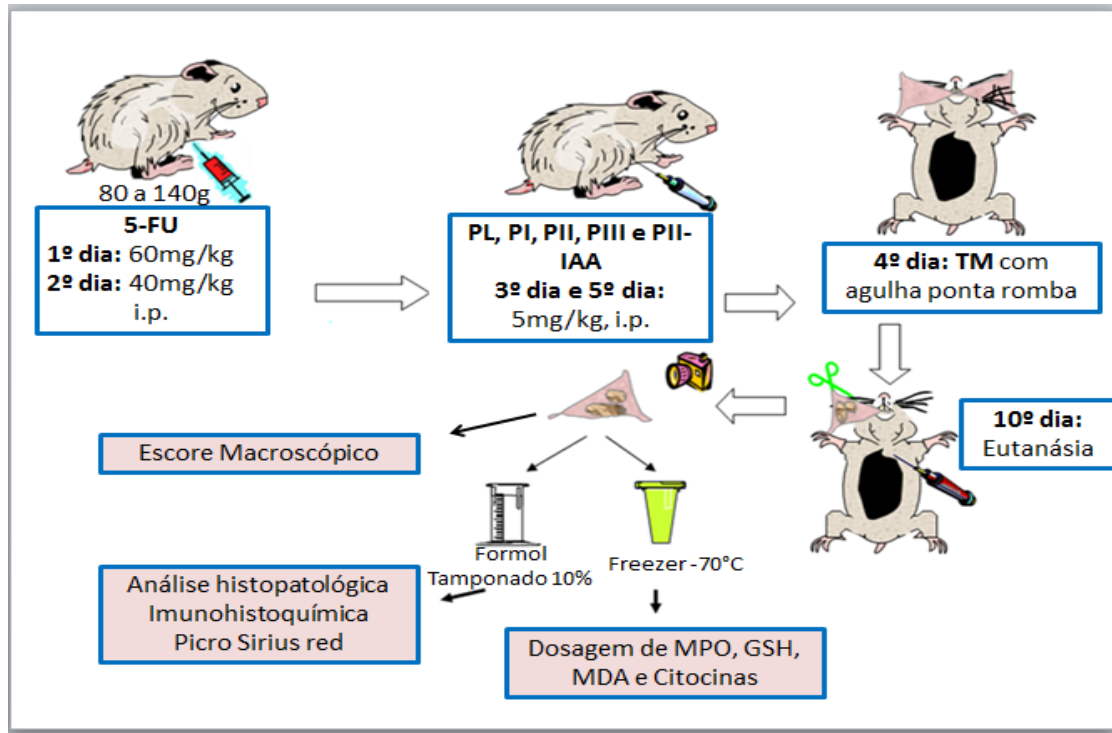
Os animais envolvidos no estudo foram acondicionados em número de 6 por gaiola (gaiola em polipropileno, autoclavável nas medidas de 30x20x13cm com tampas em arame de ferro com tratamento de zincagem nas medidas aproximadas de 49 x36 cm) mantidos em salas com o horário controlado 12/12 ciclo claro/escuro a 25°C, com ração e água à vontade. Os animais ficaram em uma sala climatizada com exaustão de gases. As gaiolas foram lavadas e a maravalha substituída duas vezes por semana.

4.8 Modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters

Utilizou-se o modelo de mucosite oral (Figura 7), originalmente desenvolvido por Sonis *et al.*, (1990), e reproduzido com modificações no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC, conforme descrito anteriormente (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005). Os animais receberam 5-FU nas doses de 60 e 40 mg/Kg nos dias 1 e 2 do protocolo experimental, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.). No quarto dia, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (60 e 5 mg/kg, i.p.) respectivamente, e em seguida tiveram suas mucosas jugais direitas expostas e submetidas a escoriações com uma agulha de ponta romba (trauma mecânico- TM), a fim de reproduzir os sinais clínicos da irritação crônica, fonação e mastigação, e como fator potencializador para a mucosite. As ranhuras foram distribuídas em número de quatro no sentido horizontal e quatro no sentido vertical em ambas as faces das mucosas. No 3° e 5° dia do protocolo experimental, os animais foram tratados com PL ou suas subfrações (PI, PII, PIII, PII IAA, via i.p), nas doses de 5mg/kg, exceto a subfração PII, que foi injetada na dose de 5 ou 10mg/kg.

No 10° dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados após overdose de Cetamina e Xilazina (180 e 15 mg/kg, i.p.). As mucosas jugais foram avaliadas, fotografadas e removidas, sendo dividida em três segmentos para analisar parâmetros deste estudo.

Figura 7 - Desenho esquemático do modelo de mucosite oral por 5-FU em hamsters.



Fonte: Adaptado de Sonis *et al.* (1990).

4.9 Grupos experimentais

Inicialmente, os hamsters foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, sendo cada grupo constituído por 6 animais, conforme descritos a seguir:

- **Grupo Controle:** animais que receberam apenas injeções de salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- **Grupo TM:** animais submetidos ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal, no 4º dia e receberam salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- **Grupo 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam salina (0,9%, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.

- **Grupo PL + 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam PL (5mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- **Grupo PI + 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam PI (5mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- **Grupo PII + 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam PII (5mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- **Grupo PIII + 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam PIII (5mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- **Grupo PII IAA + 5-FU:** animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam PII IAA (5mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.

4.10 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizadas no estudo.

Os fármacos, os reagentes, os materiais e as soluções que foram utilizadas neste estudo, encontram-se detalhados no apêndice.

4.11 Parâmetros avaliados

4.11.1 Avaliação da taxa de sobrevida

Até o 10º dia do protocolo experimental registrou-se a mortalidade dos animais para avaliar a taxa de sobrevida dos hamsters submetidos ao modelo experimental. Os dados foram expressos como percentual (%) de sobreviventes.

4.11.2 Análise macroscópica da mucosa jugal (bochechas)

No 10º dia, os hamsters foram eutanasiados, e suas mucosas jugais direitas foram fotografadas e observadas. Para análise macroscópica foram considerados os aspectos como

presença, intensidade e extensão de eritema, vasodilatação, erosão, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados por Sonis *et al.* (2000):

- **Escore 0**: mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação;
- **Escore 1**: presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa;
- **Escore 2**: eritema severo, vasodilatação e erosão superficial;
- **Escore 3**: formação de úlceras em uma ou mais faces, mas não afetando mais de 25% da área de superfície da bolsa. Severo eritema e vasodilatação;
- **Escore 4**: formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da mucosa;
- **Escore 5**: completa ulceração da mucosa, sendo impossível a sua exposição.

4.11.3 Análise histopatológica das mucosas jugais

O estudo histopatológico das mucosas jugais foi realizado em cortes seriados de 5µm de espessura. No 10º dia do protocolo experimental, após a observação das mucosas e realização das fotos, as mesmas foram removidas e fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24h. Decorridas 24 horas, os segmentos das mucosas jugais foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Na etapa seguinte, os segmentos das mucosas jugais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo para obter cortes histológicos de 5 µm de espessura, as lâminas contendo os cortes dos segmentos de mucosa jugal foram adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Para análise microscópica foram avaliados presença e intensidade do infiltrado inflamatório celular, reepitelização, vacuolização, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados de 0 a 3 (LIMA *et al.*, 2005), citados a seguir:

- **Escore 0**: epitélio e conjuntivo sem vasodilatação, infiltrado celular inflamatório ausente ou discreto; ausência de hemorragia, edema, úlceras ou abscessos.
- **Escore 1**: ingurgitamento vascular discreto, áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, às custas de leucócitos monocelulares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras ou de abscessos.

- **Escore 2:** ingurgitamento vascular moderado, degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas de hemorragia, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
- **Escore 3:** ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada, predominando polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

4.11.4 Análise ponderal

Os animais foram pesados uma vez ao dia durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em variação de peso, em relação ao peso inicial. Essa análise forneceu dados para confirmar o modelo experimental utilizado neste estudo, além de verificar o efeito de PL e suas subfrações nessa variável.

4.11.5 Dosagem de mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles a mucosa oral. A atividade da mieloperoxidase foi medida a partir das mucosas jugais dos hamsters, usando uma versão modificada do método descrito por Bradley e colaboradores (BRADLEY *et al.*, 1982). Resumidamente, 50 a 100 mg dos tecidos jugais foram colocados em tampão fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em um macerador de tecidos (Politron®). A seguir, o homegenato foi centrifugado (5000 rpm, 4°C, 2 min). Os sobrenadantes foram transferidos para *eppendorfs* e novamente centrifugados (10 minutos) para a melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 10µL do sobrenadante, em duplicata (placas de 96 poços), adicionou-se 200 µL da solução de leitura (5 mg de O-dianisidina; 15 µL H₂O₂ 1%, 3 mL de NaPO₄ tampão; 27 mL de H₂O₂ destilada). A absorbância foi medida a 460 nm em dois tempos diferentes (t₀=0 min. e t₁= 1 min.). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como U MPO/mg de tecido (atividade de MPO).

4.11.6 Determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH)

A concentração de GSH das mucosas jugais foram avaliadas utilizando-se o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As amostras obtidas das mucosas jugais foram homogeneizadas em 0,02 M EDTA. Alíquotas de 100 µL do homogenato foram misturadas com 80 µL de H₂O destilada e 20 µL de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa, centrifugou-se o material por 15 min em rotação de 3000 rpm à uma temperatura de 4°C. Em seguida, novas alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram misturadas com 200 µL de tampão TRIS (0,4 M, pH 8,9) e com 5 µL de de solução de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA) e agitadas por 3 min. A absorbância foi então determinada a 412 nm contra um reagente branco (sem o homogenato). A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.11.7 Dosagem de malondialdeído (MDA)

O Malondialdeído (MDA) constitui um indicador de peroxidação lipídica, e sua dosagem permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico- TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo (LI *et al.*, 2010). Inicialmente foi preparado um homogenato a 10% do tecido macerado em cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 µL foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375µL de ácido fosfórico (1%) e 125µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Em seguida, as amostras foram imersas em banho maria por 45 min a 100°C. Decorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 500 µL de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL da fase superior foram inseridas em placa de 96 poços e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535nm.

4.11.8 Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-1 β)

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β na mucosa jugal foram quantificados por ELISA. Os segmentos das mucosas jugais foram homogeneizados em PBS de acordo com Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção das citocinas IL-1 β e TNF- α foi realizada por meio do *Kit DuoSet* (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1 β ou TNF- α por 18h em temperatura ambiente com 100 μ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200 μ L de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100 μ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 β ou TNF- α em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μ L da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando-se 50 μ L solução de parada (H₂SO₄). A absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.11.9 Imunohistoquímica

Para avaliar a localização da expressão de IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias), ICAM-1 e Iba-1(marcador de macrófagos ativados) na mucosa oral, foi realizada imunohistoquímica para essas proteínas.

Primeiramente foram removidas as mucosas jugais, onde as mesmas foram isoladas, separadas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas, logo após foram colocadas em álcool à 70%. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos jugais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 μ m que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos jugais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol

por cinco minutos cada. Em seguida, os cortes jugais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes jugais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho maria (95°C). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Abcam) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários para anti-IL-1 β (Santa Cruz), anti-ICAM-1 (Abcam), anti-Iba-1 (Abcam) por 4h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com anticorpo secundário, biotilado (Santa Cruz) por 30 min. Após três lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com avidina-biotina por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observaram-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar o número de células imunomarcadas para IL-1 β (citocina pró-inflamatória), ICAM-1 e Iba-1, utilizou-se o programa ImageJ para obter o número de células imunomarcadas/campo. Foram fotografados de 10 a 12 campos/corte histológico (escala de 20 μ m).

4.11.10 Coloração de fibras colágenas com Picro Sirius red (PSR)

Para avaliar as fibras colágenas da mucosa jugal, realizou-se a coloração de Picro Sirius red, conforme descrito pelo fabricante (*Easy path*) e adaptado de acordo com o tecido que foi avaliado (SU *et al.*, 2015).

Inicialmente, as lâminas contendo os cortes dos tecidos jugais (5 μ m) foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C por uma hora e dois banhos em

xilol por cinco minutos cada. Em seguida, hidratou-se os fragmentos com banhos decrescentes de álcool (100%, 95% e 70%) por 5 min cada banho. Em seguida as lâminas foram imersas em água destilada por 10 min. Decorrido este tempo, os tecidos contidos nas lâminas foram incubados com reagente A (Picro Sirius red) por 30 min. Em seguida, lavou-se lâminas rapidamente com água corrente, seguida por uma lavagem com água destilada. Na etapa seguinte os tecidos foram incubados com o reagente B (hematoxilina de Carazzi) por 4 min, seguido por lavagem rápida em água corrente e água destilada. Após as lavagens, as lâminas foram secadas na estufa e montadas com etelan. As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz, com luz polarizada acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). A captura das imagens em luz de campo claro permitiu visualizar as fibras colágenas totais presentes na mucosa jugal, enquanto que ao submeter à luz polarizada possibilitou diferenciar as fibras colágenas tipo I (cor vermelha) e III (cor verde).

4. 12 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; para os escores histológicos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, e para a variável perda ponderal, foi realizado pelo teste two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

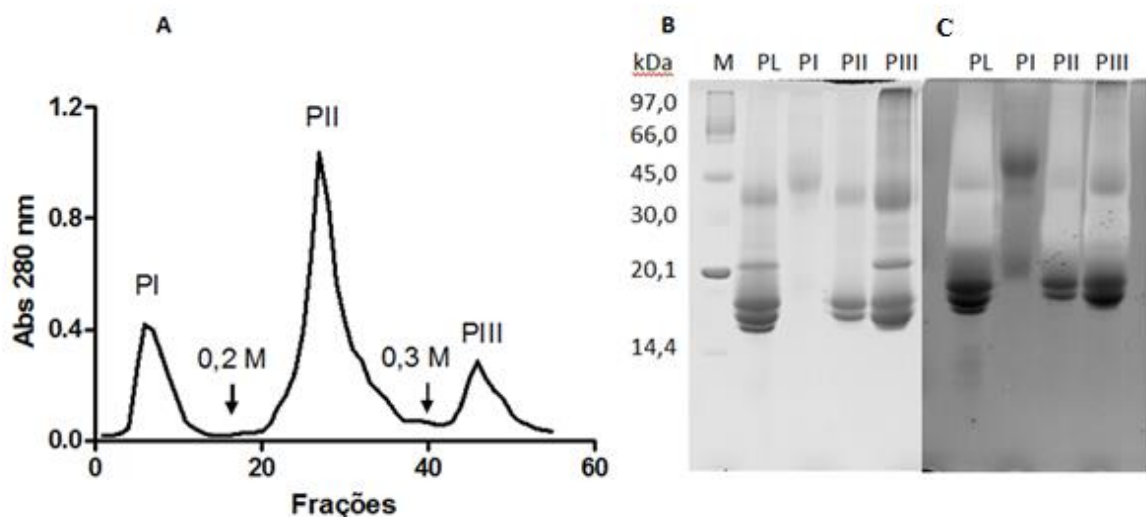
Para análise estatística da curva de sobrevida dos animais, foi utilizado o teste Mantel- Cox log rank.

5 RESULTADOS

5.1 Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex da *Calotropis procera*

Conforme apresentado na figura 8, o látex da *Calotropis procera* (PL) apresenta três subfrações bem diferenciadas, a saber: PI, PII e PIII (Figura 8A). A massa das proteínas do látex de *Calotropis procera* varia de 45-14,4 kDa, enquanto que PI apresenta peso em torno de 40kDa. Com relação às subfrações PII e PIII estas demonstram peso variável e proteínas de baixo peso não evidenciadas na subfração PI (B). Além disso, observou-se intensa atividade proteolítica na subfração PII e PIII (C).

Figura 8 - Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex de *Calotropis procera*.



A - Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex de *C. procera* em coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* pH 5,0. As setas indicam a eluição de proteínas retidas com o tampão acetato de sódio 50 mM, contendo NaCl 0,2 e 0,3 M, respectivamente. **B** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (na presença de β -Mercaptoetanol 5%) da fração proteica de *C. procera* (PL) e suas três subfrações (PI, PII e PIII) **C** e Zimograma contendo gelatina 0,1% para detecção de atividade proteolítica. (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 25 μ L das frações no interior de cada poço, a partir de soluções de 2 mg/mL.

5.2 Efeito de subfrações da *Calotropis procera* na taxa de sobrevida de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

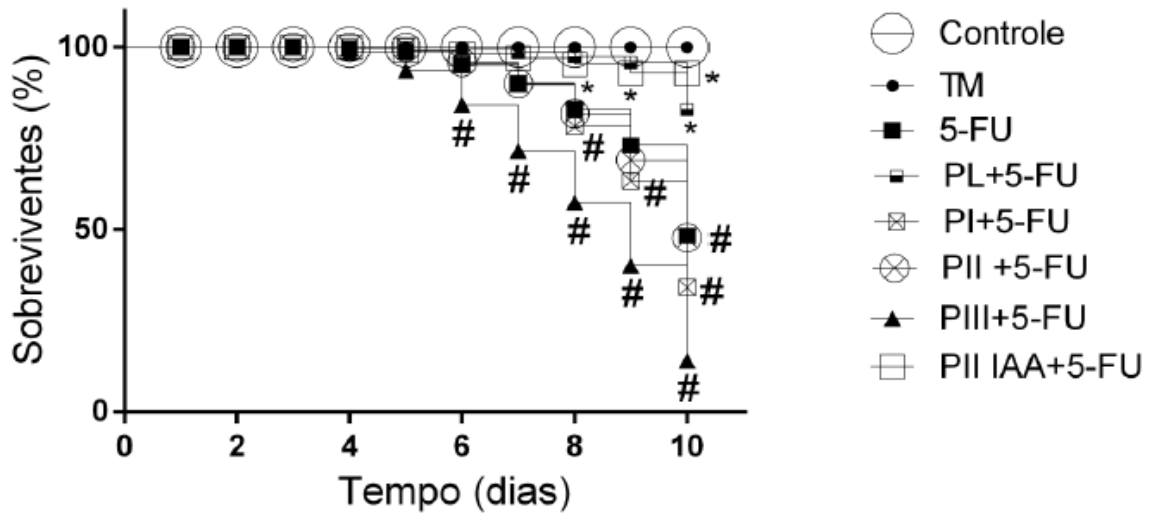
Primeiramente, investigou-se o efeito de subfrações da *C. procera* na taxa de sobrevida dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU até o 10º dia do protocolo experimental. Conforme apresentado na tabela 1, os animais normais (grupo controle) ou submetidos apenas ao trauma mecânico (grupo TM) tiveram 100% de sobrevida no 10º dia do protocolo experimental. Enquanto que o 5-FU diminuiu ($p < 0,05$) a sobrevida dos Hamsters (52%) quando comparado ao grupo controle. Já o tratamento com a fração PL da *C. procera* aumentou a sobrevida dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU para 83%. Dentre as subfrações presentes na fração PL da *Calotropis procera*, apenas PII IAA aumentou a sobrevida dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU para 92%. Comparado ao grupo 5-FU, a subfração PIII apresentou sobrevida menor, representando toxicidade para os hamsters.

Conforme apresentado na figura 9, o grupo controle e trauma mecânico exibem 100% de sobrevivência durante todo o protocolo experimental. 5-FU induz mortalidade nos hamsters submetidos à mucosite oral a partir do 6º dia do protocolo experimental, ocorrendo de forma crescente até o 9º dia. No 10º dia, 5-FU induz maior mortalidade, representado pela redução de sobreviventes. Observou-se ainda que a fração PL aumentou o percentual de sobreviventes de animais submetidos à mucosite oral quando comparado ao grupo 5-FU. Dentre as subfrações da PL, observou-se que apenas PII IAA preveniu a redução da sobrevida induzida por 5-FU no 6º e 10º dia do protocolo experimental. Ressalta-se, de acordo com a figura 9, que a subfração PIII induziu morte a partir do 3º dia do protocolo experimental (dia que foi administrado a primeira dose dessa subfração) de forma crescente até o 10º dia do protocolo experimental, apresentando menor percentual de sobreviventes quando comparado ao grupo 5-FU.

Tabela 1- Taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com proteínas do látex da *C.s procera* e suas subfrações.

Grupo Experimental	Taxa de sobrevivência (%)
Controle	100
TM	100
5-FU	48
PL + 5-FU	83
PI + 5-FU	34
PII + 5-FU	47
PIII + 5-FU	14
PII IAA + 5-FU	92

Figura 9 – Efeito de subfrações da *Calotropis procera* na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

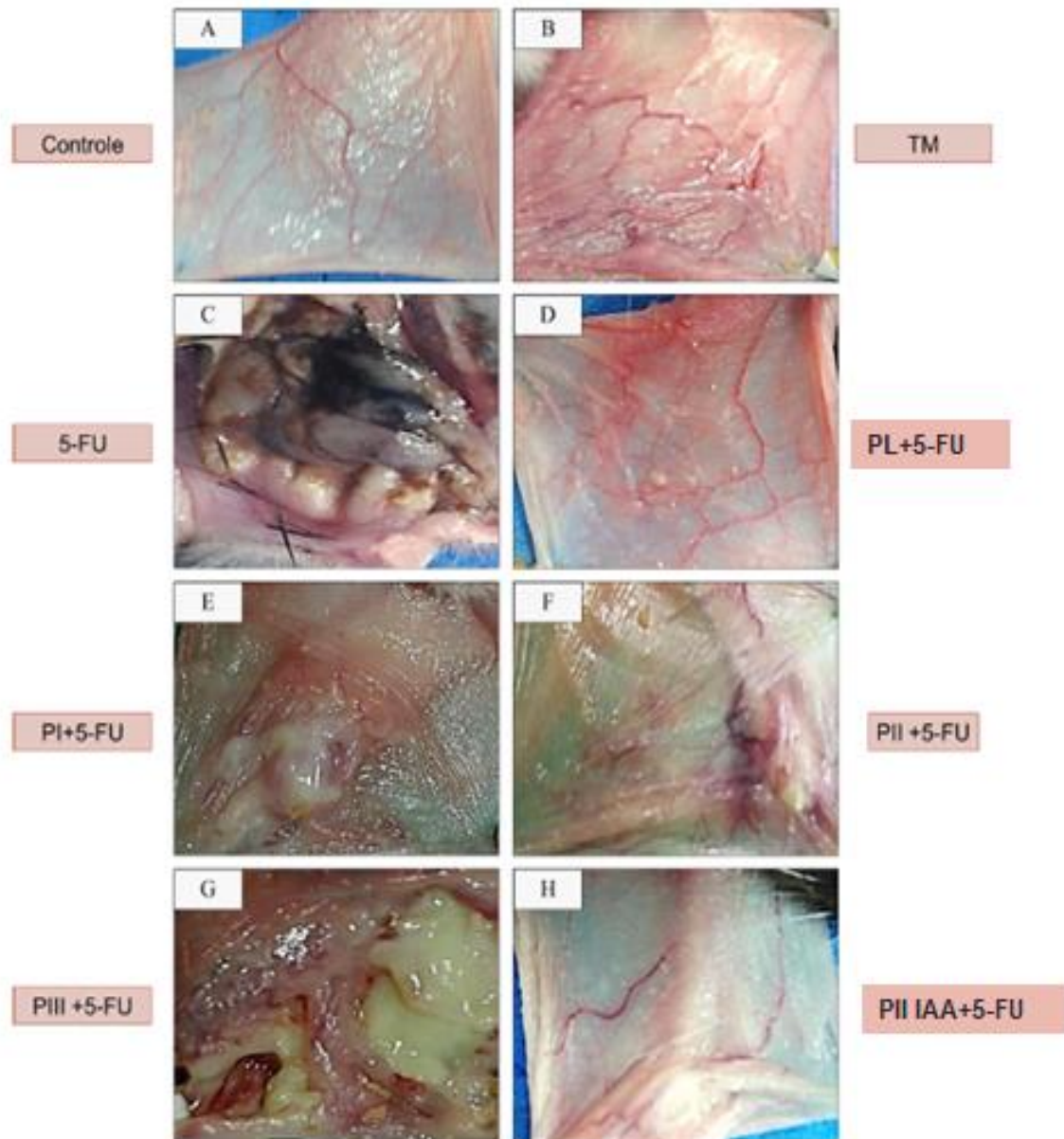


Hamsters receberam salina (Grupo controle ou Trauma Mecânico, TM, 0,9%, i.p.) ou 5-FU (Grupo 5-FU, que recebeu as doses de 60mg/kg e 40mg/kg, i.p., respectivamente, no 1º e 2º dia do protocolo experimental). Após 24h e 72h da última dose do quimioterápico, administraram-se PL (Grupo PL 5mg/kg +5-FU) e suas subfrações: PI (Grupo PI 5mg/kg + 5-FU,); PII (Grupo PII 5 mg/kg + 5-FU); PIII (Grupo PIII 5mg/kg +5-FU) e PII IAA (Grupo PII IAA-5mg/kg + 5-FU). No 4º dia do protocolo experimental, todos os grupos, exceto o grupo controle, foram submetidos ao trauma mecânico. Os animais foram observados diariamente até o décimo dia do protocolo experimental para avaliar a taxa de sobrevivência. 5-FU reduz o percentual de sobreviventes a partir do 6º dia do protocolo experimental. Enquanto que PL e PII IAA aumentaram a sobrevivência dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. Os grupos Controle e TM mantiveram seus pesos iniciais, sofrendo poucas variações. Os pontos representam o percentual (%) de sobreviventes. Para análise estatística foi utilizado o teste Mantel- Cox log rank para curva de sobrevivência. Onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.3 Efeito de subfrações da *Calotropis procera* nas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.

Conforme observado na figura 10, as mucosas jugais de animais normais (Grupo controle) e dos animais submetidos apenas ao trauma mecânico, encontram-se preservadas, com escores macroscópicos de 0 para ambos (figura 10A e B; tabela 2). Enquanto que o 5-FU ocasionou a formação de úlceras extensas em uma ou mais faces da mucosa jugal, afetando mais de 50% da área de superfície da bolsa. Observou-se também que o 5-FU levou ao desenvolvimento de abscessos, eritema acentuado, hemorragia e edema, resultando no escore macroscópico de 5 (figura 10C; tabela 2). O tratamento dos animais submetidos à mucosite oral com PL (figura 10D) e a subfração PII IAA (figura 10H) da *Calotropis procera* preveniu o surgimento dessas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU, resultando no escore 1 para ambos os grupos avaliados (tabela 2). Vale ressaltar que as demais subfrações avaliadas (E e G) não preveniram a lesão jugal induzida por 5-FU.

Figura 10 – Efeito de subfrações da *Calotropis procera* nas alterações macroscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



No 10º dia do protocolo experimental, os animais foram anestesiados e suas mucosas jugais foram expostas e fotografadas para a análise das alterações macroscópicas. A mucosa jugal de animais normais (painel A) e a mucosa jugal de animais submetidos apenas ao trauma mecânico (painel B) apresentam-se íntegras. O 5-FU induz formação de úlceras, abscessos, edema, hemorragia e necrose da mucosa jugal (painel C). O tratamento com PL (painel D) ou PII IAA (painel H) protege a mucosa jugal da lesão induzida por 5-FU. As subfrações PI (painel E), PII 5 (painel F), PIII (painel G) não protegem a mucosa jugal das alterações induzidas pelo 5-FU.

Tabela 2 - Escores macroscópicos das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental e tratados com proteínas do látex da *Calotropis procera* e suas subfrações.

Grupos experimentais	5-FU							
	<i>Calotropis procera</i>							
	Controle	TM	--	PL	PI	PII	PIII	PII IAA
Escores Macroscópicos	0(0-0)	0(0-0)*	4(2-5)#	1(0-3)*	3(1-5)#	3(1-3)#	4(3-4)#	1(1-3)*

No 10º dia do protocolo experimental, os animais foram anestesiados e suas mucosas jugais foram expostas para a definição do escore macroscópico que variou de 0-5, onde 0 representa uma mucosa jugal saudável e 5 uma mucosa com completa ulceração e abscesso. Os dados representam a mediana e as variações máximas e mínimas dos escores macroscópicos em seis animais por grupo (n=6). Os dados foram analisados usando Kruskal–Wallis seguido de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e * p<0,05 vs grupo 5-FU.

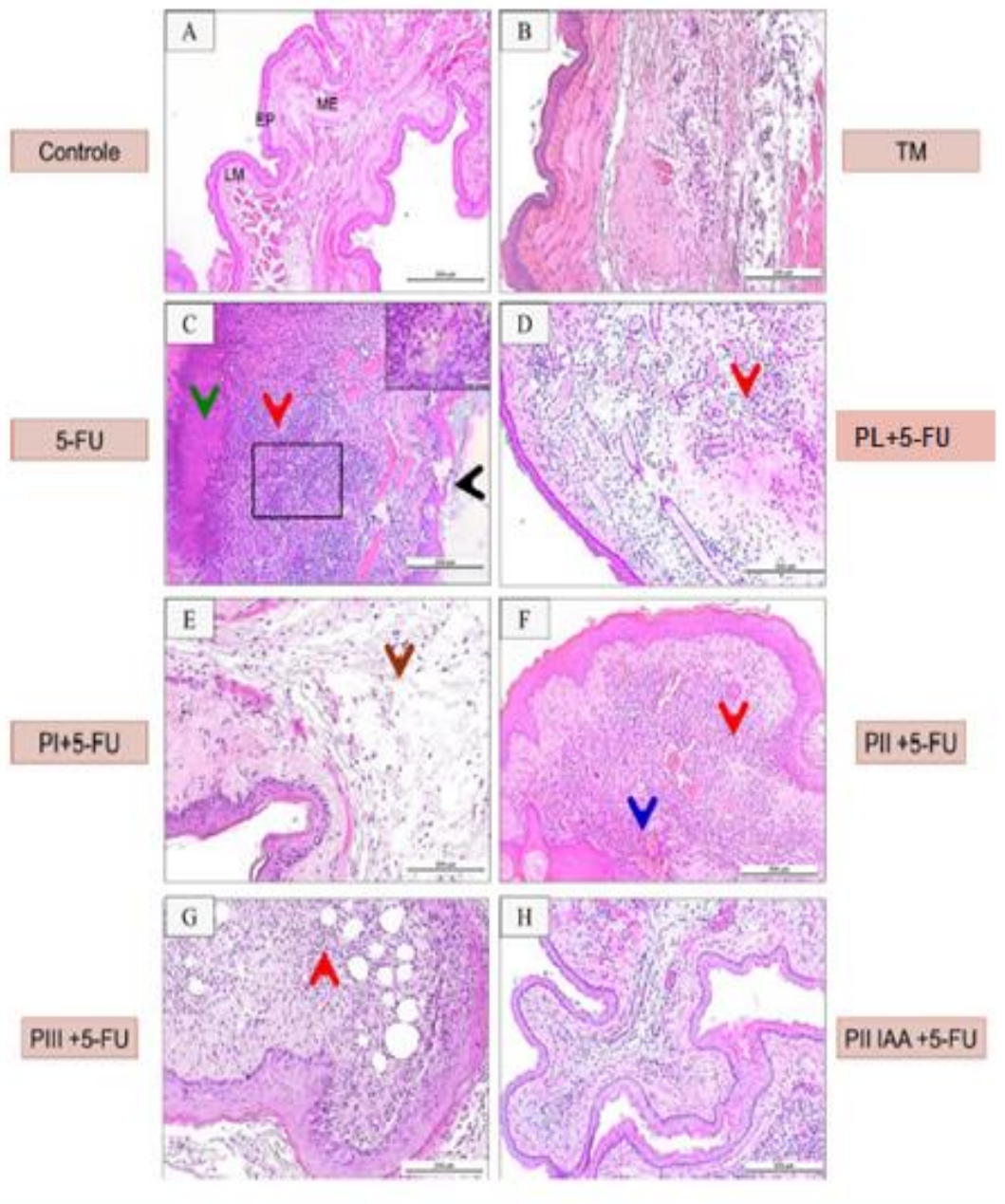
5.4 Efeito de subfrações da *Calotropis procera* nas alterações histológicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.

Em hamsters, a mucosa jugal é revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado que se encontra sob a lâmina própria de tecido conjuntivo. Este tecido está em continuidade com o tecido muscular estriado esquelético, e apresenta escassas células inflamatórias, conforme apresentado no grupo controle (Figura 11A) que apresentou escore microscópico 0 (Tabela 3).

Na mucosa jugal de animais submetidos apenas ao trauma mecânico, observou-se a presença de leve infiltrado de células inflamatórias que resultou em escore microscópico 1 (Figura 11B; Tabela 3). Enquanto que o 5-FU (Figura 11C) ocasionou a formação de abscessos, de intenso infiltrado de células inflamatórias e de úlceras caracterizado pela perda da integridade do epitélio da mucosa jugal, resultando em aumento significativo dos escores microscópicos (Tabela 3) quando comparado ao grupo controle. Observa-se ainda que a PL (Figura 11D) preveniu a formação de úlceras e abscessos e reduziu o infiltrado de células inflamatórias em animais submetidos ao modelo de mucosite oral induzida por 5-FU, apresentando redução significativa do escore microscópico (Tabela 3). Quanto ao PII IAA (Figura 11H) foi capaz de reduzir todas as alterações histológicas induzidas por 5-FU na mucosa jugal de hamsters, levando à redução do escore histológico (Tabela 3).

As demais subfrações não preveniram as alterações histológicas induzidas por 5-FU. Os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU tratados com PI (Figura 11E) apresentaram edema extenso e PII 5 (Figura 11F) apresentou áreas hemorrágicas e PIII (Figura 11G) apresentou infiltrado de células inflamatórias na mucosa jugal.

Figura 11 – Efeito de subfrações da *Calotropis procera* nas alterações microscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal dos hamsters foram removidos e corados pelo método de H&E para análise histopatológica. A mucosa normal (Grupo controle) é revestida por epitélio (EP) pavimentoso estratificado queratinizado que se encontra sob a lâmina própria (LM) de tecido conjuntivo que está em continuidade com o tecido muscular estriado esquelético (ME) (painel A). No grupo Trauma mecânico (TM), após realização das escoriações, observa-se a presença de leve infiltrado de células inflamatórias (painel B). 5-FU induz formação de abscessos e necrose (seta verde), de infiltrado de células inflamatórias (seta vermelha) e de úlceras (seta preta) (painel C). PL (painel D) e PII IAA (painel H) atenuaram essas lesões induzidas por 5-FU. As demais subfrações não preveniram as alterações microscópicas induzidas por 5-FU. PI (painel E) levou à formação de edema (seta marrom), PII 5 (painel F) e apresentaram áreas hemorrágicas (seta azul) na mucosa jugal avaliada e PIII (painel G) apresentou infiltrado de células inflamatórias. Todos os painéis foram obtidos na escala de 200 μ m, exceto a ampliação do painel C (20 μ m).

Tabela 3 – Escores baseados na análise microscópicas das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental e tratados com proteínas do látex da *Calotropis procera* e suas subfrações.

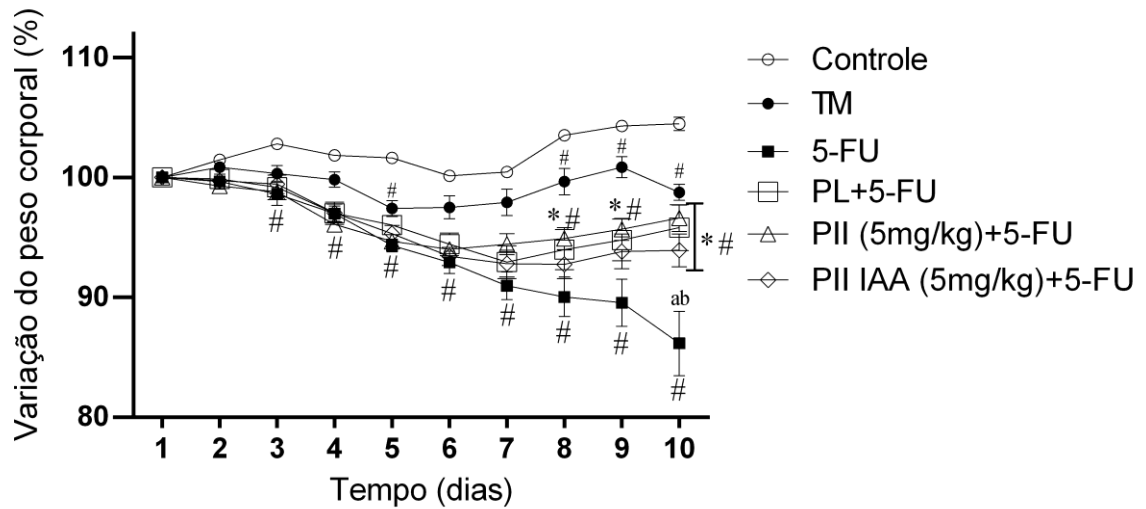
Grupos experimentais	5-FU							
	<i>Calotropis procera</i>							
	Controle	TM	--	PL	PI	PII	PIII	PII IAA
Escores Microscópicos	0(0-1)	1(1-1)*	3(2-3)#	1(0-2)*	1,5(1-3)	2(1-3)#	2(1-3)#	1(0-1)*

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU (n=6/grupo).

5.5 Efeito de subfrações da *Calotropis procera* sobre a perda ponderal induzida por 5-FU em hamsters.

Durante todo o período experimental todos os animais foram pesados diariamente. O grupo controle, conforme esperado, apresentou ganho de massa crescente durante o período do protocolo experimental. Ao submeter os Hamsters apenas ao trauma mecânico, observou-se perda de peso considerável ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no 5º, 8º, 9º e 10º dia do protocolo experimental. Todos os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU apresentaram uma perda ponderal relevante, principalmente a partir do 8º dia do protocolo experimental, com diferenças estatisticamente significantes quando comparada com o grupo controle. O grupo 5-FU apresentou diminuição ($p < 0,05$) do peso corporal a partir do 3º dia do protocolo experimental quando comparado ao grupo controle. Observa-se que PL e suas subfrações PII e PII-IAA preveniram parcialmente ($p < 0,05$) a perda de peso induzida por 5-FU a partir do 8º dia do protocolo experimental.

Figura 12 – Efeitos das Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz a perda de peso em Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



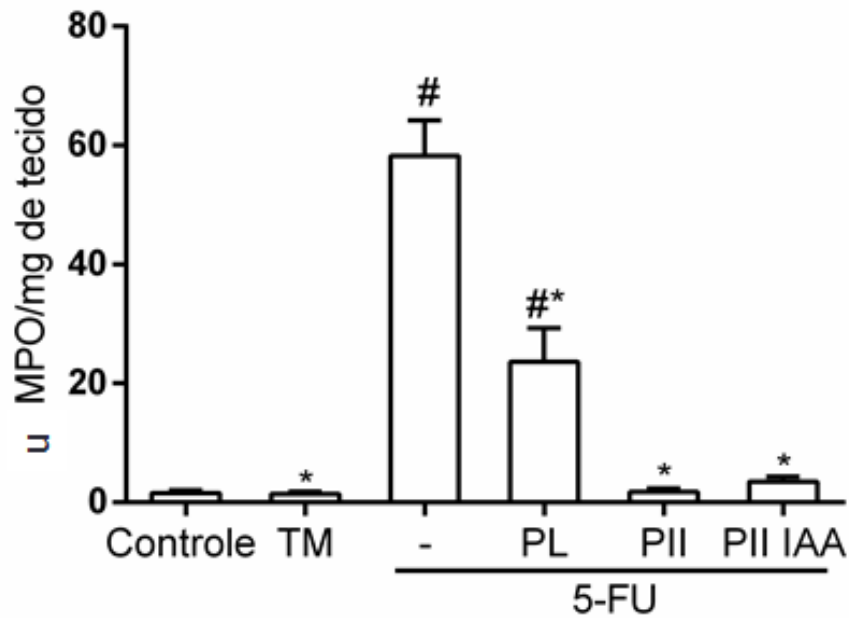
Os hamsters (n=6 /grupo) foram pesados diariamente até o 10º dia do protocolo experimental. A indução da mucosite oral por 5-FU induziu perda de peso em todos os grupos tratados com o quimioterápico quando comparado ao grupo controle. No grupo 5-FU, perda de peso significativa iniciou-se a partir do 3º dia e nos grupos tratados com PL e suas subfrações foi no 8º dia. PL e suas subfrações diminuíram a perda de peso induzida por 5-FU no 8º, 9º e 10º. Os pontos representam a média± EPM do percentual de variação do peso inicial. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # p<0,05 vs grupo controle e * p<0,05 vs grupo 5-FU.

5.6 Efeitos das subfrações das proteínas do látex (PL) da *Calotropis procera* sobre a atividade de MPO na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é utilizada como marcador de neutrófilos.

De acordo com a figura 13, observou-se que os níveis de MPO na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-FU foi significativamente aumentada (Figura13), no 10º dia do protocolo experimental, quando comparado ao grupo controle e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). Enquanto que o tratamento da mucosite oral experimental com as proteínas do látex da *Calotropis procera* ou as subfrações PII e PII IAA reduziram significativamente a atividade de MPO quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 13– Subfração PII da *Calotropis procera* diminui os níveis de MPO na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



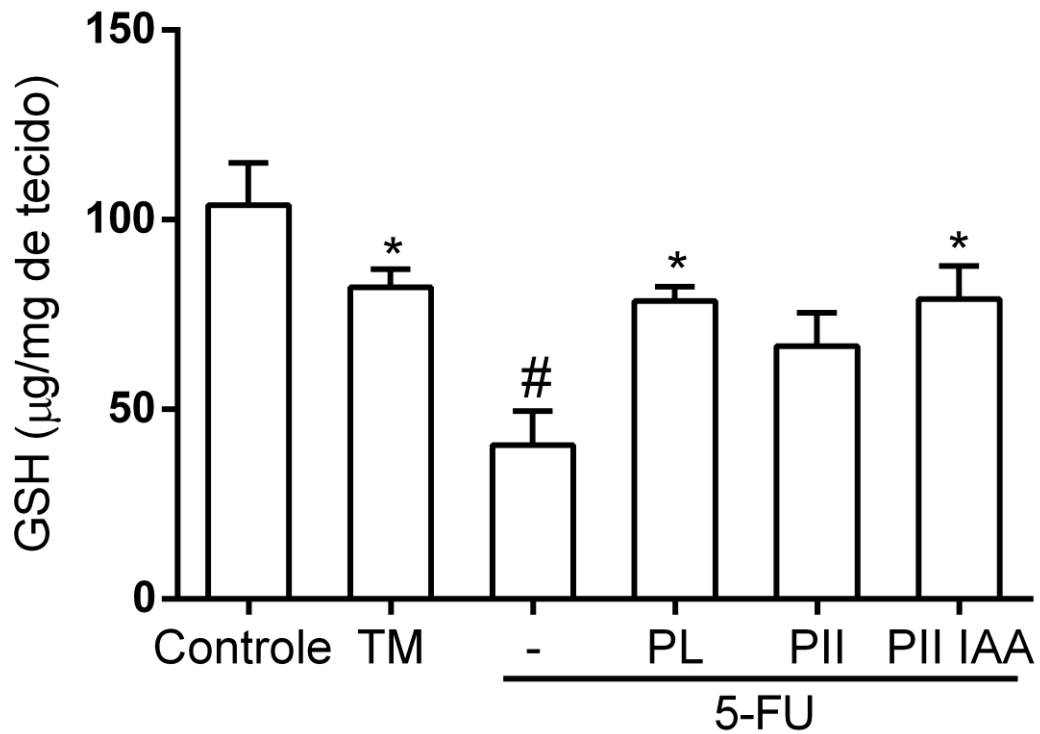
Segmentos da mucosa jugal foram coletados para avaliar os níveis de mieloperoxidase (MPO). 5-FU eleva os níveis de MPO na mucosa jugal comparado ao grupo controle. PL e suas subfrações reduzem os níveis dessa enzima na mucosa jugal comparado ao grupo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de MPO em uMPO/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.7 Efeito da subfração da *Calotropis procera* nos níveis de GSH na mucosa jugal de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A GSH é um antioxidante fisiológico que é armazenado nas células e é consumido nos processos inflamatórios, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio, uma vez que GSH as neutraliza.

Conforme apresentado na figura 14, na mucosa oral de animais normais (grupo controle) e submetidos apenas ao trauma mecânico apresenta nível considerável de GSH. Observou-se ainda que 5-FU reduziu ($p < 0,05$) os níveis de GSH quando comparado ao grupo controle. Já os grupos tratados com PL e PII IAA aumentaram os níveis desse antioxidante na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral experimental quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 14– Subfração PII IAA da *Calotropis procera* aumenta os níveis de GSH na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



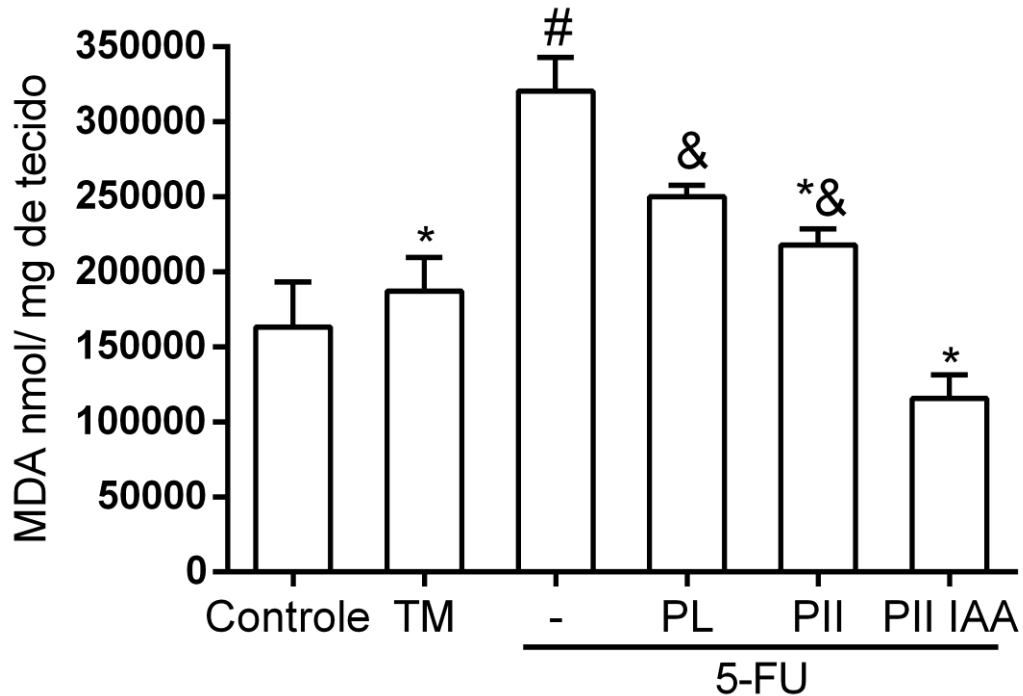
Segmentos da mucosa jugal foram coletados para avaliar os níveis de glutatona reduzida (GSH), um antioxidante fisiológico. 5-FU reduz os níveis de GSH na mucosa jugal comparado ao grupo controle. PL e PII IAA aumentam os níveis dessa enzima na mucosa jugal comparada ao grupo 5-FU. Os valores foram apresentados como média ± EPM dos níveis de GSH expressos em µg/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.8 Efeito da subfração da *Calotropis procera* nos níveis teciduais de MDA na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

O MDA é um dos produtos formados pela degradação dos lipídios da membrana pelas espécies reativas de oxigênio. Portanto, é considerado um marcador de peroxidação lipídica.

De acordo com a figura 14, observou-se que 5-FU aumentou ($p < 0,05$) os níveis de MDA na mucosa jugal quando comparado ao grupo controle. PL e a subfração PII e PII IAA foram capazes de diminuir de maneira significativa os níveis de MDA ($p < 0,05$) em comparação com o grupo 5-FU.

Figura 15– Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz os níveis de MDA na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



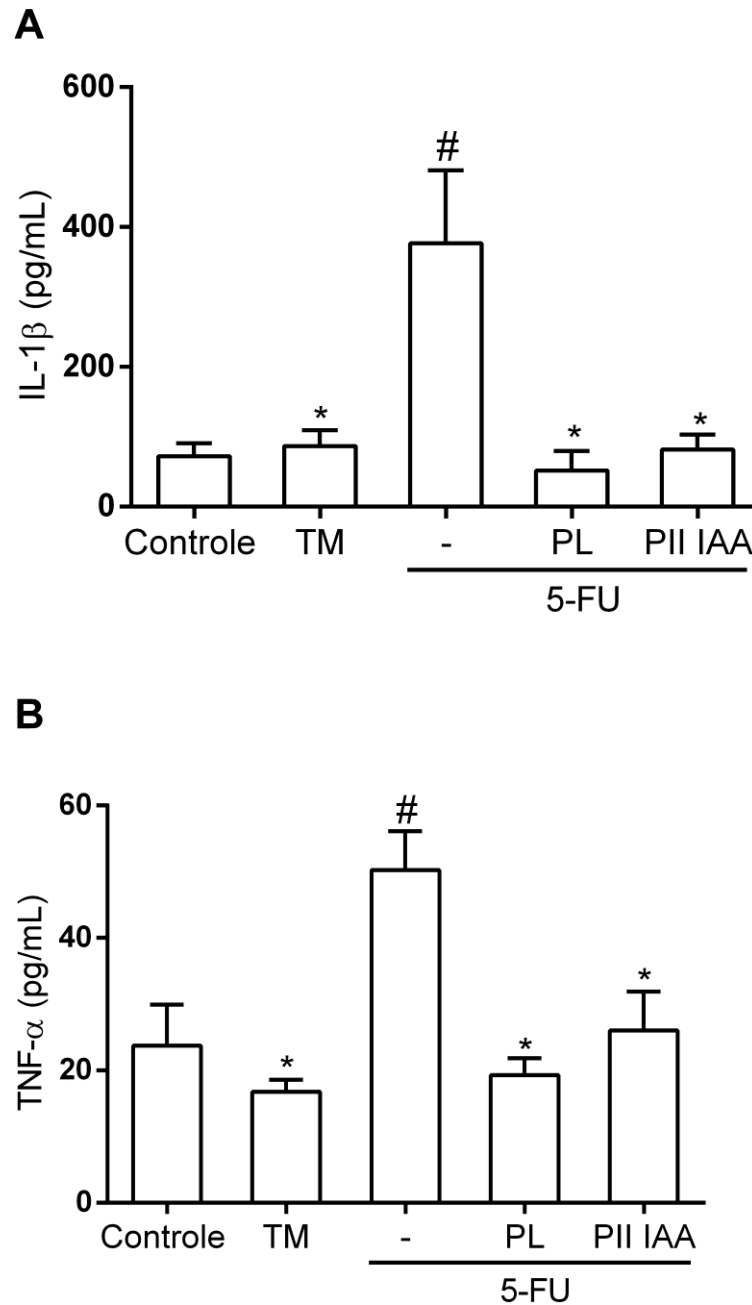
Segmentos da mucosa jugal foram coletados para avaliar os níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica. 5-FU eleva os níveis de MDA na mucosa jugal comparado ao grupo controle. PL e PII IAA diminuem os níveis dessa enzima na mucosa jugal comparado ao grupo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de GSH expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, & $p < 0,05$ vs PII IAA.

5.9 Efeitos da Subfração PII IAA da *Calotropis procera* sobre a dosagem de citocinas IL-1 β e TNF- α na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A IL-1 β e o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias que se encontram aumentadas em processos inflamatórios.

Conforme apresentado na figura 16, 5-FU elevou ($p < 0,05$) os níveis de IL-1 β e de TNF- α na mucosa jugal quando comparado ao grupo controle. O tratamento com PL (5mg/kg) e a subfração PII IAA diminuiu significativamente a concentração dessas citocinas pró-inflamatórias quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 16 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz os níveis de IL-1 β e TNF- α na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram coletados para avaliar os níveis de IL-1 β e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias. 5-FU aumenta os níveis de IL-1 β e TNF- α na mucosa jugal comparado ao grupo controle. PL e PII IAA diminuem os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias na mucosa jugal comparado ao grupo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de IL-1 β e o TNF- α expressos em μ g/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

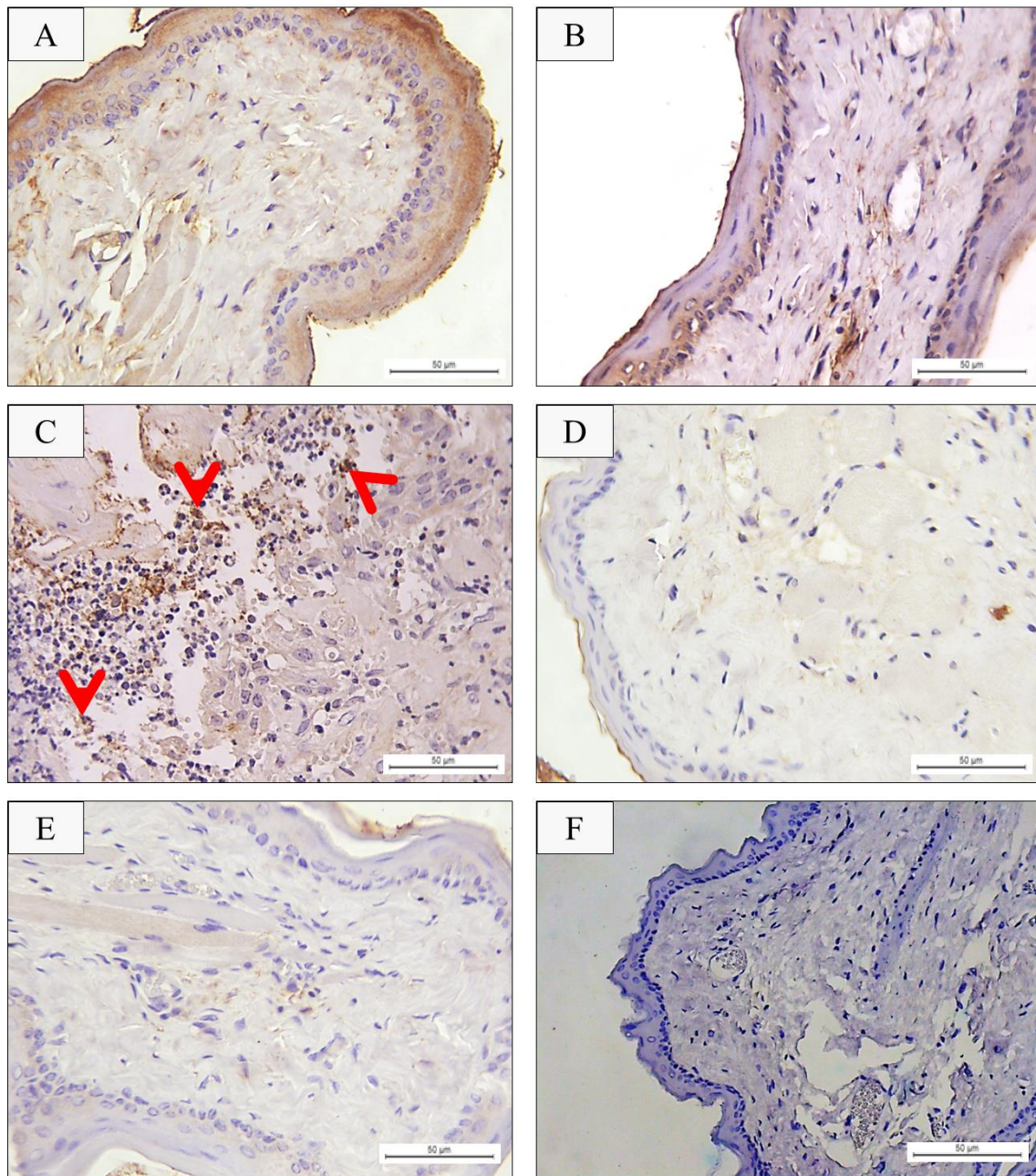
5.10 Efeito da subfração PII IAA da *Calotropis procera* sobre a imunomarcção de IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

Em condições normais, conforme observado na figura 17A, há células do epitélio e algumas células da lâmina própria expressando IL-1 β . Enquanto que 5-FU aumenta a imunomarcção de IL-1 β quando comparado ao grupo controle, os grupos tratados com PL e PII IAA, reduzem consideravelmente a imunomarcção de IL-1 β tanto no epitélio oral quando na lâmina própria comparado ao grupo 5-FU.

A análise quantitativa da imunomarcção de IL-1 β demonstrou, de acordo com os dados apresentados na figura 17, que 5-FU aumenta ($p < 0,05$) o número de células imunomarcadas para IL-1 β quando comparado ao grupo controle e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico. Enquanto que PL e PII IAA reduzem ($p < 0,05$) o número de células positivas para IL-1 β na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental comparado ao grupo 5-FU.

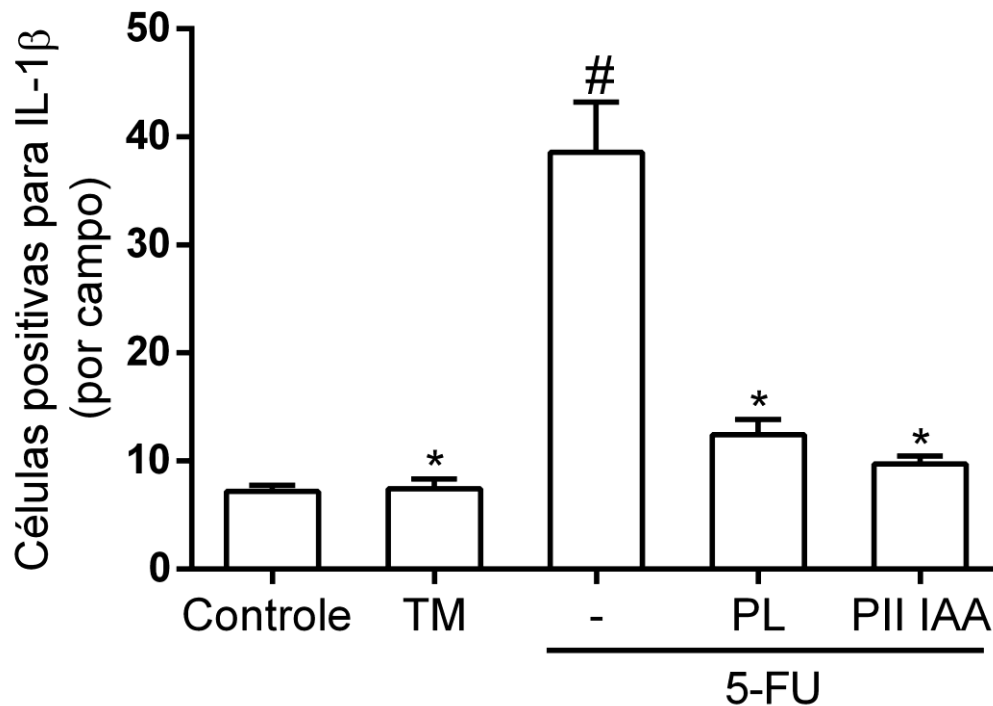
Os animais submetidos apenas ao trauma mecânico apresentaram contagem de células positiva para IL-1 β semelhante ao grupo controle.

Figura 17 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz a imunomarcção de IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para IL-1 β , que é uma citocina pró-inflamatória. Nota-se aumento da imunomarcção para IL-1 β (seta vermelha) nos segmentos da mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (painel C) quando comparado ao grupo controle (painel A). Enquanto que PL (painel D) e PII IAA (painel E) diminuem essa imunomarcção de IL-1 β na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral experimental quando comparado ao grupo 5-FU. Apenas o trauma mecânico (painel B) não alterou a imunomarcção dessa citocina comparado ao grupo controle. O painel F representa o controle negativo. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 18 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* diminui o número de células marcadas para IL-1 β na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para IL-1 β . Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A contagem das células foi realizada por meio software ImageJ. Observa-se que 5-FU aumenta o número de células marcadas para IL-1 β na mucosa jugal quando comparado ao grupo controle. O tratamento desses animais com PL ou PII IAA diminuiu essa imunomarcagem. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de células positivas para IL-1 β /campo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.11 Efeito da subfração PII IAA da *Calotropis procera* na imunomarcção de ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

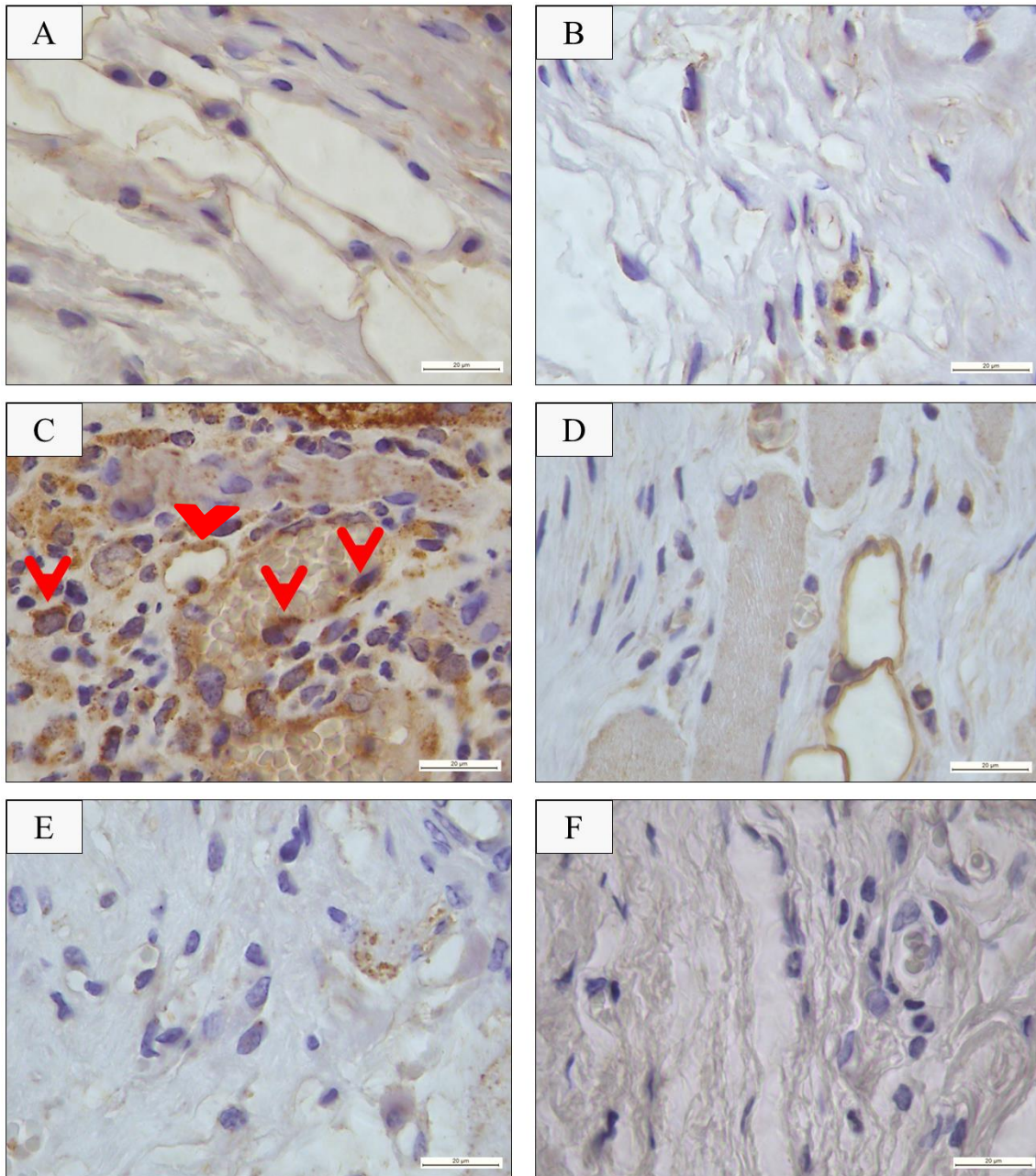
O ICAM-1 é uma molécula de adesão que pode ser expressa por células endoteliais e células inflamatórias.

Em condições normais, conforme observado na figura 19A, há células endoteliais expressando ICAM-1. Foi possível notar que 5-FU aumenta a imunomarcção de ICAM-1 em células endoteliais e células inflamatórias do conjuntivo quando comparado ao grupo controle. Enquanto que PL e PII IAA diminuem a imunomarcção de ICAM-1 comparado ao grupo 5-FU.

Conforme apresentado na figura 19, 5-FU aumentou ($p < 0,05$) o número de células imunomarcadas para ICAM-1 quando comparado ao grupo controle e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico. Nota-se também que PL e PII IAA diminuem ($p < 0,05$) o número de células positivas para ICAM-1 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental comparado ao grupo 5-FU.

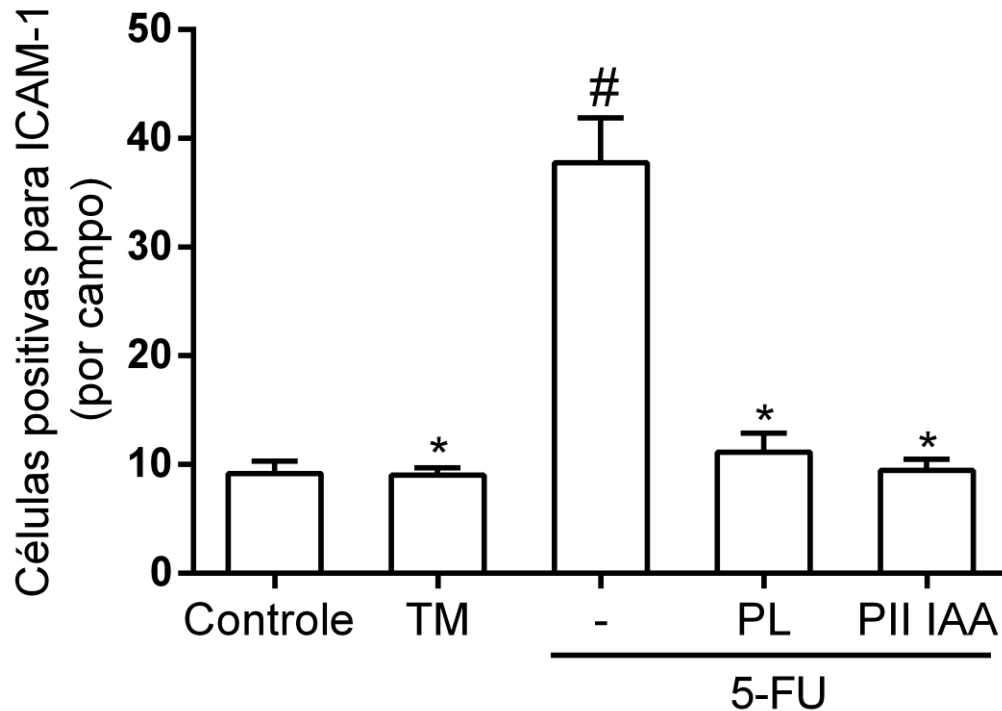
Os animais submetidos apenas ao trauma mecânico apresentaram contagem de células positivas para ICAM-1 semelhante ao grupo controle.

Figura 19 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz a imunomarcagem de ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para ICAM-1, que é uma molécula de adesão. Nota-se aumento da imunomarcagem para ICAM-1 (seta vermelha) nas células endoteliais e no infiltrado inflamatório da mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (painel C) quando comparado ao grupo controle (painel A). Enquanto que PL (painel D) e PII IAA (painel E) diminuem essa imunomarcagem de ICAM-1 na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral experimental quando comparado ao grupo 5-FU. Apenas o trauma mecânico (painel B) não alterou a imunomarcagem dessa molécula de adesão comparado ao grupo controle. O painel F representa o controle negativo. Todos os painéis foram obtidos na escala de 20 µm.

Figura 20 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* diminui o número de células marcadas para ICAM-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para ICAM-1. Foram fotografados de 10 a 12 campos/corte histológico (escala de 20 μ m). A contagem das células foi realizada por meio software ImageJ. Observa-se que 5-FU aumenta o número de células marcadas para ICAM-1 na mucosa jugal quando comparado ao grupo controle. O tratamento desses animais com PL ou PII IAA diminuiu essa imunomarcagem. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de células positivas para ICAM-1/campo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.12 Efeito da subfração PII IAA da *Calotropis procera* na imunomarcação de Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

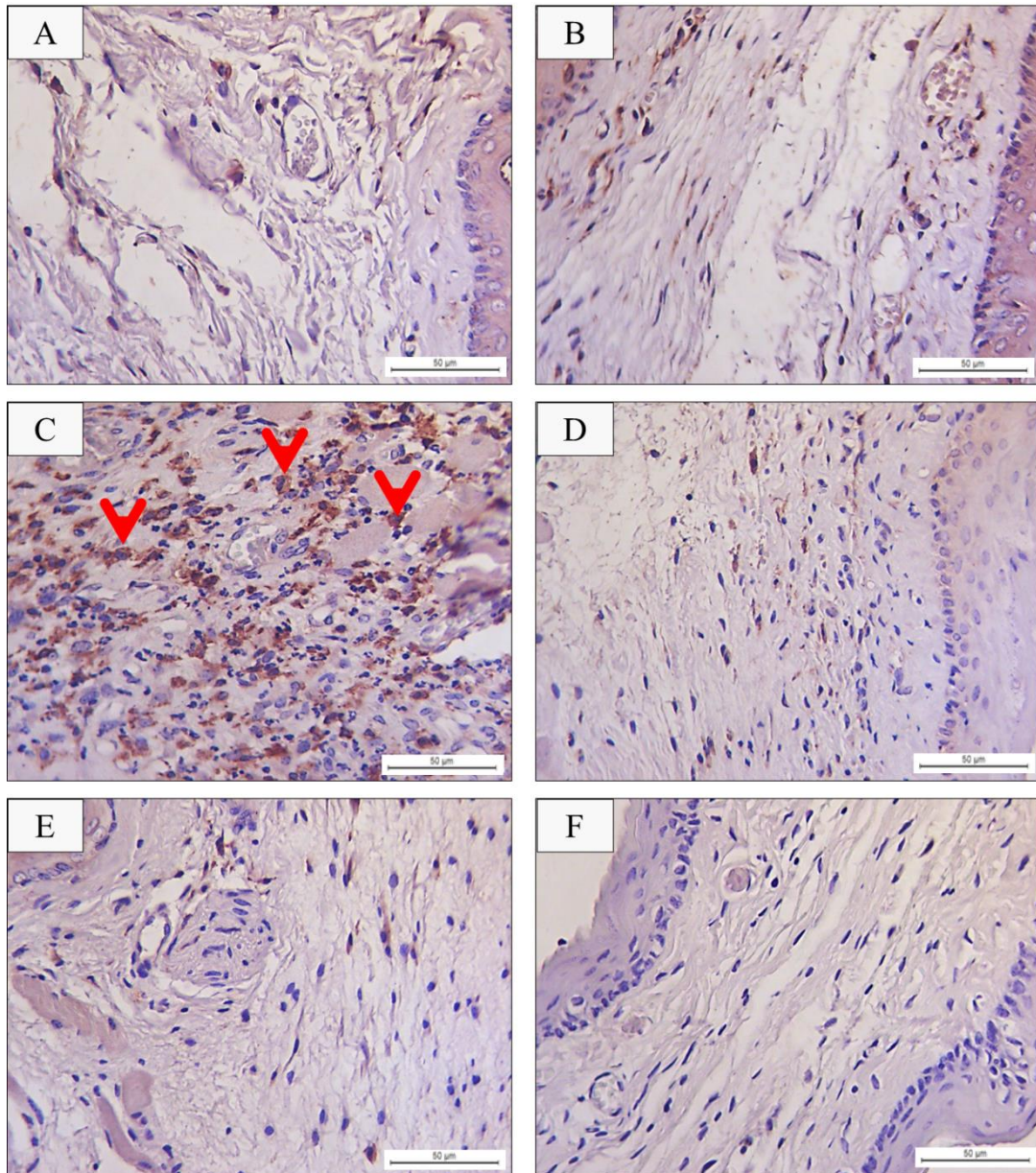
O Iba-1 é um marcador de macrófagos ativados. Em condições normais, conforme observado na figura 21, há macrófagos ativados na lâmina própria. No grupo 5-FU, nota-se um aumento da imunomarcação de Iba-1 na mucosa jugal comparado ao grupo controle. Já nos grupos PL e PII IAA houve diminuição na imunomarcação de Iba-1 comparado ao grupo 5-FU.

Conforme apresentado na figura 22, 5-FU aumentou ($p < 0,05$) o número de células imunomarcadas para Iba-1 quando comparado ao grupo controle e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico. Enquanto que PL e PII IAA diminuem ($p < 0,05$) o número de células positivas para Iba-1 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental comparado ao grupo 5-FU.

Os animais submetidos apenas ao trauma mecânico apresentaram contagem de células positiva para Iba-1 semelhante ao grupo controle.

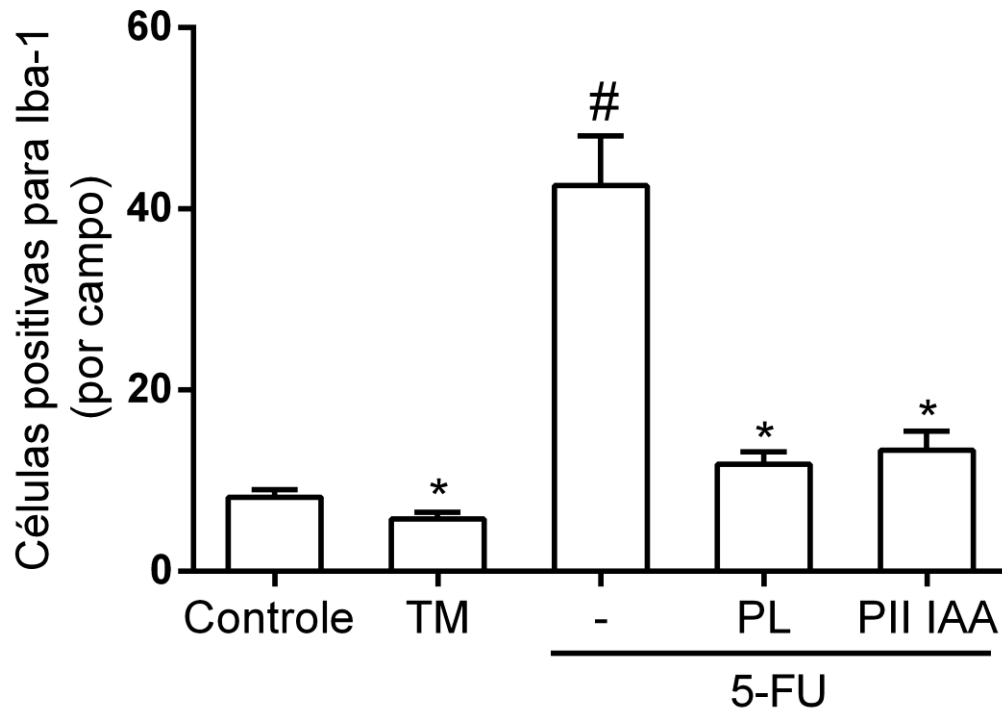
Esses dados sugerem que PL e PII IAA reduzem a ativação de macrófagos na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

Figura 21 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz a imunomarcação de Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para Iba-1, que é um marcador de macrófagos ativados. Nota-se aumento da imunomarcação para Iba-1 (seta vermelha) nos segmentos da mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (painel C) quando comparado ao grupo controle (painel A). Enquanto que PL (painel D) e PII IAA (painel E) diminuem essa imunomarcação de Iba-1 na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral experimental quando comparado ao grupo 5-FU. Apenas o trauma mecânico (painel B) não alterou a imunomarcação desse marcador de macrófagos comparado ao grupo controle. O painel F representa o controle negativo. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm.

Figura 22 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* reduz o número de células marcadas para Iba-1 na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



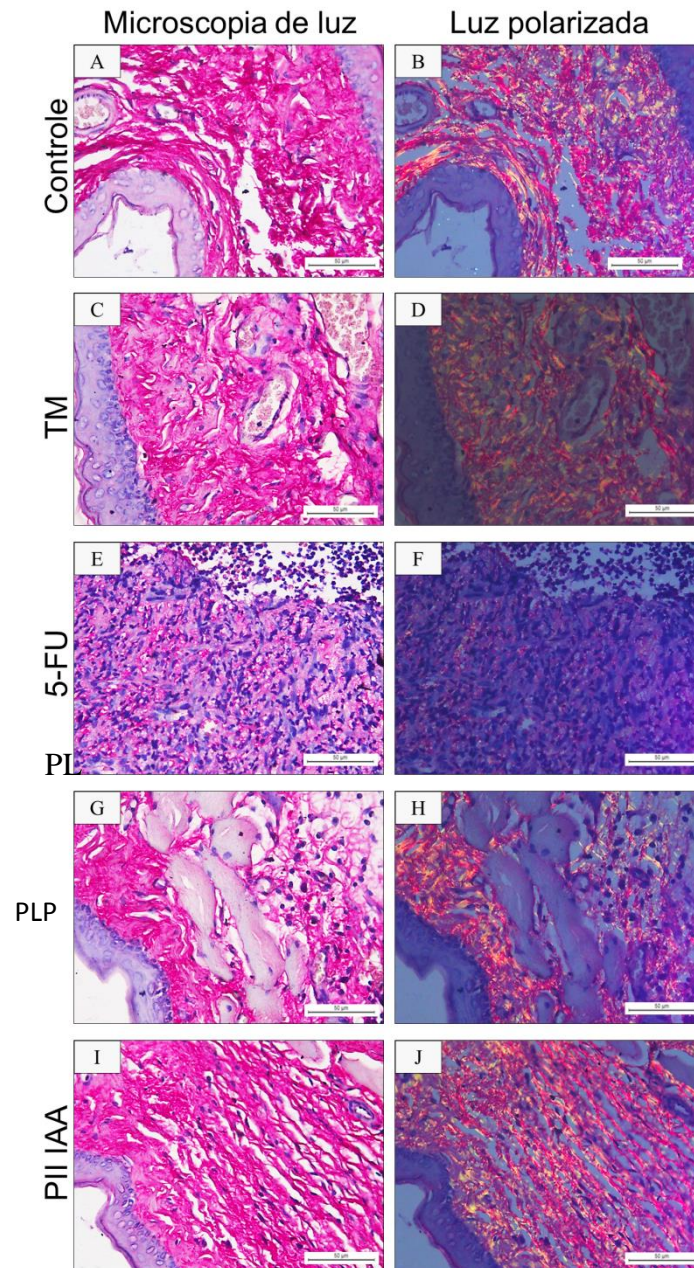
Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para Iba-1. Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A contagem das células foi realizada por meio software ImageJ. Observa-se que 5-FU aumenta o número de células marcadas para Iba-1 na mucosa jugal quando comparado ao grupo controle. O tratamento desses animais com PL ou PII IAA diminuiu essa imunomarcagem. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de células positivas para Iba-1/campo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.13 Efeito da subfração PII IAA da *Calotropis procera* nas fibras colágenas da mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

O método de coloração de *Picro Sirius red* é amplamente utilizado para corar fibras colágenas, por permitir a diferenciação de fibras colágenas do tipo I e III quando o tecido corado é exposto à luz polarizada.

No décimo dia do protocolo experimental, observou-se que em condições fisiológicas, a mucosa oral (grupo controle) apresentou grande quantidade de fibras colágenas (Figura 23 A) do tipo I e III, sendo a do tipo I encontrada de forma predominante (figura 23 B). Comparado ao grupo controle, o 5-FU diminuiu as fibras colágenas (figura 23 E) do tipo I (figura 23 F) na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral. Ao passo que ao tratar os hamsters com a fração PL da *Calotropis procera* ou a sua subfração PII IAA, observou-se que ambas aumentaram as fibras colágenas (figura 23 G e I) do tipo I (figura 23 H e J) na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

Figura 23 – Subfração PII IAA da *Calotropis procera* aumenta as fibras colágenas na mucosa oral de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de Picro Sirius red, utilizada para corar fibras colágenas, por permitir a diferenciação de fibras colágenas do tipo I e III quando o tecido corado é exposto à luz polarizada. Nota-se diminuição de fibras colágenas nos segmentos da mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (painel E e F) quando comparado ao grupo controle (painel A e B). Enquanto que PL (painel G e H) e PII IAA (painel I e J) aumentam as fibras colágenas na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral experimental quando comparado ao grupo 5-FU. Apenas o trauma mecânico (painel C e D) não alterou a essa marcação comparado ao grupo controle. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm.

6 DISCUSSÃO

Os achados deste estudo evidenciaram que a subfração PII IAA da PL da *Calotropis procera* preveniu a perda ponderal e a morte de hamsters submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU. Além disso, atenuou as alterações macroscópicas e microscópicas, o recrutamento de neutrófilos, o estresse oxidativo e a inflamação, bem como diminuiu a degradação de fibras colágenas na mucosa jugal desses hamsters.

No presente estudo, utilizou-se um modelo de mucosite oral experimental por 5-FU que é amplamente utilizado (SONIS, 1990; SONIS, 2000; LIMA, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007; PAVESI *et al.*, 2011; SKEFF *et al.*, 2014; YOSHINO *et al.*, 2013). Esse modelo consiste na aplicação de duas doses de 5-FU (60 e 40 mg/kg), aplicadas no 1º e 2º dia do protocolo experimental seguido pela realização do trauma mecânico no 4º dia. Este último potencializa o estabelecimento da lesão oral, além de mimetizar as alterações da mastigação e da fonação presentes em humanos.

A lesão na mucosa oral induzida por 5-FU se inicia a partir do 5º dia, com pico no 10º dia, quando eritema, hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras extensas e abscessos são observados. Estas alterações regridem entre os dias 12 e 16 do modelo experimental (LEITÃO *et al.*, 2007; LEITÃO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2005). No presente estudo, a maioria dos parâmetros foram avaliados no 10º dia devido ao pico da lesão ser nesse dia.

Este modelo simula tanto os aspectos clínicos (aumento da perda ponderal e redução da sobrevida), bem como as alterações histopatológicas (formação de úlceras, de intenso infiltrado de células inflamatórias e de abscessos) e bioquímicas (elevação de mediadores inflamatórios), conforme descrito no presente estudo. De forma semelhante, estudos anteriores também demonstraram reprodutibilidade deste modelo experimental (FREITAS *et al.*, 2012; LEITÃO *et al.*, 2007; PAVESI *et al.*, 2011; SKEFF *et al.*, 2014; YOSHINO *et al.*, 2013).

Anteriormente, Freitas *et al.* (2012) demonstraram que PL da *Calotropis procera* apresentava potente efeito anti-inflamatório, prevenindo a formação de úlceras e recrutamento de células inflamatórias na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU.

Desta forma, investigou-se no presente estudo das subfrações da PL era a responsável por esses efeitos benéficos evidenciados anteriormente. Para isso, foram isoladas três subfrações proteicas a partir da PL, sendo elas PI, PII e PIII. Identificou-se que apenas PII reduziu a formação de úlceras, hemorragias e necrose na mucosa oral, porém observou-se ao

administrar essas diferentes subfrações, uma importante redução na sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. Diante disso, levantou-se a hipótese de que haveria componentes proteicos tóxicos que poderiam estar ocasionando a morte desses animais. Para isto, realizou-se um zimograma para avaliar a atividade proteolítica presente nessas subfrações. Ao analisar o zimograma, evidenciou-se intensa atividade proteolítica nas subfrações PII e PIII.

A PL da *Calotropis procera* é constituída por proteínas que incluem as quitinases (presentes principalmente em PI), e enzimas proteolíticas (FREITAS *et al.*, 2007; 2016; SAYED *et al.*, 2016). As subfrações avaliadas neste estudo apresentam perfil de proteínas distintas. Em PI, há a presença de 16 aminoácidos e predominam em sua constituição glutamina, serina, glicina, arginina, alanina, fenilalanina e leucina. Em relação à PII, 11 aminoácidos estão presentes nesta constitui com predominância de glicina, prolina e isoleucina. Além disso, também foi detectada presença de glutamina, serina, histidina, treonina, valina, metionina e leucina. Enquanto PIII, também apresenta 11 aminoácidos com predominância de prolina, valina e leucina. Arginina, ácido aspártico e lisina estão presentes apenas em PI (RAMOS *et al.*, 2006). Essas diferenças na constituição de aminoácidos presentes nessas subfrações podem explicar o melhor efeito de PII quando comparado as demais subfrações.

As enzimas proteolíticas presentes na PL da *C. procera* são constituídas principalmente por proteases cisteínicas. Essas proteínas são sintetizadas como mecanismo de defesa da planta a agentes nocivos e elas têm mostrado importante efeito contra larvas e bactérias (FREITAS *et al.*, 2007). As proteases participam da sinalização celular, incluindo as vias de sinalização que direcionam à morte celular, clivando substratos proteicos. Essa clivagem desses substratos pelas proteases alteram a sua função ou afinidade pelo seu ligante (SALVESEN *et al.*, 2016). Um dos mais potentes inibidores de proteases cisteínicas presentes na PL da *Calotropis procera* é a iodoacetamida (FREITAS *et al.*, 2007).

Dessa forma, a atividade proteolítica da subfração PII, foi inibida com Iodoacetamida (IAA: um inibidor específico de proteases cisteínicas), gerando a subfração PII IAA. Neste estudo optou-se por inibir a atividade proteolítica apenas do PII devido a administração dessa subfração apresentar menos mortalidade e contribuir para atenuar as alterações da mucosa oral de hamsters submetidos ao modelo experimental de mucosite oral induzida por 5-FU.

Diferente do presente estudo, PI demonstrou potente efeito na redução de edema e do estresse oxidativo na pata de ratos submetidos ao modelo de edema de pata induzida por

carregena (CHAUDHARY *et al.*, 2016). Em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina e edema de pata em ratos, PI foi a mais efetiva em inibir a migração de neutrófilos (RAMOS *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, evidenciou-se que PI, dependendo da parte da planta utilizada para obter a subfração, elevou os níveis séricos de óxido nítrico ou não foi capaz de reduzi-lo na pata ou peritônio de animais submetidos a esses modelos de inflamação induzido por carragenina. [Essa capacidade de PI em elevar os níveis de óxido nítrico deve-se ao fato desta apresentar arginina em sua constituição \(RAMOS *et al.*, 2006\)](#). Sabe-se que o óxido nítrico tem importante participação na patogênese da mucosite oral induzida por 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2007), provavelmente devido a isso PI não foi capaz de atenuar as alterações induzidas por 5-FU na mucosa jugal.

No que concerne à perda ponderal, o presente estudo constatou que os animais tratados com 5-FU demonstraram uma perda significativa de peso que foi reduzida no grupo tratado com a subfração PII e PII IAA. Diferentemente do que foi encontrado no presente estudo, em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, PL (incluindo PI, a subfração avaliada) no presente estudo da *C. procera* não foi capaz de prevenir a perda de peso corporal induzida por esse quimioterápico (ALENCAR *et al.*, 2016). Neto *et al.* (2013) não observaram alterações significativas na ingestão de alimentos, água e peso corporal em animais submetidos ao modelo experimental de diabetes tratados com PL da *C. procera*.

A perda de peso é um importante efeito colateral presente em pacientes que estão em uso de quimioterápicos (DUNCAN; GRANT, 2003). Essa perda de peso associada ao quimioterápico tem mostrado forte relação com a redução da ingestão de alimentos relacionada à lesão na mucosa oral, à diminuição da absorção dos nutrientes pelo epitélio intestinal devido à inflamação e rompimento dessa barreira epitelial, surgimento de alterações no trânsito intestinal e diarreia (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004; GIBSON; STRINGER, 2009). Vale ressaltar que a perda de peso corporal tem demonstrado forte correlação com a sobrevivência de pacientes em uso de quimioterápicos (MARDAS *et al.*, 2016; MARDAS; STELMACH-MARDAS; MADRY, 2016).

No presente estudo, a subfração PII IAA de modo surpreendente aumentou a sobrevida (92%) de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, produzindo melhor resultado do que PL. Diferentemente, PI em modelo de sepse aumentou a sobrevida em 100% de animais submetidos à sepse (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O mesmo foi evidenciado em modelo de infecção por *L. monocytogens* em ratos (NASCIMENTO *et al.*, 2016). No presente estudo o aumento da sobrevida promovida por PII IAA foi ampliada, não apenas

porque reduziu a perda de peso, mas pela inibição das proteases e das alterações na mucosa jugal induzida pelo 5-FU.

Em seguida, investigou-se como o PII IAA atenuava as alterações da mucosa oral de hamsters induzida por 5-FU.

Primeiramente, sabendo que o recrutamento de neutrófilos tem uma importante função na lesão da mucosa oral induzida por 5-FU, investigou-se se PII IAA seria capaz de diminuir o recrutamento dessas células por meio da avaliação da concentração de MPO. Dessa forma, demonstrou-se que PII IAA reduziu os níveis de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. Nesse contexto, PL também mostrou efeito semelhante, porém apresentou níveis de MPO superiores aos evidenciados no grupo controle. Assim como observado no presente estudo, PL da *C. procera* já demonstrou diminuir a atividade de MPO em modelo de peritonite induzida por carragenina, mucosite oral e intestinal induzida respectivamente por 5-FU e irinotecano (ALENCAR *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2012).

A MPO é uma enzima encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos (BRADLEY *et al.*, 1982) e a redução da sua atividade em animais tratados com subfrações indica diminuição da infiltração desta célula nos tecidos. A mieloperoxidase é uma ferramenta importante para identificar a presença de infiltrados de neutrófilos e para revelar um processo inflamatório como resultado da inflamação da mucosa jugal. Sabe-se que o nível de MPO reflete a quantidade de neutrófilos, e uma diminuição na sua atividade reflete em diminuição da inflamação do tecido lesionado (KRAWISZ *et al.*, 1984; MARCELINO *et al.*, 2015).

Os neutrófilos liberam vários mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , geram radicais livres, alteram a homeostase de antioxidantes e produzem efeitos danosos (ROBERTS *et al.*, 2009). Esses radicais livres reagem com fosfolipídios da membrana e geram aldeídos tóxicos como o 3- hidroxinonenal e MDA, marcadores de peroxidação lipídica, que resulta em alteração da função da membrana e dano tecidual (HALLIWELL *et al.*, 1993).

É bem documentado de que 5-FU eleva a formação de MDA na mucosa oral de hamsters (LEITÃO *et al.*, 2008; LEITÃO *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2011). Da mesma forma foi mostrado no presente estudo e, além disso, pela primeira vez relatou-se o efeito de subfrações da PL da *Calotropis procera* na redução desse marcador de peroxidação lipídica. Além disso, PII IAA demonstrou ser a principal subfração que medeia esse efeito na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A mucosite oral é caracterizada por lesão tecidual, que está associada com a liberação de vários mediadores inflamatórios e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SONIS *et al.*, 2004; ARIFA *et al.*, 2014). Elas desempenham papéis importantes em várias doenças, incluindo câncer, hipertensão e diabetes (HALLIWELL, 2007). As ERO são compostas por um radical ânion superóxido (O_2^-) e um radical hidroxila (OH^-) e induzem estresse oxidativo por meio de vários mecanismos, incluindo peroxidação lipídica, apoptose e danos ao DNA (CHAPPLE, 1996). Um dos mecanismos envolvidos no surgimento da estomatite oral por radiação ou quimioterapia é a geração de ERO, que, por sua vez, ativam várias vias de sinalização (SIOMEK *et al.*, 2006; SONIS *et al.*, 2002).

A geração excessiva de EROs no estágio inicial da mucosite oral induzida por 5-FU ocasiona o consumo de grandes quantidades de antioxidantes da mucosa jugal (YOSHINO *et al.*, 2013). Esses achados de acordo com os apresentados no presente estudo, onde se mostrou que 5-FU reduziu os níveis de GSH na mucosa jugal. Estudos anteriores também mostraram achados semelhantes (LEITÃO *et al.*, 2007; PAVESI *et al.*, 2011; YOSHINO *et al.*, 2013). A ingestão exógena de antioxidantes tem mostrado contribuir para a eliminação de EROs pelo organismo (YOSHINO *et al.*, 2016).

Recentemente, Chaudhary *et al.* (2015) mostraram que a injeção intravenosa com PL (a subfração PI) é antiedemogênica e normalizou os níveis de marcadores de estresse oxidativo com preservação da arquitetura de tecidos em comparação com o diclofenaco. Diferentemente do encontrado neste estudo PII IAA reduziu o estresse oxidativo induzido por 5-FU na mucosa jugal de hamsters por aumentar os níveis de GSH e reduzir os de MDA. Essa subfração mostrou efeitos no controle do estresse oxidativo superior aos efeitos de PL da *Calotropis procera*.

De acordo com estudos anteriores os autores demonstraram a ação antioxidante do látex da *Calotropis procera* no modelo de toxicidade induzida pelo 4-Nonilfenol diminuindo o estresse oxidativo, bem como aumentando os níveis das enzimas, superóxido dismutase, glutathione s-transferase e G6PDH significativamente, confirmando que o látex bruto de *Calotropis procera* possuía atividades antioxidantes (SAYED *et al.*, 2016).

A Glutathione reduzida (GSH) é considerada um antioxidante multifuncional, que está presente no citoplasma da maioria das células e no plasma. Além de apresentar papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010). Além disso, GSH é considerado um antioxidante não-enzimático que desempenha importante função na defesa celular contra EROs, radicais livres e metabólitos eletrofílicos (CASTELL *et al.*, 1997; KEDDERIS, 1996). Assim, a

depleção acentuada de GSH deixa as células mais vulneráveis a danos oxidativos por radicais e aumenta a oxidação de grupos SH de proteínas que podem levar a alterações na homeostase celular do cálcio. Um aumento sustentado dos níveis de cálcio citosólico resulta na ativação de enzimas (fosfolipases, proteases não-lisômicas, endonucleases) e danos no citoesqueleto, o que acaba causando a morte celular (CASTELL *et al.*, 1997; VIDYASHANKAR *et al.*, 2014).

O potencial de subfrações da *Calotropis procera* para manter GSH a níveis razoavelmente elevados é importante contra a toxicidade induzida por quimioterápicos. Portanto, a capacidade da subfrações da *Calotropis procera* em prevenir a depleção de GSH induzida pelo 5-FU é significativa na restauração da viabilidade celular e resolução do processo inflamatório. Ademais, glutathiona apresenta efeito inibitório da síntese de várias citocinas, como IL-1 β (BUCKLEY *et al.*, 1991; KARMALI, 1984).

Nesse contexto, PII IAA, de acordo com os dados apresentados neste estudo mostrou ter efeito antioxidante por elevar os níveis de GSH na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. PL da *C. procera* já demonstrou efeito antioxidante na diabetes induzida por aloxano e no estômago de ratos submetidos a diferentes modelos de úlcera gástrica (BHARTI; WAHANE; KUMAR, 2010; ROY *et al.*, 2005).

Além desse efeito antioxidante, PII IAA mostrou diminuir consideravelmente a expressão proteica de Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) tanto em células endoteliais quanto em células inflamatórias presente no tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU. De acordo com os achados do presente estudo, RAMOS *et al.* (2009) evidenciaram que PL da *C. procera* inibiu o rolamento e a adesão de neutrófilos em modelo de peritonite em ratos.

Para que haja a migração de neutrófilos, é preciso que integrinas (LFA-1 ou Mac-1), presentes na membrana citoplasmática dos neutrófilos, se liguem a moléculas de adesão como ICAM-1, uma molécula de adesão intercelular presente em células endoteliais. Nesse contexto, observou-se, conforme já mencionado, que PII IAA diminui significativamente o infiltrado de células inflamatórias, dentre essas células os neutrófilos e macrófagos.

A expressão de ICAM-1 pode ser induzida por TNF- α , IL-1 β e LPS (BERNOT *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008; MYERS *et al.*, 1992; YANG *et al.*, 2010). Esse processo é mediado por vários fatores de transcrição, sendo o NF κ B um dos principais. NF κ B medeia a transcrição de mais de 200 genes, incluindo as moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β e TNF- α) e quimiocinas (LIU 2005; SCOTT *et al.*, 2005).

Concomitante a esse aumento da expressão de ICAM-1, também observou-se no presente estudo que 5-FU aumentou a síntese de IL-1 β e de TNF- α na mucosa jugal de hamsters. Estudos anteriores já demonstraram que 5-FU eleva a expressão proteica de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (FREITAS *et al.*, 2012; LEITÃO *et al.*, 2007; SKEFF *et al.*, 2014). Além disso, mostrou-se que PII IAA preveniu o aumento tanto da síntese de IL-1 β quanto de TNF- α na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite induzida por 5-FU. PL da *Calotropis procera* já mostrou reduzir essas citocinas pró-inflamatórias na mucosite intestinal induzida por irinotecano e na mucosite oral induzida por 5-FU (ALENCAR *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2012).

A IL-1 β é responsável pela indução de outras citocinas e age em sinergismo com estas e principalmente com TNF- α por meio de *feedback positivo* (MOURA *et al.*, 2001). Neste estudo, evidenciou-se que PII IAA reduziu a expressão proteica de IL-1 β no tecido epitelial e na lâmina própria da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU. De forma semelhante, PL demonstrou anteriormente diminuir IL-1 β no intestino de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (ALENCAR *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma proteína de baixo peso molecular, produzida principalmente por macrófagos ativadas. TNF- α regula a sobrevivência das células e a morte celular através de receptores TNFRSF1A e TNFRSF1B. A ativação dos receptores TNFRSF1A regula a proliferação de linfócitos (WALLACH *et al.*, 2002) e promove a ativação das células endoteliais, migração e sobrevivência (PAN *et al.*, 2002).

Sabendo-se que uma das principais fontes de TNF- α é o macrófago ativado que também pode ser recrutado para o local da inflamação por meio de ICAM-1, levantou-se o questionamento se PII IAA reduziria o recrutamento e ativação de macrófagos já que, conforme já mencionado, essa subfração foi capaz de diminuir consideravelmente a expressão proteica de ambos a ICAM-1 e o TNF- α na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU. Para responder essa questão, os macrófagos jugais foram submetidos à imunomarcção com Iba-1.

Estudos mostraram que Iba-1 (molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1) é uma proteína especificamente expressa em macrófagos/microglia e essa proteína tem sido usada como marcador para danos axonais em astrócitos reativos e microglia, respectivamente. Reações inflamatórias promovem a elevação da expressão de Iba-1 em relação aos níveis basais em animais (TEO *et al.*, 2016).

Os macrófagos são conhecidos principalmente por serem mediadores inflamatórios em vários tecidos em resposta à infecção e lesão. Demonstrou-se que a ativação prolongada de macrófagos em modelo de lesão aumentou a morte das células neuronais através do aumento de citocinas pró-inflamatórias, compostos neurotóxicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HAGBERG *et al.*, 2015 e KICHEV *et al.*, 2014).

No presente estudo, identificaram-se macrófagos positivos para Iba-1 mesmo no grupo controle. A presença desses macrófagos ativados na mucosa jugal do grupo controle pode estar relacionada com a vasta microbiota oral dos hamsters, conforme descrito anteriormente (SKEFF *et al.*, 2014).

Sabe-se que dois tipos de macrófagos com fenótipos distintos vêm sendo identificados em condições de homeostase e de inflamação. Macrófagos ativados por via clássica, denominados macrófagos M1, caracterizados pelo envolvimento de citocinas da resposta T helper do tipo 1 (Th1), como $\text{INF-}\gamma$, que promovem a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, e contribuem para a exacerbação do processo inflamatório. Em contraste, macrófagos ativados por citocinas oriundas da resposta Th2 desenvolvem características de célula anti-inflamatória e são denominados macrófagos M2 (LUO; CHEN, 2012).

Assim, demonstrou-se que 5-FU aumentou expressivamente o número de macrófagos ativados, enquanto PII IAA o reduziu de forma mais eficaz do que a PL da *C. procera*. Anteriormente, SEDDEK *et al.* (2009) evidenciaram em seu estudo que PL da *C. procera* quando injetada por via intraperitoneal estimulava o recrutamento de macrófagos para o peritônio. Nesse mesmo estudo eles mostraram que macrófagos expostos a essa fração total, em cultura primária de células, sintetizavam mais óxido nítrico. De forma similar, porém em cultura primária de macrófagos infectados por *Listeria monocytogenes*, a subfração PI presente em PL aumentou a expressão gênica de $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 nas primeiras 4 horas após a infecção e as reduziu após 24h da infecção (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Lima *et al.* (2007) relataram que durante a inflamação, diversos tipos de células, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células endoteliais e fibroblastos participam do processo de reparo tecidual. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e secretam a matriz extracelular, que é rica em fibras colágenas, fibras elásticas, reticulares e substância fundamental amorfa (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Quando há lesão tecidual, os fibroblastos próximos à lesão proliferam, migram para a ferida e produzem matriz rica em colágeno, que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado (HINZ *et al.*, 2003; GONCALVES *et al.*, 2010).

Nesse contexto, outro importante achado deste estudo foi que PII IAA reduziu consideravelmente os efeitos do 5-FU na degradação de fibras colágenas presentes na lâmina própria da mucosa jugal de hamsters. Esse achado foi demonstrado por meio da coloração de Picro Sirius red onde se observou intensa marcação de fibras colágenas do tipo I na mucosa de hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU que foram tratados com PII IAA. Esses achados sugerem importante efeito de PII IAA em fibroblastos, uma vez que o colágeno do tipo I na lâmina própria da mucosa jugal é sintetizado exclusivamente por essas células. Acredita-se que PII IAA aumente a síntese de colágeno por fibroblastos, uma vez que PL não produziu efeito semelhante, pois apresentou menos marcação de colágeno do tipo I do que PII IAA. Vale ressaltar que o aumento de fibras colágenas na mucosa jugal de animais submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU que foram tratados com PII IAA coincidiu com os achados macroscópicos, no qual a lesão foi praticamente revertida por esta subfração.

De acordo com os achados deste estudo, Figueiredo *et al.* (2014) observaram que membranas de polivinil contendo PL de *Calotropis procera* (0,2 ou 1%) aceleraram de forma significativa a cicatrização de feridas, efeito este acompanhado por fibroplasia e deposição de colágeno.

O reparo de lesões teciduais é um processo fisiológico complexo e progressivo que envolve diversos eventos celulares, teciduais e bioquímicos que se iniciam após o dano tecidual com a finalidade de promover a integridade morfológica e fisiológica dos tecidos lesionados (KAPOR *et al.*, 2011).

A mucosite oral ocorre por meio de cinco fases interdependentes: inicialmente há um estágio iniciação, resposta primária ao dano, amplificação, ulceração e cicatrização (MANDELBAUM *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 2004). Em conjunto, essas etapas contribuem para o reparo e a remodelação tecidual.

A avaliação qualitativa do colágeno existente na mucosa jugal de hamsters foi realizada pela coloração pelo Picro sirius red para reconhecer, ao microscópio com luz polarizada, a densidade total do colágeno e as frações de colágeno I (maduro) e III (imaturo). As fibras mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja a vermelho (colágeno I) e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes coradas de verde (colágeno III) (JUNQUEIRA *et al.*, 1978; GUIMARÃES *et al.*, 2013). No presente estudo, evidenciou-se predominantemente colágeno do tipo I na mucosa jugal.

A formação e deposição de colágeno é o passo inicial do processo de cicatrização de lesões teciduais (SANTOS *et al.*, 2014). O tratamento com a subfração PII IAA preveniu a

destruição de fibras de colágeno tipo I quando comparado com o grupo 5-FU, onde se observou uma diminuição dessas fibras. Neste estudo, sugere-se que a síntese deficiente de colágeno tipo I no grupo 5-FU pode estar relacionada ao dano no DNA de fibroblastos promovida por esse quimioterápico, o que provavelmente leva a diminuição de fibroblastos. Essa redução de fibroblastos pode diminuir a síntese de colágeno. Em cultura primária de fibroblastos de ratos recém-nascidos, Skeff *et al.* (2014), demonstraram que 5-FU diminuiu a proliferação dessas células.

Segundo Komorowska-Timek *et al.*, (2004) diversos fatores interferem na síntese de colágeno como a proliferação de fibroblastos, fluxo sanguíneo, a epitelização, a angiogênese e os fenômenos dependentes da oxigenação tecidual.

Estudos comparando diversos métodos de coloração para análise do colágeno mostraram que o corante Picro Sirius-red é de simples execução, fácil interpretação e específico para o estudo do colágeno tecidual, uma vez que torna suas fibras birrefringentes à luz polarizada, possibilitando, assim, a sua identificação. As fibras de maior espessura (colágeno do tipo I) aparecem fortemente birrefringentes e fibras de menor espessura (colágeno do tipo III) fracamente birrefringentes. Esta diferenciação de cores permite análise qualitativa das fibras colágenas, obtendo-se a densitometria de fibras maduras (colágeno tipo I) e imaturas (colágeno tipo III) que, em última análise, refletem a proporção de entrelaçamento das fibras (JUNQUEIRA *et al.*, 1982; TRUBIAN *et al.*, 2007).

Freitas *et al.* (2011) isolaram e caracterizaram uma proteína denominada osmotina (CpOsm) a partir da PL da *C. procera*. Essa osmotina de látex de *C. procera* demonstrou uma potente atividade antifúngica. Assim como a adiponectina, a osmotina tem mostrado inibir NFκB (SAMMY *et al.*, 2012). Além disso, essa osmotina está presente nas frações PII e PII IAA, o que provavelmente seja a responsável pelos seus principais efeitos biológicos. Para que essa hipótese seja comprovada é necessário o desenvolvimento de mais estudos.

Com base nos resultados apresentados neste estudo, PII IAA é a subfração responsável pelos efeitos benéficos observados anteriormente da LP na mucosite oral induzida por 5-FU. Além disso, os dados deste estudo evidenciaram que PII IAA atenua a mucosite oral induzida por 5-FU por reduzir o estresse oxidativo, a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1), o recrutamento de neutrófilos e a ativação de macrófagos com consequente diminuição de IL-1β e TNF-α. Além disso, PII IAA preveniu a degradação das fibras colágenas e aumentou a sobrevivência e o ganho de massa corporal em animais submetidos a mucosite oral experimental.

A subfração PII IAA da *Calotropis procera* além representar uma terapêutica de baixo custo, demonstra ser promissora para o tratamento da mucosite oral induzida por 5-FU, pois apenas duas administrações foram suficientes para prevenir a lesão na mucosa oral induzida por esse quimioterápico.

7 CONCLUSÕES

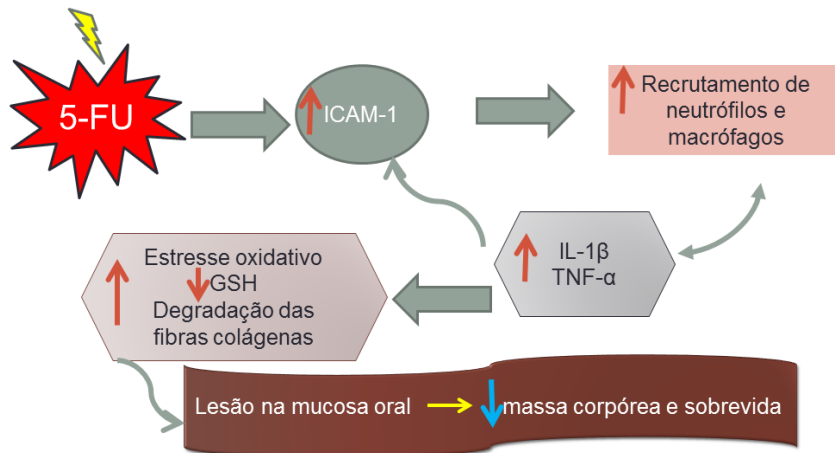
Observou-se que PII IAA no modelo de mucosites oral induzida por 5-FU em hamsters

- Aumenta a sobrevivência e previne a perda ponderal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU;
- Previne as alterações macroscópicas e histológicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters;
- Inibe a inflamação (por reduzir os níveis de MPO e a síntese de IL-1 β e TNF- α) e o estresse oxidativo (por aumentar os níveis de GSH e reduzir os de MDA) na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU;
- Diminui a expressão de ICAM-1 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU;
- Diminui a ativação de macrófagos na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU;
- Previne a degradação das fibras colágenas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

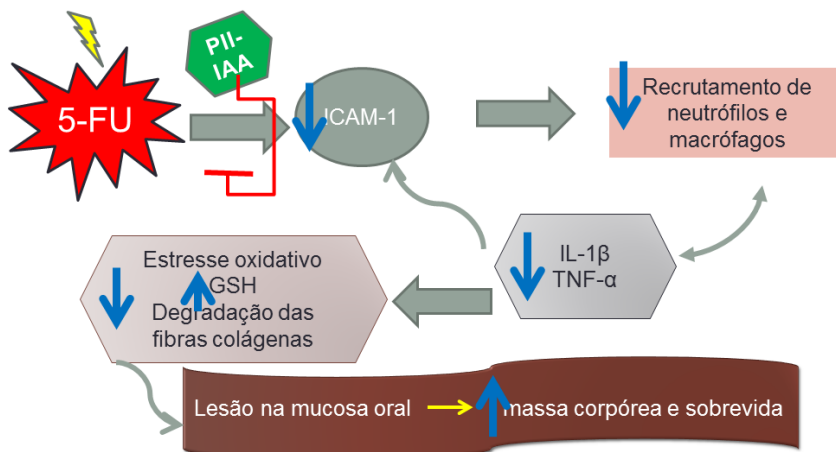
Com base nesses resultados, conclui-se que a subfração PII IAA no esquema posológico avaliado reduz os parâmetros inflamatórios, reduz a expressão de citocinas e preserva a arquitetura tecidual, prevenindo a mucosite oral induzida por 5-FU.

Modelo hipotético

Efeitos do 5-FU nos parâmetros avaliados



Efeitos da subfração PII IAA nos parâmetros avaliados



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, B.; EL-TAYEB; SULLEIMAN, Y. R. *Calotropis procera*: feed potencial for arid zones. **Veterinary-Record.**, v. 131, n. 6, p. 132, 1992.

ABBAS AK, LICHTMANN AH. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição, , Editora Elsevier, 2005.

ADCOCK, IM; ITO, K.; BARNES, PJ. Glucocorticoids: effects on gene transcription. **Proc Am Thorac Soc.**;1(3):247-54, 2004

ALBUQUERQUE, R. A; MORAIS, V. L; SOBRAL, A. P. V. Protocolo de atendimento odontológico a pacientes oncológicos pediátricos – revisão de literatura. **Rev. Odontol. Unesp**, v. 36, n. 3, p. 275-80, 2007.

ALENCAR, N. M. N. *et al.* Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Med.**, v. 70, p. 1144–1149, 2004.

ALENCAR, N. M. N. *et al.* Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 559–564, 2006.

ALIKHANI, M. *et al.* LPS indirectly stimulates apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 52901–52908, 2003.

AL-QARAWI, A. A. *et al.* A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 25 , p. 61–70, 2001.

ANDRADE, M. V. M. *et al.* Fenologia da *Calotropis procera* Ait R.Br., em função do sistema e da densidade de plantio. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 208, p-632, 2005.

ARAÚJO, S. N.M. *et al.* Cancer patients with oral mucositis: challenges for nursing care. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 23, n. 2, p. 267-274, 2015.

ARIFA, R.D. *et al.* Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-Induced mucositis through IL-1beta and IL-18 in mice. **Am. J. Pathol.**, 184, pp. 2023–2034, 2014.

ARIFA *et al.*, The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan. **Pharmacological Research**. Volume 107, p. 102–110, 2016.

BALIS, F.M. *et al.* Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. **J. Clin. Oncol.**, v.3, p.485-489, 1985.

BAMBA, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. **J. Gastroenterol.**, v. 38, p. 548–554, 2003.

BARBOSA, A. M.; RIBEIRO, D. M.; CALDO-TEIXEIRA, A. S. Conhecimentos e práticas em saúde bucal com crianças hospitalizadas com câncer. **Cien. Saude Colet.**, v. 15, Supl. 1, p. 1113–1122, 2010.

BARROS, F. E. V. *et al.* Avaliação das atividades analgésica antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, (ciume). **Infarma.**, v. 16, p. 9-10, 2004.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist.**, Philadelphia, v. 4, n. 127, p. 617-633. 1994.

BENSADOUN, R. J. *et al.* Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 258, p. 481-7, 2001.

BEZERRA, D. A. C. *et al.* Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009 .

BISHOP, J. F. *et al.* A phase I-II study of cytosine arabinose, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust. NZ. J. Med.**, v. 16, p. 48-51, 1986.

BOING, L. *et al.* The benefits of physical activity in men with prostate cancer - a systematic review. **J. Phys. Educ.**, v. 27, e2729, 2016.

BOSSI, P. *et al.* Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estudos da representatividade ecológica nos biomas brasileiros.** Brasília, 2007.

BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol.**, v. 13, p. 90-801, 2012.

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

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

CARVALHO, K. M.; ASSREUY, M. A. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Ethnopharmacology**, v. 99, p. 125-129, 2005.

- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 314-319, 2008.
- CASTELL, J.V.; GOMEZ-LECHON. M.J., X.; PONSODA, R. BORT. **In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity** IN: J.V. CASTELL, M.J. GOMEZ-LECHON (Eds.), *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, London , pp. 375–410, **1997**.
- CAVALCANTE, G. S. *et al.* Antimicrobial activity of latex silver nanoparticles using *Calotropis procera* **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 876–883, 2014.
- CHAUDHARY, P.; VIANA, C. A.; RAMOS, M. V.; KUMAR, V. L. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 69-73, 2015.
- CHAPPLE, I.L. CHAPPLE. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. **Clinical Molecular Pathology**, 49 (5), pp. M247–M255, 1996.
- CHENG K. K. F. *et al.* Incidence and risk factors of oral mucositis in paediatric and adolescent patients undergoing chemotherapy. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 3, p. 153-62, 2011.
- CHILDERS, J. M.; BRZECHFFA, P. R.; HATCH, K. D.; SURWIT, E. A. Laparoscopically assisted surgical staging (LASS) of endometrial cancer. **Gynecology Oncol.**, v. 51, n. 1, p. 33-38, 1993.
- CHOEDON, T.; MATHAN, G.; ARYA, S.; KUMAR V. L.; KUMAR, L. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.
- CHUNDATTU, S. J.; AGRAWAL, V.K.; GANESH, N. Phytochemical investigation of *Calotropis procera*. **Arabian J. Chem.**, v. 9, p. 230-234, 2011.
- COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. Copyright, Boston University, 2. ed, 2000.
- CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E **Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis: Vozes, 2001.
- COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 5, p. 65-69, 1985.
- CRISWELL, T. *et al.* Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. **Oncogene**, v. 22, p. 5813–5827, 2003.

COHEN T, NAHARI D, CEREM LW, GERA N, LEVI B. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem.**271(2):736-41, 1996.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell.**, v. 103, p. 239– 252, 2000.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the anagelsic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 307-311, 2000.

DIASIO, H. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clin Pharmacokinet**, v. 16, n. 4, p. 215-37, 1989.

DOMINGUES, R.J. *et al* . Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 149-151, 2011.

DUBEY, V.K.; JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1057–1071, 2003.

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

ELNER, VM; SCALES, W; ELNER, SG; DANFORTH, J; KUNKEL, SL; STRIETER, RM. Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. **Exp Eye Res.**;54(3):361-8, 1992.

ENGELS-DEUTSCH, M. A. *et al*. Inertinal inactivation of pac and rmKB genes reduces the release of tumor necrosis factor α , interleukin-6, and interleukin-8 by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp and periodontal ligament cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5169–5177, 2003.

FERNANDES, H. B. *et al* . Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Rev. Bras. Farmacogn.**,v. 25, n. 3, p. 269-277, 2015.

FERREIRA, J. E. V. *et al*. **Chemometric Study on Molecules with Anticancer Properties**. In: Varmuza, K. Chemometrics in Practical Applications, p. 326, 2012.

FERREIRA, M. B.; GOMES, V. *Calotropis procera* (Ait) **R. Br. Oréades UFV.**, v. 5, p. 68-74, 1974/76.

FERREIRA, P. M. P. *et al*. *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutr.**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FIGUEIREDO, A. L. P. *et al*. Laser terapia no controle da mucosite oral: um estudo de metanálise. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 59, n. 5, p. 467-474, 2013 .

FIGUEIREDO, I. S. T. *et al.* Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 512–519, 2014.

FREITAS, A. P. *et al.* Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 10, p. 981-990, 2012.

FREITAS, C. D. *et al.* Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 738-743, 2011a.

FREITAS, D. A. *et al.* Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Rev. CEFAC**, v. 13, n. 6, p. 1103-1108, 2011b.

GLIMELIUS, K. *et al.* Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. **Annals of Oncology**, v. 8, p. 163–168, 1997.

GUIMARAES, M.V.T.N *et al.* Ação da l-arginina na evolução de retalhos cutâneos de ratos sob exposição à nicotina. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro , v. 40, n. 1, p. 49-54, 2013

HAAGEN, J. *et al.* Effect of selective inhibitors of inflammation on oral mucositis: Preclinical studies. **Radiotherapy and Oncology**, v. 92, p. 472–476, 2009.

HANISCH, U.K.; KETTENMANN, H.. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat. Neurosci.**, 10, pp. 1387–1394, 2007.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, p. 894–901, 2008.

HESPANHOL, F. L. *et al.* Manifestações bucais em pacientes submetidos à quimioterapia. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 15, supl. 1, p. 1085-1094, June 2010.

HINZ B, GABBIANI G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. **Thromb Haemost.**;90(6):993-1002, 2003.

HUSSEIN , H. I. *et al.* Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n.11, p. 135-140, 1994.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Divisão de Informação e Análise de Situação**. Informativo Vigilância do Câncer. Rio de Janeiro: MS; 2012. p.1-12.

INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 122 p, 2015.

IQBAL, Z; LATEEF, M; JABBAR, A; MUHAMMAD, G; KHAN, MN. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **J Ethnopharmacol**, 102 (2) pp. 256–261, 2005.

JAIN, H.K; KULSHRESTHA, D.K . Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs. **J Ethnopharmacol**, 68:261–266, 1999.

JEMAL, A. *et al.* Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**, v. 19, n. 8, p. 1893-907, 2010.

JUNQUEIRA LC, MONTES GS, SANCHEZ EM. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**.;74 (Suppl 1):153-6, 1982.

JUNQUEIRA LC, COSSERMELLI W, BRENTANI R. Differential staining of collagen type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn.**;41(3):267-74, 1978.

KAMATH, J. V.; RANA, A. C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia**, v. 73, p. 111-115, 2002.

KOMOROWSKA-TIMEK E, TIMEK TA, BREVETTI LS, SZUBA A, STUEHLINGER M, HARDESTY RA, *et al.* Oral administration of L-arginine decreases necrosis of the epigastric skin flap in the rat. **Ann Plast Surg**. 53(1):73-8, 2004.

KAPOOR P, SACHDEVA S, SACHDEVA S. Topical hyaluronic Acid in the management of oral ulcers. **Indian J Dermatol**. 56(3):300-2, 2011.

KEDDERIS, G.L. Biochemical basis of hepatocellular injury. **Toxicol. Pathol.**, 24, pp. 77–83, 1996.

KIM, H. J. *et al.* Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 179–183, 2015.

KOPF M, BAUMANN H, FREER G, FREUDENBERG M, LAMERS M, KISHIMOTO T, *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, 368(6469):339-42, 1994.

KRAWISZ JE, SHARON P, STENSON WF. Ensaio quantitativo para a inflamação intestinal aguda com base na actividade de mieloperoxidase. Avaliação da inflamação no modelo de rato e hamster. **Gastroenterologia**, 87: 1344-50, 1984.

KUMAR, H. S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 2, p. 123-125, 1994.

KUMAR, S. *et al.* Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 115–118, 2001.

KUMAR, V. L.; SHIVKAR, Y. M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Taylor & Francis Health Sciences**, v. 13, p. 151- 155, 2004.

KUMAR, V. L.; ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. In: Govil J.N. eds. **Recent Progress in Medicinal Plants**. Texas Studium Press, v.11, p. 373-388, 2006.

KUMAR, V. L. *et al.* Protective effect of proteins derived from the latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1336-1341, 2011.

KUMAR, V.L.; PADHY, B.M.. Protective effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* against oxidative stress and renal damage in diabetic rats. **Biocell**, 35, pp. 63–69, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARHSINI, M. *et al.* Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extract of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 68, p. 371-373, 1997.

LEITÃO, R. F. C. *et al.* Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 61, p.215-222, 2008.

LEITÃO, R. F. C. *et al.* Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p.603-12, 2007.

LI, J. W. H.; VEREDAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. **Science**, v. 325, p. 161- 165, 2009.

LI, J.; SUN, Y. M.; WANG, L. F.; LI, Z. Q.; PAN, W.; CAO, H. Y. Comparison of Effects of Simvastatin Versus Atorvastatin on Oxidative Stress in Patients With Coronary Heart Disease. **Clin. Cardiol.**, v.33,n. 4, p.222-227, 2010.

LIMA, V. *et al.* Effects of the tumornecrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210-217, 2005.

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 327-34, 2010.

LIMA-JÚNIOR RCP, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC, *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol** 69: 931–942, 2012.

LIMA, R. C. S. *et al.* Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior**. v. 23, p. 123-126, 2012.

LIMA-JÚNIOR RCP, FREITAS HC, WONG DVT, *et al.* 2014. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol** 171: 2335–2350, 2014.

LOGAN, R. M. *et al.* Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 63, n. 2, p. 239-245, 2009.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Rev. Cancer**, v.3, p.330-8, 2003.

LOPES, K. L. B. *et al.* Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atroviolacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany.**, v. 87 n. 2, p. 202-209, 2009.

WALLACH D, ARUMUGAM TU, BOLDIN MP, CANTARELLA G, GANESH KA, GOLTSEV Y, *et al.* How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF-kB activation by members of the TNF/NGF receptor family. **Arthritis Res.**;4 Suppl 3:S189-96, 2002.

MANDELBAUM, SH; DI SANTIS, EP; MANDELBAUM, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros Dermatologia**. v. 78, n. 4, p.393-410, 2003.

MAGALHAES, H. I. F. *et al.* In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MAGRATH, I. T. *et al.* An effective therapy for both undifferentiated (including Burkitt's) lymphoma and lymphoblastic lymphomas in children and young adults. **Blood**, v. 63, p. 1102-1111, 1984.

MAJUMDAR, P.K., KUMAR, V.L. Anti-inflammatory activity of fractions of latex of *Calotropis procera* in carrageenan induced rat paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 166-167, 1997.

MARCELINO, M. Y.*et al.* Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease . **J. Coloproctol. (Rio J.)**, Rio de Janeiro , v. 35, n. 1, p. 20-27, 2015 .

MASCOLO, N. *et al.* Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 211-221, 1988.

MATHUR, R. *et al.* Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p. 343- 348, 2009.

MATSUNAGA, T Y.; TSUJI, K. K., KOHNO, S., R. HIRAYAMA, D.H. ALPERS, T. KOMODA, A. HARA. Toxicity against gastric cancer cells by combined treatment with 5-fluorouracil and mitomycin c: Implication in oxidative stress. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 66 (3), pp. 517–526, 2010.

MEDEIROS, C. A. C. X. *et al.* Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, p. 1-16, 2010.

MEDEIROS, C. A. C. X.; LEITÃO, R. F. C. ; MACEDO, R. N. ; BARBOZA, D. R. M. M. ; GOMES, A. S. ; NOGUEIRA, N. A. P. ; ALENCAR, N. M. N. ; RIBEIRO, R. A. ; BRITO, G. A. C. . Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 1085-1100, 2011.

MELO, M. M. *et al.* Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Rev. Bras. Saúde Prod.**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2001.

MENDONÇA, E. F. *et al.* Complicações bucais da quimioterapia e radioterapia no tratamento do câncer. **Rev. ABO Nac.**, v. 13, n. 3, p. 151-7, 2005.

MOHAMED, N. H. *et al.* Activity of latex silver nanoparticles using *Calotropis procera*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 876–883, 2014.

MANGONI M. *et al.*, A PPAR gamma agonist protects against oral mucositis induced by irradiation in a murine model. **Oral Oncology**, V. 64, Pages 52–58, 2017.

MOREIRA-FILHO, S. P. *et al.* **Arquivos de zootecnia.**, v. 56, n. 214, p. 248, 2005.

MOSSA, J. S. *et al.* Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **Am. J. Chin. Med.**, v. 19, n. 3/4, p. 223-31, 1991.

MOTA J.M. *et al.* Amifostine (Wr2721) prevents indomethacin induced gastric damage in rats: role of no protein sulfhydryl groups and leukocyte adherence. **Dig Dis Sci.** v.52, n.1, p. 119-25, 2007.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly. *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v. 27, p. 505-514, 1997.

NASCIMENTO, D. C. O.; RALPH, M.T.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, D. M. F.; GOMES-FILHO, M.A; ALENCAR, N.M.; LEAD, N.C.; RAMOS, M.V.; LIMA-FILHO, J.V. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against

experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, V. 23, Issue 7, pp 745–753, 2016.

NETO, M. C. L. *et al* . Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 23, n. 6, p. 913-919, 2013.

NEVILLE, B. W. *et al*. **Patologia oral e axilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

OLIVEIRA, J. S. *et al*. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v.21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA S.H.F. *et al*. Seedling growth of the invader *Calotropis procera* in ironstone rupestrian field and seasonally dry forest soils. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, p. 69-76, 2009.

OLIVEIRA, J. S. *et al*. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 139–149, 2010.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, R. S. *et al*. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against Salmonella infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, v. 61, n. 7, p. 689-698, 2012.

OLIVEIRA, M. M. *et al*. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Rev. bras. epidemiol.**, v. 18, supl. 2, p. 146-157, 2015.

PAN S, AN P, ZHANG R, HE X, YIN G, MIN W. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. **Moll Cell Biol**. 22(21):7512-23, 2002.

PETERSON, D. E. Research advances in oral mucositis. **Curr Opin Oncol**. v. 11, n. 4, p. 261-6, 1999.

PETERSON, D. E.; JONES, J. B ; PETIT, R. G 2nd. Randomized, placebo-controlled trial of Saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. **Cancer**, v.109, n.2, p.322-331, 2007.

PETRELLI, F. *et al.* Modified schedules of DCF chemotherapy for advanced gastric cancer: a systematic review of efficacy and toxicity. **S. Anticancer Drugs.**, 2016.

PIZZORNO, G. *et al.* **Pyrimidine Analogs.** In: Kufe, D. W. *et al.* Cancer Medicine. Editora BC Decker, Hamilton, 6 ed, 178p. 2003.

RABER-DURLACHER, J. E. Current practices for management of oral mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 7, p. 71-4, 1999.

RAJESH, V. L. *et al.* Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. **Dent Clin North Am.**, v. 52, n. 1, 2008.

RAMESH, J., *et al.* Analysis of antioxidant activity in extracts of *Calotropis procera* (Ait) R, Br **J. Appl. Biosci.**, 17, pp. 899–903, 2009.

RAMOS, M. V. *et al.* Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1001, n. 5, p. 503-510, 2006.

RAMOS, M.V. *et al.* Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 115-122, 2007.

RAMOS, M. V. *et al.* Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n. 3, p. 387-92, 2009.

RAMOS, M. V. *et al.* The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-Plant interactions**, v. 4, p. 57-67, 2010.

RAMOS, M. V. *et al.* Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 5, p. 455-463, 2012.

RAMOS, M. V. *et al.* New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 211-219, 2013.

RASIKA, A. M. *et al.* Healingi potencial of *Calotropis procera* on der-mal wounds in guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, n. 1/3, p. 261-6, 1999.

RIBEIRO, I. L. A.; VALENCA, A. M. G.; BONAN, P. R. F. Treatment of severe oral mucositis in a pediatric patient undergoing chemotherapy. **RGO, Rev. Gaúch. Odontol.**, Campinas, v. 63, n. 4, p. 467-471, 2015.

RIOS, ERV; ROCHA, N. F. M; V., E. T. ; MOURA, B.A. ; FEITOSA, M. L. ; CERQUEIRA, G.S; SOARES, P. M. G. ; WOODS, D. J.; DE SOUSA, F. C. F. ; LEAL, L. K. A. M.

Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chemico-Biological Interactions**, 2010.

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA, G V; ARAÚJO, F Y R ; RIOS, E. R; CARVALHO, A.M.R ; SOARES, P. M. G.; SOUSA, D. P. ; SOUSA, F. C. F. . (-)-bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 455-461, 2011.

ROMERO-SANDOVAL, A., CHAI, N.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J.A.. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Res.**, 1219, pp. 116–126, 2008.

ROTH, B. J. *et al.* Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic breast cancer. A phase II trial of the Hoosier Oncology Group. **Cancer**, v. 68, p. 248–252, 1991.

RUBENSTEIN, E. B. *et al.* Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer. **Cancer**, v. 1, n. 100, p. 2026-46, 2004.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. *et al.* Interleukin-1 beta contributes to the inflammation-induced increase in nerve-growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265–1275, 1995.

SANGRAULA, H.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Evaluation of anti-inflammatory activity of latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 9, p. 257–264, 2002.

SANTANA, D. F. Y. *et al.* Caracterização da caatinga e da dieta de novilhos fistulados, na época chuvosa, no semiárido de Pernambuco. **R. Bras. Zootec.**, v. 40, n. 1, p. 69-78, 2011.

SANTOS, J.A.A. *et al.* Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev. bras. plantas med.**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 637-643, 2014.

SAPOLNIK, R. Suporte de terapia intensiva no paciente oncológico. **Jornal de Pediatria**, v. 79, Supl. 2, 2003.

SASADA, I. N. V.; MUNERATO, M. C.; GREGIANIN, L. J. Oral mucositis in children with cancer – literature review. **RFO**, v. 18, n. 3, p. 345-350, 2013.

SASADA, I. N. V. *et al.* Prevenção de intercorrências estomatológicas em oncologia pediátrica. **RFO**, v. 20, n. 1, p. 105–109, 2015.

SHARMA, G. K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro screening schizonticidal de *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 77-79, 2000.

SHARMA, A. *et al.* *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges reduce radiation- and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: A randomized double-blind placebo-controlled study. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 6, p. 875–881, 2012.

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

SEMKOVA I, MUETHER PS, KUEBBELER M, MEYER KL, KOCIOK N, JOUSSEN AM. Recruitment of blood-derived inflammatory cells mediated via tumor necrosis factor- receptor 1b exacerbates choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**;52(11):6101-8, 2011.

SESAKI, M. *et al.* Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 β and TNF- α . **Mediators Inflamm.**, v. 9, p. 155–160, 2000.

SETTY, S. R. *et al.* Hepato-protective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 451-454, 2007.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clinic**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6^aed Porto Alegre Ed UFSC/UFPR, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**, 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2010.

SILVESTRI, M; SABATINI, F; SCARSO, L; CORDONE, A; DASIC, G; ROSSI, GA. Fluticasone propionate downregulates nasal fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling. **Int Arch Allergy Immunol.**128(1):51-8, 2002.

SIOMEK, A.; TUJAKOWSKI, A J. ; GACKOWSKI, D.; ROZALSKI, R.; FOKSINSKI, M.; DZIAMAN, T.; ROSZKOWSKI, K.; OLINSKI, R.. Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. **International Journal of Cancer**, 119 (9) pp. 2228–2230, 2006.

SHIN, SH; PARK, JY; JEON, CH; CHOI, JK; LEE, SH. Quantitative analysis of eotaxin and RANTES messenger RNA in nasal polyps: association of tissue and nasal eosinophils. **Laryngoscope.**110(8):1353-7, 2000.

SONIS, S. T.; PETERSON, D. E. Oral complications of cancer chemotherapy: present status and future studies. **Cancer Treatment Reports**, v. 66, p. 1251–1256, 1982.

SONIS, S. T.; FAZIO, R. C.; FANG, L. **Complicações bucais da quimioterapia do câncer.** In: Medicina Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 375-401, 1989.

SONIS, S. T. *et al.* An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.**, v.69, n. 437-443, 1990.

SONIS S. T.; CLARK, J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. **Oncology**, v. 12, p. 92-5, 1991.

SONIS, S. T. *et al.* Oral complications of cancer therapy. **Cancer-principles & practice of oncology**, 4th ed., p 2385-2393, 1993.

SONIS ST, LINDQUIST L, VAN VUGT A, STEWART AA, STAM K, QU GY *et al.* Prevention of chemotherapy induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta-3. **Cancer Res** 54:1135–1138, 1994.

SONIS, S. T. *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 373–381, 2000.

SONIS ST, PETERSON RL, EDWARDS LJ, LUCEY CA, WANG L, MANSON L *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**, 36: 373–38, 2000

SONIS, S. T. The biologic role of nuclear factor-kB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, p. 300-9, 2002.

SONIS, S. T. The Pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277-84, 2004.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M *et al* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer** 100:1995–2025, 2004.

SONIS, S. T. *et al.* The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral Oncol.**, v. 40, p. 170–176, 2004.

SOVERI, L. M. *et al.* Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin is efficacy an impact of toxicity. **European Journal of Cancer**, v. 50, p. 2966-2974, 2014.

SU, S. *et al.* miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program. **Nat Commun** 6:8523, 2015.

TEO, J.D. *et al.*, Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2016.

TEIXEIRA, S. C. C. **Mucosite oral em cuidados paliativos.** Dissertação de Mestrado em Oncologia – Universidade do Porto, 2010.

TEIXEIRA, F. M. *et al.* *In vitro* tissue culture of the medicinal shrub *Calotropis procera* to produce pharmacologically active proteins from plant látex. **Process Biochem.**, v. 46, p. 1118–1124, 2011.

THEODOSSIADIS PG, LIARAKOS VS, SFIKAKIS PP, VERGADOS IA, THEODOSSIADIS GP. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol.**14(5)7:825-30.147(5):761-3, 2009.

TOUR, N. S.; TALELE, G. S. Gastric antiulcer and antiinflammatory activities of *Calotropis procera* stem bark. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 21, n. 6, p. 1118-1126, 2011.

TURKELI, M.; ALDEMIR, M. N.; BINGOL, F.; DOGAN, C.; KARA, A. A morphometric study of the protective effect of cryotherapy on oral mucositis in cancer patients treated with 5-fluorouracil. **Biotech Histochem.**, v. 91 n. 7, p. 465-471, 2016.

TRUBIAN, Paula Suzin et al . Influência do octreotide subcutâneo na cicatrização de sutura gástrica em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo , v. 20, n. 3, p. 172-178, 2007 .

VANHOECKE, B. *et al.* Dark agouti rat model of chemotherapy-induced mucositis: establishment and current state of the art. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, p. 725-741, 2015.

VALERA, F. *et al.* . In vitro effect of glucocorticoids on nasal polyps. **Braz. j. otorhinolaryngol. (Impr.)**, São Paulo , v. 77, n. 5, p. 605-610, out. 2011.

VAN SNICK J. Interleukin-6: an overview. **Annu Rev Immunol.**8:253-78; 1990.

VERDE, R.; BUZINA, H.; ERICKSON, J. M. Comer Experiências de crianças e adolescentes com quimioterapia - relacionadas Náuseas e mucosite. **J. Pediatr. Oncol. Nurs.**, v. 27, n. 4, p. 209-16, 2010.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinaseslaticíferas de *Calotropis procera***. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, 2016.

VOLPATO, L. E. R. *et al.* Mucosite bucal radio e quimioinduzida. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 73, n. 4, p. 562-8, 2007.

YOSHINO,F; A. YOSHIDA, A. NAKAJIMA, S. WADA-TAKAHASHI, S.S. TAKAHASHI, M.C. LEE. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **PLoS ONE**, 8 (12), p. e82834, 2013.

ZHANG, W. *et al.* Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 679–685, 2012.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**.. Disponível em http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, 2015.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World cancer report**, 2014.

Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em 7 de novembro de 2016.

ANEXO



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

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 28/2013, sobre o projeto intitulado: **“INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA CALOTROPIS PROCERA E SUAS SUB-FRAÇÕES NO TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Mariana Lima Vale e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 24 de julho de 2013


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2166369

APÊNDICE

Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
5-FU	Eurofarma	214508-00
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin [®])	Syntec	-
Xilazina 2% (Calmin [®])	Agener União	-

Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
DAB	Dako	K3468
Dako Pen	Dako	52002
Diluyente do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130-5
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
Kit de citocinas para TNF- α	R&D Systems	DY510
Kit de citocinas para IL-1 β	R&D Systems	DY501
O-dianosidina	Sigma- Aldrich	D9143
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
PicroSirius Red	EasyPath	-
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluyente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126

Anticorpos

Anticorpo	Fabricante	Código do produto
Anti-Iba-1	Abcam	ab107159
Anti-ICAM-1	Abcam	ab124760
Anti-IL-1 β	Santa Cruz Biotechnology	sc 7884

Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Tampão citrato (concentrado 10x)	29,4g de Citrato de sódio 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 6,0 Completar para 1000 mL.
Tampão citrato (concentrado 1x)	20 mL de tampão citrato 10x 180 mL de água destilada
PBS/0,2% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 50 μ L de triton-X-100
PBS/1% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 250 μ L de triton-X-100
Solução de DTNB	13,2 mg de DTNB 3,33 mL de metanol Observação: Proteger a solução da luz.
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9