



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

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE *Calotropis procera*
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS

FORTALEZA – CE
2021

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

**EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE *Calotropis procera*
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

**Fortaleza
2021**

FLÁVIO DA SILVEIRA BITENCOURT

**EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE *Calotropis procera*
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.**

Aprovada em 14 / 12 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra Vilma de Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

Prof. Dra. Sandra Maria Nunes Monteiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B536e Bitencourt, Flávio da Silveira.

Efeito protetor da fração protéica do látex de *Calotropis procera* na mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / Flávio da Silveira Bitencourt. – 2021.

113 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

1. *Calotropis*. 2. Látex. 3. Irinotecano. I. Título.

CDD 615.1

AGRADECIMENTOS

À prof^a Dra. **Nylane Maria Nunes de Alencar** minha orientadora desde a iniciação científica (10 anos de convívio), por me ajudar na minha formação científica, sempre com confiança, honestidade, compreensão, dedicação, paciência e profissionalismo durante a realização desse trabalho, mas antes de tudo por ser uma grande amiga e segunda mãe (mãe científica).

Ao Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**, por ter acreditado em mim e me acolhido no laboratório LAFICA para realização de grande parte desse trabalho pela amizade e admiração e também por todo o apoio e confiança no trabalho realizado como coordenador de pesquisa clínica do ICC.

Ao Prof. Dr. **Márcio Viana Ramos**, pelo fornecimento do látex, essencial ao trabalho, pelas críticas ao trabalho e por ter aceitado participar da banca de avaliação.

Às prof. Dra. **Vilma de Lima** e prof. Dra. **Sandra Nunes** por terem aceitado participar da avaliação desse trabalho.

A minha família pela paciência, principalmente durante a fase final desse trabalho, e por terem ensinado muitas coisas na vida. Em especial aos meus pais (**Maria Bitencourt** e **Ciro Bitencourt**-in memoriam) e aos meus irmãos, **Ciro Roberto Bitencourt** e **Marco Antônio Bitencourt**, e à minha irmã **Ana Maria Bitencourt**.

À Profa. Dra. **Gerly Anne Brito**, pelas indispensáveis análises histopatológicas realizadas nesse trabalho.

As amigas de longas datas **Ingrid Samantha** e **Karoline Aragão** por estarem sempre ajudando, pela paciência, conselhos e palavras de conforto durante o desenvolvimento desse trabalho.

A **Patricia Bastos**, pela amizade e pela sempre disposição e ajuda no desenvolvimento dos experimentos e desse trabalho.

Aos grandes amigos e amigas do laboratório prof. **Marcus Vale**, **Rachel Sindeaux**, **Lyara Freitas**, **Rafael Alencar**, **Saulo Melo**, **Luana David**, **Tamiris Goebel**, **Cesar Osório**, **Patrícia Samara (técnica)**, **Manuel Carlos**, **Italo Mesquita**, **Thiago Olinda**, **Alana Rabelo** por grandes momentos de aprendizado e companhia.

Ao pessoal do LAFICA, **Ana Paula Macedo, Anielle Torres, Eudmar Marcolino**, pela amizade e convívio, em especial ao hoje prof. Dr. **Roberto Cesar**, pela amizade e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Instituto do Câncer do Ceará: **Nelson Belarmino, prof. Manfredo Lins, Lus Mario, Armando Falcão, Monique Maciel, Josianne Carneiro, Aline Bernardino e Danusio Sartori** pela amizade e palavras de apoio no desenvolvimento do trabalho e pela paciência nos momentos de ausência.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial a **Aurha Rhanes, Marcia Borges** ao **Haroldo** e a **Maria Sinvandira** (Vandinha-LAFICA).

Aos funcionários do NEMPI, **Josyanne, Socorro, Andrea**, pelas técnicas histopatológicas.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

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

Meu Muito Obrigado!

“Quem disse que na vida tudo é fácil, esqueceu-se de lembrar que o bom da vida conquistamos nas dificuldades.”

RESUMO

Efeito Protetor da Fração Protéica do Látex de *Calotropis procera* na Mucosite Intestinal Induzida por Irinotecano em Camundongos.

A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral do irinotecano (CPT-11), usado para o tratamento do câncer colo-retal. Verifica-se uma incidência de MI associada à diarreia grave em até 25% dos pacientes. Contudo, o manejo clínico desses efeitos colaterais ainda é em parte inefetivo. *Calotropis procera* (CP) é uma planta encontrada na África, Ásia e América do sul, sendo de forma abundante no Nordeste do Brasil e tem apresentado um potencial anti-inflamatório em modelos animais. Objetivamos avaliar o efeito anti-inflamatório do látex de uma fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) na MI induzida por CPT-11. Camundongos *Swiss* (n=8-12; 23±2g) foram tratados por 4 dias com salina (Sal, 5mL/kg, i.p.) ou CPT-11 (75mg/kg, i.p.). Em outros grupos experimentais, LP (1, 5 e 50 mg/kg/dia, e.v) foi administrado durante 7 dias, 30 min antes do CPT-11. No 7º dia avaliou-se a diarreia (escores) e a contagem sanguínea de leucócitos e neutrófilos ($\times 10^3/\text{mL}$). Em outro experimento, sobrevida e peso ponderal foram avaliados até o 12º dia. Após sacrifício (7º dia), coletou-se o duodeno para dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) (neutrófilos/MG de tecido), análise microscópica (Hematoxilina/Eosina), análise morfométrica (vilo/crípta), TNF- α , IL-1 β (pg/mL) por Elisa, contratilidade in vitro (% de contração em relação ao KCl 60mM), imunohistoquímica para ciclooxigenase-2 (COX-2), TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico sintase induzida iNOS, fator nuclear κB (NF- κB) e a expressão de iNOS por Western Blot. Para estatística utilizou-se ANOVA/Teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn. $P < 0,05$ foi aceito. LP diminuiu os escores de diarreia, os níveis de MPO e melhorou a sobrevida na dose de 5mg/kg (diarreia:1[0-2]; MPO:4,05±1,07; sobrevida: 75%) e 50mg/kg (diarreia:1[0-3]; MPO:5,57±1,50; sobrevida: 75%) quando comparado ao CPT-11 (diarreia:3[2-3]; MPO:24,45±3,0; sobrevida: 47%, respectivamente). LP diminuiu a contratilidade (5mg/kg:165,1±57,2) e os níveis de citocinas TNF- α (5mg/kg:3,31±3,0 e 50mg/kg:9,79±5,6), IL-1 β (5mg/kg:143,5±41,5 e 50mg/kg:182±65,7) e aumentou razão vilo/crípta (5mg/kg:2,79±0,17) em comparação ao grupo CPT-11 (contratilidade: 906,1±225,4; TNF- α :28,0±3,5; IL1 β :806,1±247,6 e vilo/crípta:1,63±0,17). LP nas doses de 5 (1[0-2]) e 50 (1[0-3]) mg/kg foi capaz de diminuir aspectos microscópicos duodenais em animais com mucosite intestinal (4[1-4]). LP na dose de 5 mg/kg diminuiu a marcação imunohistoquímica para COX-2, TNF- α , IL-1 β , iNOS e NF- κB , bem como a expressão de iNOS no duodeno dos animais com mucosite. No entanto, LP, nas doses utilizadas, não alterou a leucopenia, peso ponderal e diminuição do n de neutrófilos induzido por CPT-11. Esses resultados sugerem atividade antiinflamatória e antidiarreica de LP por inibir mediadores inflamatórios importantes na mucosite intestinal induzida por CPT-11.

Palavras-chave: Calotropis, látex e irinotecano.

ABSTRACT

Protective Effect of *Calotropis procera* Latex Protein Fraction on Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis in Mice.

Intestinal mucositis (IM) is a side effect of irinotecan (CPT-11), which is used for the treatment of colorectal cancer. The incidence of IM associated with severe diarrhea is estimated to be approximately 25% in patients. However, the clinical management of these side effects is still partially ineffective. *Calotropis procera* is a plant found in Africa, Asia, and South America. In Brazil, it is abundant in the northeast and has been shown to have antiinflammatory effects in animal models. The objective of the present study was to evaluate the antiinflammatory effect of a protein fraction of the latex of *Calotropis procera* in IM induced by CPT-11. Swiss mice ($n = 8-12$; 23 ± 2 g) were treated with saline (Sal; 5 ml/kg, i.p.) or CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) for 4 days. In the other groups, the animals were given *Calotropis procera* (1, 5, and 50 mg/kg/day, i.v.) for 7 days, 30 min prior to CPT-11. On day 7, we evaluated diarrhea scores and the blood count of leukocytes and neutrophils ($\times 10^3/\text{ml}$). In another experiment, we evaluated survival and body weight until day 12. After sacrifice on day 7, we collected the duodenum to determine myeloperoxidase (MPO) activity (neutrophils/mg of tissue) and perform microscopic (hematoxylin & eosin staining) and morphometric (villus/crypt ratio) analyses. Tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β ; pg/ml; enzyme-linked immunosorbent assay), and *in vitro* contractions (i.e., percentage of contractions compared with 60 mM KCl) were also assessed. Immunohistochemistry was performed for cyclooxygenase 2 (COX-2), TNF- α , IL-1 β , inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nuclear factor- κ B (NF- κ B). The expression of iNOS was determined by Western blot. The statistical analyses were performed using analysis of variance followed by the Newman-Keuls or Kruskal Wallis/Dunn *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. *Calotropis procera* reduced diarrhea scores and MPO levels and improved survival at doses of 5 mg/kg (diarrhea: 1 [0-2]; MPO: 4.05 ± 1.07 ; survival: 75%) and 50 mg/kg (diarrhea: 1 [0-3]; MPO: 5.57 ± 1.50 ; survival: 75%) compared with CPT-11 (diarrhea: 3 [2-3]; MPO: 24.45 ± 3.0 ; survival: 47%). *Calotropis procera* reduced contractions (5 mg/kg: 165.1 ± 57.2) and the levels of the cytokines TNF- α (5 mg/kg: 3.31 ± 3.0 ; 50 mg/kg: 9.79 ± 5.6) and IL-1 β (5 mg/kg: 143.5 ± 41.5 ; 50 mg/kg: 182 ± 65.7) and increased the villus/crypt ratio (5 mg/kg: 2.79 ± 0.17) compared with the CPT-11 group (contractions: 906.1 ± 225.4 ; TNF- α : 28.0 ± 3.5 ; IL-1 β : 806.1 ± 247.6 ; villus/crypt ratio: 1.63 ± 0.17). *Calotropis procera* at doses of 5 and 50 mg/kg diminished the microscopic aspects of the duodenum (1 [0-2] and 1 [0-3], respectively) in animals with intestinal mucositis (4 [1-4]). *Calotropis procera* at a dose of 5 mg/kg reduced immunohistochemistry labeling for COX-2, TNF- α , IL-1 β , iNOS, and NF- κ B and the expression of iNOS in the duodenum in animals with mucositis. However, *Calotropis procera* at any of the doses tested did not alter leukopenia, body weight, or the reduction of the number of neutrophils induced by CPT-11. These results suggest that the antiinflammatory and antidiarrheal effects of *Calotropis procera* are produced by the inhibition of inflammatory mediators that are important in CPT-11-induced intestinal mucositis.

Keywords: *Calotropis*, látex and irinotecan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do cloridrato de irinotecano.....	19
Figura 2 –	Metabolismo do cloridrato de irinotecano.....	21
Figura 3 –	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br. A.	36
Figura 4 –	Esquema de fracionamento do látex de <i>Calotropis procera</i> .	45
Figura 5 –	Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite	49
Figura 6 –	Figura esquemática do grau de diarreia apresentada em animais tratados com irinotecano.....	51
Figura 7 –	Figura esquemática de avaliação in vitro em intestino.....	53
Figura 8 –	O tratamento com LP não altera o peso ponderal dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	59
Figura 9 –	O tratamento com LP aumenta a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	60
Figura 10 –	O tratamento com LP não altera o perfil de leucócitos totais (painel A) e neutrófilos (painel B) de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	61
Figura 11 –	O tratamento com LP previne alterações histopatológicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	64
Figura 12 –	O tratamento com LP previne alterações histopatológicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	65
Figura 13 –	O tratamento com LP previne as alterações sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Irinotecano.....	66
Figura 14 –	Efeito do LP sobre a contratilidade duodenal in vitro de animais com mucosite induzida por irinotecano.....	67
Figura 15 –	O tratamento com LP diminui a atividade de MPO dos	69

	animais com mucosite induzida por irinotecano.....	
Figura 16 –	Efeito do com LP nos níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no duodeno de animais com mucosite induzida por irinotecano.....	70
Figura 17 –	O tratamento com LP diminui a imunomarcção para TNF- α no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	73
Figura 18 –	O tratamento com látex de <i>Calotropis procera</i> diminui a imunomarcção para IL-1 β no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano..	74
Figura 19 –	O tratamento com LP diminui a imunomarcção para COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	75
Figura 20 –	O tratamento com látex de <i>Calotropis procera</i> diminui a imunomarcção para NF- κ B no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano..	76
Figura 21 –	O tratamento com LP diminui o número de células marcadas para NF- κ B no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano..	77
Figura 22 –	O tratamento LP diminui a imunomarcção para iNOS no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	78
Figura 23 –	Efeito do tratamento com LP na expressão de iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por irinotecano	79
Figura 24 –	Modelo hipotético proposto para a ação de LP na mucosite intestinal.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Critérios comuns de terminologia para eventos adversos – CTCAE (versão 4.03) – Mucosite.....	24
Tabela 2 –	Critérios comuns de terminologia para eventos adversos – CTCAE (versão 4.03) – Diarreia.....	25
Tabela 3 –	LP nas doses de 5 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.....	62
Tabela 4 –	LP nas doses de 5 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir aspectos microscópicos duodenais em animais com mucosite intestinal.....	66
Tabela 5 –	Efeito do látex de <i>Calotropis procera</i> no grau de expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β), enzimas (iNOS, COX-2) na mucosa duodenal de camundongos com mucosite intestinal.....	72

LISTA DE SÍMBOLOS

% =	Porcentagem
°C=	Grau Celsius
µg=	Micrograma
µL =	Microlitro
µm =	Micrômetro
min =	Minuto
mL =	Mililitro
mg =	Miligrama
ACh =	Acetilcolina
AChE =	Acetilcolinesterase
ANOVA =	Análise de Variância
BSA =	Albumina sérica bovina
cMOAT =	Transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos
COX-2 =	Ciclooxigenase-2
CPT-11 =	Cloridrato de Irinotecano
CYP3A4 =	Citocromo P450 3A4
Da =	Daltons
DNA =	Ácido desoxirribonucleico
E.P.M =	Erro Padrão da Média
e.v. =	Endovenosa
g =	Gramma
h =	Hora
HE =	Hematoxilina-Eosina
i.p. =	Intraperitoneal
IFN-α ou γ =	Interferon alfa ou gama
IL-1 Ra=	Antagonista do receptor de IL-1 (do inglês: Interleukin 1 receptor antagonist)
FDA =	Food and Drug Administration
G-CSF =	Fator estimulante da colônia de granulócitos
HTAB =	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-10 =	Interleucina-10
IL-11=	Interleucina-11
IL-15 =	Interleucina-15

IL-1 β =	Interleucina-1 tipo beta
IL-2 =	Interleucina -2
IL-4 =	Interleucina-4
IL-6 =	Interleucina-6
IL-8 =	Interleucina-8
MI =	Mucosite Intestinal
NO =	Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)
iNOS =	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (do inglês: inducible form of nitric oxide synthase)
NOS =	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: Nitric oxide sintase)
kg =	Kilograma
L =	litro
Ig E =	Imunoglobulina do tipo E
IgA =	Imunoglobulina do tipo A
LP =	Proteínas do látex (do inglês Latex proteins)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
m ² =	Metro quadrado
MPO =	Mieloperoxidase
MRP2 =	Proteína 2 associada à resistência multidroga
NCI =	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
NF κ B=	Fator de transcrição nuclear Kappa B (do inglês: Nuclear factor Kappa B)
nm =	Nanômetros
nmol=	Nanomols
p=	peso
PAF =	Fator de ativação de plaquetas (do inglês: platelet activator factor)
PBS =	Solução tamponada com fosfato
pg =	picogramas
PGs=	Prostaglandinas
P-gp =	Glicoproteína P
s =	Segundo
s.c. =	Subcutânea
SN-38 =	7- etil-10-hidroxicamptotecina
SNC =	Sistema nervoso central
TGF- β =	Fator transformador de crescimento-beta (do inglês:

	Transforming growth factor beta)
TNF- α =	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumoral necrosis factor-alpha)
U =	Unidades
UDP =	Enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase
v =	Volume
5-FU =	5-Fluorouracil

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Cloridrato de Irinotecano	18
1.2.	Mucosite Intestinal – Fisiopatologia e Fase do Desenvolvimento...	23
1.2.1.	Mucosite Intestinal – Mediadores Inflamatórios.....	28
1.2.2.	Mucosite Intestinal Experimental: A experiência do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer.....	32
1.3.	Látex e Latícíferos.....	33
1.3.1.	<i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br.	34
1.3.1.1.	Atividades Farmacológicas da Planta <i>Calotropis procera</i>	34
1.3.1.2.	Composição Química do Látex de <i>Calotropis procera</i>	36
1.3.1.3.	Atividades Farmacológicas do látex da Planta <i>Calotropis procera</i> .	37
1.4.	Justificativa.....	41
2.	OBJETIVOS	43
2.1.	Geral.....	43
2.2.	Específicos.....	43
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1.	Espécie Vegetal – Coleta e Fracionamento do Látex.....	44
3.2.	Animais experimentais.....	46
3.3.	Drogas e reagentes.....	46
3.4.	Equipamentos e Materiais.....	47
3.5.	Indução da Mucosite Intestinal.....	48
3.6.	Grupos experimentais e protocolos de tratamento.....	48
3.7.	Parâmetros Avaliados.....	49
3.7.1.	Curva Ponderal.....	49
3.7.2.	Análise de sobrevivência.....	49
3.7.3.	Avaliação do perfil hematológico: Leucócitos totais e neutrófilos..	50
3.7.4.	Avaliação da diarreia.....	55
3.7.5.	Análise histopatológica e morfométrica do intestino.....	51
3.7.6.	Avaliação sobre a contratilidade intestinal <i>in vitro</i>	52
3.7.7.	Avaliação do processo inflamatório.....	54
3.7.7.1.	Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	54
3.7.7.2.	Quantificação de citocinas TNF- α e IL-1 β no intestino.....	54

3.7.7.3.	Imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B.....	55
3.7.7.4.	Avaliação da expressão de iNOS por Western Blot.....	56
3.8.	Análise estatística.....	57
4.	RESULTADOS	58
4.1.	Tratamento dos animais com LP não modifica a curva ponderal de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	58
4.2.	LP aumenta a sobrevivência dos animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	59
4.3.	LP não modifica a leucopenia e neutrofilia da mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	60
4.4.	LP diminui a intensidade de diarreia nos animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	62
4.5.	LP reverte as alterações histopatológicas e morfológicas duodenais devido a mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	63
4.6.	LP diminui a contratilidade duodenal in vitro na mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	67
4.7.	LP modula a resposta inflamatória intestinal da mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	68
4.7.1.	LP reduz atividade da MPO intestinal.....	68
4.7.2.	LP reduz os níveis intestinais das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL- β	68
4.7.3.	LP promove a diminuição da expressão intestinal de TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B e iNOS : avaliação por imunohistoquímica.....	71
4.7.4.	LP diminui a expressão de iNOS intestinal : avaliação por Western Blot.....	78
5.	DISCUSSÃO	80
6.	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

A principal estratégia contra o câncer atualmente é o amplo conhecimento de suas relações causais, características biológicas e clínicas de forma a que se estabeleçam abordagens populacionais eficazes de prevenção e diagnóstico precoce, tendo em vista que o diagnóstico tardio é o principal fator prognóstico nessa patologia.

Neoplasias malignas avançadas determinam baixa probabilidade de sobrevida quando submetidos ao tratamento local isoladamente. Por essa razão, cada vez mais a terapia tem sido multidisciplinar, através principalmente de cirurgia, radio e/ou quimioterapia.

A terapêutica antineoplásica por quimioterapia, forma mais comum de terapia oncológica, é empregada fundamentalmente no tratamento de tumores não curáveis por cirurgia ou por radioterapia. Essa terapia também é utilizada naqueles casos em que se deseja reduzir a dimensão e a agressividade de cirurgias oncológicas através de um tratamento pré-operatório (quimioterapia neoadjuvante) ou após um tratamento principal, como por exemplo, a cirurgia, para diminuir a incidência de disseminação a distância de células neoplásicas (quimioterapia adjuvante).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto as células neoplásicas, quanto às células normais.

Tal abordagem terapêutica embora possa incrementar em alguns casos as taxas de sobrevida, acarretam impacto em termos de qualidade de vida, encargos econômicos e sociais, principalmente devidos a seus efeitos colaterais.

No momento em que populações celulares normais são comprometidas, estas substâncias podem provocar efeitos tóxicos graves (CALABRESI; CHABNER, 2003), sendo um dos órgãos mais afetados o trato gastrointestinal (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Dentre os efeitos colaterais relacionados ao uso de antineoplásicos, destacam-se náusea, vômitos, diarreia, mielossupressão, alopecia, cardiotoxicidade, cistite hemorrágica, mucosite, dentre outros. No entanto, pouco

tem sido descoberto para prevenir e controlar esses sintomas (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; CHU, 2005).

Em relação à mucosite intestinal, vários autores, demonstram o aparecimento dessa patologia após o uso de metotrexato (CARNEIRO-FILHO et al., 2004a; GIBSON et al., 2002; LEITÃO et al., 2011; SOARES et al., 2011a;), 5-fluorouracil (5-FU) (SOARES et al., 2012; SOARES et al., 2011b; SOARES et al., 2008; SONIS et al., 2004), ciclofosfamida (XIANG et al., 2011; WOO et al., 2000); gencitabina (APOSTOLIDOU et al., 2003), capecitabina (BOEHMER; JAEGER 2002; PISANO et al., 2009) e cloridrato de irinotecano (CPT-11) (ALIMONTI et al., 2004; GIBSON et al., 2003; LIMA-JÚNIOR et al., 2012; LOGAN et al., 2008; MELO et al., 2008).

1.1. Cloridrato de Irinotecano (CPT-11)

O CPT-11 é um derivado semi-sintético da camptotecina. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall et al., em 1966, de uma planta nativa na China e no Tibet, *Camptotheca acuminata*. Apesar dos estudos desta época terem evidenciado seu potencial antineoplásico, sua comercialização só teve início na década de 1990, mais precisamente em 1996 quando foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e quando foi sintetizada uma molécula com menor toxicidade, o CPT-11 (ALIMONTI et al., 2004; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

O nome químico do irinotecano é cloridrato triidrato (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-dipiperidino) carboniloxila]-1H pirano [3',4',6,7] indolizino [1,2-b] quinolina- 3,14(4H,12H)diona; sua fórmula molecular é C₃₃H₃₈N₄O₆ •HCl•3H₂O, um composto moderadamente solúvel em água e solventes orgânicos (**Figura 1**).

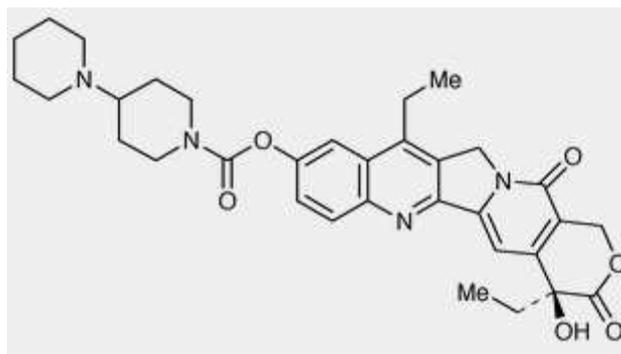


Figura 1 – Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11) (DODDS et al., 1998).

Farmacocinética

O CPT-11 é uma pró-droga convertida ao seu metabólito ativo, SN-38 (7- etil-10-hidroxicamptotecina), pela enzima carboxilesterase (CE), particularmente hCE2. O SN-38 é 100 a 1.000 vezes mais ativo que o CPT-11 (RIVORY et al., 1996; XIE et al., 2002; CHESTER et al., 2003). A CE encontra-se presente abundantemente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Esta enzima libera a cadeia lateral da dipiperidina presente na posição C-10 da molécula de irinotecano (ALIMONTI et al., 2004).

Após a administração intravenosa em seres humanos, o CPT-11, sob a forma de lactona, tem meia-vida de aproximadamente 6,8 horas (5 a 9,6 horas), enquanto que a meia-vida do SN-38 é de aproximadamente 11,05 horas (9,1 a 13 horas). A depuração sistêmica é de aproximadamente 46,9 L/h/m² (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001). E, o volume de distribuição para as doses de 125 mg/m² e 340 mg/m² é de 110±48,5 L/m² e 234±69,6 L/m², respectivamente (ALIMONTI et al., 2004).

O metabolismo do irinotecano é principalmente hepático por uma enzima do sistema P450, particularmente CYP3A4, que gera componentes inativos como APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) (CHESTER et al., 2003; MATHIJSEN et al., 2004). Pequena parte de APC pode ser metabolizada pela CE em SN-38 (RIVORY et al., 1996; MATHIJSEN et al., 2004); já o NPC é metabolizado completamente em

SN-38 por esta enzima, contribuindo na atividade e toxicidade do CPT-11 *in vivo* (RIVORY et al., 1996; DODDS et al., 1998; MATHIJSSSEN et al., 2004).

Após o CPT-11 ser convertido em SN-38 nos tecidos, a detoxificação ocorre pela sua conjugação com a enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT) – UGT1A1, com a formação de SN-38 glicuronídeo (SN-38G), composto inativo (HAAZ et al., 1997; CHESTER et al., 2003; MATHIJSSSEN et al., 2004). Gupta et al. (1997) observaram que a atividade da enzima UDP-GT pode ser modulada pelo ácido valpróico e fenobarbital. O primeiro provoca aumento da biodisponibilidade do SN-38, porque inibe glicuronidação, enquanto a administração do fenobarbital aumenta a reação de conjugação do SN-38, pois induz UDP-GT, podendo ser benéfico seu uso em pacientes com comprometimento da função hepática.

CPT-11 e SN-38 são transportados ligados às seguintes proteínas: glicoproteína P (P-gp), transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos (cMOAT) e proteína 2 associada à resistência multidroga (MRP2) (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; TAKASUNA et al., 2006).

A eliminação do CPT-11 é preferencialmente pelas fezes (60-70%), sendo também excretada pela bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI et al., 2004). CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile através das proteínas de transporte MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) e MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) e chegam ao intestino delgado. No intestino, uma parte é excretada pelas fezes; outra parte pode ser re-transformada em SN-38 por bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidase (como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) (TAKASUNA et al., 1996; XIE et al., 2002). Isso foi demonstrado por Stringer et al. (2009) ao qual evidenciou que a diarreia induzida por CPT-11 poderia ser causada por um aumento de bactérias produtoras de β -glicuronidase, especialmente *E. coli* exarcebando a toxicidade dos metabólitos ativos. O uso de antibióticos como penicilina associado à estreptomicina (TAKASUNA et al., 1998; TAKASUNA et al., 2006), neomicina associado à bacitracina (TAKASUNA et al., 2006) e cefalosporina (CHOWBAY et al., 2003) reduz o acúmulo de SN-38 no intestino (**Figura 2**).

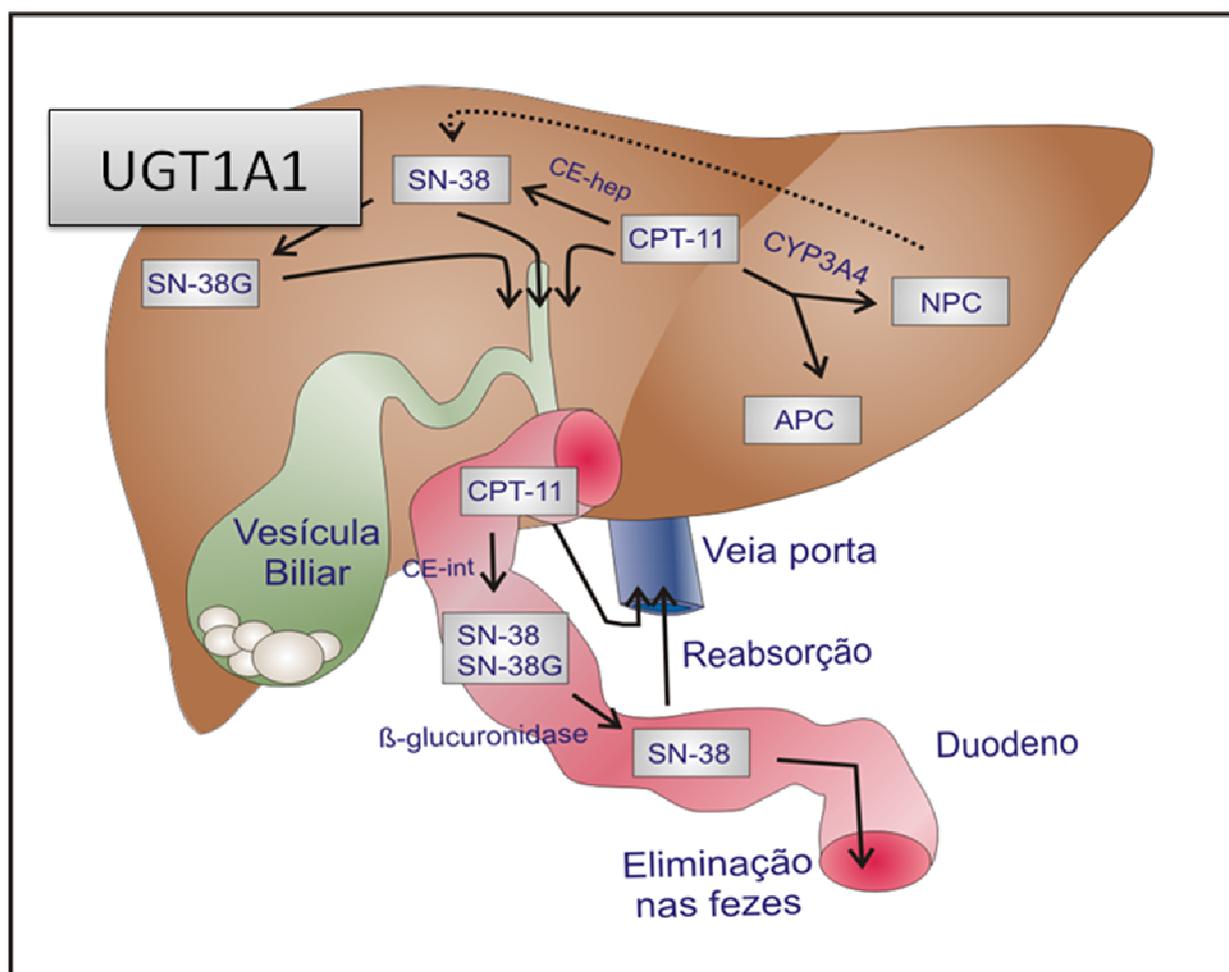


Figura 2 – Metabolito do cloridrato de irinotecano (CPT-11) (Ribeiro, R.A.).

Mecanismo de ação

O CPT-11 e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação e transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA). As topoisomerases mantêm a conformação tridimensional do DNA através da remoção dos espirais durante a replicação e transcrição, aliviando a tensão da torção produzida pelo enrolamento da molécula. A citotoxicidade deve-se ao dano no DNA durante fase S do ciclo celular, quando as enzimas de replicação do DNA colidem com um complexo ternário da droga, com o DNA e com a topoisomerase I. Este dano induzido pela droga não é corrigido de forma eficaz, provocando apoptose (ALIMONTI et al., 2004; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

Os estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células tumorais humanas e de roedores indicam, de forma consistente, que o SN-38 é, pelo menos, 1000 vezes mais potente como um inibidor de topoisomerase I do que o irinotecano (TAKIMOTO, ARBUCK, apud KOIZUMI et al., 2006), sendo este último, por consequência, comumente descrito como sendo uma pró-droga.

Efeitos colaterais

Os efeitos tóxicos mais severos e que limitam o seu uso são a mielossupressão (principalmente neutropenia) e a diarreia tardia (ALIMONTI et al., 2004; CHESTER et al., 2003; SALIBA et al., 1998; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

A neutropenia, apesar de alta incidência, 23% (ENZINGER et al., 2005) a 43% dos pacientes (ROSATI et al., 2002), pode ser facilmente tratada com a administração de G-CSF (fator estimulante da colônia de granulócitos) (ALIMONTI et al., 2004).

Dois tipos de diarreia são associados com o uso do CPT-11: diarreia aguda ou precoce e diarreia crônica ou tardia (RUBEINSTEIN et al., 2004). O primeiro tipo, de curso geralmente leve, ocorre durante ou logo após administração da droga pelo aumento da atividade colinérgica, pois o CPT-11 inibe acetilcolinesterase (AChE) (DODDS et al., 1999; DODDS; RIVORY, 1999; DODDS et al., 2001; GANDIA et al., 1993). O segundo, de início tardio, possui alta incidência, em torno de 82% (SALIBA et al., 1998), e, quando grave, pode limitar a eficácia do tratamento, já que muitas vezes é necessário reduzir sua dose ou até mesmo suspender a administração da droga (ALIMONTI et al., 2004; DUNCAN; GRANT, 2003; IKEGAMI et al., 2002).

O irinotecano é um fármaco antineoplásico ativo contra uma variedade de tumores, sendo utilizado principalmente no tratamento do câncer coloretal (CHESTER et al., 2003; LANGER, 2004; PEREZ et al., 2004; ROCHA-LIMA et al., 2004).

1.2. MUCOSITE INTESTINAL – Fisiopatologia e Fases do Desenvolvimento

O intestino exerce funções importantes para a saúde do organismo, tais como: digestão e absorção de macro e micronutrientes, produção de importantes hormônios reguladores. Ele pode funcionar ainda como órgão imune e agir como barreira contra agentes nocivos. O intestino é formado por três camadas básicas, a camada epitelial, a lâmina própria e a muscular da mucosa. O uso de antineoplásicos pode levar a defeitos na divisão celular e na renovação epitelial, o que ocasiona perda rápida da estrutura e função do intestino (DUNCAN; GRANT, 2003).

Por serem os agentes citotóxicos mais efetivos em tecidos com alta taxa proliferativa, o epitélio do trato gastrintestinal, pelo seu elevado *turnover* celular, torna-se particularmente susceptível aos efeitos danosos dos antineoplásicos (PARRILLI et al., 1989; PLEDGER et al., 1988). Esses danos parecem envolver principalmente as células das criptas intestinais (FOX et al., 1988; SKUBITZ, 1994; SHOU et al., 1991).

Dessa forma, mucosite alimentar ou gastrintestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). Esta síndrome, a depender da gravidade, caracteriza-se por ulceração da mucosa do trato digestivo, podendo resultar em dor, disfagia, diarreia e disfunção, de acordo com o tecido afetado (SONIS; FAY, 2002; SONIS et al., 2004; SCULLY; SONIS, 2006).

De forma geral, cerca de 15 a 40% dos pacientes em quimioterapia apresentam algum grau de mucosite (SCULLY et al., 2003; 2004). A combinação de diferentes drogas antineoplásicas aumenta essa incidência de 40-70% (ROTH et al., 1991; SCULLY; SONIS, 2006). Esta incidência pode chegar próxima a 100% naqueles pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (RUBENSTEIN et al., 2004).

A **tabela 1** descreve os critérios de graduação da mucosite formulados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*NCI –National Cancer Institute*), usados universalmente em estudos clínicos e também na prática clínica assistencial.

A ocorrência de mucosite e seu grau de intensidade (**Tabela 1**) podem retardar ou impedir a continuação do tratamento antineoplásico. Pacientes que apresentaram mucosite tendem a receber doses reduzidas de quimioterapia nos ciclos subsequentes ao episódio de mucosite (RUBENSTEIN et al., 2004). Além disso, em pacientes neutropênicos, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (PICO et al., 1998). Portanto, a mucosite intestinal induzida por antineoplásicos é um efeito colateral de grande relevância tendo em vista os custos envolvidos no tratamento, geralmente paliativo, dessa condição.

Cerca de 5-15% dos pacientes podem ser acometidos de mucosite mais grave (graus 3 e 4). Destes, 35% sofrerão um atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30%, a descontinuação do regime de tratamento. Em geral, 60% apresentam febre e requerem hospitalização (KEEFE et al., 2007).

TABELA 1– Critérios comuns de terminologia para eventos adversos – CTCAE (versão 4.03) – Mucosite

	GRAU				
	1	2	3	4	5
MUCOSITE INTESTINAL	Assintomática ou Sintomas leves; Intervenção não indicada	Sintomática; Intervenção médica indicada; Limita atividades da vida diária	Dor severa; interfere com ingestão oral; Tubo alimentar, Nutrição Parenteral Total ou indicação de hospitalização; Autos cuidados limitados (Atividades da vida diária).	Consequente risco de vida; indicado intervenção urgente	Óbito

Fonte: National Cancer Institute

Um dos problemas em se entender a mucosite e a diarreia a ela associada recai no fato de que os mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa doença não são conhecidos com precisão. Realizar uma terapia efetiva dessa condição continua sendo um desafio na prática clínica. A diarreia é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando diarreia de graus 3-4 (**Tabela 2**) pode ser observada em até 25% dos pacientes (CUNNINGHAM et al., 1998; KEEFE et al., 2007).

Clinicamente, a diarreia é o sintoma mais marcante, podendo ser aquosa e em pequeno volume uma ou duas vezes ao dia ou, nos casos mais severos, em número superior a dez episódios por dia. Nos quadros mais dramáticos, pode haver necessidade de nutrição parenteral ou até de intervenções cirúrgicas em casos de perfuração intestinal ou hemorragia maciça (GIBSON et al., 2002; BLIJLEVENS et al., 2007).

TABELA 2– Critérios comuns de terminologia para eventos adversos – CTCAE (versão 4.03) – Diarreia

	GRAU				
	1	2	3	4	5
DIARRREIA	Aumento da frequência das evacuações, menor que 4 vezes por dia em relação ao basal; Leve aumento na saída de ostomia comparado ao basal.	Aumento da frequência das evacuações de 4 a 6 vezes por dia; Médio aumento na saída de ostomia comparado ao basal.	Aumento da frequência das evacuações \geq 7 vezes por dia; Severo aumento na saída de ostomia comparado ao basal; Limitações de auto cuidado (Atividades da vida diária).	Consequente risco de vida; indicado intervenção urgente	Óbito

Fonte: National Cancer Institute

A importância clínica se torna evidente se considerarmos que a diarreia pode, muitas vezes, requerer alterações no esquema de tratamento antineoplásico adotado ou, até mesmo, comprometer a viabilização do tratamento. A diarreia é geralmente controlada com loperamida, porém nos casos mais graves do evento adverso (graus 3 e 4) o tratamento se mostra ineficaz. Outras estratégias têm sido sugeridas, tal como octreotida, acetorfan, antibióticos, glutamina, budesonida, IL-15, talidomida, inibidores da enzima cicloxigenase-2, ciclosporina e alcalinização do lúmen intestinal (GIBSON; KEEFE, 2006), peptídeo semelhante ao glucagon exógeno (GLP-2) (KISSOW et al., 2012), *Saccharomyces boulardii* (SEZER et al., 2009), antagonista do receptor de IL-1 (XIANG et al., 2011).

A mucosite por antineoplásicos é um processo complexo, no qual ocorre a seguinte sequência de eventos biológicos interligados: iniciação, resposta primária ao dano, sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (SONIS et al., 2004; SCULLY et al., 2004). A manifestação de todos os estágios não ocorre obrigatoriamente em todos os casos. Portanto, em uma mucosite branda com poucos danos à mucosa, a rápida recuperação e proliferação epitelial evita a ocorrência da fase ulcerativa, que é a mais sintomática (SONIS, 1998; SONIS; FAY, 2002).

A fase de iniciação ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais basais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS et al., 2004). A resposta primária ao dano, observada nas células e tecidos da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- κ B (NF- κ B) (SCULLY et al., 2006). Em paralelo à ativação do NF- κ B, enzimas como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalizam a síntese de ceramida, são ativadas diretamente pela quimio e/ou radioterapia, ou indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio e TNF- α . A via da ceramida induz apoptose tanto em células submucosas, como epiteliais (MADDENS et al., 2002). Adicionalmente, a destruição da fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e subsequente injúria tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- α . A participação do TNF- α na patogênese da mucosite oral foi evidenciada por de Lima et al.

(2005) o qual mostrou que a pentoxifilina e talidomida, ambas inibidores da síntese de TNF- α , reduzem significativamente a lesão gastrointestinal induzida por 5-FU em hamster.

Assim, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimio ou radioterapia, resulta em uma série de retroalimentações positivas, amplificando e prolongando a injúria tecidual, através de seus efeitos nos fatores de transcrição e nas vias da ceramida e caspases, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

A fase seguinte, denominada ulcerativa é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. A lesão e morte das células basais epiteliais resultam em mudanças atróficas que culminam na real deterioração e quebra da mucosa. Nessa fase é comum a ocorrência de infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos. Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa estimulando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas que, associado à neutropenia induzida pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING et al. 1992, SONIS et al., 2004).

A fase de cicatrização é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observam-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS et al., 2004). Foi demonstrado que a glutamina e seu derivado estável alanil-glutamina aceleram a recuperação da mucosa oral (LEITÃO et al., 2008) e mucosa intestinal (CARNEIRO-FILHO et al., 2004b) lesadas pelo uso de 5-Fluorouracil. Braga-Neto et al. (2008) demonstraram que a suplementação com alanil-glutamina e glutamina melhora os danos induzido no epitélio intestinal na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil in vitro.

1.2.1. Mucosite Intestinal – Mediadores inflamatórios

O processo inflamatório tem um grande impacto sobre as células epiteliais intestinais e sobre células especializadas do intestino, tais como: as células enteroendócrinas e as células produtoras de muco. A inflamação intestinal pode apresentar importantes alterações na estrutura da mucosa, como a infiltração de polimorfonuclear com conseqüente prejuízo na função de barreira desempenhada pela mucosa intestinal, podendo haver aumento de permeabilidade e uma dificuldade na absorção (HAWKER et al., 1980; KOYAMA et al., 1991; NUSRAT et al., 1997; WEILAND et al., 1986). Essas alterações de barreira são provenientes da ação dos polimorfonucleares sobre as *tigh junctions* ou zona de oclusão (MILKS et al., 1983; NASH et al., 1987; PARSONS et al., 1987).

Dentre as células polimorfonucleares podemos destacar a importância do infiltrado neutrofílico e a migração neutrofílica transepitelial em doenças inflamatórias intestinais.

As citocinas compreendem um amplo grupo de glicoproteínas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de modular a atividade celular em condições fisiológicas e patológicas. Podem ser sintetizadas por todas as células nucleadas do corpo, mas são liberadas principalmente por macrófagos e linfócitos. A maioria delas age localmente, de forma autócrina, ou seja, atuam sobre os receptores das próprias células que as produzem; e de forma parácrina, atuam em células-alvo vizinhas ou distantes (NICOLA, 1994; SARTOR, 1994).

Em geral, as citocinas são pleiotrópicas, isto é, têm múltiplos efeitos, uma única citocina pode interagir com mais de um tipo de célula, ter muitas atividades biológicas, interagir com outras citocinas com atividades sinérgicas ou antagônicas. Estas ações incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação da resposta inflamatória. A produção constitutiva das citocinas é normalmente baixa ou ausente, a sua síntese é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição (NICOLA, 1994).

A exposição do intestino a determinadas citocinas reproduz a inflamação intestinal, induzindo a migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos da lâmina própria para a superfície do epitélio. Estas células representam uma importante defesa contra microrganismos luminiais e facilitam o processo de reparo por aumento no processo de restituição (DE KONING et al., 2006;

MAHIDA et al.,1997; SARTOR, 1994; WILSON; GIBSON, 1997; WILLIAMS, 2001).

Segundo Williams (2001), citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , interferon-gama (IFN- γ) e IL-2; e antiinflamatórias, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), TGF- β , IL-4, IL-10, IL-11 estão envolvidas na lesão e reparo da mucosa. Wilson; Gibson (1997) destacou no processo inflamatório intestinal a importância da IL-8, IL-2, IFN- γ e IL-1 β . No entanto, segundo o mesmo autor, IL-4 e IL-10 podem perpetuar a injúria epitelial por inibir a migração celular.

O TNF é expresso em duas formas: TNF- α e TNF- β . TNF- α é produzido por macrófagos, células natural *Killer* e mastócitos, enquanto TNF- β é primariamente um produto de linfócitos T ativados. São atividades bem definidas destas citocinas, a habilidade de ativar neutrófilos, estimular a produção de IL-1, inibir a atividade da lipoproteína lípase, induzir a caquexia e choque séptico (FONG; LOWRY, 1990; PALLADINO Jr.; FINKLE, 1986). O TNF- α tem sido apontado como um dos mediadores inflamatórios implicados nas alterações da fisiologia intestinal por induzir expansão na população de células residentes da lâmina própria e epitélio intestinal, com conseqüente liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8; e também de derivados lipídicos, enzimas, oxidantes, capazes de provocar secreção e lesão na mucosa intestinal (McKAY; PERDUE, 1993; SARTOR, 1994).

Existem duas formas de IL-1, a IL-1 α e IL-1 β , que possuem atividades biológicas semelhantes e se ligam com a mesma afinidade aos receptores de membrana. Existe um terceiro membro na família de genes IL-1, o IL-1ra, que inibe as ações inflamatórias de IL-1, porque compete biologicamente pela ligação com receptores de IL-1 (AREND, 1991). IL-1 possui influência marcante no desenvolvimento de lesões e na secreção intestinal por estimular a síntese de PGs (THEODOROU et al., 1994) e IL-8 (SARTOR, 1994). *In vitro*, demonstrou-se que o efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados pela toxina A foi dependente da atividade de IL-1 β (ROCHA et al., 1998). Xiang et al. (2011) demonstrou, em modelo murino de mucosite induzida por 5-Fluorouracil, que o antagonista do receptor de IL-1 é capaz de atenuar a mucosite.

O NF- κ B foi descoberto em 1986 e representa um fator nuclear (NF) que quando ativado por vários agentes inflamatórios, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que

codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (kB) (SEN; BALTIMORE, 1986). O termo NF- κ B autêntico designa a combinação p50/p65 (RelA). Outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52 são sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente (HUXFORD et al., 1998).

Normalmente o NF- κ B encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, ligado à proteína inibitória, I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação (DELHASE; KARIN, 1999). Uma particularidade importante da mucosite é o fato do NF- κ B regular elementos chaves que levam a toxicidade do tecido normal, mais especificamente por promover apoptose. Na verdade, existe um paradoxo entre o efeito pró-apoptótico do NF- κ B em células normais e o potencial anti-apoptótico e citoprotetor que o NF- κ B promove nas células tumorais (SONIS, 2002).

Yeoh et al. (2005) referem seu aumento de expressão acompanhando as alterações no tecido colorretal após tratamento radioterápico em seres humanos. A radiação ativa e aumenta a expressão de NF- κ B, que ativa as proteínas como a ciclooxigenase-2 (COX-2). Bowen et al. (2007) identificaram que a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) também sinaliza a destruição intestinal induzida por CPT-11 e que o aumento de expressão das caspases 1 e 3 é responsável pelo processo de apoptose.

A COX-2, enzima importante na conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas (PGs) e tromboxanos, com expressão predominantemente no processo inflamatório, é induzida na presença de citocinas (IL-1, IL-2, TNF- α), fatores de crescimento e endotoxinas (VANE et al., 1998; HINZ; BRUNE, 2002). As citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 e os corticosteróides reduzem a indução de COX-2 (VANE et al., 1998; HINZ; BRUNE, 2002). Sabe-se que COX-2 também é expressa em pequenas quantidades constitutivamente (VANE et al., 1998).

Prostaglandinas desempenham um papel relevante na fisiopatologia das diarreias inflamatórias. Os eicosanóides são ativados durante a inflamação intestinal pela COX-2 (TAN et al., 2000; STURM; DIGNASS, 2002). Trabalhos *in*

vitro relatam o papel deste mediador no estímulo à secreção de cloro e água no intestino (SAKAI et al., 1995 e 1997; SUZUKI et al., 2000). Por outro lado, as PGs também são importantes nos mecanismos de reparo intestinal (TAN et al., 2000), pois, existem evidências que a atividade de COX-2 é um fator importante nos mecanismos de proliferação intestinal e, portanto, possuem um papel na recuperação do epitélio intestinal (TAN et al., 2000; WALLACE; DEVCHAND, 2005; SHAO et al., 2006).

Óxido nítrico é um radical livre, altamente reativo, que apresenta importantes funções nos sistemas cardiovascular, neurológico e imune. É sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular pelas enzimas óxido nítrico sintases, liberando L-citrulina como co-produto (MONCADA et al., 1991). Três isoformas de NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal, inicialmente encontrada no cérebro (BREDT; SNYDER, 1994; SESSA et al., 1992), uma endotelial, isolada em endotélio (LAMAS et al., 1992) e uma isoforma induzida (iNOS), isolada inicialmente em macrófagos (XIE et al., 1992).

A NOS_i, por sua vez, é regulada à nível transcripcional, em resposta à estímulos pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo, ao passo que glicocorticóides, citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação de crescimento (TGF- β) suprimem a produção de NO (MONCADA et al., 1991; BOGDAN et al., 1994). A ativação da NOS_i, independe da concentração do cálcio intra-celular e resulta na liberação de grandes quantidades de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos (NATHAN; XIE, 1994). O NO produzido em altas concentrações atua como uma molécula citotóxica contra fungos, bactérias, protozoários e células tumorais (MONCADA, 1991; WONG; BILLIAR, 1995). Por outro lado, essa liberação de NO têm outras consequências biológicas, incluindo vasodilatação, danos teciduais aos tecidos do hospedeiro, dor, lesão tecidual e apoptose (MONCADA et al., 1991; SZABÓ, 1996).

Tem-se relacionado que as citocinas estimulam a expressão de iNOS com a conseqüente produção de óxido nítrico. Um efeito bifásico e dosedependente da iNOS na inflamação tem sido relatado (CALABRESE, 2001). Dependendo da condição, o papel da iNOS varia do aumento do padrão inflamatório à inibição deste (NATHAN, 1997). Em baixas concentrações, o NO exerce um efeito protetor contra lesões de mucosa, em parte devido a um efeito

vasodilatador que resulta em aumento do fluxo sanguíneo mesentérico (KUBES, MACCAFFERTY, 2000; COCKCROFT, 2005). Contudo, em altas concentrações, quando derivado da iNOS, verifica-se um grande papel do NO na citotoxicidade (HAN et al., 2003), levando ao aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (UNNO et al., 1997).

Muitos estudos relatam que o NO, oriundo da atividade de iNOS, exibe propriedades deletérias, participando na fisiopatologia de doenças como, por exemplo, a cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO et al., 1997; RIBEIRO et al., 2002), mucosite oral (LEITÃO et al., 2007), mucosite intestinal (LEITÃO et al., 2011, LIMA-JÚNIOR et al., 2012).

1.2.2. Mucosite Intestinal Experimental: A Experiência do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer

Há mais de 10 anos o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer (LAFICA), sob coordenação do prof. Dr. Ronaldo Ribeiro, vem se dedicando ao estudo da toxicidade da quimioterapia do câncer, em especial a mucosite intestinal induzida por quimioterápicos do qual resultou diversas dissertações/teses e conseqüentemente artigos científicos. Recentemente, o projeto intitulado Núcleo de Estudos da Toxicidade do Tratamento Oncológico (NETTO), coordenado pelo prof. Dr. Ronaldo Ribeiro, foi aprovado pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX/FUNCAP/CNPq.

No tocante a mucosite intestinal foi primeiramente demonstrado por Carneiro-Filho et al. (2004a) que o antineoplásico metrotexato foi capaz de causar grandes mudanças na função do intestino delgado por perturbar a permeabilidade intestinal e a indução da secreção de eletrólito em paralelo com danos histológicos significativos e que este antineoplásico retarda o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal de líquidos em ratos acordados (SOARES et al., 2011a).

Foi demonstrado também que a glutamina, e especialmente a alanil glutamina, têm efeitos expressivos na proteção da mucosa intestinal contra a agressão por 5-Fluorouracil (CARNEIRO-FILHO et al., 2004b) e que este quimioterápico é capaz de induzir dismotilidade gastrintestinal através do estudo

das variações funcionais decorrentes do tratamento quimioterápico (SOARES et al., 2008) e que o fator de ativação de plaquetas (PAF) está envolvido na mucosite induzida por este agente (SOARES et al., 2011b). Recentemente, evidenciou-se que a citocina IL-4 participa como uma citocina pró-inflamatória na mucosite induzida por 5-fluorouracil, sugerindo que o antagonista de IL-4 pode ser um novo alvo terapêutico para esta condição (SOARES et al., 2012).

Quanto à mucosite intestinal induzida por irinotecano, Freitas (2007) demonstrou que a IL-18 está envolvida na patogênese da MGI induzida por CPT-11 e que o ligante de IL-18 atenua os eventos envolvidos na MI induzida por CPT-11. Logo após, Melo et al. (2008) demonstraram que a talidomida e a pentoxifilina reduziram significativamente a gravidade da lesão intestinal. Entretanto, a pentoxifilina foi mais efetiva quanto à proteção reduzindo a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 e a talidomida inibindo especificamente a produção de TNF- α .

Outro mediador inflamatório importante estudado foi o óxido nítrico. Lima-Júnior et al. (2012) demonstraram o papel do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por irinotecano e também forneceu evidência na participação de citocinas na indução de iNOS uma vez que infliximabe (anticorpo anti-TNF- α) e pentoxifilina significativamente inibiram a expressão de iNOS induzida por irinotecano.

Portanto, diversos tem sido os trabalhos abordados pelo referido grupo de pesquisa no que concerne a mucosite intestinal experimental.

1.3. Látex e laticíferos

O látex é uma secreção vegetal que se apresenta geralmente como um líquido de aspecto leitoso, de caráter viscoso ou não (ENDRESS; BRUYNS 2000; PICKARD, 2008). Este látex não apresenta nenhuma função metabólica conhecida para o vegetal, mas tem como principal atividade proteger a planta contra herbívoros, microorganismos ou dano mecânico selando o tecido danificado (AGRAWAL; KONNO, 2009).

A produção de látex ocorre em mais de 12.500 espécies de plantas distribuídas entre mais de 900 gêneros, compreendendo aproximadamente 22 famílias (HAGEL et al., 2008). A maioria das plantas produtoras de látex pertence

às famílias Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora plantas pertencentes a outras famílias também produzam esta substância (DELTA, 1982).

Dentre a diversidade de plantas laticíferas, a mais conhecida é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia. A borracha produzida por esta planta é amplamente utilizada pela indústria para produção de vários utensílios tais como luvas, brinquedos, bicos de mamadeira, chupeta, balões de festa, preservativos, entre outros (SUSSMAN et al., 2002). Como o látex de *H. brasiliensis* é intensamente explorado por apresentar valor comercial, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com fluidos laticíferos se refere ao látex desta planta. A maioria destas pesquisas restringiu-se a estudar proteínas envolvidas em processos indutores de alergia em pessoas submetidas a contínuo contato com utensílios produzidos com seu látex (KIMATA, 2005; POSCH et al., 1997; SUSSMAN et al., 2002).

1.3.1. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Calotropis procera (Ait.) R. Br. é uma espécie vegetal pertencente à família Apocynaceae. É popularmente conhecida por diferentes nomes dependendo do estado em que é encontrada: algodão de seda ou seda (PE), paninha de seda (SP), leiteiro (SP, MG), Flor-de-seda, Ciúme ou Hortência (CE). Esta espécie é nativa da Índia e África Tropical, mas pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais da América, incluindo o Brasil. Apresenta-se como um arbusto perene ou subarbórea ereta com pouca ramificação e que pode alcançar até 3,5m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são globosos, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescência fasciculadas terminais (**Figura 3**) (KISSMANN; GROTH, 1999; LORENZI; MATOS, 2002).

1.3.1.1. Atividades farmacológicas da planta *Calotropis procera*

Essa espécie tem sido usada na medicina popular para o tratamento de lepra, úlceras, tumores, hemorróidas, doenças hepáticas, do baço e abdômen (KIRTIKAR; BASSU, 1935).

Experimentalmente várias atividades biológicas têm sido descritas para diferentes partes da planta e estes incluem atividades proteolíticas, antimicrobianas, anti-helmínticas e larvicida (ATAL; SETHI, 1961; KUMAR; ARYA, 2006; MALIK; CHUGATI, 1979; RAMOS et al., 2006a; SHIVAKAR; KUMAR, 2003;).

As folhas frescas ou aquecidas têm sido usadas para dores reumáticas nas articulações, inchaços, inflamações e feridas (WEALTH OF INDIA, 1992). Atividade antioxidante e citotóxica foi descrita em flavonóides isolados da folha de *Calotropis procera* (MOHAMED et al., 2011), bem como atividade sobre a tolerância a glicose em ratos e camundongos hiperglicêmicos (MOHAMMED et al., 2010).

Enquanto que o extrato da casca do caule demonstrou, através de um estudo piloto, possuir atividade cicatrizante por inibir a infecção bacteriana (PERUMAL; CHOW, 2012).

Atividade antiangiogênica e antitumoral foram demonstradas para diferentes extratos da raiz de *Calotropis procera* (MATHUR et al., 2011; MATHUR et al., 2009).

As partes aéreas da planta possuem látex em abundância que tem sido relatado propriedades medicinais como antidiarréico, antidiabéticos, anti-câncer, antiartrítica, antioxidante e antiulcerosa (BHARTI et al., 2010; CHOEDON et al., 2006; KUMAR et al., 2001; KUMAR; ROY, 2007 e 2009; KUMAR; PADHY, 2011 ROY et al., 2005).



Figura 3 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. A: Inflorescência; **B:** Fruto globoso; **C:** Sementes ligadas a fios de seda; **D:** Planta jovem de *C. procera* (EIN GEDI, 2009).

1.3.1.2. Composição química do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Em análises químicas dos extratos brutos do látex de *C. procera*, diversas moléculas têm sido identificadas, tais como cardenólídeos ativos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER et al., 1982), além de esteróides, terpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA et al., 2002). Além disso, proteinases do tipo cisteínica, quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo vegetal foram detectadas (FREITAS et al., 2007). Duas proteases cisteínicas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SINGH et al., 2010), uma osmotina (FREITAS et al., 2011) foram identificadas no látex de *C. procera*. Ramos et al. (2010) detectaram a presença de proteína com atividade de inibidor de papaína.

1.3.1.3. Atividades farmacológicas do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Calotropis procera é uma planta bem conhecida e bastante utilizada na medicina popular, principalmente na Índia, por apresentar diversas propriedades curativas (WARRIER et al., 1994). Dentre a diversidade das atividades farmacológicas relevantes desta planta, grande parte desta está relacionada ao seu látex. No Ceará, o látex desta planta é utilizado pela população de baixa renda sendo aplicado sobre doenças bacterianas e fúngicas de pele.

Estudos mostram que o produto da extração do látex íntegro de *C. procera* com solvente orgânico possui atividade antibacteriana (LARHSINI et al., 1997; SHUKLA; MURTI, 1961), molusquicida (HUSSEIN et al., 1994) e esquistossomicida (SHARMA; SHARMA, 2000). Ensaio preliminares revelaram que o extrato orgânico apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL et al., 2005).

A aplicação tópica diária do látex íntegro extraído com água reduziu a área de feridas induzidas no dorso de animais, sugerindo que o látex de *Calotropis procera* apresenta ação cicatrizante (RASIK et al., 1999). A mesma preparação, quando administrada por via oral, apresentou efeito antipirético (LARHSINI et al., 2002) e foi capaz de reduzir a diarreia em ratos induzida pela ingestão de óleo de mamona (KUMAR et al., 2001). Esse látex íntegro, por via oral, inibiu a inflamação induzida por carragenina (KUMAR; BASU, 1994) e reduziu as contorções abdominais induzida por ácido acético (DEWAN et al., 2000). Além disso, a capacidade anti-inflamatória parece ser comparável a da fenilbutazona em modelos de inflamação aguda e crônica (ARYA; KUMAR, 2005; SANGRAULA et al., 2002). Entretanto, dependendo da via de administração, o extrato aquoso deste látex induz processos pró-inflamatório em animais (SINGH et al., 2000; SHIVAKAR; KUMAR, 2003).

Com relação às propriedades farmacológicas acima citadas, é importante destacar que os estudos foram conduzidos utilizando extratos aquosos e/ou orgânicos obtidos de uma preparação íntegra do látex onde pouca ou nenhuma caracterização bioquímica das moléculas envolvidas nos eventos farmacológicos observados foi realizada. Alguns destes resultados são atribuídos

a compostos orgânicos do metabolismo secundário produzidos pela planta e não há descrições sobre o envolvimento de suas proteínas. Assim, embora uma riqueza de atividades tenha sido observada, estes trabalhos foram realizados de modo exploratório não contemplando um eficiente método de extração, separação ou isolamento de compostos.

Por outro lado, de forma pioneira, o nosso grupo de pesquisa em colaboração com o prof. Dr. Márcio Viana Ramos, do Dep. de Bioquímica da UFC, vem, há alguns anos, investigando o potencial farmacológico e bioquímico de proteínas do látex de *C. procera* (LP). Nesses estudos, uma fração rica em proteínas solúveis em água (LP), livre em borracha e compostos com massa molecular inferior a 8.000 Da foi utilizada. Essas proteínas se caracterizaram por serem isentas de borracha e obtidas a partir do látex bruto por processos de diálises, centrifugações e cromatografias.

Um dos primeiros estudos realizados pelo nosso grupo demonstrou que as proteínas do látex quando administrada por via intravenosa foram capaz de reduzir o processo inflamatório nos modelos experimentais de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina e cistite hemorrágica por ciclofosfamida em camundongos (ALENCAR et al., 2004). Posteriormente, foi demonstrado que as atividades pró e anti-inflamatórias do látex de *Calotropis procera* são mediadas por diferentes compostos fracionados na diálise (ALENCAR et al., 2006).

Importante atividade antinociceptiva da fração proteica foi demonstrada em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, lambadura da pata induzida por formalina e placa quente (SOARES et al., 2005).

LP também demonstrou ter potencial para aliviar a inflamação e a dor associada à artrite induzida em ratos (KUMAR et al., 2011).

Em ensaios imunológicos, a fração LP, quando administrada por via oral, não foi capaz de induzir síntese de IgA ou IgE em animais experimentais (RAMOS et al., 2007).

Após identificação da presença de atividade antiinflamatória na fração LP, estudos subsequentes desencadearam o fracionamento de LP em coluna de CM-Sepharose em pH 5,0 ao qual resultou em três novas frações (LPPI, LPPII e LPPIII) que foram testadas em modelos animais. Como resultado, foi interessante observar que as três subfrações apresentaram atividade anti-inflamatória, mas somente LP e LPPI induziram produção de óxido nítrico, uma molécula envolvida

no processo de migração celular na resposta inflamatória, que em alta quantidade no soro, suprime a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular (DAL-SECCO et al., 2003; KUBES et al., 1991; PENG et al., 1998). Neste estudo, considerável avanço foi realizado quanto à identificação de moléculas envolvidas em eventos farmacológicos promovidos pelo látex e quanto à observação de que diferentes proteínas do látex desempenham suas atividades através de mecanismos distintos (RAMOS et al., 2009).

Proteínas do látex de *C. procera* também foram investigadas quanto à capacidade de inibir os efeitos letais provocados no curso de uma infecção bacteriana sistêmica induzida por *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* utilizando camundongos. Neste trabalho, foi observado que enquanto 100% dos animais infectados por *S. Typhimurium* morreram em 7 dias, os animais tratados com LP permaneceram protegidos por tempo indefinido. A análise do perfil celular e bioquímico sanguíneo revelou que LP apresentou ação imunoestimulante, evitando a leucopenia provocada pela infecção bacteriana. LP protegeu os animais da infecção bacteriana por um mecanismo de ação indireto já que LP não apresentou ação *in vitro* contra *S. Typhimurium* (LIMA-FILHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Neste mesmo modelo de infecção bacteriana, estudo recente mostrou o efeito significativo da fração proteica (LP) e das suas subfrações (LPPI, LPPII e LPPIII) em manter a homeostase da coagulação sanguínea em animais sépticos. LP foi capaz de não promover trombocitopenia significativa e não reduzir tempo de coagulação quando comparados aos animais infectados. Este último efeito foi também demonstrado pelas subfrações LPPII e LPPIII que apresentaram atividades proteolíticas semelhantes à trombina e plasmina, importantes enzimas da coagulação sanguínea. A LPPI, subfração desprovida de atividade proteolítica, não mostrou efeito semelhante às demais (RAMOS et al., 2012).

Com relação às atividades na área oncológica, as frações proteicas demonstraram citotoxicidade *in vitro* contra diferentes linhagens de células cancerígenas humanas (OLIVEIRA et al., 2007;) e *in vivo* demonstraram atividade de inibição do crescimento do sarcoma 180 em camundongos (OLIVEIRA et al., 2010).

Em trabalho recente do nosso programa de pós-graduação foi demonstrado, que LP diminui a resposta inflamatória da mucosite oral induzida

por 5-fluorouracil em hamsters através de supressão da indução de mediadores pró-inflamatórios (FREITAS et al., 2012).

Ao nível de sistema nervoso central LP demonstrou efeitos depressores, mas sem efeito ansiolítico. No entanto, as doses utilizadas nesse trabalho foram altas em relação às doses observadas para as atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas, etc, descritas pelo nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2010). Mais recentemente, LP demonstrou atividade anticonvulsivante induzida por pentilenotetrazol (LIMA et al., 2012).

Na literatura, relatos de eventos toxicológicos e até letais são observados quando o látex de *C. procera*, na sua forma íntegra, é dado por via oral a mamíferos (EL-BADWI et al., 1998). Por outro lado, animais que receberam LP durante 35 dias consecutivos não apresentaram mudanças nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, renais e hepáticos, mantendo-se rigorosamente similares aos do grupo controle (RAMOS et al., 2006b). A administração diária da fração proteica do látex não promoveu morte dos animais e nem ocasionou rejeição ao consumo da amostra. Toxicidade aguda não foi registrada durante o período experimental (RAMOS et al., 2006b). Neste contexto, proteínas do látex parecem ser excelentes candidatas a estudos de propriedades farmacológicas já que, até o momento, não foram observadas alterações fisiológicas negativas nos animais que receberam a fração.

1.4. JUSTIFICATIVA

A Terapia Oncológica moderna tem sido cada vez mais intervencionista e tem utilizado doses de quimioterápicos, isolados ou combinados, cada vez maiores. Tal fato encontra justificativa na tentativa de vencer a resistência primária das neoplasias a ação das drogas e a busca de uma maior eficiência nas terapêuticas de salvamento e de primeira linha.

Contudo, a lida com os efeitos colaterais advindos desta prática se constitui, muitas vezes, no principal obstáculo a conduta terapêutica avaliada como ideal.

Assim, não há dúvidas, que a toxicidade, algumas vezes, direcionada para um órgão específico, acarreta uma grande limitação do tratamento quimioterápico convencional ocasionando um prejuízo substancial para o paciente, visto que tal toxicidade, muitas vezes, leva a necessidade de redução da dose ou até mesmo interrupção do tratamento.

A mucosite, enquanto efeito colateral de alta prevalência permanece como um terreno fértil para pesquisas. Apesar de muitos trabalhos já realizados, não se descobriu, ainda, um meio eficaz para o seu controle, sendo, até o momento, todos os métodos utilizados apenas paliativos. Há, portanto, que se continuar valorizando a sua importância clínica, buscando alternativas certas para o seu diagnóstico precoce e abordagem farmacológica eficiente.

Calotropis procera é uma planta laticífera encontrada facilmente no território cearense e é utilizada pela população local para alguns fins terapêuticos, como dor de dente, diabetes, infecções de pele, entre outras. Na medicina tradicional indiana, essa planta também tem sido utilizada por muito tempo para diversas patologias incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorroidas, dores nas articulações e doenças do baço, fígado e abdômen (KIRTIKAR; BASU, 1935). Na pesquisa pré-clínica, inúmeros estudos mostram que o látex de *Calotropis procera*, rico em proteínas, apresenta propriedades farmacológicas anti-inflamatórias, antinociceptiva, imuno-modulatória, antitumoral, envolvendo mecanismos celulares, vasculares e liberação ou inibição de importantes mediadores inflamatórios (ALENCAR et al., 2006; 2004; RAMOS et al., 2009; 2012; SOARES et al., 2005; KUMAR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; 2010; 2007; LIMA-FILHO et al., 2010).

Neste contexto, o interesse incessante por tratamentos farmacológicos alternativos em processos inflamatórios que apresentem menores efeitos colaterais, melhor eficácia e menor custo, aliado aos conhecimentos populares e científicos da planta *Calotropis procera*, dão suportes para a realização de estudos que possibilitem a investigação de efeitos anti-inflamatórios de uma fração proteica isolada desta planta em no modelo de mucosite intestinal induzido por irinotecano.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito de uma fração proteica (LP) isolada do látex de *Calotropis procera* sobre as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais associadas á mucosite intestinal (MI) induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito de LP sobre a sobrevivência, ganho ponderal e perfil hematológico dos animais com MI induzida por CPT-11;
- Investigar o efeito de LP sobre as alterações morfofuncionais, histológicas e funcionais na MI induzida por CPT-11, através de análise morfométrica, histopatológica e avaliação do grau de diarreia e motilidade intestinal *in vitro*, respectivamente;
- Investigar o efeito de LP sobre a resposta inflamatória da MI induzida por CPT-11 através da avaliação do efeito desta fração sobre: a atividade da mieloperoxidase intestinal (por ELISA), os níveis de TNF- α e IL-1 β no intestino (ELISA) e sobre a expressão intestinal de TNF- α , IL-1 β , COX-2, NF- κ B, iNOS (por imunohistoquímica e/ou Western blot).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Espécie vegetal – Coleta e Fracionamento do látex

A planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br., pertencente à família Asclepiadaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde uma exsicata (N. 32663) desse material está depositada. A planta é facilmente encontrada em vários locais da cidade de Fortaleza, principalmente na área litorânea e devido a sua boa capacidade regenerativa, a coleta de látex não compromete a sua saúde.

A coleta do látex foi realizada através da quebra do ápice caulinar. O material foi coletado em tubos falcon com capacidade para 45 ml, onde foram colocados previamente 20 ml de água destilada. A quantidade de látex coletada por tubo mantinha sempre a proporção de 1:1 (v/v) com a água.

Após a coleta do látex em água, a obtenção da fração proteica do material biológico de estudo foi realizada segundo o protocolo esquematizado a seguir (**Figura 4**). O material foi submetido inicialmente à centrifugação a 5.000 x *g* durante 10 minutos a 10 °C e o precipitado, rico em borracha, foi descartado. O sobrenadante foi submetido à diálise exaustiva contra água destilada durante 60h com trocas de água a cada 6 horas. A diálise foi desenvolvida utilizando membranas com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Após diálise, o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições como descrito acima e o novo sobrenadante foi liofilizado e nomeado de Proteínas do Látex (LP) (ALENCAR et al., 2006).

Todo o processamento e fornecimento das LP foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob coordenação do professor Dr. Márcio Viana Ramos.

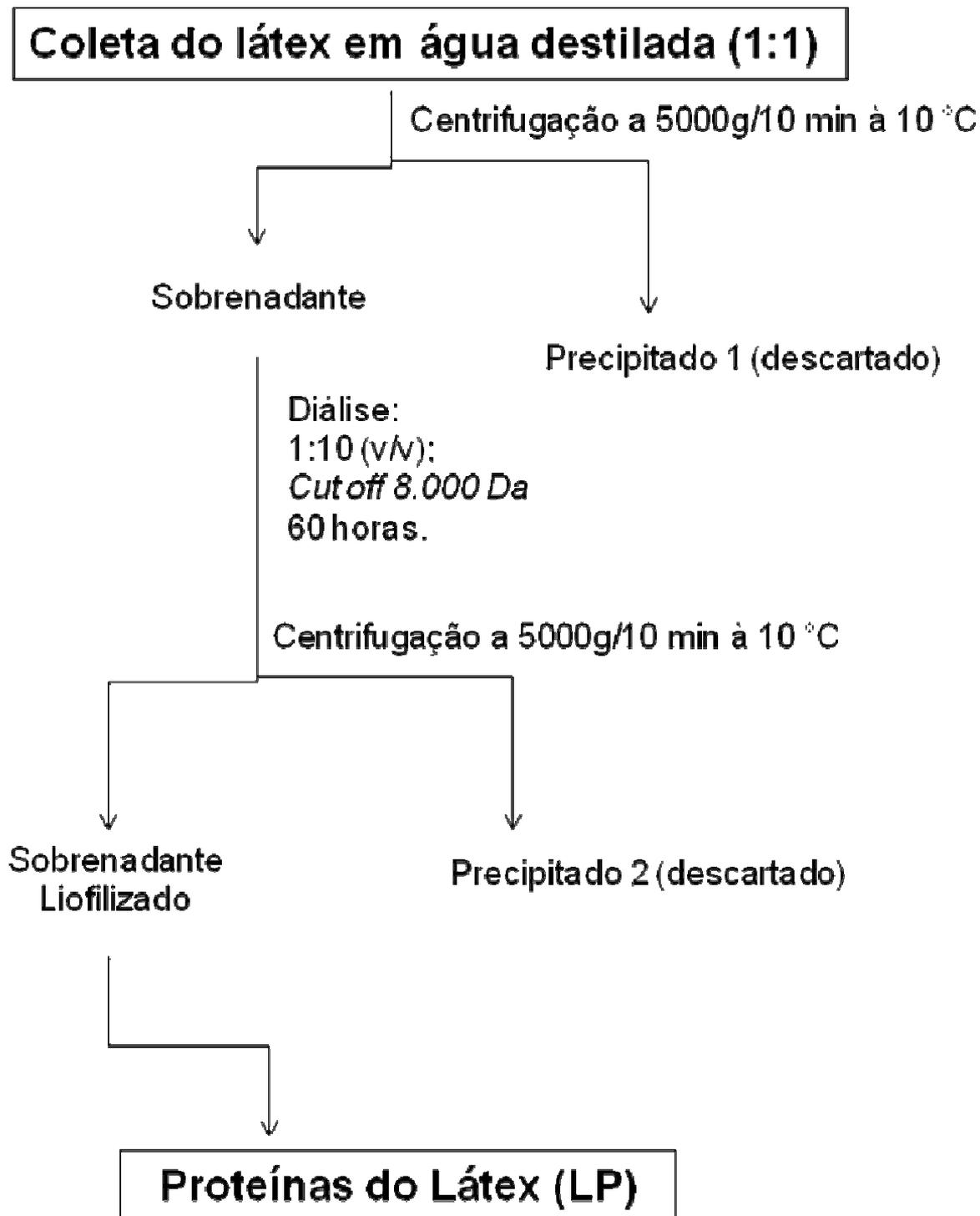


Figura 4: Esquema de fracionamento do látex da planta *Calotropis procera*.

3.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 20 e 25 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os protocolos utilizados nesse trabalho estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo: 24/09).

3.3. Drogas e reagentes

- Cloridrato de Irinotecano (CPT-11, Evoterin®, ampolas 5 mL, 100mg/mL, Evolabis);
- Ácido acético glacial P.A. (Merck);
- Ácido Sulfúrico P.A. (Merck);
- Soro fisiológico 0,9% (Salina),
- Formaldeído 40% (Reagen);
- Éter etílico (Merck)
- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merck);
- Xilol (Reagen);
- Solução salina 0,9 % (estéril e apirogênica) (Pharmace);
- Solução de Turk;
- Solução tamponada com fosfato (PBS);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma);
- O-dianisidina (Sigma);
- Envision Flex (Dako) (ref: K8006) diluente para anticorpo;
- Violeta de Genciana (Reagen);

- Fosfato de potássio monobásico KH_2PO_4 (Synth);
- Fosfato de potássio dibásico K_2HPO_4 (Synth);
- Envision Flex PBR (reagente de bloqueio de peroxidase) (ref: K8010/K8012/K8024);
- Envision Flex tampão de lavagem (Wash Buffer) (ref. S3006);
- Envision Flex tampão de substrato/DAB (ref K3468);
- Envision Flex – Hematoxilina (ref: K8018);
 - ANTICORPOS
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-TNF- α (Sigma) (ref: 028K4872);
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-IL1- β (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). (ref: H-153-SC-7884);
- Anticorpo primário policlonal de cabra Anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). (ref: M19-SC-1447);
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-NF κ B (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). (ref: p50-NLS- SC-114);
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (ref: N-20 SC-651);
- Anticorpo secundário anti-cabra (ref: 2328).

3.4. Equipamentos e materiais

- Agitador de tubos tipo Vortex cetomart® MV;
- Amplificador – AD Instruments, ML845 Powerlab 4/25;
- Aquecedor com temperatura controlada;
- Balança analítica Ohaus AS2600;
- Balança analítica Marte AI200;
- Bequers;
- Câmera de contagem Neubauer;
- Centrífuga Eppendorf 5804R;
- ELISA ELX 800 – Biotek;
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys;
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergierstation T8.10 da Ika
 - Labortechnik;

- Lâmina lisa para microscopia 26 X 76 mm;
- Lamínula 24X32 mm;
- Material cirúrgico;
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N;
- Microscópio Óptico binocular Nikon e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10X;
- Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x) acoplado ao computador;
- Pipeta Pasteur, Eppendorfs;
- Seringas (B-D Plastipack);

3.5. Indução da Mucosite Intestinal

O modelo experimental de mucosite intestinal utilizado foi descrito inicialmente por Ikuno et al. (1995) e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), Universidade Federal do Ceará (MELO et al., 2008).

Para tanto, Os animais receberam quatro injeções, por via intraperitoneal (i.p.), de irinotecano (CPT-11) na dose de 75 mg/kg, uma vez ao dia e foram avaliados no 7º dia após a primeira injeção.

3.6 Grupos experimentais e protocolos de tratamento

Os animais foram divididos em três grupos (n= 8-12). **Grupo I** : controle normal tratado com salina (5mL/kg, i.p.); **Grupo II** : controle mucosite intestinal tratado com CPT-11 (75 mg/kg,i.p., 1x dia por 4 dias); **Grupo III**: mucosite tratado com LP. Os animais deste grupo foram sub-divididos em três grupos os quais foram tratados, 24h antes da administração do CPT-11 (dia zero) com diferentes doses de LP (1,0; 5,0 e 50 mg/kg; e.v em 100 µL de salina) e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de tratamento (**Figura 5**).

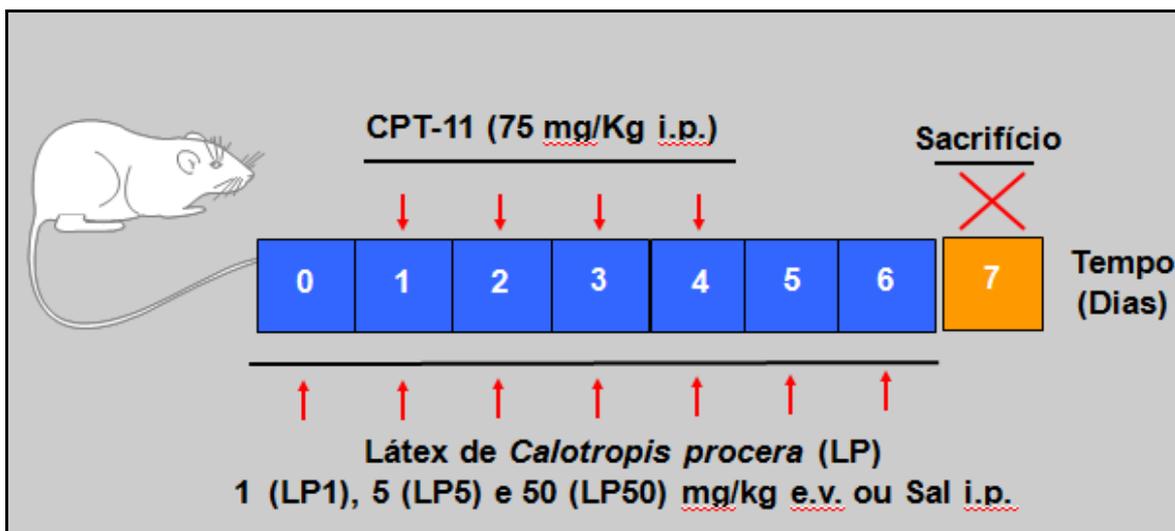


Figura 5: Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite.

3.7. Parâmetros Avaliados

3.7.1. Curva Ponderal

Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados no início do experimento, antes dos tratamentos, diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em % de perda ponderal em relação ao peso inicial.

3.7.2. Análise de sobrevivida

Com o objetivo de avaliar a taxa de sobrevivida em cada grupo experimental os animais foram observados durante 12 dias a partir do início do tratamento com CPT-11. Diariamente registrou-se a mortalidade dos animais em cada grupo experimental e os resultados foram expressos como o percentual de sobrevivida.

3.7.3. Avaliação do perfil hematológico: Leucócitos totais e neutrófilos

No 7^o dia os animais foram anestesiados com éter e, em seguida, colhidas amostras de sangue periférico por punção na artéria ocular, com microcapilar heparinizado, imediatamente antes do sacrifício.

Utilizou-se 20 µL de sangue diluído em 380 µL do líquido de Turk para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Moura et al. (1998). Os valores foram expressos em número total de leucócitos x 10³/ mL de sangue.

Para a avaliação de neutrófilos sangüíneos, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método Hematoxilina/Eosina, e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de Souza e Ferreira (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de neutrófilos x 10³/ mL de sangue.

3.7.4. Avaliação da Diarreia

Para avaliarmos o grau de diarreia apresentada nos grupos experimentais a intensidade da mesma foi determinada no 7^o dia experimental, anteriormente ao sacrifício dos animais, de acordos com os escores descritos por Kurita et al. (2000) (**Figura 6**):

Escore 0 = fezes com aspecto normal;

Escore 1 = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas;

Escore 2 = fezes úmidas com pouca sujidade perianal;

Escore 3 = fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

Os resultados foram expressos como medianas do grau apresentado em cada grupo experimental.

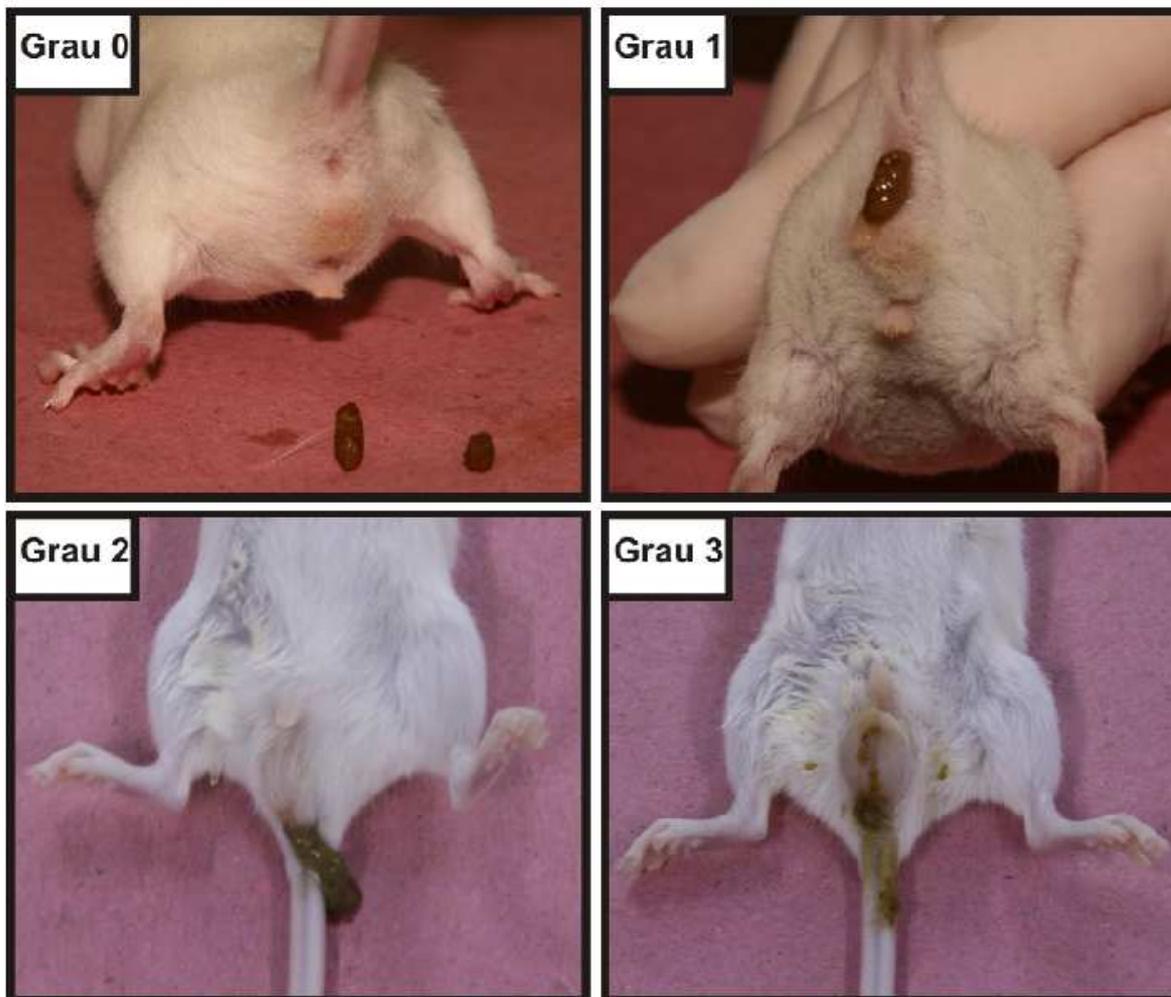


Figura 6 - Figura esquemática do grau de diarreia apresentada em animais tratados com irinotecano. À diarreia são atribuídos escores de acordo com a intensidade. Grau 0=fezes com aspecto normal; Grau 1=fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; Grau 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; Grau 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal (Freitas, 2007).

3.7.5. Análise histopatológica e morfométrica do intestino

No 7^o dia, segmentos obtidos do duodeno, considerados em torno de 0,5 cm de duodeno proximal, foram removidos e em seguida fixados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados imersos em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura e processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 100x e 400x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar

10x). Foram analisados os aspectos de vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. A severidade e o grau da mucosite foram determinados conforme os critérios descritos por WOO et al. (2000):

0 = ausência de lesão;

1 = menos de 10% das criptas contém células necróticas;

2 = mais de 10% das criptas contém células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta;

3 = mais de 10% das criptas contém células necróticas, com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes;

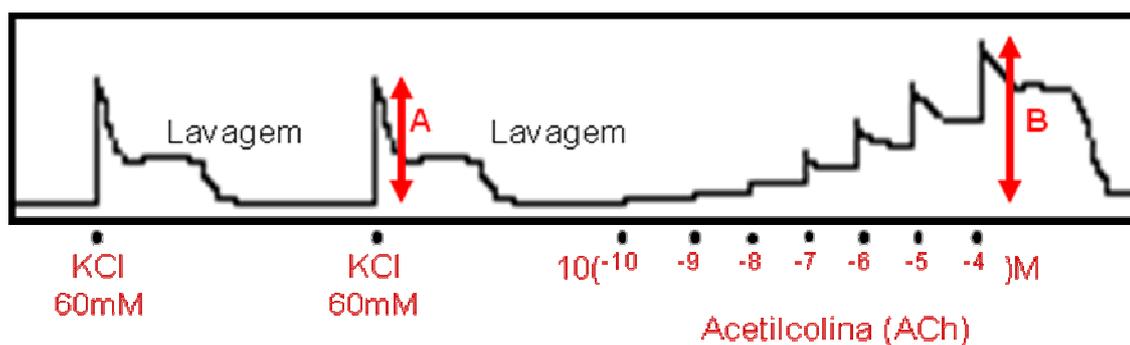
4 = semelhante à 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura de criptas e encurtamento dos vilos.

Para a análise morfométrica, as variáveis incluíram a altura dos vilos, considerada desde o topo até a base, correspondente à junção cripta/vilo, e a profundidade das criptas definidas como a invaginação entre os vilos adjacentes (CARNEIRO-FILHO et al., 2004a). As medidas morfométricas foram calculadas em μm e mm^2 utilizando o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico.

3.7.6. Avaliação sobre a contratilidade intestinal in vitro

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de intestino proximais dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritora de Tyrode modificada (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; $\text{MgCl}_2 = 0,98$; $\text{CaCl}_2 = 2$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 0,36$; $\text{NaHCO}_3 = 11,9$; glicose= 5,5). A dose de látex de *Calotropis procera* utilizada a partir desse experimento, foi aquela que melhor resposta apresentou nos modelos acima descritos. Cada intestino foi limpo de seus tecidos adjacentes em seguida, amarrados com linha no sentido da musculatura longitudinal, suspensos em banho de órgão (20mL de solução de Tyrode, aquecida a 37° C, pH=7,4 e e oxigenada continuamente com mistura carbogênica 95% O₂/5% CO₂) e conectados a um transdutor de força

(ADInstruments, modelo MLT0201, EUA), apropriado para registro isométrico de contrações, conectado a um Amplificador (ADInstruments, ML845 Powerlab 4/25, EUA), para registro das contrações longitudinais da preparação. Os sinais gerados pelo transdutor foram registrados em um Sistema de Aquisição de Dados (Chart Pro, EUA). Após calibração do sistema, foi aplicado ao tecido 1g de tensão de repouso e o tempo de equilíbrio com as condições artificiais do banho foram de 40 minutos. Duas contrações padrão (fase fásica) foram inicialmente obtidas mediante a adição de KCl 60 mM ao banho e, em seguida, feita uma curva concentração-efeito com o agonista colinérgico acetilcolina (ACh em concentrações crescentes e cumulativas variando de 10^{-10} - 10^{-4} M adicionadas ao banho pelo período máximo de 5min para cada concentração). Entre as aplicações de KCl e entre a de KCl e a primeira de ACh realizou-se a troca de solução (lavagem do preparo) permitindo-se a estabilização do padrão contrátil basal antes da adição de novo agente ao banho (**Figura 7**). Os dados obtidos da curva de ACh foram analisados como percentual de resposta contrátil em relação à média das contrações padrão observadas inicialmente para o KCl 60 mM.



$$\% \text{contração} = \frac{B}{A} \times 100$$

Figura 7 - Figura esquemática de avaliação *in vitro* em intestino.

3.7.7. Avaliação do processo inflamatório

3.7.7.1. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, foi utilizada como marcador da presença de neutrófilos no intestino e sua atividade foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. Para tanto, após o sacrifício dos animais, uma porção do duodeno foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50 mg de tecido por mL de HTAB, homogeneizada e centrifugada (1500 g/20 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10 min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7 µL do sobrenadante (placas de 96 poços), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O) foram adicionados e lidos a 460 nm (t₀=0 min e t₁=1 min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO).

3.7.7.2. Quantificação de citocinas TNF-α e IL-1β no intestino

As concentrações de TNF-α e IL-1β foram determinadas em amostras do duodeno retirados no 7º dia e estocadas em freezer -70°C até o momento do ensaio.

Para o ensaio, o tecido coletado foi homogeneizado em tampão PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4 e processados como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1995). A detecção de TNF-α e IL-1β foi determinada no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA et al., 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-TNF-α e anti-IL-1β (4µg/mL, DuoSet ELISA Development kit R&D Systems Catalog DY501 e DY510 respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foram adicionada em várias diluições e incubadas por 2h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05%

SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti –TNF- α e anti-IL-1 β (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-streptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro para TNF- α e IL-1 β . As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 4000 pg/mL. O resultado foi expresso em picograma de citocinas/mL.

3.7.7.3. Imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B

Foram realizadas as imunohistoquímicas para TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B nas amostras dos duodenos que foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 μ m de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 3 horas. Após a desparafinização do tecido, seguida de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ (PBR). Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com tampão de lavagem (DAKO) 0,01M (5 min). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para detecção de TNF- α (Sigma), IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B (Santa Cruz), na diluição de 1:200 em diluente DAKO (diluente primário), por 60 min. Em seguida, na imunohistoquímica para COX-2, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 0,01M e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (Santa-Cruz), na diluição de 1:200, por 30 min, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, foi incubado com o complexo streptavidinabiotina- peroxidase (Santa Cruz) diluído em PBS, por 30 minutos. Nas lâminas para investigação dos outros mediadores, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão de lavagem e incubadas com o Flex HRP (polímero), por 30 min, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, e a

lavagem com tampão, a reação foi revelada utilizando diamina-benzina-peróxido de hidrogênio (DaKo) substrato buffer, à temperatura ambiente, por 5 min, no escuro. Para todas as imunohistoquímicas, após controle da intensidade, a reação foi interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Mayer (Invision Flex-Dako), por 5 minutos, sendo o excesso retirado com água corrente. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilóis e montadas com lamínulas em Entellan (RIBEIRO et al., 2002). Nas lâminas para imunohistoquímica de NF- κ B, a contracoloração foi realizada com Metil Green, por 10 minutos, sendo o excesso retirado com água corrente e passagens em Butanol e Xilol e montadas com lamínulas em Entellan. Os controles negativos foram processados simultaneamente, como descrito acima, e o anticorpo primário foi substituído por diluente DAKO (diluente primário).

O grau de expressão das células marcadas foi avaliado por escores descritos por Yeoh et al. (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação.

3.7.7.4. Avaliação da expressão de iNOS por Western Blot

As amostras de duodeno, obtidas no sétimo dia experimental, foram congeladas e no dia da experimentação estas foram submetidas à sonicação com solução de lise celular (Triton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM) e inibidor de protease e logo após centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C. Padronizou-se a quantidade de proteína para 50 μ g, dosadas previamente, de acordo com uma curva padrão para proteína. Em seguida, foi feita a separação eletroforética (Bio Rad mini-gel) das amostras após desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS- Page), com o marcador de proteína (Invitrogen). O gel foi, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose *overnight* em aparelho de transferência 36v (Bio Rad mini-transfercell) a 4°C. No dia seguinte, a membrana de celulose foi bloqueada com leite desnatado por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário durante 1 hora e meia, diluição 1:500 em albumina bovina 5%. Após lavagens com tampão contendo TRIS, glicina, Tween 20 e água destilada, foi feita incubação

com anticorpo secundário, diluído 1:500 em albumina bovina 5%, durante 1 hora e meia, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana de nitrocelulose pela técnica de quimioluminescência (ECL), em filme de raio-X (Kodak X-Omat), em sala escura. As bandas foram analisadas e quantificadas por densitometria pela razão de expressão da proteína de interesse no gel pela expressão da proteína controle. A quantificação das bandas foi determinada com o auxílio de um programa de computador Image J. Os dados foram expressos como intensidade da banda de iNOS.

3.8. Análise estatística

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism®, versão 5.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. Quando utilizado ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas (teste de Bonferoni), baseando-se na continuidade das variáveis em análise e, quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn. Para análise da sobrevida foi utilizado o teste de Log-Rank. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento dos animais com LP não modifica a curva ponderal de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

Os animais submetidos ao tratamento com irinotecano apresentaram uma perda ponderal crescente a partir do primeiro dia após o início do tratamento (**Figura 8**), tendo atingido uma perda máxima de 21,29% no sétimo dia, a partir do qual houve uma tendência à recuperação em relação ao peso inicial. Os animais pré-tratados com LP, apesar de, aparentemente, terem apresentado menor perda de peso, nas doses de 5 e 50 mg/kg com uma perda máxima de 19,10% e 20,5%, respectivamente, atingida no sétimo dia após o início do tratamento, tal diferença não foi significativa quando comparado com o grupo tratado com irinotecano. Não houve perda ponderal no grupo de animais controle normal

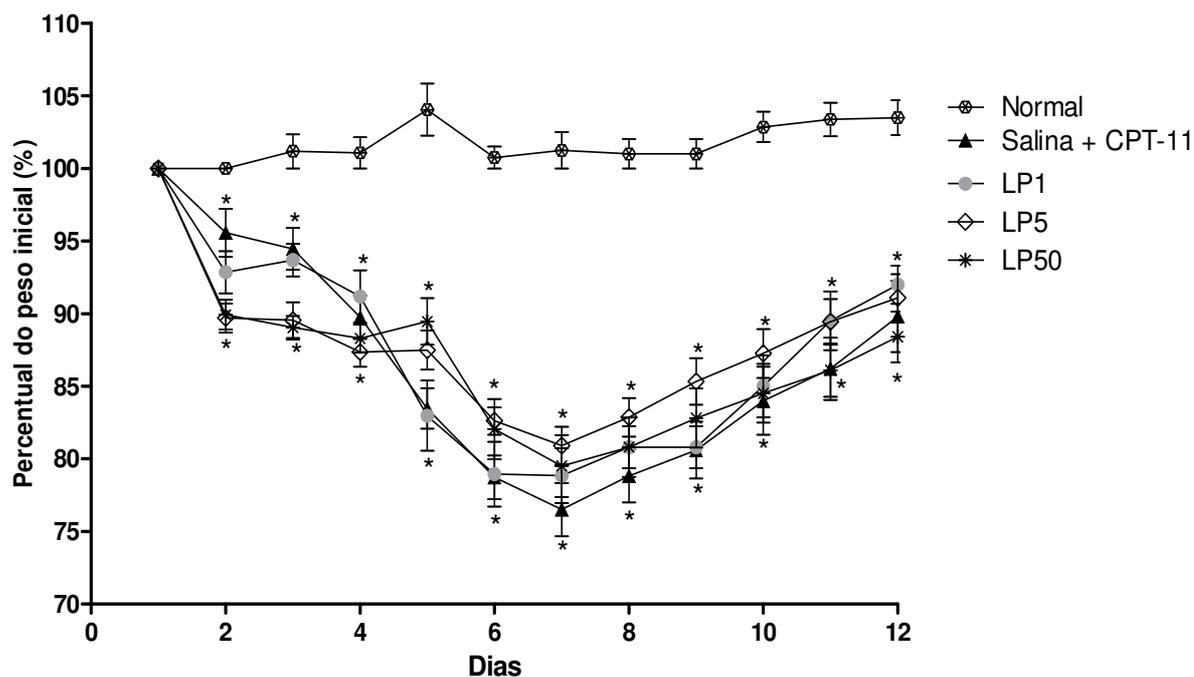


Figura 8 – O tratamento com LP não altera o peso ponderal dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/kg, e.v., LP1, LP5 e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p.), grupo LP + CPT-11. Camundongos foram pesados diariamente por 12 dias. Valores representam o percentual do peso comparado ao peso inicial. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.). (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.2. LP aumenta a sobrevida dos animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

A **figura 9** evidencia a redução da sobrevida dos animais tratados com Irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia se comparado com os animais tratados apenas com salina ($p < 0,05$). Houve uma sobrevida de 100% dos animais tratados apenas com salina e de 41,67% no grupo de animais tratados com Irinotecano, a partir do oitavo dia. Ao comparar-se, no entanto, a curva de sobrevida dos animais

Tratados com LP nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg associado ao Irinotecano com aqueles tratados somente com Irinotecano, verificou-se que estas foram significativamente diferentes, com taxas de sobrevida de 75% para a dose de 5 mg/kg a partir do sétimo dia e 75% para a dose de 50 mg/kg a partir do oitavo dia.

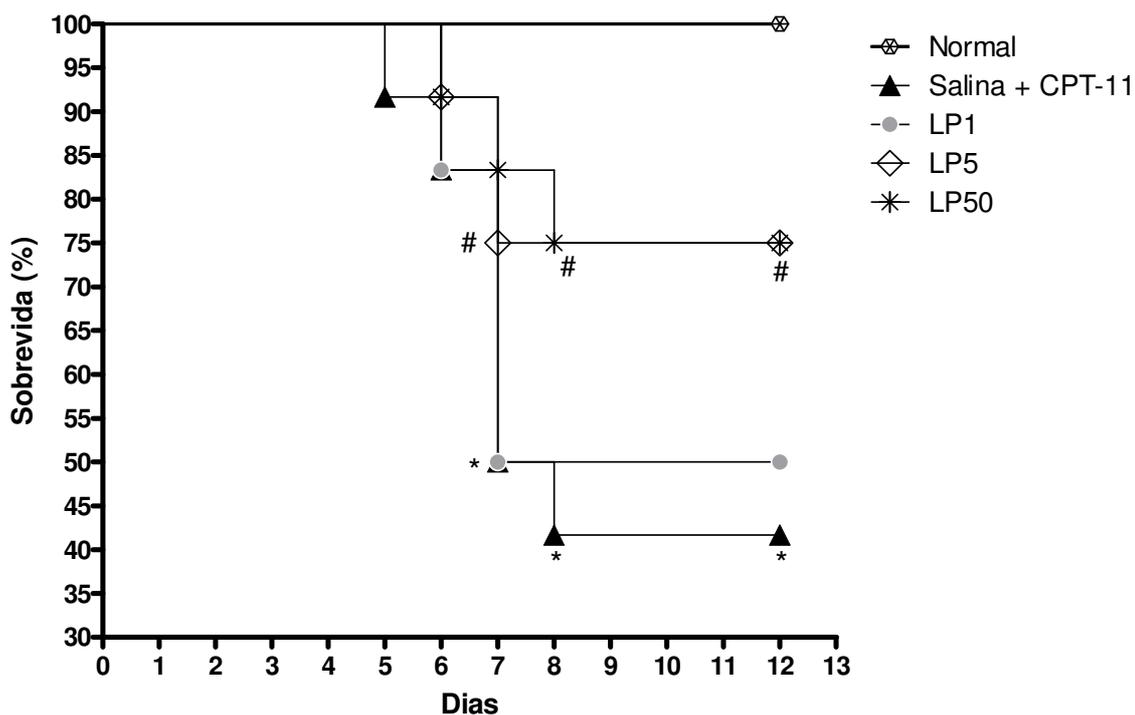


Figura 9 – O tratamento com LP aumenta a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. Foram avaliados diariamente por 12 dias quanto à sobrevivência. Valores representam o percentual de animais vivos comparados ao primeiro dia. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. Teste de Log-Rank.

4.3. LP não modifica a leucopenia e neutrofilia da mucosite intestinal induzida por CPT-11

O tratamento dos animais com LP nas doses de 1, 5 e 50 mg/kg em dose única diária não foi capaz de alterar significativamente o perfil leucocitário quando comparados ao grupo de animais que receberam CPT-11 (**Figura 10A**). No entanto, como esperado, o tratamento de animais com irinotecano, causou uma queda significativa no número de leucócitos totais quando comparados ao grupo que recebeu somente salina (grupo Normal).

Com o objetivo de avaliarmos se o perfil de neutrófilos poderia estar sendo alterado, foi realizada a contagem diferencial por esfregaço sanguíneo. Foi observado o mesmo padrão de resposta apresentado pelo perfil de leucócitos totais (**Figura 10B**), ou seja, o tratamento dos animais com LP nas doses de 1, 5

e 50 mg/kg em dose única diária não foi capaz de alterar significativamente o número de neutrófilos quando comparado ao grupo de animais que receberam CPT-11.

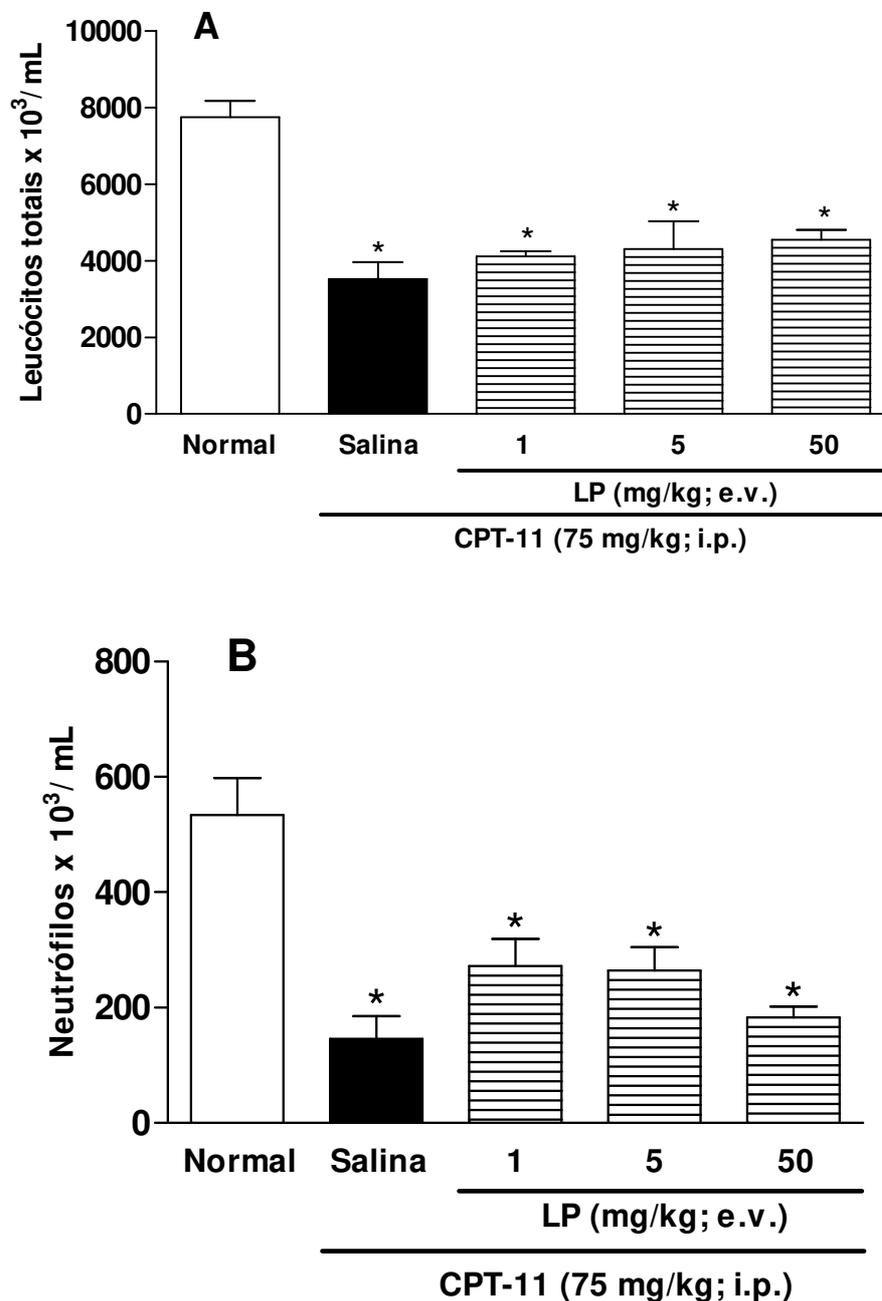


Figura 10 – O tratamento com LP não altera o perfil de leucócitos totais (painel A) e neutrófilos (painel B) de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, amostras de sangue foram coletadas para realização de esfregaço e análise de neutrófilos (x 10³/mL). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.). (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.4. LP diminui a intensidade de diarreia nos animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

Na avaliação do grau de diarreia no sétimo dia se observou que o CPT-11 induziu aumento significativo nos escores de diarreia 3 (2-3) quando comparados ao grupo Normal 0 (0-0). Os animais tratados com LP nas doses de 5 e 50 mg/kg, apresentaram diferença significativa em diminuir o grau de diarreia apresentada no sétimo dia, quando comparados ao grupo de animais que receberam somente CPT-11. Os grupos tratados com LP, apresentaram mediana de escores de diarreia igual a 1 (0-2) e 1 (0-2), respectivamente, para as doses de 5 e 50 mg/kg. No entanto, a dose de 1 mg/kg de látex não foi capaz de apresentar diferença significativa na mediana de escores 2,5 (1-3) quando comparado aos animais tratados somente com CPT-11. (**Tabela 3**).

Grupos experimentais	Mediana (min-máx)
Normal	0(0-0)
CPT-11	
Salina	3 (2-3)*
LP – 1 mg/kg	2.5 (1-3)*
LP – 5 mg/kg	1 (0-2)#
LP – 50 mg/kg	1 (0-2)#

Tabela 3 – LP nas doses de 5 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50 + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, antes do sacrifício dos animais, o grau de diarreia foi avaliado. Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina+CPT-11 (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

4.5. LP reverte as alterações histopatológicas e morfológicas duodenais devido a mucosite intestinal induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**Figuras 11 e 12**) e os escores histopatológicos (**Tabela 4**) indicam que o irinotecano (CPT-11) na dose de 75 mg/kg/dia, em comparação com animais tratados apenas com salina, promoveu destruição do comprimento da cripta, encurtamento dos vilos, infiltração inflamatória na mucosa, vacualização das células do epitélio de revestimento. O grupo tratado com irinotecano obteve uma mediana dos escores anatomopatológicos igual a 4 (1-4), enquanto o grupo controle obteve mediana igual a 0 (0-0). Nos animais tratados com LP, nas doses de 5 e 50 mg/kg, observou-se redução significativa quando comparados ao grupo CPT-11. Tais escores apresentaram medianas de 1 (0-2) e 1 (0-3) para as doses de 5 e 50 mg/kg, respectivamente. (**Tabela 4**).

Ao realizar-se a análise morfométrica no duodeno dos animais tratados com CPT-11, verificou-se que o antineoplásico, induziu redução significativa ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com o controle tratado apenas com salina. Quanto aos grupos tratados com LP nas doses de 5 e 50 mg/kg, estas induziram um aumento significativo na razão vilo/cripta, indicativo de preservação tecidual, quando comparados ao grupo CPT-11. A dose de 1 mg/kg, conforme demonstrado nos outros parâmetros analisados até o momento não foi capaz de aumentar a razão vilo/cripta de forma significativa (**Figura 13**) o que corrobora com a análise microscópica e escores de diarreia.

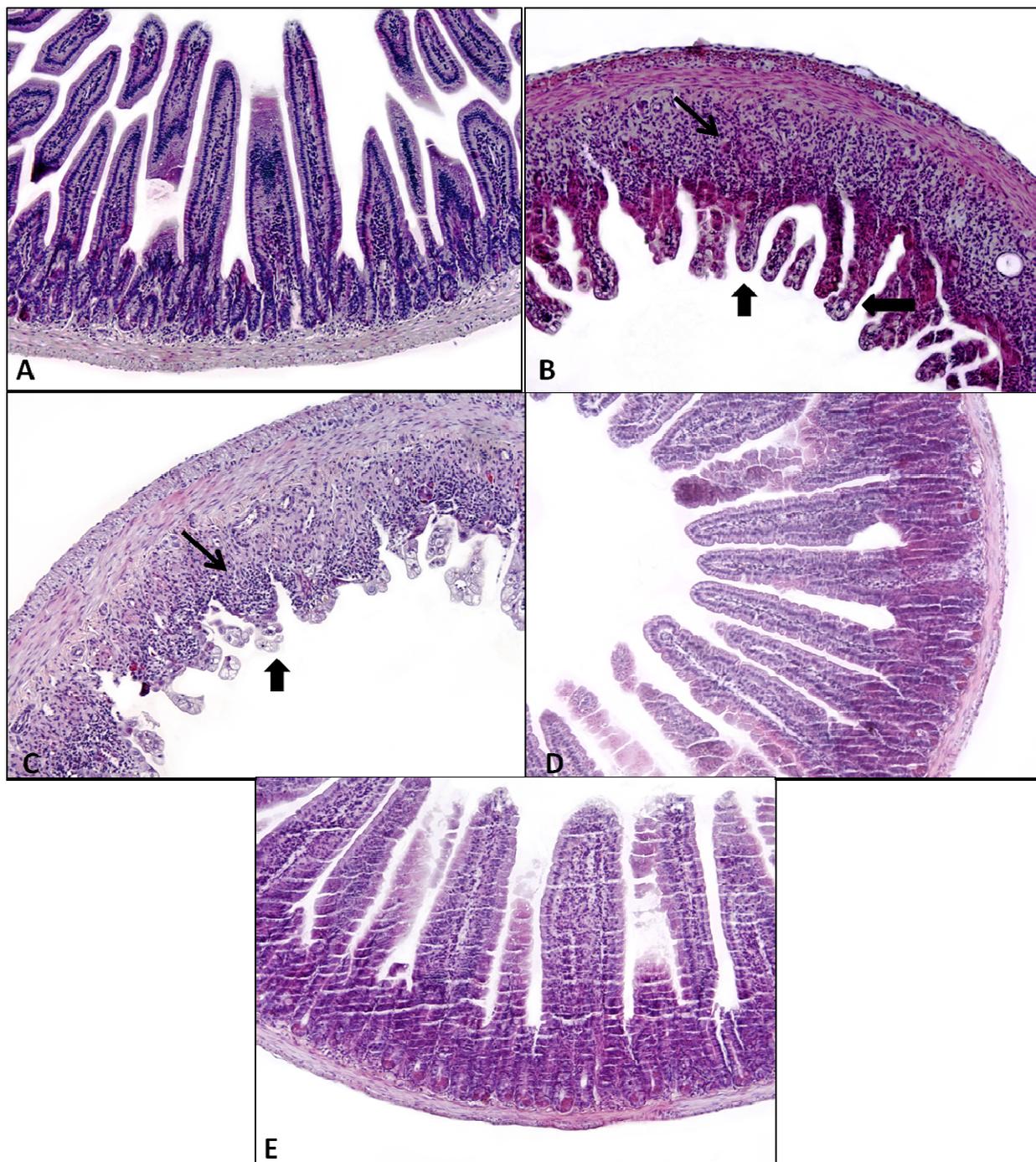


Figura 11 – O tratamento com LP previne alterações histopatológicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v . LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Observam-se encurtamento de vilos (setas verticais), vacualização de células (seta horizontal) e intenso infiltrado inflamatório (setas inclinadas). **Painel A:** Normal; **Painel B:** CPT-11+Salina; **Painel C:** dose de 1 mg/kg; **Painel D:** dose de 5 mg/kg e **Painel E:** dose de 50 mg/kg.

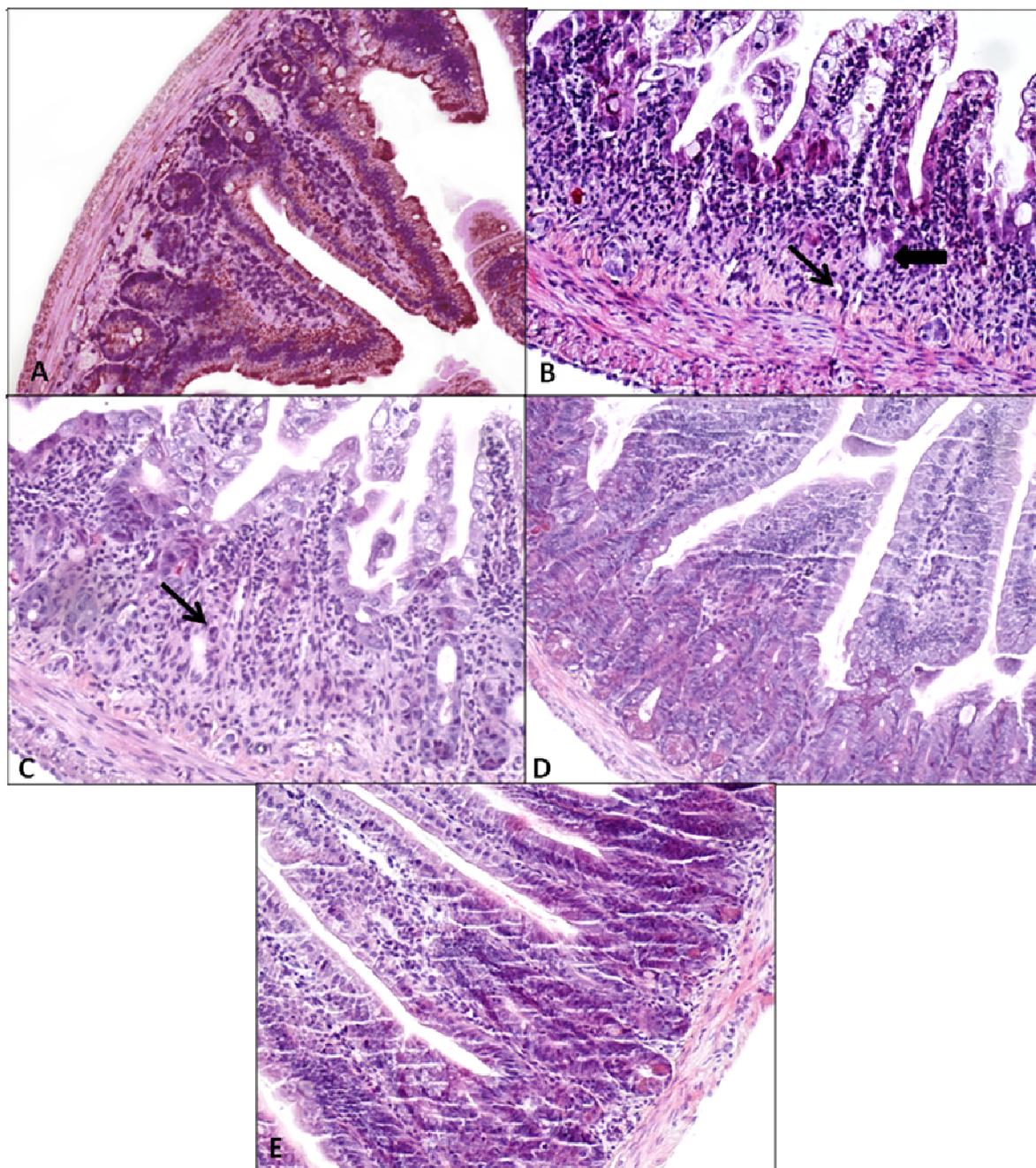


Figura 12 – O tratamento com LP previne alterações histopatológicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v . LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (400x). Observam-se vacuolização de células (seta horizontal) e intenso infiltrado inflamatório (setas inclinadas). **Painel A:** Normal; **Painel B:** CPT-11+Salina; **Painel C:** dose de 1 mg/kg; **Painel D:** dose de 5 mg/kg e **Painel E:** dose de 50 mg/kg.

Grupos experimentais	Mediana (escores)
Normal	0(0-0)
CPT-11	
Salina	4 (1-4)*
LP – 1 mg/kg	3.5 (1-4)*
LP – 5 mg/kg	1 (0-2)#
LP – 50 mg/kg	1 (0-3)#

Tabela 4 – LP nas doses de 5 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir aspectos microscópicos duodenais em animais com mucosite intestinal. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+ Salina; 75 mg/kg/dia) LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina+CPT-11 (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

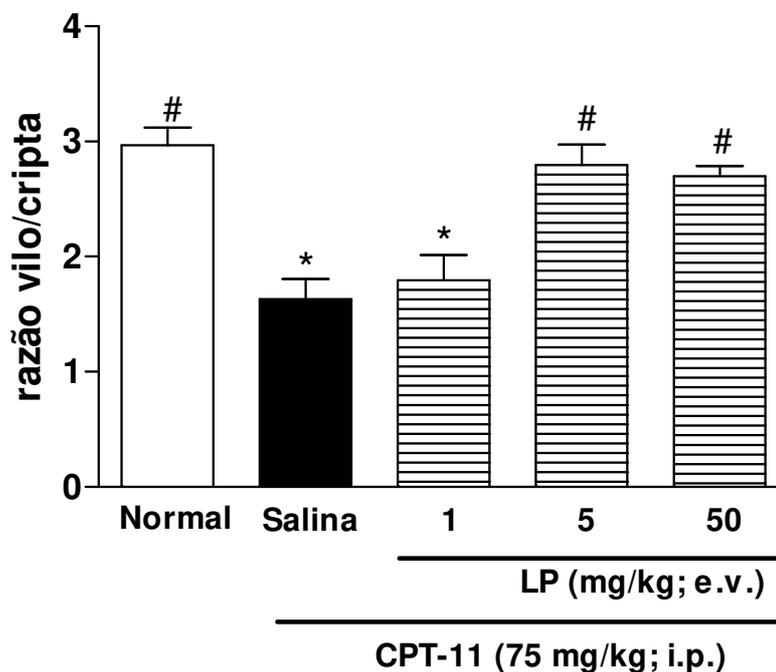


Figura 13 – O tratamento com LP previne as alterações sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica. Os resultados foram expressos como média±E.P.M dos valores da razão obtida. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.6. LP diminui a contratilidade duodenal *in vitro* na mucosite intestinal induzida por CPT-11

O irinotecano (75 mg/kg/dia, i.p.) induziu significativo aumento da atividade contrátil do duodeno ao estímulo com acetilcolina, verificada *in vitro*, sendo esta resposta 1695,38% maior que a contratilidade do duodeno de animais tratados apenas com salina. Nos animais tratados com látex (5 mg/kg,) associado ao irinotecano, verificou-se uma diminuição a responsividade do tecido a acetilcolina quando comparada ao grupo que recebeu CPT-11. Essa queda na responsividade, pela dose de 5 mg/kg, foi máxima de 81,77%. Esses dados corroboram com os dados apresentados até o momento. (**Figura 14**).

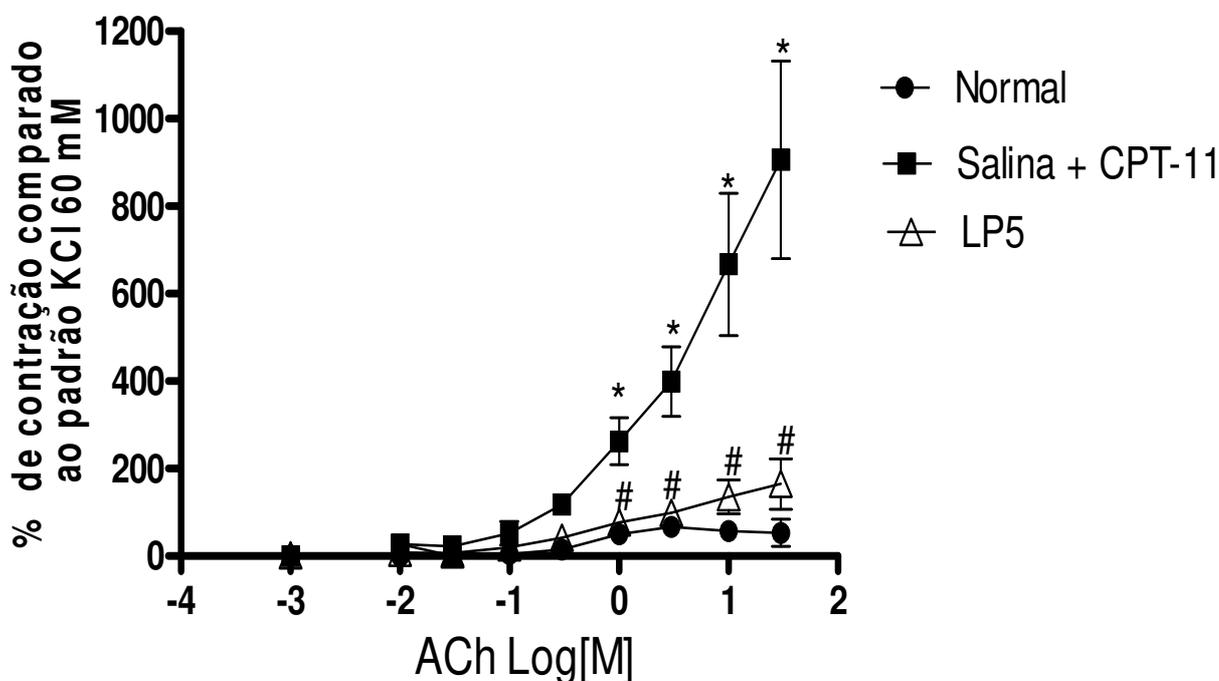


Figura 14 – Efeito do LP sobre a contratilidade duodenal *in vitro* de animais com mucosite induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (5 mg/kg, e.v . LP5) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de contratilidade *in vitro*. Os resultados foram expressos como média±E.P.M. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.7. LP modula a resposta inflamatória intestinal da mucosite intestinal induzida por CPT-11:

4.7.1. LP reduz atividade da MPO intestinal

O tratamento dos animais com LP doses de 5 e 50 mg/kg foi eficiente em reduzir, significativamente a atividade de mieloperoxidase (MPO) quando comparado ao grupo tratado somente com CPT-11. Essa redução foi de 83, 42% para a dose de 5 mg/kg e de 77, 21% para a dose de 1 mg/kg. Por outro lado, a dose de 1 mg/kg não alterou significativamente (28,99%) a atividade de MPO quando comparados ao grupo tratado somente com CPT-11. (**Figura 15**).

4.7.2. LP reduz os níveis intestinais das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL- β

Os resultados apresentados na **Figura 16** mostram que a mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 aumenta significativamente os níveis de TNF- α e IL- β no duodeno de animais sacrificados no 7^o dia de tratamento. O tratamento dos animais com LP nas doses de 5 e 50 mg/kg diminuiu significativamente os níveis dessas duas citocinas pró-inflamatórias. Essas reduções foram de 88,18% e 65,03% para os níveis de TNF- α nas doses de 5 e 50 mg/kg, respectivamente. Para os níveis de IL-1 β essas reduções foram de 82,19% e 77,42% para as doses de 5 e 50 mg/kg, respectivamente, sempre comparadas ao grupo experimental que recebeu somente CPT-11. Tanto para os níveis de TNF- α e IL-1 β a dose de 1 mg/kg não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo CPT-11.

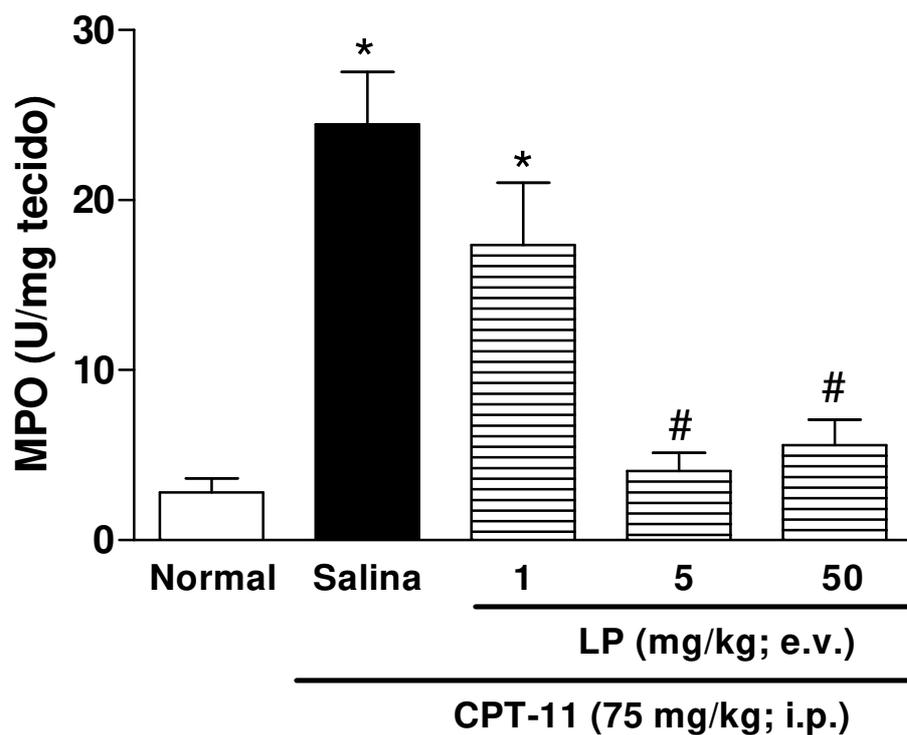


Figura 15 – O tratamento com LP diminui a atividade de MPO dos animais com mucosite induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+ Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50 + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

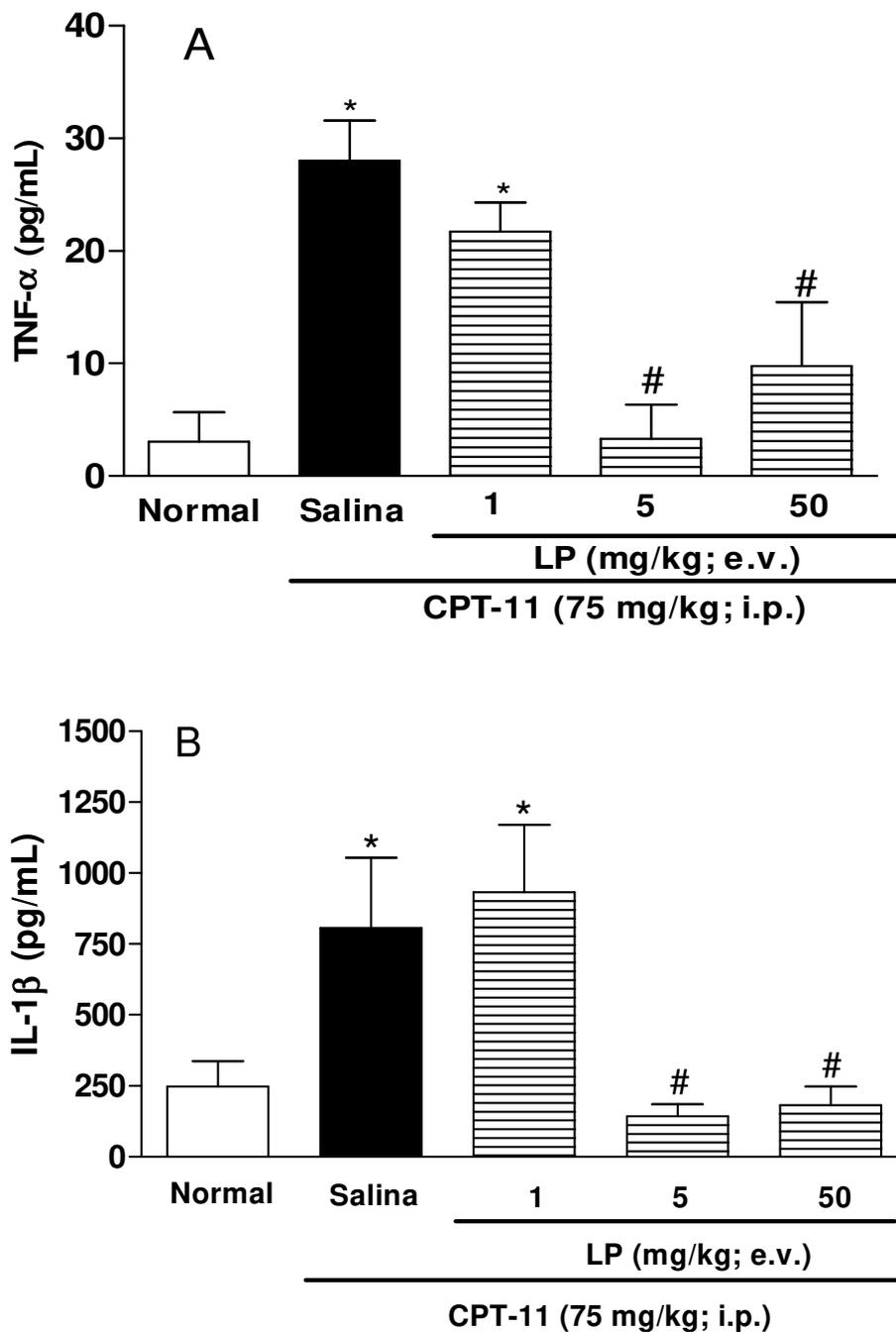


Figura 16 – Efeito do com LP nos níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no duodeno de animais com mucosite induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (1, 5 e 50 mg/Kg, e.v. LP1, LP5, e LP50) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de citocinas. Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{E.P.M}$. Painel A: TNF- α e Painel B: IL-1 β . * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

4.7.3. LP promove a diminuição da expressão intestinal de TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B e iNOS : avaliação por imunohistoquímica

Através das figuras 17, 18, 19, 20 e 21 e **tabela 5**, evidencia-se que o LP foi capaz de diminuir/inibir a imunomarcção de TNF- α , IL-1 β iNOS, COX-2 e NF- κ B. No grupo controle negativo (painéis A; ausência de anticorpo primário) não se observa imunomarcção 0 (0-0).

Na tabela 5 e **figura 17** se observam o resultado do efeito do LP na marçção de TNF- α por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. É evidente a marçção presente na lâmina própria 4 (2-4). No grupo LP (painel D) observa-se uma leve marçção, porém inespecífica 1 (1-3).

Na tabela 5 e **figura 18** se observam o resultado do efeito do LP na marçção de IL-1 β por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. Evidencia-se marçção presente no epitélio e cripta e uma grande evidência no conjuntivo (400x painel D). No grupo LP (Figura 19; painel E) praticamente não é observado imunomarcção.

Na tabela 5 e **figura 19** se observam o resultado do efeito do LP na marçção de COX-2 por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. No painel C evidencia-se marçção presente no tecido conjuntivo 4 (2-4) e também na serosa. No grupo LP (painel D) apesar de haver marçção, está é menos intensa e de forma inespecífica (1-2).

Nas **figuras 20 e 21** se observam o resultado do efeito do LP na marçção de NF- κ B por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. Na figura 21 (painel C) observa-se marçção presente no tecido conjuntivo. No grupo LP (Figura 21; painel D) apesar de haver marçção, está é menos intensa e de forma inespecífica. No grupo controle negativo (ausente de anticorpo primário) houve imunomarcção de forma discreta. Para tanto, foi realizada a contagem de células marcadas em aumento de 200x. Como resultado, o grupo LP apresenta uma menor quantidade de células imunomarcadas quando comparadas ao grupo CPT-

11. No grupo controle negativo, apesar de haver marcação de células (Figura 22, painel A), a quantidade dessas células marcadas foi diferente significativamente quando comparadas ao grupo CPT-11 (figura 21).

Na tabela 5 e **figura 22** se observam o resultado do efeito do LP na marcação de iNOS por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. Observa-se marcação presente no tecido conjuntivo 4 (3-4). No grupo LP (painel D) praticamente não é observado imunomarcação 1 (1-2).

	Controle negativo	Normal	CPT-11	LP 5 mg/kg
TNF- α	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (2-4)*	1 (1-3)#
IL-1 β	0 (0-0)	1 (0-2)	3 (3-3)*	1 (1-2)#
iNOS	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (3-4)*	1 (1-2)#
COX-2	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (2-4)*	1 (1-2)#

Tabela 5 – Efeito do látex de *Calotropis procera* no grau de expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β), enzimas (iNOS, COX-2) na mucosa duodenal de camundongos com mucosite intestinal. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (5 mg/Kg, e.v. LP5 + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica de imunohistoquímica. Controle negativo representa o duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-iNOS e anti-COX-2. O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh et al. (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação. Os valores representam mediana e variação mínima e máxima, sendo analisados pelo teste de Kruskal-Wallis teste de Dunn. *p<0,05 quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina+CPT-11.

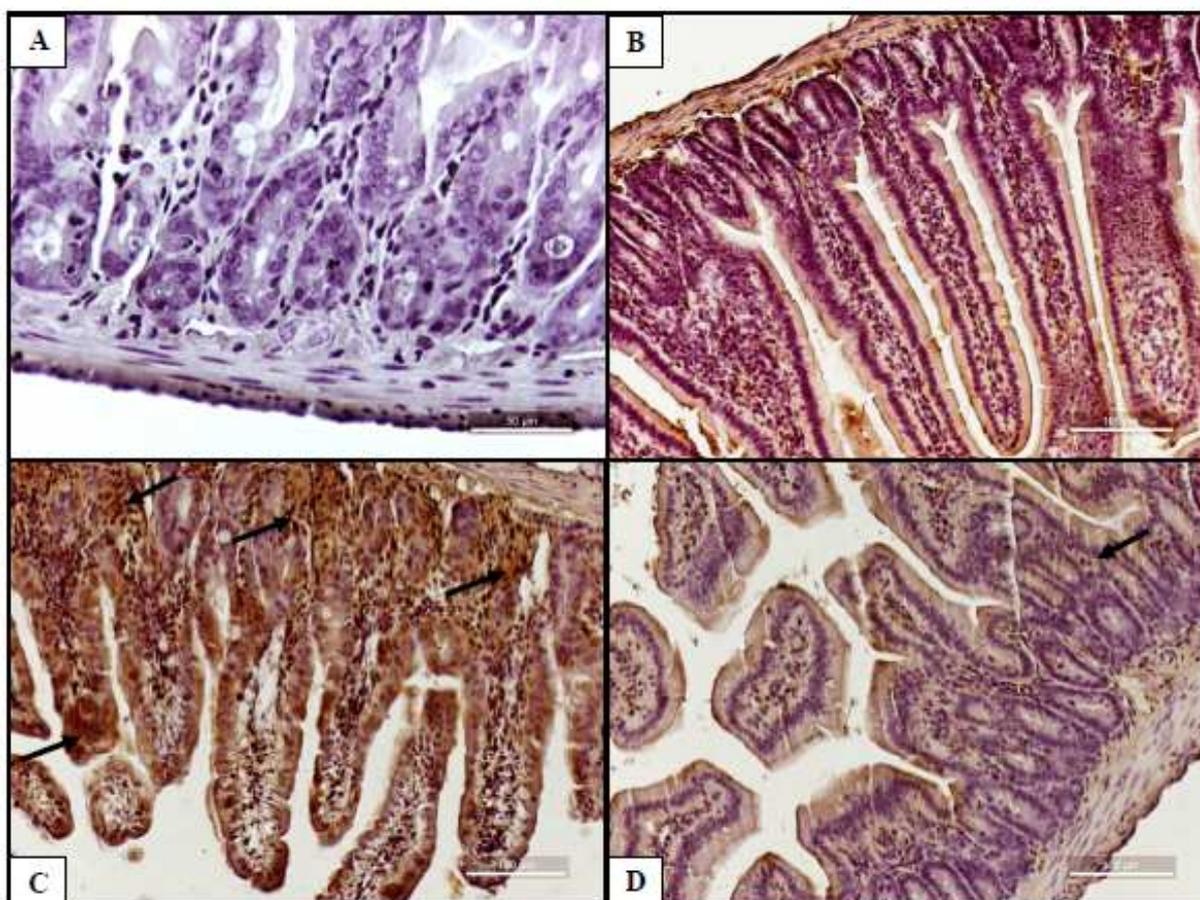


Figura 17 – O tratamento com LP diminui a imunomarcagem para TNF- α no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia, 4 dias) ou LP (5 mg/Kg, e.v. dose única um dia antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração) + Irinotecano (75 mg/kg/dia, 4 dias, i.p). No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). Painel A: Controle negativo da imunohistoquímica (ausência do anticorpo primário); Painel B: Normal; Painel C: CPT-11+Salina e Painel D: dose de 5 mg/kg. As setas indicam células marcadas.

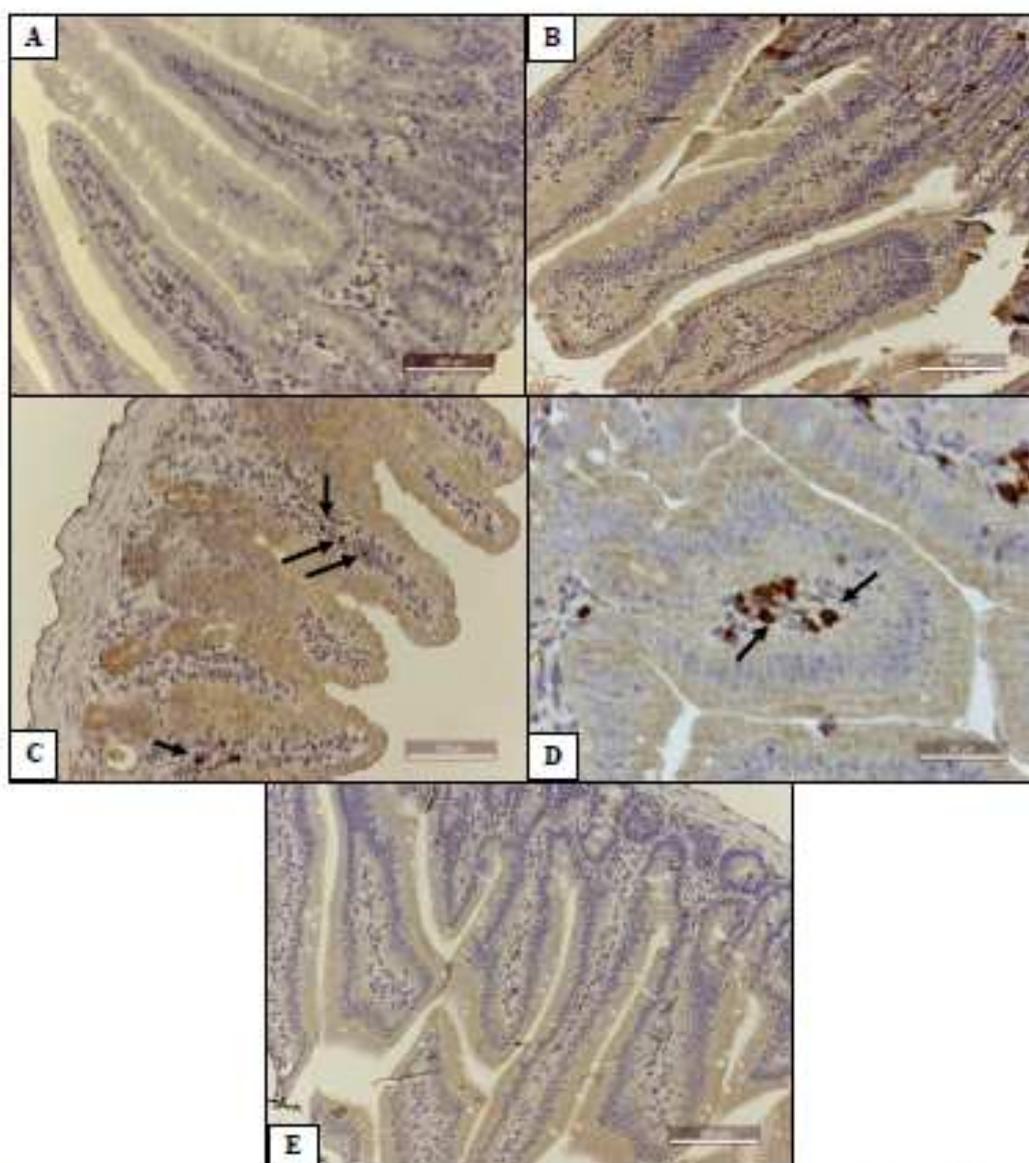


Figura 18 – O tratamento com látex de *Calotropis procera* diminui a imunomarcagem para IL-1 β no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por Irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia, 4 dias) ou LP (5 mg/Kg, e.v dose única um dia antes antes da 1ª injeção de Irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração) + Irinotecano (75 mg/kg/dia, 4 dias, i.p). No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). Painel A: Controle negativo da imunohistoquímica (ausência do anticorpo primário); Painel B: Normal; Painel C: CPT-11+Salina, Painel D: CPT-11+Salina (400x) e Painel E dose de 5 mg/kg. As setas indicam células marcadas.

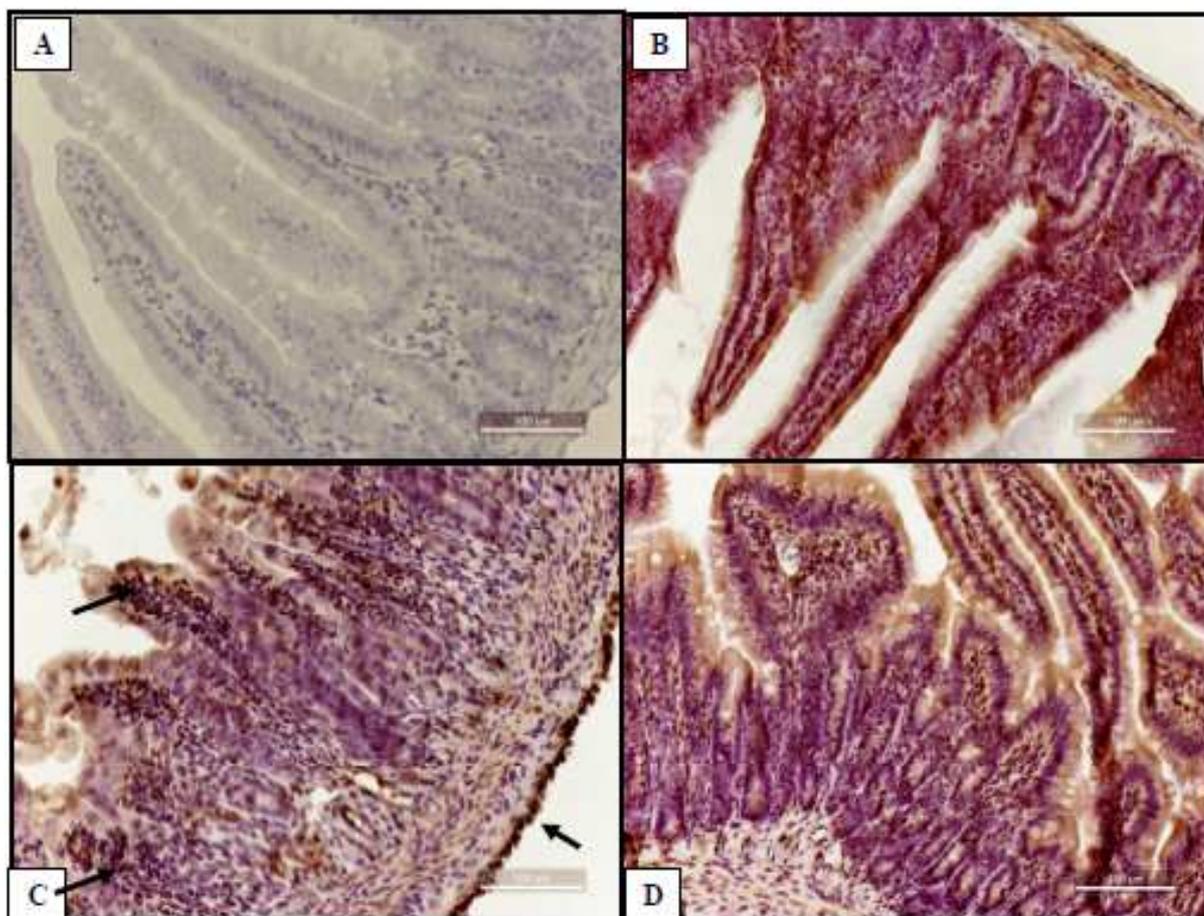


Figura 19 – O tratamento com LP diminui a imunomarcagem para COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia, 4 dias) ou LP (5 mg/Kg, e.v dose única um dia antes antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração) + Irinotecano (75 mg/kg/dia, 4 dias, i.p). No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). Painel A: Controle negativo da imunohistoquímica (ausência do anticorpo primário); Painel B: Normal; Painel C: CPT-11+Salina e Painel D: dose de 5 mg/kg. As setas indicam células marcadas.

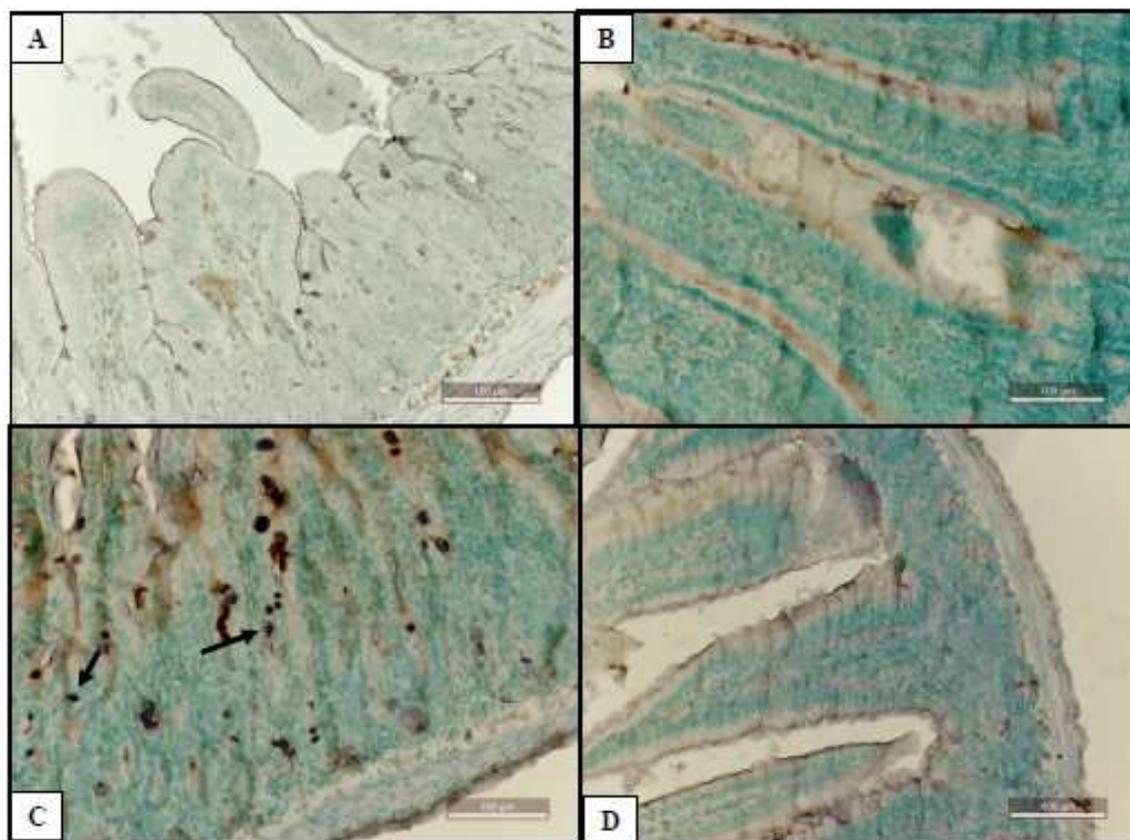


Figura 20 – O tratamento com látex de *Calotropis procera* diminui a imunomarcagem para NF- κ B no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia, 4 dias) ou LP (5 mg/Kg, e.v dose única um dia antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração) + Irinotecano (75 mg/kg/dia, 4 dias, i.p). No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). **Painel A:** Controle negativo da imunohistoquímica (ausência do anticorpo primário); **Painel B:** Normal; **Painel C:** CPT-11+Salina e **Painel D:** dose de 5 mg/kg. As setas indicam células marcadas.

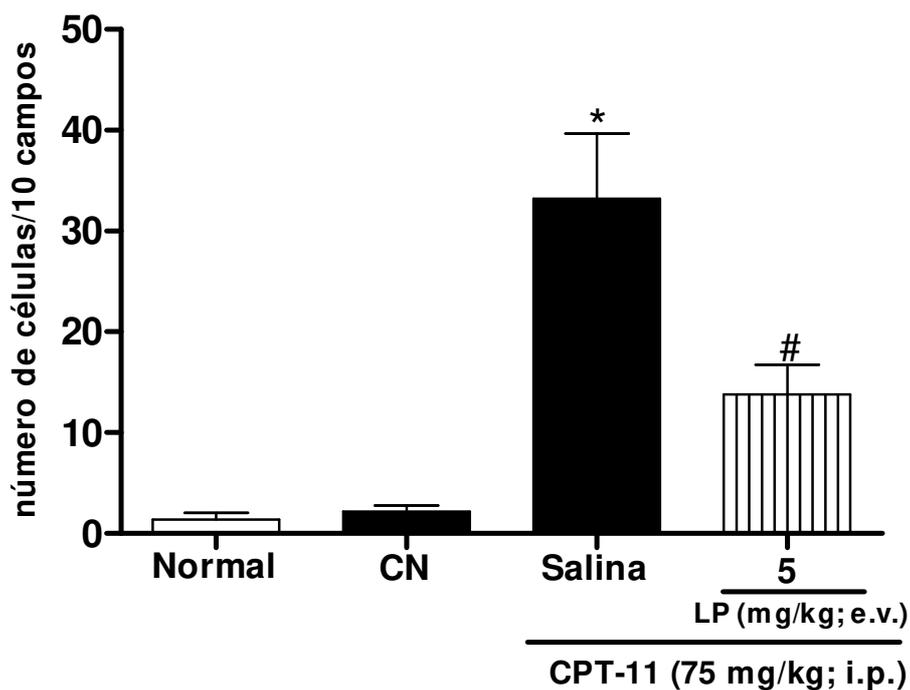


Figura 21 – O tratamento com LP diminui o número de células marcadas para NF-κB no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (5 mg/Kg, e.v. LP5 + Irinotecano (75 mg/kg, i.p), grupo LP + CPT-11. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica. O gráfico representa a média do número de células marcadas para NF-κB em 10 campos/lâmina. O controle negativo (CN, ausência de anticorpo primário) apresentou zero células marcadas.* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

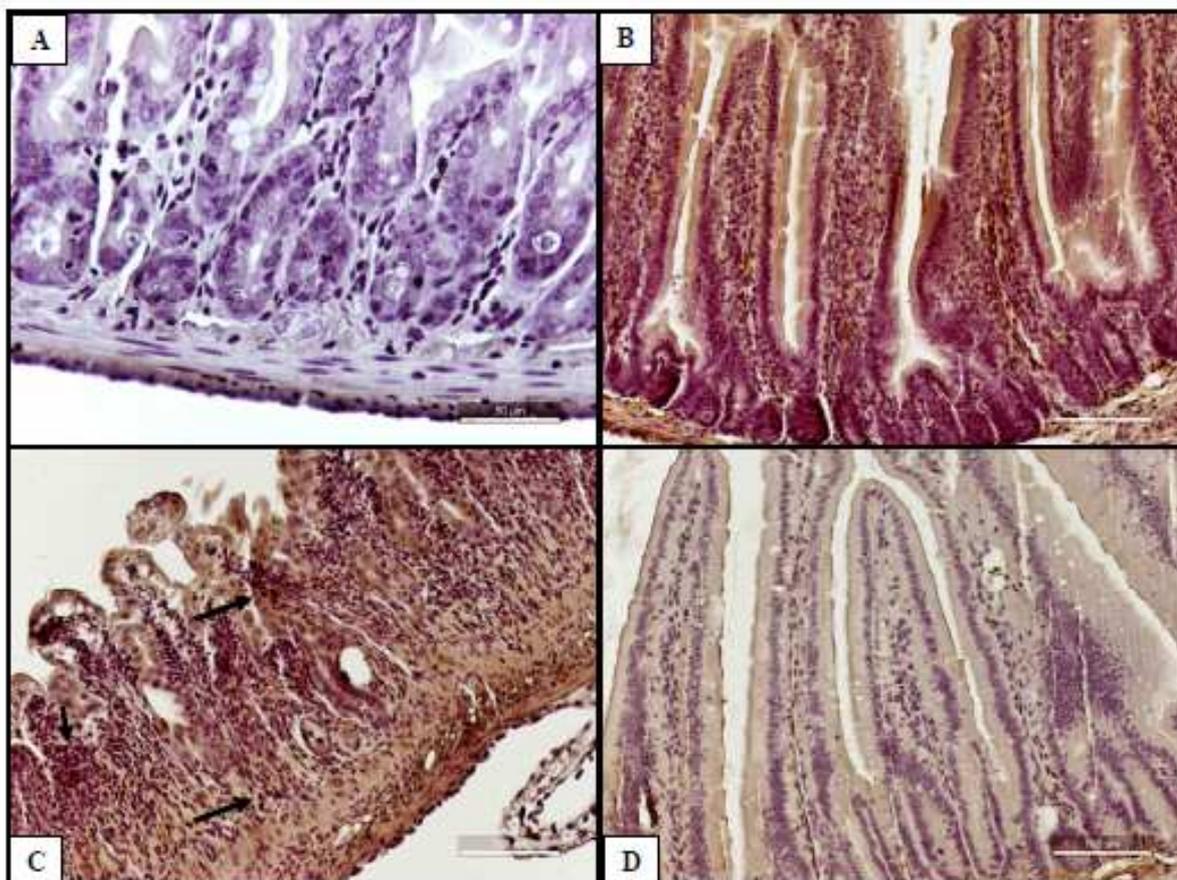


Figura 22 – O tratamento LP diminui a imunomarcção para iNOS no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia, 4 dias) ou LP (5 mg/Kg, e.v dose única um dia antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração) + Irinotecano (75 mg/kg/dia, 4 dias, i.p). No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica imunohistoquímica (200x). **Painel A:** Controle negativo da imunohistoquímica (ausência do anticorpo primário); **Painel B:** Normal; **Painel C:** CPT-11+Salina e **Painel D:** dose de 5 mg/kg. As setas indicam células marcadas.

4.7.4. LP diminui a expressão de iNOS intestinal : avaliação por Western Blot

O aumento da expressão do iNOS foi claramente detectada no duodeno dos animais submetidos a mucosite intestinal. Os animais com mucosite intestinal e tratados com LP (5 mg/kg) tiveram redução, de forma significativa, na expressão de iNOS (**Figura 23 A e B**). Vale ressaltar que pelo resultado apresentado para Western Blot, podemos inferir que LP está diminuindo a expressão de iNOS. No entanto, em virtude do nosso grupo controle (β -actina) não haver apresentado resultado satisfatório (resultados não mostrados) para a

correta interferência de LP sobre a expressão de iNOS, futuro novo experimento será necessário.

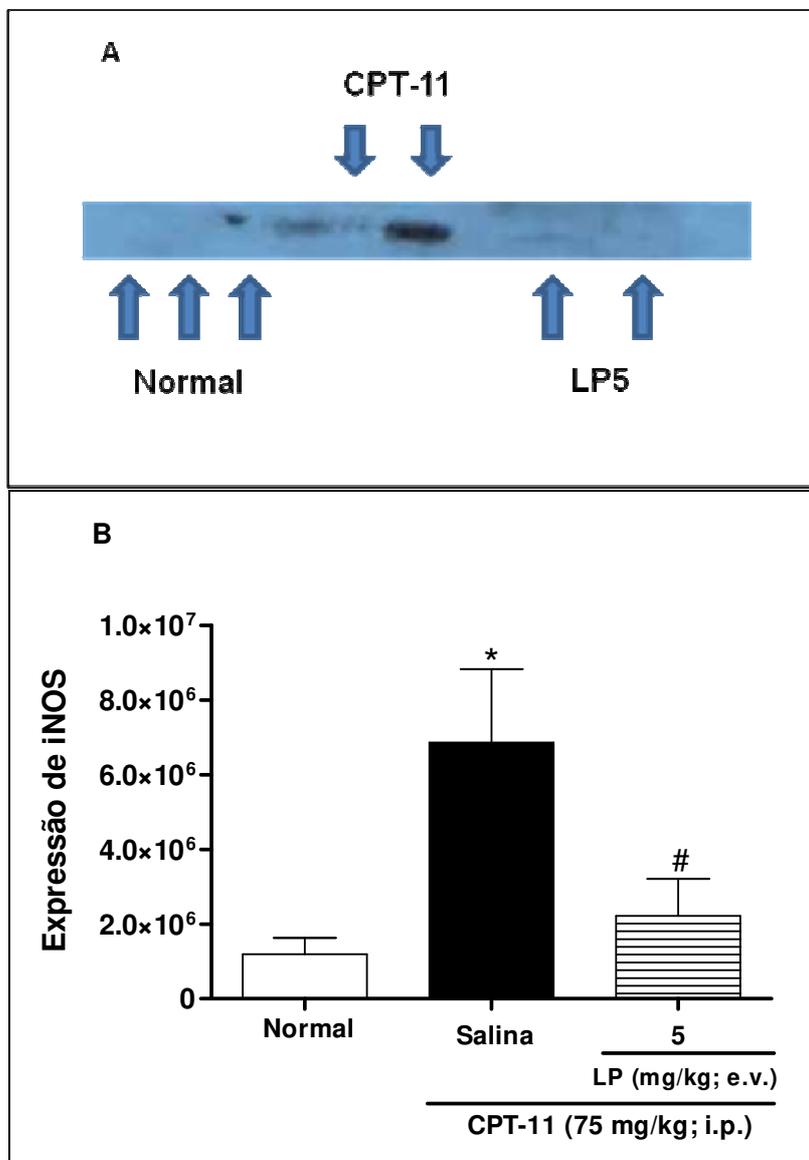


Figura 23 – Efeito do tratamento com LP na expressão de iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por irinotecano. Os animais receberam salina (Normal; 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p.+Salina; 75 mg/kg/dia) ou LP (5 mg/kg, e.v. LP5) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p). No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de Western Blot. (A), representa bandas de Western Blot para iNOS. (B), representa a média± EPM da intensidade da banda iNOS. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal (tratado somente com salina i.p.) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina+CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

A mucosite é um dos efeitos colaterais mais frequentes e limitantes da quimioterapia, envolvendo o trato gastrointestinal como um todo e causando um espectro de sinais e sintomas que variam desde dor na cavidade oral e região abdominal a vômitos e diarreia, podendo comprometer a dose e duração do tratamento (LOGAN et al., 2008). Ela é uma complicação comum, mas insuficientemente estudada associada à terapia citotóxica (ELTING et al., 2003).

A mucosite afeta quase todos os pacientes que receberam transplante de células-tronco hematopoiéticas, e uma considerável proporção dos que receberam tratamento de regimes de quimioterapia ou radioterapia (KEEFE et al., 2007; SONIS et al., 2004; TOOLEY et al., 2009).

A redução de mucosite induzida por terapia citotóxica tem sido reconhecido como um importante alvo para melhorar as terapias oncológicas, bem como para reduzir a carga econômica associada aos tratamentos oncológicos (LUTGENS et al., 2007).

Até o momento, as opções disponíveis para o tratamento da mucosite intestinal são escassas e, muitas vezes ineficientes. O guia terapêutico recomenda, para a mucosite intestinal, a utilização de ranitidina ou omeprazol para a prevenção de epigastralgia e loperamida ou octreotida para o tratamento da diarreia (KEEFE et al., 2007) opções muitas vezes ineficazes.

Recentes estudos tem sugerido o uso de *S. boulardii*, (SEZER et al., 2009), antagonistas dos receptores de serotonina (ondansetrona e ramosetrona) (YASUDA et al., 2012), peptídeo semelhante ao glucagon exógeno (KISSOW et al., 2012) e antagonistas de IL-4 (SOARES et al., 2012), podem ser novos alvos terapêuticos para esta condição.

A planta *Calotropis procera* vem recebendo atenção especial por causa das inúmeras publicações que descrevem relevantes atividades biológicas desempenhadas por moléculas provenientes da extração de diferentes tecidos ou órgãos com solvente orgânico ou aquoso. Constitutivamente, *Calotropis procera* produz látex e esta secreção é descrita por possuir propriedades bacteriolíticas, inseticida, cicatrizante e antidiarreica (LARHSINI et al., 1997; SHUKLA; MURTI, 1961; DEWAN et al., 2000; RASIK et al., 1999; KUMAR et al., 2001).

Mais especificadamente, as proteínas do látex (LP), caracterizadas bioquímica, farmacológica e imunológica por nosso grupo de pesquisa, têm sido alvo por demonstrar atividade anti-inflamatória e analgésica em diversos modelos experimentais (ALENCAR et al., 2004; SOARES et al., 2005;) e ausência de atividades toxicológicas (RAMOS et al., 2006b).

O presente estudo demonstra, de forma inédita, que proteínas do látex de *C. procera*, ausentes em borracha e separadas de moléculas de baixa massa molecular (inferior a 8.000 Da) administradas diariamente nas doses de 5 e 50 mg/Kg reduzem os danos inflamatórios causados pela mucosite intestinal experimental induzida pelo cloridrato de irinotecano. O tratamento aqui proposto foi no sentido de simular o tratamento aos indivíduos que recebem esse agente antineoplásico para tratamento de tumor, ou seja, os animais foram tratados com LP um dia antes do tratamento (tratamento profilático), durante e após o tratamento (tratamento curativo) com CPT-11.

O modelo experimental utilizado neste estudo foi inicialmente proposto por Ikuno et al. (1995) e adaptado por Melo et al. (2008). Estes últimos autores, demonstraram que administração i.p de 75 mg/kg de cloridrato de irinotecano, uma vez ao dia, durante 04 dias, provoca dano à mucosa intestinal dos animais, induzindo uma mucosite intestinal caracterizada por alterações morfofuncionais, diarreia intensa e uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), avaliados no 7^o dia após a primeira aplicação do CPT-11.

Um dos efeitos tóxicos mais severos do uso clínico do CPT-11, e que limitam o seu uso, é a diarreia tardia, que quando grave, pode limitar a eficácia do tratamento, podendo haver necessidade de redução da dose de CPT-11 ou até mesmo suspensão de sua administração (IKEGAMI et al., 2002).

Foi demonstrado neste estudo que o tratamento endovenoso dos animais com LP nas doses de 5 e 50 mg/kg, administrada antes e durante o tratamento com CPT-11, reduziu de forma eficiente e significativa a diarreia induzida pelo CPT-11. Corroborando com o efeito antidiarreico de LP, foi demonstrado também que esta fração proteica na dose de 5 mg/kg reduziu a contratilidade intestinal induzida por acetilcolina *in vitro*.

Previamente, Kumar et al., (2001) demonstraram atividade antidiarreica para o látex bruto de *Calotropis procera*, no modelo de diarreia induzida por óleo de castor em ratos *Wistar*, sendo tal atividade sobre a propulsão e secreção de fluido gastrointestinal. No entanto, tal látex apresentava-se na sua forma íntegra e não na forma purificada e isolada utilizada no presente trabalho (LP). Além do mais, o método utilizado estes autores, ao qual é determinado que o óleo de castor libera ácido recinólico, e este produz mudanças no fluido intestinal e no transporte de eletrólitos ao qual resulta em uma resposta hipersecretória seguida de diarreia, demonstrando assim que tais eventos não são de cunho inflamatório.

A diarreia relacionada com o tratamento do câncer pode envolver redução da superfície absorptiva do intestino, aumento da motilidade, mecanismos secretores de eletrólitos e fluidos, redução da atividade enzimática intestinal e aumento da colonização da parede intestinal por agentes infecciosos (ENGILKING et al., 1998).

O modelo experimental utilizado neste trabalho é proposto para estudo da diarreia tardia. A diarreia precoce, não abordada no desenvolvimento desse trabalho, ocorre geralmente com uso do CPT-11 em altas doses, em consequência do aumento da atividade colinérgica, que estimula a contratilidade intestinal, prejudicando a função absorptiva e secretora da mucosa intestinal (GANDIA et al., 1993; DODDS et al., 1999; DODDS; RIVORY, 1999).

Existem relatos que a diarreia tardia induzida pelo CPT-11 é secretória, decorrente da redução intestinal de absorção de fluidos e com a presença de componentes exsudativos (SAKAI et al., 1995, 1997; SALIBA et al., 1998). A diarreia, portanto, pode ser causada pelo transporte anormal de água e íons por falha nos mecanismos secretórios, provavelmente provocada pelas alterações das células epiteliais induzidas pelo agente quimioterápico (IKUNO et al., 1995; SALIBA et al., 1998).

Nossos achados mostraram que o tratamento com CPT-11 induziu uma destruição significativa da mucosa do duodeno, caracterizando mucosite grau 4, segundo o critério de classificação descrito por Woo et al. (2000). Observou-se achatamento acentuado dos vilos, acompanhado de uma redução significativa do tamanho e número das criptas, vacuolização de enterócitos e infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria.

Os eventos histopatológicos que acompanham a mucosite intestinal em modelo animal são idênticos aos observados em humanos. No intestino delgado sabe-se que a apoptose nas criptas ocorre desde o primeiro dia após administração da droga, precedendo a atrofia dos vilos e criptas. Estas alterações são acompanhadas pelo aparecimento dos sintomas gastrintestinais, prejuízo da absorção de monossacarídeos e aumento da permeabilidade intestinal que ocorre entre o terceiro e sétimo dia após quimioterapia (KEEFE et al., 2000).

A magnitude dos danos intestinais induzidos pelo CPT-11 foi também avaliada por morfometria (razão vilo/cripta), onde se observou redução da altura dos vilos no duodeno, bem como menor profundidade das criptas, o que reflete o efeito desta droga sobre a capacidade absorptiva do intestino. Estes resultados são semelhantes aos demonstrados em estudos anteriores sobre a fisiopatologia do modelo de mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos (MELO et al., 2008; LIMA-JUNIOR et al., 2012).

O tratamento com LP, nas doses de 5 e 50 mg/kg, apresentou redução significativa dos escores microscópicos observados na avaliação histopatológica do intestino, quando comparados aos resultados encontrados no grupo de animais com mucosite intestinal sem nenhum tratamento (grupo CPT-11). No grupo de animais tratados com LP, menos de 10% das criptas continham células necróticas ao contrário do grupo CPT-11 em que a lesão é mais extensa com perda da arquitetura de criptas e encurtamento dos vilos. Ao realizar-se a análise morfométrica nesses animais, observou-se que LP foi capaz de aumentar a razão vilo/cripta, indicativo de preservação tecidual.

Melo et al. (2008) demonstraram que talidomida e pentoxifilina foram capazes de reduzir significativamente a gravidade da lesão intestinal induzida por CPT-11, mas que somente a pentoxifilina foi capaz de reduzir a diarreia em detrimento da talidomida, pois esta última é um inibidor específico de TNF- α . Carneiro-Filho et al. (2004b) evidenciaram que glutamina, e especialmente a alanil glutamina, têm efeitos expressivos na proteção da mucosa intestinal contra a agressão por outro agente quimioterápico, o 5-Fluorouracil.

Outro aspecto observado neste estudo foi a variação da perda ponderal do peso dos animais tratados com LP e submetidos à mucosite. Nas três doses estudadas LP não foi capaz de reverter a perda ponderal induzida pelo CPT-11.

Apesar de LP ter, conforme já descrito, apresentado evidencia de preservação tecidual intestinal, esse não foi capaz de prevenir a perda de peso dos animais.

Similarmente, a glutamina, e especialmente a alanil glutamina, também não foram capazes de preservar a perda de peso dos animais, apesar de terem efeitos expressivos na proteção da mucosa intestinal (CARNEIRO-FILHO et al., 2004b).

No entanto, outros estudos demonstram preservação do peso corporal de animais submetidos a diferentes tratamentos. Ratos Sprague-Dawley submetidos a mucosite intestinal por CPT-11 (60 mg/kg/04 dias e.v.), mas pré-tratados com *S. boulardii* (800 mg/kg) por via oral, demonstraram de forma significativa, menor perda de peso comparado aos animais que receberam apenas CPT-11 (SEZER et al., 2009). Antagonistas dos receptores de serotonina (ondansetrona e ramosetrona) também demonstraram uma significativa preservação da redução de massa corpórea de animais (C57BL/6) em modelo de mucosite induzida por 5-fluorouracil (YASUDA et al., 2012).

Portanto, um possível fato, mas que merece investigação futura, poderia se supor que devido ao alto catabolismo metabólico causado pelo CPT-11 e seus metabolitos tóxicos, isto poderia estar provocando a perda de peso nos animais tratados com LP apesar da preservação tecidual e diminuição significativa da diarreia.

No decorrer da presente investigação, observou-se, ainda, que o irinotecano foi capaz de provocar leucocitose e neutropenia significativa e que as doses de LP utilizadas não foram capazes de alterar esses achados.

O modelo utilizado no presente trabalho, corrobora com estudos clínicos, que demonstram alta incidência (30 a 36%) de leucopenia, particularmente neutropenia grau 3 e 4 (ENZINGER et al., 2005; PEREZ et al., 2004; VAMVAKAS et al., 2002). Experimentalmente, o número de neutrófilos e linfócitos no sangue foi reduzido significativamente em ratos tratados com CPT-11 (YANG et al., 2006). Sabe-se que a mielossupressão juntamente com a toxicidade gastrointestinal é um dos efeitos colaterais que mais preocupam no tratamento com CPT-11 pelo risco de septicemia (ALIMONTI et al., 2004).

Vale ressaltar que a presença de leucopenia demonstra que o efeito do CPT-11 permanece a despeito das observações, de inibição sobre o desenvolvimento da mucosite por LP no modelo utilizado. Isso evidencia que as

ações não eram ocasionadas pela perda da atividade do irinotecano, mas sim de uma ação realmente moduladora de LP sobre a atividade inflamatória nesse modelo. Oliveira et al. (2007) verificaram, *in vitro*, que sangue periférico humano de indivíduos saudáveis exposto a LP por 72 h não se evidenciou efeitos sobre a viabilidade ou morfologia celular, ou seja, ausência de toxicidade celular.

Fato interessante no tocante aos leucócitos sanguíneos foi observado por Oliveira et al. (2010) em modelo de estudo *in vivo* de sarcoma 180 ao qual foi demonstrado que LP impediu a leucopenia e neutropenia provocada pelo tratamento dos animais com 5-fluorouracil. Este resultado sugeriu que proteínas do látex poderiam atuar estimulando o sistema imune. Esta hipótese foi confirmada através de trabalho publicado por Lima-Filho et al. (2010) ao qual observou que o tratamento dos animais com LP, por via i.p., os protegeu da infecção letal promovida por *Salmonella enterica*. Os autores ainda mostraram que as proteínas não inibiram o crescimento das bactérias *in vivo* e *in vitro*, mas protegeu os animais do choque séptico. Outro trabalho recente do grupo de pesquisa que reforçou essa ideia foi publicado por Oliveira et al. (2012), que verificou que a subfração (LPPI) de LP aumentou a fagocitose e equilibrou a liberação de NO no sangue, prevenindo o choque séptico induzido por *S. enterica*. No entanto, o possível efeito imunoestimulante de LP permanece por ser investigado em mais detalhes.

Diante desses achados de Oliveira et al. (2010), pode-se supor que LP poderia ainda atuar como agente protetor no tratamento de pacientes com 5-FU. O efeito protetor de LP foi anteriormente demonstrado por Alencar et al. (2004) no qual camundongos tratados com LP não desenvolveram cistite hemorrágica induzida por ifosfamida sendo esta um agente anticâncer de uso humano que tem como efeito colateral a indução de inflamação na bexiga (cistite). Apesar de a injeção de LP, por via i.p., supor uma estimulação imune a via utilizada no presente trabalho e o produzido por Alencar et al. (2004) foi a endovenosa ao qual demonstrou atividade anti-inflamatória.

No modelo experimental aqui utilizado, CPT-11 também induziu aumento significativo de mortalidade. No oitavo dia apenas 42% dos animais apresentaram taxa de sobrevivência. Os animais tratados com LP nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg apresentaram taxas de sobrevivência de 75% para a dose de 5 mg/kg a partir do sétimo dia e 75% para a dose de 50 mg/kg a partir do oitavo dia.

Esses achados justificam com os efeitos protetores evidenciados pelo LP até aqui discutidos.

Mortalidade significativa com uso do CPT-11 também foi observada por Gibson et al. (2003), que relataram mortalidade proporcional à dose administrada.

Neste trabalho, em até 96 horas, a administração de dose única de 100 mg/kg em

ratos não induziu nenhuma morte. Entretanto, em até 96 horas, quando se injetou uma dose de 150 mg/kg, 50% dos animais morreram; e no grupo em que foi utilizado a dose de 200 mg/kg, a mortalidade foi de 100%. Na autópsia, observou-se peritonite e perfuração duodenal como causa *mortis*. Alta mortalidade com o tratamento com CPT-11 também foi observada por Cao et al. (1998), os quais referiram que 86% dos ratos tratados com 200 mg/kg, durante três dias consecutivos, morreram até o 12º dia, sendo que apenas 7% destes animais recuperaram-se da diarreia e sobreviveram.

Publicações recentes demonstraram que LP promoveu aumento de sobrevida em modelo de sepse letal induzida por *Salmonella entérica* quando administrado por via i.p. e previamente (24 antes) a infecção (LIMA-FILHO et al., 2010) e também quando administrado, por via oral, preveniu de forma significativa a morte dos animais no modelo de sarcoma 180 (OLIVEIRA et al., 2010).

A mieloperoxidase é uma enzima microbicida e representa 2 a 5% do total de proteínas celulares presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo amplamente utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado (BOS et al., 1978; BRADLEY et al., 1982). Neste estudo, demonstrou-se o efeito inibidor de LP na resposta inflamatória induzida pelo CPT-11, através da diminuição da atividade da mieloperoxidase no duodeno dos animais submetidos a mucosite, pelo tratamento destes com LP nas duas maiores doses testadas. Este achado é acrescido pelo encontrado na avaliação histopatológica do duodeno dos animais, onde se demonstrou uma redução da infiltração de neutrófilos no grupo de animais com mucosite e tratados com LP.

A combinação da injúria epitelial com a infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal, confirma a hipótese da fase inflamatória no processo patológico da mucosite documentado por Sonis em vários estudos (SONIS, 2004, SONIS et al., 2004) e descrito por Duncan e Grant (2003), Melo et al. (2008). Assim, a mucosite induzida por agentes quimioterápicos provoca destruição de células

epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (SONIS et al., 2004; RUBEINSTEIN et al., 2004). Os neutrófilos representam um componente central da resposta imune, que é importante nos mecanismos como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de mediadores inflamatórios (REAVES et al., 2005).

Desta forma, o efeito de LP aqui demonstrado consiste com vários estudos que evidenciam efeito anti-inflamatório de LP em diferentes modelos animais (ALENCAR et al., 2004; KUMAR et al., 2011; RAMOS et al., 2009).

Estudo prévio reporta que a administração intravascular de LP e suas frações purificadas significativamente reduzem o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório por inibir o rolamento e adesão de neutrófilos através de microscopia intravital (RAMOS et al., 2009) e que parece ser modulada por NO, uma vez que seus níveis encontram-se elevados nos animais tratados com LP. Vários mecanismos podem estar envolvidos nesta atividade anti-inflamatória. Uma possibilidade é o efeito direto sobre a migração de neutrófilos através da supressão dos receptores de citocinas (McCOLL; CLARK-LEWIS, 1999). Outra, descrita por alguns autores, têm sugerido que a migração de neutrófilos induzida por IL-1 β e TNF- α não é causada por um efeito direto sobre neutrófilos, mas ocorre via liberação de fatores quimiotáticos de macrófagos residentes (FACCIOLI et al., 1990).

Tem sido demonstrado que as citocinas regulam e amplificam a resposta imune, induzem injúria tecidual e intermedeiam complicações como a diarreia. Citocinas inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α estimulam a secreção de outras citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e proteases por macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, fibroblastos e células epiteliais (SARTOR, 1994). Williams (2001) reportou que citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-2 contribuem para a severidade e manutenção da injúria na mucosite intestinal. Conforme já descrito por Melo et al (2008) evidenciaram que TNF- α , IL-1 β e KC (IL-8) estão envolvidos na patogênese da mucosite intestinal, pois seus níveis encontram-se aumentados, principalmente no sétimo dia mas quando os animais são pré-tratados com talidomida ou pentoxifilina, inibidores da síntese de TNF- α , seus níveis encontram-se significativamente reduzidos.

Assim, dando continuidade a investigação do mecanismo pelo qual LP diminui a resposta inflamatória na mucosite intestinal induzida por CPT-11, foi

avaliado a correlação desta fração com a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado que LP reduz os níveis de TNF- α e IL-1 β na mucosa intestinal dos animais submetidos à mucosite por CPT-11.

Portanto, para confirmarmos a hipótese de que LP modula o processo inflamatório na mucosite intestinal por inibir/controlar mediadores inflamatórios, foi investigado também sua ação sobre a expressão de TNF- α , IL-1 β , COX-2, NF- κ B e iNOS por imunohistoquímica no duodeno dos animais submetidos a mucosite intestinal. Foi demonstrado que LP reduziu significativamente a expressão desses mediadores. Freitas et al. (2012) demonstraram que LP, na mesma dose utilizada no presente trabalho (5 mg/kg), foi capaz de diminuir a imuno expressão de TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS no modelo de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters.

Na cascata da inflamação, IL-1 β e TNF- α estimulam a transcrição do gene de COX-2 (AKARASEREENONT et al., 1995; DIAZ et al., 1998). Alguns estudos referem que prostaglandinas participam no curso evolutivo da mucosite oral (SONIS et al., 2004; SONIS, 2004; LOGAN et al., 2007) e mucosite intestinal (SAKAI et al., 1995 e 1997; YEOH et al., 2005).

O NF- κ B é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição. NF- κ B pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvida na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antigénios virais e bacterianos (GILMORE, 1999). NF- κ B desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. Consistente com este papel, a regulação incorrecta de NF- κ B tem sido ligada ao cancro, a doenças inflamatórias e auto-imunes, choque séptico, infecção viral e também a desenvolvimento imunitário impróprio. NF- κ B também tem sido implicado em processos de plasticidade sináptica e memória (ALBENSI; MATTSON, 2000).

NF- κ B parece ser o condutor importante no curso da mucosite, pois modifica a expressão de citocinas e enzimas. Sua ativação resulta em *upregulation* de uma variedade de genes e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e de COX-2 (KEIFER et al., 2001; SONIS et al., 2004; SONIS, 2004; YEOH et al., 2005; LOGAN et al., 2007). Sabe-se que a inibição de NF- κ B melhora a inflamação (KEIFER et al., 2001).

Outros estudos também sugerem que a ativação do NF- κ B, tanto pelos agentes quimioterápicos como pela radioterapia, é um elemento chave na gênese da mucosite. A regulação positiva de outros genes resulta na expressão de moléculas de adesão, ativação da via da COX-2 e, conseqüente angiogênese (SONIS et al., 2004, 2006).

Desta forma, LP reduziu consideravelmente a imunomarcagem de quatro importantes mediadores (TNF- α , IL-1 β , COX-2, NF- κ B) envolvidos na mucosite intestinal.

Está bem estabelecido que citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 são potentes indutores de iNOS em grande variedade de tipos celulares, com conseqüente produção de NO.

O efeito de NO sobre a função e injúria intestinal varia de benéfico a prejudicial. A atividade de iNOS tem sido associada com o aumento da apoptose (MESSMER et al., 1994), e citotoxicidade (BECKMAN, 1996) o que parece ser dependente da dose, em alta concentração o NO promove danos no DNA (NGUYEN et al., 1992). Além disso, elevados níveis de NO são associados com lesão intestinal e perda de função da barreira intestinal. Xu et al.(2002) demonstraram que o NO pode diretamente aumentar o dano a membrana da mucosa ileal e permeabilidade na monocamada do enterócito, bem como a translocação bacteriana, e que o aumento de NO, via iNOS, são associados com a indução de citocinas e/ou endotoxinas que levam a perda da função da barreira intestinal.

Alguns estudos demonstram a participação de NO, via iNOS, na mucosite intestinal. Leitão et al. (2011) demonstraram o envolvimento de NO na mucosite intestinal induzida por metrotexato, uma vez que aminoguanidina e L-NAME, inibidores da síntese de NO, reduziram dano tecidual e parâmetros inflamatórios no modelo. Lima-Júnior et al. (2012) demonstraram o papel do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por irinotecano e também forneceu evidência na participação de citocinas na indução de iNOS uma vez que infliximabe (anticorpo anti-TNF- α) e pentoxifilina significativamente inibiram a expressão de iNOS induzida por irinotecano.

Assim, LP foi capaz de reduzir a imunoexpressão de iNOS no duodeno de animais submetidos a mucosite intestinal por CPT-11 e para confirmar a participação de NO no efeito anti-inflamatório de LP no modelo de mucosite, foi

investigado a sua expressão por Western Blot. Neste último modelo, como resultado observou-se que houve tendência de LP em reduzir a expressão de iNOS (confirmando o resultado da diminuição da imunexpressão) quando comparado aos animais que somente receberam CPT-11. Vale ressaltar que o resultado aqui demonstrado para iNOS no modelo de Western Blot não foi evidente, e sim sugestivo, uma vez que não foi possível obter resultado satisfatório com o controle β -actina.

Estudo prévio, demonstrou que LP e uma suas subfrações (LPPI), por via e.v., induziram a produção de NO no soro de animais no modelo de peritonite induzido por carragenina e que o tratamento dos animais com aminoguanidina (inibidor específico da iNOS) reverteu esse efeito, sugerindo efeito anti-inflamatório de LP (RAMOS et al., 2009) o que pode corroborar com nossos resultados, uma vez que LP utilizado nesse trabalho foi administrado por via endovenosa. Relata-se que o NO é uma molécula envolvida no processo de migração celular na resposta inflamatória, que em alta quantidade no soro, suprime a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular (DAL SECCO et al., 2003; KUBES et al., 1991; PENG et al., 1998)

Por fim, sugere-se que LP modula a resposta inflamatória na mucosite intestinal induzida por CPT-11, por inibir as alterações morfofuncionais, inflamatórias e funcionais (diarreia) associadas à mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos. Além do mais LP parece modular a expressão/ação de importantes mediadores inflamatórios envolvidos nessa patogênese.

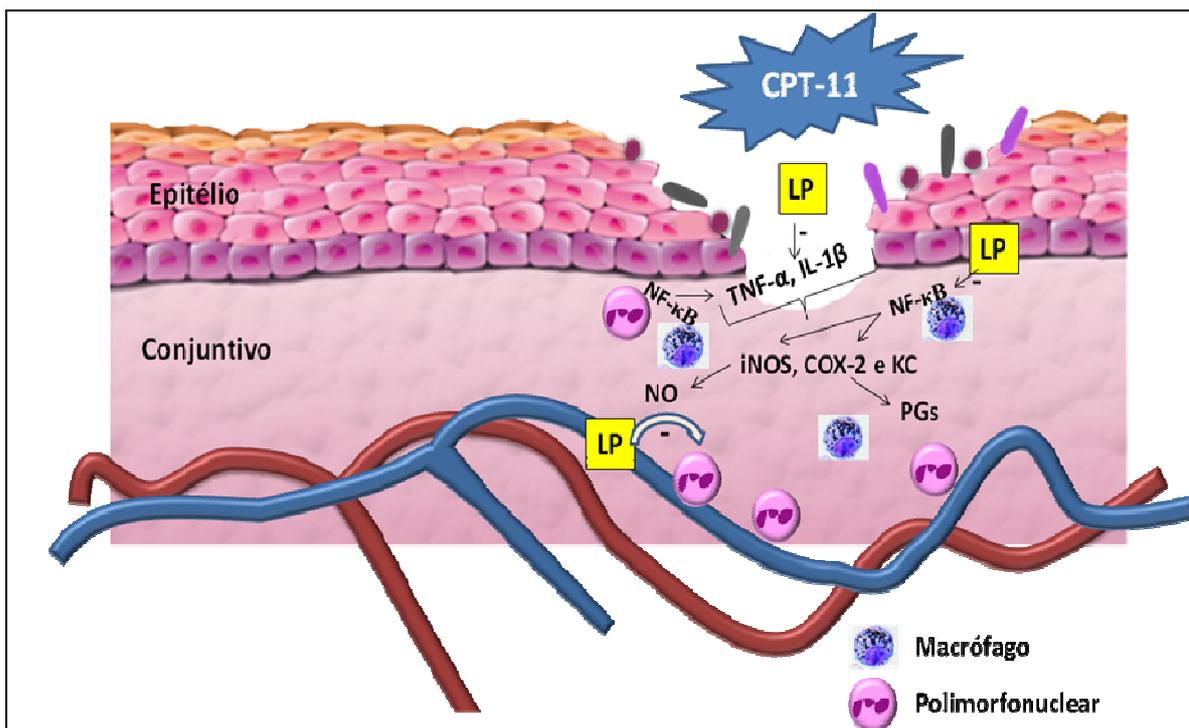


Figura 24 – Modelo hipotético proposto para a ação de LP na mucosite intestinal. LP atua inibindo a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, corroborando com Ramos et al. (2009), e parece exercer ação sobre mediadores tais como: TNF- α , IL-1 β , COX-2, NF- κ B e iNOS uma vez que diminuiu a imunexpressão desses mediadores. Portanto, LP inibe alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais (diarreia) associadas à mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos.

6. CONCLUSÃO

A fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* atenuou a progressão da resposta inflamatória intestinal no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, por:

- Prevenir as alterações morfológicas, histológicas e funcionais, através da análise morfométrica, histopatológica, avaliação do grau de diarreia e motilidade intestinal *in vitro*.
- Promover aumento de sobrevivência dos animais;
- Diminuir os níveis de duas importantes citocinas (TNF- α e IL-1 β) no duodeno;
- Reduzir a expressão de citocinas (TNF- α e IL-1 β), enzimas (COX-2 e iNOS) e fator de transcrição nuclear (NF- κ B) envolvidos nessa patogênese.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AKARASEREENONT, P.; BAKHLE, Y. S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 3, p. 401-408, 1995.
- ALBENSI, B. C.; MATTSON, M. P. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappa B in hippocampal synaptic plasticity. **Synapse**, v. 35, p.151–159, 2000.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. 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.
- ALENCAR, N. M. N.; FIGUEREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in: Three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Plant. Med.**, v. 7, p. 1144-1149, 2004.
- ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRETTI, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; PALMA, M. D. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer. Treat. Rev.**, v. 30, p. 555-562, 2004.
- APOSTOLIDOU, E.; ESTEY, E.; CORTES, J.; GARCIA-MANERO G.; FADERL, S. THOMAS, D.; TSIMBERIDOU, A.; KANTARIJIAN, H.; GILES, F. J. Mitoxantrone and prolonged infusion gemcitabine as salvage therapy in patients with acute myelogenous leukemia. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 4, p. 301-4, 2003.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1445-51, 1991.
- ARYA, S.; KUMAR, V. L. (2005) Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228-232, 2005.
- ATAL, C. K.; SETHI, P.D. Proteolytic activity of some Indian plants. III. Pharmacological evaluation of calotropin from *Calotropis procera*. **Indian J. Pharm.**, v. 24, p. 131–134, 1961.
- BECKMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol**, v., 9, p. 836–844,1996.
- BHARTI, S.; WAHANE, V. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 440-444, 2010.

- BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis, **Ann Oncol.**, v. 18, n. 5, p. 817-826, 2007.
- BOEHMER, C. H.; JAEGER, W. Capecitabine in treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 1A, p. 439-43, 2002.
- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **J. Leukocyte Biol.**, v. 55, p. 227-233, 1994.
- BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J. T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H.- P. Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinetics. **New York: Marcel Dekker.**, cap. 4, p. 235-61, 1999.
- BOS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochim Biophys Acta**, v.525, p.37-44, 1978.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; CUMMINS, A. G.; TYSKIN, A. KEEFE, D. M. K. Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, n. 3, p. 337-48, 2007.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support. Care Cancer**, v. 14, n. 7, p. 713-731, 2006.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v.60, p.618-622, 1982.
- BRAGA-NETO, M. B.; WARREN, C. A.; ORIA, R. B.; MONTEIRO, M. S.; MACIEL, A. A. S.; BRITO, G. A. C.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Alanyl-Glutamine and Glutamine Supplementation Improves 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Epithelium Damage In Vitro. **Dig Dis Sci.**, v.53, p. 2687–2696, 2008.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 175-195, 1994.
- BROCKBANK, W. J.; LYNN, K. R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochim. Biophys. Acta.**, v.578, p.13-22, 1979.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINONOFF, P. B. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, s. 10, p. 1040-1093, 2003.
- CALABRESE, E. J. Nitric oxide: biphasic dose responses. **Crit Rev Toxicol**, v. 31, p. 489-501, 2001.

CAO, S.; BLACK, J. D.; TROUTT, A. B.; RUSTUM, Y. M. Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model. **Cancer Res.**, v. 58, p. 3270-4, 1998.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, L. P. F.; ARAÚJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M. N.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digest. Dis. Sci.**, v. 49, p. 65-72, 2004a.

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

CHESTER, J.D.; JOEL, S. P.; CHEESEMAN, S. L.; HALL, G. D.; BRAUN, M. S.; PERRY, J.; DAVIS, T.; BUTTON, C. J.; SEYMOUR, M. T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 6, p. 1125-1132, 2003.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR, V. L., KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.

CHOWBAY, B.; SHARMA, A.; ZHOU, Q.-Y.; CHEUNG, Y. B.; LEE, E. J. D. The modulation of irinotecan-induced diarrhoea and pharmacokinetics by three different classes of pharmacologic agents. **Oncol. Rep.**, v. 10, p. 745-751, 2003.

CHU, E. Drug development. In: DEVITA Jr., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles and practice of oncology, pancreatic cancer**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, cap. 8, s. 1, p. 195-204, 2005.

COCKCROFT, J.R. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. **AJH**, v. 18, p. 177S-183S, 2005.

CUNHA, F. Q.; BOUKILI, M. A.; MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B.; FERREIRA, S.H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, p. 47-52, 1993.

CUNNINGHAM, D.; PYRHONEN, S.; JAMES, R. D. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluoruracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet**, v. 352, p. 1413-8, 1998.

DAL SECCO, D.; PARON, J. A.; OLIVEIRA, S. H. P.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 153-164, 2003.

DE KONING, B. A. E.; VAN DIEREN, J. M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J.; VAN DER SLUIS, M.; MATSUMOTO, T.; YAMAGUCHI, K.; EINERTHAND, A. W.; SAMSOM, J. N.; PIETERS, R.; NIEUWENHUIS, E. E. S. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int. Immunol.**, v. 24, p. 1-9, 2006.

DELTA UNIVERSAL (1982) 4^a ed. Rio de Janeiro, editora Delta, 1394 p.

DELHASE, M.; KARIN, M. The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**, v.64, p.491-503, 1999.

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

DIAZ, A.; CHEPENIK, K. P.; KORN, J. H.; REGINATO, A. M.; JIMENEZ, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 in human lung fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, v. 241, p. 222-229, 1998.

DODDS, H. M.; HANRAHAN, J.; RIVORY, L. R. The inhibition of acetylcholinesterase by irinotecan and related camptothecins: key structural properties and experimental variables. **Anticancer Drug Des.**, v. 16, n. 4-5, p. 239-246, 2001.

DODDS, H. M.; RIVORY, L. P. The mechanism for inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 1346-1353, 1999.

DODDS, H. M.; BISHOP, J.; J. F.; RIVORY, L. P. More about: irinotecan-related cholinergic syndrome induced by coadministration of oxaliplatin. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n.1, 1999.

DOODS, H. M.; HAAZ, M.-C.; RIOU, J.-F.; ROBERT, J.; RIVORY, L. P. Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 286, n. 1, p. 578-583, 1998.

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. Ther.**, v. 18, p. 853-874, 2003.

EIN GEDI. **Flowers in Israel**. Disponível em: <http://www.flowersinisrael.com/Calotropisprocera_page.htm>. Acesso em: 05 Nov. 2012.

EL-BADWI, SAMIA, M. A. B., ADAM, S. E. I., SHIGIDI, M. T., HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex

giving by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v.105, p.425-427, 1998.

ELTING, L. S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S. B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E. B.. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**. v.98, p.1531-1539, 2003.

ELTING, L. S.; BODEY, G. P.; KEEFE, B. H. Septicemia e shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 1201-1207, 1992.

ENDRESS, M. E. & BRUYNS, P. V. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, v.66, p.1-56, 2000.

ENGELKING, C.; RUTLEDGE, D. N.; IPPOLITI, C.; NEUMANN, J.; HOGAN, C.M. Cancer related diarrhea: a neglected cause of cancer-related symptom distress. **Oncol Nurs Forum**, v. 25, p. 859-860, 1998.

ENZINGER, P. C.; KULKE, M. H.; CLARK, J. W.; RYAN, D. P.; KIM, H.; EARLE, C. C.; VINCITORE, M. M.; MICHELINI, A. L.; MAYER, R. J.; FUCHS, C. S. A. phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 12, p. 2218-23, 2005.

FACCIOLI L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Ag. Actions.**, v. 30, p344–349, 1990.

FONG, Y.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 55, p. 157-170, 1990.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN.**, v. 12 (4), p. 325-331, 1988.

FREITAS, A. P. F.; BITENCOURT, F. S.; BRITO, G. A. C.; ALENCAR, N. M. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; RAMOS, M. V.; VALE, M. L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.** In press, DOI 10.1007/s00210-012-0778-3, 2012.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol. Biochem.**, v.49, p.738-743, 2011.

FREITAS, H. C. Envolvimento da interleucina-18 (IL-18) na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11). 2007, 104f.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO N. M. R.; SALES M. P.; VILLAS-BOAS L. A.; RAMOS M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.45, p.781-789, 2007.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L. M. S.; SILVEIRA, E. R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v.73, p.263-265, 2002.

GANDIA, D.; ABIGERGES D.; ARMAND, J.-P.; CHABOT, G.; DA COSTA, L.; DE FORNI, M.; MATHIEU-BOUE, A.; HERAIT, P. CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients (letter). **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 196-197, 1993.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer**, v. 14, n. 9, p. 890-900, 2006.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R. B.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 1095-100, 2003.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; CLARKE, J. M.; REGESTER, G. O.; THOMPSON, F. M.; GOLAND, G. J.; EDWARDS, B. G.; CUMMINS, A. G. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 53-8, 2002.

GILMORE, T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, p. 6842–6844, 1999.

GUPTA, E.; WANG, X.; RAMIREZ, J.; RATAIN, M. J. Modulation of glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by valproic acid and phenobarbital. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 39, p. 440-4, 1997.

HAAZ, M. C.; RIVORY, L.; JANTET, S.; RATANASAVANH, D.; ROBERT, J. Glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by human hepatic microsomes. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 80, n. 2, p. 91-96, 1997.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? the secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**, v.13, p.631-639, 2008.

HAN, X.; FINK, M.P.; DELUDE, R.L. Proinflammatory cytokines cause NO* dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. **Shock**, v. 19, p. 229-237, 2003.

HAWKER, P. C.; MCKAY, J. S.; TURNBERG, L. A. Electrolyte transport across

colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 79, p. 508-511, 1980.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2: 10 years later. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, n. 2, p.367-74, 2002.

HUSSEIN, H. T.; KAMEL, A.; ABOUT-ZEID, M.; EL-SEBAE, A. K. H.; SALEH, M. A. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **J. Chem. Ecol.**, v.20, p.135-140, 1994.

HUXFORD, T.; HUANG, D. B.; MALEK, S.; GHOSH, G. The crystal structure of the I κ B α /NF κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B Inactivation. **Cell**, v.95, p.759-770, 1998.

IKEGAMI, T.; HA, L.; ARIMORI, K.; LATHAM, P.; KOBAYASHI, K.; CERYAK, S.; MATSUZAKI, Y.; BOUSCAREL, B. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. **Cancer Res.**, v. 62, n. 1, p. 179-187, 2002.

IKUNO, N.; SODA H.; WATANABE M.; OKA M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 1876-1888, 1995.

KEEFE, D.M.; SCHUBERT, M. M.; ELTING, L. S.; SONIS, S. T.; EPSTEIN, J. B.; RABER-DURLACHER, J.E.; MIGLIORATI, C.A.; MCGUIRE, D.B.; HUTCHINS, R.D.; PETERSON, D.E. Mucositis study section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guideline for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, 109(5):820-831, 2007.

KEEFE, D. M. K.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, p. 632-637, 2000.

KEIFER, J. A.; GUTTRIDGES, D. C.; ASHBURNER, B. P.; BALDWIN Jr., A. S. Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22382-7, 2000.

KIMATA, H. Increased incidence of latex allergy in children with allergic diseases in Japan. **Public Health**, v. 119, p. 1145-1149, 2005.

KIRTIKAR, K. R., BASU, B. D. **Indian medicinal plants**. Lolit Mohan Basu, Allahabad, p.1606, 1935.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: editora BASF, 2.ed., p.978, 1999.

KISSOW, H.; VIBY, N.E.; HARTMANN, B.; HOLST, J.J.; TIMM, M.; THIM, L.; POULSEN, S.S. Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) prevents chemotherapy-induced mucositis in rat small intestine. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.70, p. 39–48, 2012.

KOYAMA, S.; RENNARD, S. I.; LEIKAUF, G. D.; SHOJI, S.; VON ESSEN, S.; CLAASEN, L.; ROBBINS, R. A. Endotoxin stimulates bronchial epithelial cells to release chemotactic factors for neutrophils: a potential mechanism for neutrophil recruitment, cytotoxicity, and inhibition of proliferation in bronchial inflammation. **J. Immunol.**, v. 147, p. 4293-4301, 1991.

KOIZUMI, F.; KITAGAWA, M.; NEGISHI, T.; ONDA, T.; MATSUMOTO, S.; HAMAGUCHI, T.; MATSUMURA, Y. Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res.**, v. 66, n. 20, p. 10048-10056, 2006.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 150-158, 2000.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 4651–4655, 1991.

KUMAR, V. L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M. V.; MOHAN, M.; MATOS, M. P. Protective Effect of proteins derived from the latex *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother. Res.**, v.25, 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.**, v. 35, p. 63-69, 2011.

KUMAR, V. L.; ROY, S. Protective effect of latex of *Calotropis procera* in Freund's complete adjuvant induced monoarthritis. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 1–5, 2009.

KUMAR, V. L.; ROY, S. *Calotropis procera* latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 2007, p. 47523–47529, 2007.

KUMAR, V. L.; ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. **Recent. Prog. Med. Plant.**, v.11, p.373–388, 2006.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.115-118, 2001.

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

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 46, p. 211-220, 2000.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHE, L. T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, n. 14, p. 6348-6352, 1992.

LANGER, C. J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology**, v. 18, n. 7, p. 17-28, 2004.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J. T.; BEKKOUICHE, K.; LAZREK, H. B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v.16, p.97-98, 2002.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H. B.; JANA, M.; AMAROUCHE, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.4, p.371-373, 1997.

LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; BRAGA-NETO, M. B.; BELLAGUARDA, E. A. L.; SILVA, J.V.; GOMES, A.S.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SIQUEIRA, F. J. W. S.; FREIRE, R. S.; VALE, M. L. ; RIBEIRO, R. A. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterology**, v. 11, p. 1-10, 2011.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; LIRA, A. M. S.; SILVA, L. R.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SOUSA, R. B.; BRITO, G. A. C. 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.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. 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.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H. C.; MELO, M. L. P.; WONG, D. V. T.; LEITE, C. A. V. G.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; Ribeiro, R. A. Involvement of Nitric Oxide on the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis: Role of Cytokines on Inducible Nitric Oxide Synthase Activation. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 69, p. 931-942, 2012.

LIMA, R. C. S.; SILVA, M. C. C.; AGUIAR, C. C. T.; CHAVES, E. M. C.; DIAS, K. C. F.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; MORAIS, K.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, S. M. M. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior.**, v. 23, p. 123–126, 2012.

LIMA, R.; LIMA, N.; CHAVES, E.; LEAL, L.; PATROCÍNIO, M.; LOBATO, R.; VIANA, M. V.; SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, K.; VASCONCELOS, S. Central Nervous System Activity of Acute Administration of Latex Proteins from *Calotropis procera* in Mice. **J. of Complem. Integ. Med.**, v. 7, p. 09-12, 2010.

LIMA, V.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L. P.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci.**, v. 113(3), p. 210–217, 2005.

LIMA-FILHO, J. V. M.; PATRIOTA, J. M.; SILVA, A. F.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Ethnopharmacol.**, v.129, p.327-334, 2010.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; SONIS, S. T.; KEEFE, D.M. K.Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 62, p. 33–41, 2008.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Nuclear factor-κB (NF-κB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 4, p. 395-401, 2007.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Planatarum, p. 512, 2002.

LUTGENS, L.; LAMBIN, P. Biomarkers for radiation-induced small bowel epithelial damage: an emerging role for plasma citrulline. **World J Gastroenterol.**, v. 12, n. 22, p 3033-3042, 2007.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p. 939-944, 1987.

McCOLL, S. R.; CLARK-LEWIS, I. Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists. **J. Immunol.**, v.163, p. 2829–2835, 1999.

McKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators (1). **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 1377-1387, 1993.

MADDENS, S.; CHARRUYER A, P. L. O. I.; DUBREUIL, P.; BERGER, S.; SALLES, B.; LAURENT, G.; JAFFREZOU, J. P. Kit signaling inhibits the sphingomyelil-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, v. 100, p. 1294-1301, 2002.

MAHIDA, Y. R.; GALVIN, A. M.; GRAY, T.; MAKH, S.; McALINDON, M. E.; SEWELL, H. F.; PODOLSKY, D. K. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 109, p. 377-86, 1997.

MALIK, N. N.; CHUGATI, M. I. D. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* – a preliminary study. **Pak. J. Sci.**, v. 31, p. 127–129, 1979.

MATHIJSSSEN, R. H. J.; JONG, F. A.; VAN SCHAİK, R. H. N.; LEPPER, E. R.; FRIBERG, L. E.; RIETVELD, T.; BRUIJN, P.; GRAVELAND, W. J.; FIGG, W. D.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 21, p. 1585-1592, 2004.

MATHUR, R.; GUPTA, S. K.; MATHUR, S. R.; VELPANDIAN, T. *Calotropis procera* root extracts block VEGF-induced angiogenesis: quantitative analysis. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 55, p. 05-12, 2011.

MATHUR, R.; GUPTA, S. K.; MATHUR, S. R.; VELPANDIAN T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 47, p. 343–348, 2009.

MELO, M. L. P.; BRITO, G. A. C.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B. L.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M. G.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 61, p. 775-784, 2008.

MESSMER, U. K.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. **FEBS Lett**, v. 355, p.23–26, 1994.

MILKS, L. C.; BRONTOLI, M. J.; CRAMER, E. B. Epithelial permeability and the transepithelial migration of human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v. 96, p. 1241-1247, 1983.

MOHAMED, M. A.; HAMED, M. M.; AHMED, W. S.; ABDU, A. M. Antioxidant and cytotoxic flavonols from *Calotropis procera*. **Z. Naturforsch. C.**, v. 66, p. 574-554, 2011.

MOHAMMED, R.; SHAMSUDDIN, S.; TANZILA, T. T.; SAYEDA-A-SAFA, L.; MAJEEDUL, H. C.; WAHID, M. H.; MST, E. A. A.; ROWNAK, J. Effect of *Cuscuta Reflexa* Stem and *Calotropis Procera* Leaf Extracts on Glucose Tolerance in Glucose-Induced Hyperglycemic Rats and Mice. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v. 7, p. 109–112, 2010.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIBBS, J. R.; HIGGS, A. E. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v.43, p.109, 1991.

MOURA, R. A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. Estudo dos elementos figurados do sangue. In: _____. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 32, p. 343-74, 1998.

NASH, S.; STAFFORD, J.; MADARA, J. L. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **J. Clin. Invest.**, v. 80, p. 1104-1113, 1987.

NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L.; DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3030-3034, 1992.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest**, v. 100, n. 10, p. 2417-2423, 1997.

NATHAN, C., XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994.

NICOLA, N. A. An introduction to the cytokines. In: _____. **Guidebook to cytokines and their receptors**. Oxford, New York: Oxford University Press, p. 1-7, 1994.

NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; LIANG, T. W.; CARNES, D. K.; MADARA, J. L. Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. **Gastroenterology**, v. 113, p.1489-1500, 1997.

OLIVEIRA, R. S.; FIGUEIREDO, I. S.; FREITAS, L. B.; PINHEIRO, R. S.; BRITO, G. A.; ALENCAR, N. M.; RAMOS, M. V.; RALPH, M. T.; LIMA-FILHO, J. V. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against Salmonella infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm. Res.**, v. 61, p. 689-698, 2012.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 382, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Toxicol. in Vitro.**, v. 21, p. 1563-1573, 2007.

PALLADINO Jr., M. A.; FINKLE, B. S. Immunopharmacology of tumor necrosis factors α e β . **Tips**, p. 388-399, 1986.

PARRILLI, G.; IAFFAIOLI, R. V.; MARTORANO, M.; CUOMO, R.; TAFUTO, S.; ZAMPINO, M. G.; BUDILLON, G.; BIANCO, A. R. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. **Cancer. Res.**, v. 49 (13), p. 3689-3691, 1989.

PARSONS, P. E.; SUGAHARA, K.; COTT, G. R.; MASON, R. J.; HENSON, P. M. The effect of neutrophil migration and prolonged neutrophil contact on epithelial permeability. **Am. J. Pathol.**, v. 129, p. 302-312, 1987.

PENG, H. B.; SPIECKER, M.; LIAO, J. K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J. of Immun.**, v. 161, p. 1970–1976, 1998.

PEREZ, E. A.; HILLMAN, D. W.; MAILLIARD, J. A.; INGLE, J. N.; RYAN, J. M.; FITCH, T. R.; ROWLAND, K. M.; KARDINAL, C. G.; KROOK, J. E.; KUGLER, J. W.; DAKHIL, S. R. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 14, p. 2849-2855, 2004.

PERUMAL, S. R.; CHOW, V. T. Pilot Study with regard to the Wound Healing Activity of Protein from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. in press DOI:10.1155/2012/294528, 2012.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol.**, v.177, p. 877-888, 2008.

PICO, J-L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **Oncologist.**, v. 3, p. 446-451, 1998.

PISANO, C.; MORABITO, A.; SORIO R.; BREDA, E.; LAURIA, R.; GEBBIA, V.; SCALTRITI, L.; SCALONE, S.; ZANONEL, V.; GREGGI, S.; BENEDEUCE, G.; LOSITO, S.; GALLO, C.; DI MAIO, M.; FORESTIERI, V.; PIGNATA, S. A phase II study of capecitabine in the treatment of ovarian cancer resistant or refractory to platinum therapy: a multicentre Italian trial in ovarian cancer (MITO-6) trial. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 64, p. 1021-1027, 2009.

PLEDGER, J. V.; PEARSON, A. D.; CRAFT, A. W.; EASTHAM, E. J. Intestinal permeability during chemotherapy for childhood tumours. **Eur. J. Pediatr.**, v. 147 (2), p. 123-127, 1988.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; DUNN, M. J.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BAUR, X. (1997) Characterization and identification of latex allergens by twodimensional electrophoresis and protein microsequencing. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 385-395, 1997.

RAMOS, M. V.; VIANA, C. A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C. D.; FIGUEIREDO, I. S.; OLIVEIRA, R. S.; ALENCAR, N. M.; LIMA-FILHO, J. V.; KUMAR, V. L. Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin-and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 385, p. 455-463, 2012.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact.**, v. 4, p. 57-67, 2010.

RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. S.; FIGUEIREDO, J.G .; FIGUEIREDO, I. S. T.; KUMAR, V. L.; BITTENCURT, F. S.; CUNHA, F. Q.; OLIVEIRA, R. S. B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J. V.; RAMOS, M. V. Involvement of NO in the

inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 125, p. 1-10, 2009.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; MELO, V. M. M.; MESQUITA, R. O.; SILVESTRE, P. P.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; MACEDO, N. M. R.; ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Plant Sci.**, v. 173, p. 349-357, 2007.

RAMOS, M. V.; BANDEIRA, G. P.; FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, M. N.; SOUSA, P. A. S.; CARVALHO A. F. U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 503-510, 2006a.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; SILVA-XAVIER, A. A.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P.; ETCHELLS, J. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, p. 251-256, 2006b.

RASIK, A. M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M. P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, suppl. I, p. 191-198, 2005.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J. Urol.**, v.167, n. 5, p. 2229-34, 2002.

RIVORY, L. P.; BOWLES, M. R.; ROBERT, J.; POND, S. M. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hidroxicamptothecin (SN 38), by human liver carboxylesterase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, n. 7, p. 1103-1111, 1996.

ROCHA-LIMA, C. M.; GREEN, M. R.; ROTCHE, R.; MILLER, W. H. JR.; JEVREY, G. M.; CISAR, L. A.; MORGANTI, A.; ORLANDO, N.; GRUIA, G.; MILLER, L. L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p. 18-21, 2004.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor

released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin-1 β . **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4910-4916, 1998.

ROTH, B. J.; SLEDGE, G. W. J.; WILLIAMS, S. D.; MEYER, S. C.; ANSARI, R.; FISHER, W. B. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic. **Cancer**, v. 68(2), p. 248-252, 1991.

ROSATI, G.; ROSSI, A.; REGGIARDO, G.; MANZIONE, L. A phase II study of irinotecan alternated with a weekly schedule of high-dose leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil infusion in patients with metastatic colorectal cancer. **Oncology**, v. 62, n. 3, p. 209-215, 2002.

ROY, S.; SEHGAL, R.; PADHY, B. M.; KUMAR, V. L. Anti-oxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 470-473, 2005.

RUBENSTEIN, E. B.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L. S.; FOX, P. C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S. T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100 (suppl 9): p. 2026-2046, 2004.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265-1275, 1995.

SAKAI, H.; SATO, T.; HAMADA, N.; YASUE, M.; IKARI, A.; KAKINOKI, B.; TAKEGUCHI, N. Thromboxane A₂, released by the anti-tumor drug irinotecan, is a novel stimulator of Cl⁻ secretion in isolated rat colon. **J. Physiol.**, v. 505, p. 133-144, 1997.

SAKAI, H.; DIENER, M.; GARTMANN, V.; TAKEGUCHI, N. Eicosanoid mediated Cl⁻ secretion induced by the antitumor drug, irinotecan (CPT-11), in the rat colon. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 351, p. 309-14, 1995.

SALIBA, F.; HAGIPANTELLI, R.; MISSET, J. L.; BASTIAN, G.; VASSAL, G.; BONNAY, M.; HERAIT, P.; COTE, C.; MAHJOUBI, M.; MIGNARD, D.; CVITKOVIC, E. Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 8, p. 2745-2751, 1998.

SANGRAULA, H.; DEWANS, S.; KUMAR, V. L. Evaluation of Antiinflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol.**, v. 9, p. 257-264, 2002.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-9, 1994.

SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P. D. Oral mucositis. **Oral Dis.**, 12(3): 229-241, 2006.

SCULLY C, EPSTEIN J, SONIS S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis. **Head Neck.**, v. 26(1), p. 77-84, 2004.

SCULLY C, EPSTEIN J, SONIS S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head Neck.**, v. 25(12), p. 1057-1070, 2003.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V. L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian J. Pharmacol.**, v. 37, p. 334-335, 2005.

SEIBER, J. N.; NELSON, C. J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2343-2348, 1982.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v.46, p.705-16, 1986.

SESSA, W. C.; HARRISON, J. K.; BARBER, C. M.; ZENG, D.; DURIEUX, M. E.; D'ANGELO, D. D.; LYNCH, K. R.; PEACH, M. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 22, p. 15274-15276, 1992.

SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Med. Oncol.**, v. 26, p. 350–357, 2009.

SHAO, J.; SHENG, G. G.; MIFFLIN, R. C.; POWELL, D. W.; SHENG, H. Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 846-55, 2006.

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

SHIVAKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Anthelmintic activity of latex of *Calotropis procera*. **Pharm. Biol.** v. 41, p. 263–265, 2003.

SHOU, J.; LIEBERMAN, M.D.; HOFMANN, K.; LEON, P.; REDMOND, H.P.; DAVIES, H.; DALY, J.M. Dietary manipulation of methotrexate-induced enterocolites. **JPEN.**, v. 15 (3), p. 307-312, 1991.

SHUKLA, O. P.; MURTI C. R. K. Properties & partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J. Sci. Ind. Res.**, v.20, p. 109-112, 1961.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochem.**, v. 45, p. 399-406, 2010.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*: a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 43, p. 219-224, 2000.

SKUBITZ, K. M. Glutamine as a potential treatment for the prevention of chemotherapy induced mucositis. **J. Infusional Chemotherapy**, v. 4, p. 64-67, 1994.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, p. 46-49, 2012.

SOARES, P. M. G.; LOPES, L. O.; MOTA, J. M. S. C.; BELARMINO FILHO, J. N.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48, p. 80-85, 2011a.

SOARES, P. M. G.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; MOTA, J. M. S.; JUSTINO, P. F. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Role of Platelet activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 713-720, 2011b.

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

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI B, A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p.125-129, 2005.

SONIS, S. T.; FAY, E. G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**, v. 16, p. 680-686, 2002.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**, v.4 n. 4, p. 277-284, 2004.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONELLY, J.P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 1995-2025, 2004.

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

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA-FILHO, M. V.; LIMA, M. V.; POMPEU, M. M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 1, p. 247-56, 1997.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; LOGAN, R. M.; ASHTON, K.; YEOH, A. S. J.; AL-DASOOQI, N.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int. J. Exp. Path.**, v. 90, p. 489-499, 2009.

STURM, A.; DIGNASS, A. U. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. **Biochem. Biophys. Acta**, n. 1582, p. 282-8, 2002.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, v. 27, p. 3-9, 2002.

SZABO, C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v.6, n. 2, p. 79-88, 1996.

SUZUKI, T.; SAKAI, H.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. Inhibition of thromboxane A₂-induced Cl⁻ secretion by antidiarrhea drug loperamide in isolated rat colon. **Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 295, n. 1, p. 233-8, 2000.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; WATANABE, K.; ONOSE, S.; YOSHIDA, S.; KUMAZAWA, E.; NAGAI, E.; KAMATAKI, T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 25, p. 1-10, 2006.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Inhibition of intestinal microflora glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 42, p. 280-286, 1998.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3752-3757, 1996.

TAKIMOTO, C. H.; ARBUCK, S. G. Topoisomerase I targeting agents: the camptothecins. In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 2001. cap. 20, p. 579-646, 2001.

TAN, X. D.; CHEN, Y. H.; LIU, Q. P.; GONZALEZ-CRUSSI, F.; LIU, X. L. Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 2149-55, 2000.

THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J. L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1493-1500, 1994.

TOOLEY, K. L.; HOWARTH, G. S.; BUTLER, R. N. Mucositis and non-invasive markers of small intestinal function. **Cancer Biol Ther.**, v.9, p. 753-758, 2009.

UNNO, N.; WANG, H.; MENCONI, M. J.; TYTGAT, S.; LARKIN, V.; SMITH, M.; MORIN, M. J.; CHAVEZ, A.; HODIN, R.; FINK, M. P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1246-11257, 1997.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VAMVAKAS, L.; KAKOLYRIS, S.; KOUROUSSIS, C.; KANDILIS, K.; MAVROUDIS, D.; ZIRAS, N.; ANDROULAKIS, N.; KALBAKIS, K.; SAARA, E.; SOUGLAKOS, J.; GEORGOULIAS, V. Irinotecan (CPT-11) in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin (de gramont regimen) as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer: a multicenter phase II study. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 1, p. 65-70, 2002.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, n. 16, p. 3888-90, 1966.

WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P. R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, p. 275-82, 2005.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea*.

Indian Medicinal Plants, v.1, p. 341-345, 1994.

Wealth of India. Information and Publication Directorate, CSIR: New Delhi, **Raw Materials**, v. 3, p. 78-84, 1992.

WEILAND, J. E.; DAVIS, W. B.; HOLTER, J. F.; MOHAMMED, J. R.; DORINSKY, P. M.; GADEK, J. E. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p. 218-225, 1986.

WILLIAMS, D. A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v. 29, p. 26-30, 2001.

WILSON, A. J.; GIBSON, P. R. Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. **Clin. Sci.**, v. 93, p. 97-108, 1997.

WONG, J. M.; BILLIAR, T.R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Adv Pharmacol.**, v. 34, p. 155-70, 1995.

WOO, P. C.; NG, W. F.; LEUNG, H. C.; TSOI, H. W.; YUEN, K.Y. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 527-532, 2000.

XIANG, D.; GUO, GUO.Y.; ZHANG, J.; GAO, J.; LU, H.; ZHU, S.; WU, M.; YU, Y.; HAN, W. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates cyclophosphamide induced mucositis in a murine model. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 67, p. 1445–1453, 2011.

XIE, R.; MATHIJSEN, R. H. J.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J.; KARLSSON, M. O. Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 72, n. 3, p. 265-75, 2002.

XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science.**, v. 256, n. 5054, p. 225-228, 1992.

XU, D. Z.; LU, Q.; DEITCH, E. A. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. **Shock**, v. 17, p. 139–145, 2002.

YANG, X. X.; HU, Z. P.; XU, A. L.; DUAN, W.; ZHU, Y. Z.; HUANG, M.; SHEU, F. S.; ZHANG, Q.; BIAN, J. S.; CHAN, E.; LI, X.; WANG, J. C.; ZHOU, S. F. A mechanistic study on reduced toxicity of irinotecan by coadministered thalidomide, a tumor necrosis factor- α inhibitor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 319, n. 1, p. 82-104, 2006.

YASUDA, M.; KATO, S.; YAMANAKA, N.; MATSUMOTO, K.; UTSUMI, D.; VKITAHARA, Y.; AMAGASE, K.; HORIE, S.; TAKEUCHI, K.. Serotonin 5-HT(3) receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in mice intestinal crypt cells. **Br J Pharmacol.** doi: 10.1111/bph.12019, 2012.

YEOH, A. S. J.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Nuclear factor κ B (NF κ B) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 63, n. 5, p. 1295-1303, 2005.