



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

ROSANE OLIVEIRA DE SANT'ANA

**“ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DOS EXTRATOS DE *Aloe  
barbadensis* (BABOSA)” E *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO-SERTÃO)**

FORTALEZA  
2006

ROSANE OLIVEIRA DE SANT'ANA

**ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DOS EXTRATOS DE *Aloe  
barbadensis* (BABOSA) E *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO-SERTÃO)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA  
2006

ROSANE OLIVEIRA DE SANT'ANA

**ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DOS EXTRATOS DE *Aloe  
barbadensis* (BABOSA) E *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO-SERTÃO)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO (Orientador)

---

Prof. Dr. FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA

---

Prof. Dr. MARCELLUS HENRIQUE LOIOLA PONTE DE SOUSA

ROSANE OLIVEIRA DE SANT'ANA

Dedico esta dissertação a todos que acreditaram e apostaram no meu potencial e sucesso. E todos aqueles que perseveraram e insistem no aprimoramento profissional sem pensar em glória, poder, status.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus e Nossa Senhora**, por me abençoarem com uma vida repleta de bênçãos e graças.

À minha mãe, **Claudia**, por todo o seu amor, pelos exemplos de carinho, dedicação e fortaleza, os quais jamais serão esquecidos. Ao meu pai **Roberto** pelo exemplo de honestidade, dedicação e caráter.

Ao meu marido **Herlânio**, pela compreensão nas horas de ausência, pelo seu eterno bom humor, pelas lições de dedicação, paciência e fé.

Aos meus maravilhosos e amados filhos, **Pedro e Gabriel** pela paciência com minhas ausências e por me darem inspiração na busca de um mundo melhor.

**Aos meus irmãos**, pelo carinho incondicional, especialmente **Isaac Lucas**.

**Aos meus avós**, especialmente **Ivone**, que me incentivaram ao estudo da Medicina e apoiaram todas as decisões de minha vida. Saudades....

**Aos meus amigos**, especialmente, Paula, Klenilton, Rochelle e Elicelia, pessoas maravilhosas que eu tive o prazer de conhecer, que completam minha vida e que me incluem em suas preces.

**Ao Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**, meu orientador, pelo carinho, apoio e disponibilidade, sempre presente quando necessário e exemplo de dedicação ao trabalho e ao ser humano.

**À Dra. Gerly Ane Castro Brito**, por sempre ter me tratado com tanta atenção, esclarecendo as minhas dúvidas, colaborando no aprimoramento do meu crescimento científico e pela engrandecedora presença no transcorrer desse mestrado.

Aos meus primeiros e inesquecíveis mentores, **Dra. Yacy Mendonça e Dr. Marcos Valle** que me ensinaram os conhecimentos básicos da pesquisa básica durante a minha iniciação científica e principalmente me ensinaram a ética, amizade e a honestidade necessárias à arte de ser cientista.

Aos colegas de Pós-Graduação do LAFICA, especialmente **Renata Leitão e Antoniella**, pela paciência e desprendimento em ajudar e ensinar.

**À Vanda e Ivan**, sempre com sua presença marcante nos ajudando nos experimentos.

**Aos colegas do Serviço de Oncologia Clínica do ICC**, pela compreensão e ajuda nos momentos decisivos desse Mestrado.

**À direção do ICC**, que me acolheu e apostou no meu trabalho e disposição para o engrandecimento de em uma instituição com grande potencial assistencial e acadêmica.

**Aos bolsistas** de Iniciação Científica, sobretudo **Carol** e **Rafael**, pela dedicação, paciência, interesse, bom humor e pela grande oportunidade de participar do crescimento de um novo profissional.

**Aos Professores do Curso de Pós – Graduação**, por terem transmitido seus conhecimentos com tanta sapiência e dedicação.

**Ao Professor Said Fonseca e ao colega Marco Botelho**, por contribuírem intensamente no conhecimento de plantas medicinais, e ao primeiro pelo fornecimento maciço das drogas desse estudo.

**À Áurea**, secretária da Pós – Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelo seu constante sorriso e pela disposição em ajudar sempre.

**Ao Comitê de Ética em Pesquisa Clínica**, pelo aprimoramento deste trabalho científico.

**CNPq**, por ter colaborado financeiramente durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ALOE – *Aloe vera*

AR – Aroeira

CDK – quinases ciclina dependentes

COX – Ciclooxigenase

EPM – Erro padrão da média

EV - Via endovenosa

DNA – ácido desoxiribonucléico

5- FU – 5-fluorouracil

g – gramas

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL- 8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-11 – Interleucina 11

NOS<sub>i</sub> – Óxido nítrico sintase induzida

i.p. – Intra-peritoneal

KDa – KiloDalton

Kg – Kilograma

INCA – Instituto Nacional do Câncer

m – metros

Md - Mediana

Mg – Miligrama

ml – mililitro

MMP – Metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase

NF-kB - Fator nuclear kB

NO – Óxido nítrico

PM – Peso molecular

QT – quimioterapia antineoplásica

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RT – Radioterapia

TGI - Trato gastrointestinal

TM – Trauma mecânico

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TS - Timidilato sintetase

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A mucosite oral (MO) é um efeito colateral frequente em pacientes sob tratamento oncológico, em especial à quimioterapia (QT). Caracteriza-se por hiperemia, edema e úlceras em toda a cavidade oral e faringe. A importância da MO é devido à dor, alterações do paladar e infecções locais. Surge incapacidade de alimentar-se, ingerir líquidos, risco de infecções sistêmicas, necessidade de interrupção da QT, necessidade de hospitalização, tornando o tratamento mórbido, dispendioso, doloroso e muitas vezes impossível ou ineficaz. Ainda não há terapêutica totalmente eficaz, com nível de evidência que torne a MO manejável. **OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos do tratamento tópico com duas plantas medicinais, a *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) e a *Aloe barbadensis* (babosa) sobre o desfecho da MO experimental induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters, através de escores macro e microscópicos e avaliação de perda ponderal. Investigar os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos, através de análise da atividade de mieloperoxidase (MPO) e expressão tissular de TNF $\alpha$  e iNOS. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Hamsters *Goldem siriam* receberam injeções i. p. de 60 e 40 mg/Kg de 5-FU, nos dias 1 e 2, respectivamente. No dia 4 os animais eram anestesiados, tinham suas mucosas jugais submetidas a trauma mecânico (TM) com agulha de ponta romba. Em seguida, eram tratadas com gel inerte (controle), gel de aroeira a 5, 10 ou 20% (AR) ou gel de babosa (ALOE) a 25, 50 e 100%. Tais tratamentos eram realizados 2x/dia até o dia 9. Os animais eram pesados diariamente. No dia 10, ocorriam os sacrifícios para: 1. Análise macroscópica das mucosas; 2. Retiradas de amostras para histopatologia, imunohistoquímica para e dosagem de MPO. **RESULTADOS:** Na análise macroscópica, AR determinou inibição significativa da MO (AR 5% - Md 2; AR 10% - Md 3; Controle - Md 4), ALOE também inibiu a MO (ALOE 25% - Md 1; ALOE 50% - Md 1,5; ALOE 100% - Md 1; Controle - Md 4). À histopatologia confirmou-se inibição significativa da MO pela AR ( $p < 0,01$ ) e pela ALOE a 50 e 100% ( $p < 0,01$ ). Houve também inibição dos níveis de MPO pelos extratos das duas drogas e a expressão de TNF $\alpha$  e iNOS também foi reduzida. Houve uma tendência a menor perda ponderal nos grupos experimentais. **CONCLUSÕES:** Extratos de ALOE e AR foram capazes de inibir a MO experimental induzida por 5-FU através de aplicações tópicas e tal efeito pode ser modulado por suas atividades anti-inflamatórias sobre a produção de citocinas envolvidas com o processo e de NO.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Oral mucositis (OM) is a frequent dose-limiting and costly complication of antineoplastic chemotherapy. It's characterized by ulcerative lesions and causes pain, restrict food and fluids oral intake and causes substancial risk for sepsis. In severe cases, hospitalization, parenteral nutrition and opioide analgesics are required.

**OBJECTIVES:** Evaluate the effects of extracts of two herbal medicines, *Aloe barbadensis* Miller (Ab) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Mu) on 5-fluorouracil-induced OM in hamsters. To evaluate the possible mechanisms by the extracts act, it was performed analysis of intensity of activity of myeloperoxidase (MPO) and analysis of immunohistochemistry for TNF $\alpha$  and iNOS in mucosa specimens.

**METHODS:** *Golden siriam* hamsters were submitted to intra-peritoneal 60 and 40 mg/Kg injections of 5-fluorouracil (5-FU) in day 1 and 2, respectively. On day 4, animals were submitted to anaesthesia, followed by mecanic trauma with needle to potencieate the effect of 5-FU. After that, the mucosas were treated with topical gel containing Mu extracts at 5, 10 or 20%, Ab extracts at 25, 50 or 100% (experimental groups) or carbapol gel (control group). The treatments above were mantained twice daily until day 9. On day 10 the animals were sacrificed. Diferent parameters were evaluated: macroscopic and microscopic scores of OM, body mass variation and immunohistochemistry for TNF $\alpha$  e iNOS.

**RESULTS:** Mu significantly inhibited macroscopic oral mucositis at 5 and 10% concentrations (5% Mu – Md 2; 10% Mu – Md 3; control – Md 4,  $p < 0,01$ ). Ab also inhibited OM (25% Ab – Md 1; 50% Ab – Md 1,5; 100% Ab – Md 1; control – Md 4,  $p < 0,001$ ). These results were confirmed by histological analysis (5% Mu – Md 1,5; 10% Mu – Md 1; 25% Ab – Md 1; 50% Ab – Md 1,5; 100% Ab – Md 1; control – Md 2,  $p < 0,01$ ). MPO activity was significantly decreased by Mu and Ab compared to control animals. Both Mu and Ab decreased expression of TNF $\alpha$  and iNOS on tissue. It was observed a decrease on ponderal lost in experimental groups.

**CONCLUSIONS:** *Myracrodruon urundeuva* and *Aloe barbadensis* cause important inhibitory effects in oral mucositis 5-FU induced probably by their antiinflammatory properties.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA 1</b> – Estrutura química do 5-fluorouracil _____	12
<b>FIGURA 2</b> – Metabolização e ativação intracelular do 5-Fluorouracil _____	13
<b>FIGURA 3</b> – Aspecto normal da mucosa oral _____	18
<b>FIGURA 4</b> – Desenho esquemático da fase inicial da mucosite oral _____	19
<b>FIGURA 5</b> – Desenho esquemático da segunda fase da mucosite oral _____	20
<b>FIGURA 6</b> – Desenho esquemático da fase de amplificação de sinal e dano celular na mucosite oral _____	21
<b>FIGURA 7</b> - Desenho esquemático da fisiopatologia da mucosite oral (4ª fase) _____	22
<b>FIGURA 8</b> - Desenho esquemático da fase de cicatrização da mucosite oral _____	23
<b>FIGURA 9</b> – Aspecto da árvore de <i>Aloe vera</i> L _____	30
<b>FIGURA 10</b> – Fotografia do detalhe da polpa gelatinosa de <i>Aloe vera</i> L _____	31
<b>FIGURA 11</b> – Fotografia ilustrativa da árvore da aroeira-do-sertão _____	35
<b>FIGURA 12</b> - Desenho esquemático da mucosite oral experimental _____	49
<b>FIGURA 13</b> – Fotografias do aspecto macroscópico de mucosas jugais de animais submetidos a mucosite oral _____	59
<b>TABELA 1</b> - Efeito de aloe vera (ALOE) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-FU _____	61
<b>FIGURA 14</b> - Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais normais e animais submetidos a mucosite oral experimental e tratados com gel inerte ou com ALOE _____	62
<b>TABELA 2</b> - Efeito de aloe vera (ALOE) sobre as alterações histológicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-FU _____	64

<b>FIGURA 15</b> - Aspecto microscópico das mucosas jugais de animais normais e animais submetidos a mucosite oral experimental e tratados com gel inerte ou com ALOE_____	65
<b>GRÁFICO 1</b> – Atividade de mieloperoxidase em mucosite experimental tratada com <i>Aloe vera</i> _____	67
<b>FIGURA 16</b> - Fotografias da imunohistoquímica para expressão de NO sintase induzida em mucosas tratadas com <i>Aloe vera</i> _____	69
<b>FIGURA 17</b> - Fotografias e escores relativos a expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$ em mucosas jugais de hamsters tratados com <i>Aloe vera</i> _____	71
<b>GRÁFICO 2</b> – Efeito de <i>Aloe vera</i> sobre a variação de massa corpórea de animais submetidos a mucosite oral experimental _____	72
<b>TABELA 3</b> - Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-FU_____	75
<b>FIGURA 18</b> - Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais normais e animais submetidos a tratamento com 5-FU e trauma mecânico seguido por: gel base ; gel de aroeira a 5% ; gel de aroeira a 10% e gel de aroeira a 20% _____	76
<b>TABELA 04</b> - Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-FU _____	78
<b>FIGURA 19</b> - Aspecto microscópico de mucosa jugal normal, ou com mucosite oral experimental recebendo tratamento tópico com gel inerte, ou AR a 5% e 10% _____	79
<b>GRÁFICO 03</b> – Atividade de MPO em mucosite oral experimental tratada com Aroeira_____	81
<b>FIGURA 20</b> - Fotografias da imunohistoquímica para expressão de NO sintase em mucosas tratadas com aroeira _____	83

<b>FIGURA 21</b> - Fotografias e escores relativos a expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$ em mucosas jugais de hamsters tratados com aroeira _____	85
<b>GRÁFICO 04</b> – Variação de massa corpórea em hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com aroeira _____	87
<b>FIGURA 22</b> – Modelo hipotético dos mecanismos de ação de <i>Aloe vera</i> sobre a mucosite oral experimental _____	95
<b>FIGURA 23</b> – Modelo hipotético dos mecanismos de ação de <i>M. urundeuva</i> sobre a mucosite oral experimental _____	98

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	
<b>1. Câncer e epidemiologia</b>	<b>6</b>
<b>2. Drogas antineoplásicas</b>	<b>8</b>
<b>2.1 5-flurouracil</b>	<b>12</b>
<b>3. Mucosite oral</b>	
<b>3.1 Definição, incidência e importância clínica</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Fisiopatologia</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Classificação</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Tratamento e prevenção</b>	<b>25</b>
<b>4. Drogas utilizadas na abordagem terapêutica</b>	
<b>4.1. Aloe vera</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Aroeira</b>	<b>35</b>
<b>II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>1. Animais</b>	<b>44</b>

2. Aparelhos e instrumentos _____	44
2. Soluções, drogas, extratos, líquidos e corantes utilizados _____	45
3. Protocolos experimentais _____	48
<b>3.1 Grupos experimentais</b>	
A. Grupos controles _____	50
B. Grupos tratados com Aroeira _____	50
C. Grupos tratados com <i>Aloe vera</i> _____	51
<b>3.2. Parâmetros avaliados</b>	
<b>3.2.1. Análise da estrutura das mucosas jugais</b>	
A. Análise macroscópica _____	51
B. Análise histopatológica _____	52
C. Dosagem de mieloperoxidase _____	53
D. Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ e NOS _____	54
<b>3.2.2 Análise das alterações sistêmicas nos animais</b>	
A. Análise da variação de massa corpórea _____	56
4. Análise estatística _____	56

#### IV. RESULTADOS

1. Mucosite oral induzida por 5-fluorouracil _____	58
2. Efeito dos tratamentos farmacológicos nos grupos experimentais	
2.1 Tratamento com <i>Aloe vera</i>	
2.1.1. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil _____	60

<b>2.1.2. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre as alterações histopatológicas observadas na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>63</b>
<b>2.1.3. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>66</b>
<b>2.1.4. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre a expressão por imunohistoquímica de NO sintase</b>	<b>68</b>
<b>2.1.5. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre a expressão por imunohistoquímica de TNF<math>\alpha</math></b>	<b>70</b>
<b>2. 1. 6. Efeito do <i>Aloe vera</i> sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral</b>	

## **2.2. Tratamento com *M. urundeava***

<b>2.2.1. Efeito do <i>M. urundeava</i> sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>74</b>
<b>2.2.2. Efeito do <i>M. urundeava</i> sobre as alterações histopatológicas observadas na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>77</b>
<b>2.2.3. Efeito do <i>M. urundeava</i> sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>80</b>
<b>2.2.4. Efeito do <i>M. urundeava</i> sobre a expressão por imunohistoquímica de NO sintase</b>	<b>82</b>

2.2.5. Efeito do <i>M. urundeuva</i> sobre a expressão por imnohistoquímica de TNF $\alpha$	84
2. 2. 6. Efeito do <i>M. urundeuva</i> sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral	86
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>89</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>101</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>104</b>

**I. INTRODUÇÃO**

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1. Câncer e epidemiologia**

A proliferação celular é cuidadosamente regulada e responde a necessidades específicas do organismo. Em um indivíduo jovem a multiplicação é maior que a morte celular e assim, o animal cresce. Na fase adulta os processos de proliferação e morte celular estão balanceados de maneira a manter equilíbrio. Eventualmente os mecanismos de regulação de proliferação e morte celular falham, quando isso ocorre a célula passa a multiplicar-se indefinidamente de forma irregular e irresponsiva a qualquer mecanismo de controle. A clonagem dessa célula defeituosa leva ao que chamamos de câncer. Dessa forma, o câncer é uma doença genética que se caracteriza por mutações em células somáticas e pelo fato de ser necessário o acúmulo de várias mutações em genes envolvidos com proliferação celular para que a doença se desenvolva. Os genes envolvidos com multiplicação celular são chamados proto-oncogenes e genes supressores de tumores.

A célula cancerosa mantém como características principais, além da capacidade de multiplicar-se na ausência de fatores de crescimento e de forma resistente aos sinais de apoptose, a capacidade de invadir tecidos vizinhos ou à distância, perda de função, ausência de propriedades de diferenciação celular e a capacidade de induzir angiogênese (LODISH *et al*, 2000).

O câncer é uma doença obviamente associada a idade avançada. Considerando-se que a população mundial vem envelhecendo verifica-se a sua importância na saúde mundial. São esperados 1.399.790 novos casos de câncer em todo o mundo em 2006, com expectativa de óbito de mais 500 mil pacientes no mesmo ano pela doença (American

Cancer Society). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) traz estimativa de 472.050 casos novos de câncer em 2006, sendo os mais incidentes (com exceção do câncer de pele não melanoma) os cânceres de próstata e de pulmão em homens e de mama e colo uterino em mulheres.

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.

Tais abordagens terapêuticas embora possam 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. Entre eles estão: mielossupressão, mucosite intestinal e oral, náuseas, vômitos, neurotoxicidade, infecções e dermatites, dentre outras.

## 2. Quimioterapia anti-neoplásica

Um dos principais objetivos do tratamento oncológico consiste em além de reduzir o volume tumoral e aumentar sobrevida, melhorar os sintomas relacionados a sua doença com o mínimo de interferência em suas atividades habituais. Apesar disso algumas toxicidades relacionadas a quimioterapia antineoplásica podem causar efeitos colaterais piores que a própria doença, causando impacto negativo em sua qualidade de vida (BOYER, 2005).

Dependendo da situação clínica, a quimioterapia pode ser utilizada para curar a doença (**tratamento curativo**), para impedir a disseminação da neoplasia antes ou após a ressecção da lesão primária (**tratamento neoadjuvante e adjuvante**) ou **tratamento paliativo** que objetiva diminuir o crescimento tumoral, aliviando sintomas e eventualmente aumentando a sobrevida (KAUFMAN, 2001).

A quimioterapia antineoplásica consiste no uso de substâncias químicas de forma isolada ou combinada com o objetivo de erradicar neoplasias malignas não curáveis com o tratamento local (VALLE, 1999). Agem através da interferência nos processos de crescimento e divisão celular. A maioria dessas drogas não apresentam seletividade para as células neoplásicas, podendo agir em qualquer tecido de rápida proliferação (BLIJHAM, 1993). As drogas antineoplásicas agem basicamente através de alterações bioquímicas ou estruturais induzidas na molécula do DNA em diversas fases do ciclo celular, promovendo em última instância em morte celular programada ou apoptose (MALIK; WAXMAN, 1992).

Para compreender o mecanismo de ação dos quimioterápicos é preciso compreender alguns aspectos relevantes sobre o ciclo celular e cinética tumoral. O ciclo celular é uma

série ordenada de eventos que culminam na duplicação organizada da célula. Esse especializado e distinto processo bioquímico é checado a cada estágio do seu ciclo. Compõe-se de quatro fases: fase S (síntese), fase M (mitose) e dois “*gaps*” chamados G1 e G2 (SCHWATZ, 2005). Na fase G1, a célula modifica suas atividades metabólicas usuais no sentido de preparar-se para duplicação do DNA. Assim, pode-se observar um aumento na célula às custas do citoplasma e no número de organelas como as mitocôndrias. O final da fase G1 é considerado “um ponto sem retorno”, ou ponto de restrição onde a célula está preparada para dividir-se. A fase S caracteriza-se pela duplicação do DNA. Na fase G2 a célula permanece em crescimento e alto metabolismo e a quantidade de DNA já esta duplicada, ou seja, aumenta para 4c, no entanto, a célula ainda é considerada diploide. Na fase M a célula segrega seus cromossomos em dois, um par para cada célula-filha. Esse período divide-se ainda em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Essa última é seguida pela “*citokinesis*” (divisão do citoplasma). Quando o citoplasma está completamente dividido, as células-filhas estão em fase G1 novamente. Células em estado não proliferativo progredirão para quiescência (fase G0), o que pode se manter por longos períodos ou indefinidamente, como no exemplo dos neurônios (LODISH, 2004 e WATSON, 2004).

A progressão da célula em seu ciclo é regulada por moléculas chamadas ciclinas e quinases ciclina-dependentes (CDKs), sendo as primeiras responsáveis por atividade regulatória e as segundas por atividade catalítica. As CDKs são inativas na ausência de uma ciclina, quando ativadas pela ligação com as ciclinas, determinam reação de fosforilação que ativa ou inativa proteínas-alvo, promotoras de parada ou de progressão do ciclo celular (SCHWATZ, 2005). Por exemplo, uma vez sob um sinal extra-celular pró-mitótico, complexos G1 ciclina-CDK tornam-se ativos e preparam a célula para a fase S, através da

fosforilação de proteínas que, em reação em cadeia, promovem a expressão de fatores de transcrição. Esses irão aumentar a expressão de ciclinas S e de enzimas envolvidas na replicação do DNA.

É importante ressaltar a existência de um sistema de controle de qualidade no processo do ciclo celular. Esse sistema monitora a progressão de forma a bloqueá-la caso algum dano importante ao DNA tenha ocorrido em algum ponto, garantindo, assim que a célula só se multiplique caso o erro ao DNA tenha sido reparado ou tenha sido completada toda a sua replicação. Há quatro pontos de checagem para erro de DNA regulados pela proteína p53: um durante a fase G1, dois na fase S (entrada e saída) e um na entrada da fase M. Durante a fase M há pontos de verificação de defeitos na duplicação do DNA, bem como do pareamento de cromossomos: um entre metáfase e anáfase, outro entre a anáfase e telófase. Quando o erro ao DNA é muito extenso e irreparável, a célula é conduzida a apoptose ou morte programada.

O conhecimento acerca do ciclo celular nos permite determinar quais drogas escolher ou combinar no tratamento de um tipo de neoplasia. Algumas drogas atuam em células estando elas ou não em estado proliferativo (ciclo-inespecífico), por exemplo, os alquilantes. A maioria das drogas só age em células em ciclo ativo (ciclo-específico ou fora do estado G0) de forma independente da fase (fase-inespecífica) ou de forma dependente de fases específicas do ciclo celular (fase-específica), como por exemplo os antimetabólitos que só interferem em células na fase S, ou paclitaxel que atinge células em fase M (BACARAT, 2000).

Outro aspecto importante que determina a ação dos fármacos antineoplásicos é a cinética de crescimento tumoral. A população de células que compõem um tumor é bastante heterogênea, sendo representada por células em fases variadas de seu ciclo. Dados

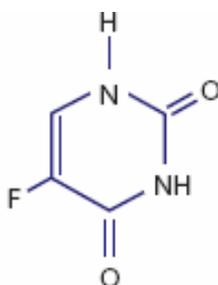
experimentais sustentam que tumores sólidos humanos apresentam modelo de cinética de crescimento do tipo Gompertziano onde a fração de crescimento não é constante, mas diminui exponencialmente ao longo do tempo. A fração de crescimento consiste na quantidade de células de uma população tumoral que se encontra em ciclo ativo (em multiplicação), ou seja, susceptível à ação dos quimioterápicos antineoplásicos. O pico de fração de crescimento ocorre, em tumores sólidos, quando o tumor atinge 37% do seu tamanho máximo. Dessa forma, quanto maior o tumor, menor sua fração de crescimento e portanto menor sua susceptibilidade à ação da quimioterapia, mais especificamente às drogas ciclo-específicas. Então, a resposta à QT depende de onde na sua curva de crescimento o tumor se encontra (NORTON, 1991 e NORTON, 1988).

Experimentos com quimioterapia em tumores transplantados em camundongos validaram a hipótese de “*fractional cell kill*” que estabelece que uma determinada concentração de droga aplicada durante um determinado intervalo de tempo, mata uma fração constante de células, independente do número absoluto contido no tumor. O restante das células sobreviventes são responsáveis pelo repovoamento tumoral que ocorrerá no intervalo entre as doses da quimioterapia, necessário para a recuperação dos tecidos normais. Então, o resultado do tratamento também depende: da dose de fármaco administrado, bem como do número e frequência dos ciclos de aplicação (KAUFMAN, 2001). Por essa razão é importante o suporte aos efeitos colaterais, no sentido de serem evitados atrasos, redução de doses ou interrupção do tratamento quimioterápico.

## 2.1. Fluoropirimidinas

A utilização das fluoropirimidinas no tratamento do câncer adveio da observação de uma maior captação de uracil pelos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais (RUTMAN, 1954). Têm sido bastante úteis no tratamento de diversos tipos tumorais, como: câncer de mama, de trato gastrointestinal e de cabeça e pescoço. Adicionalmente, têm apresentado importantes interações sinérgicas com outros tipos de drogas e com a radioterapia.

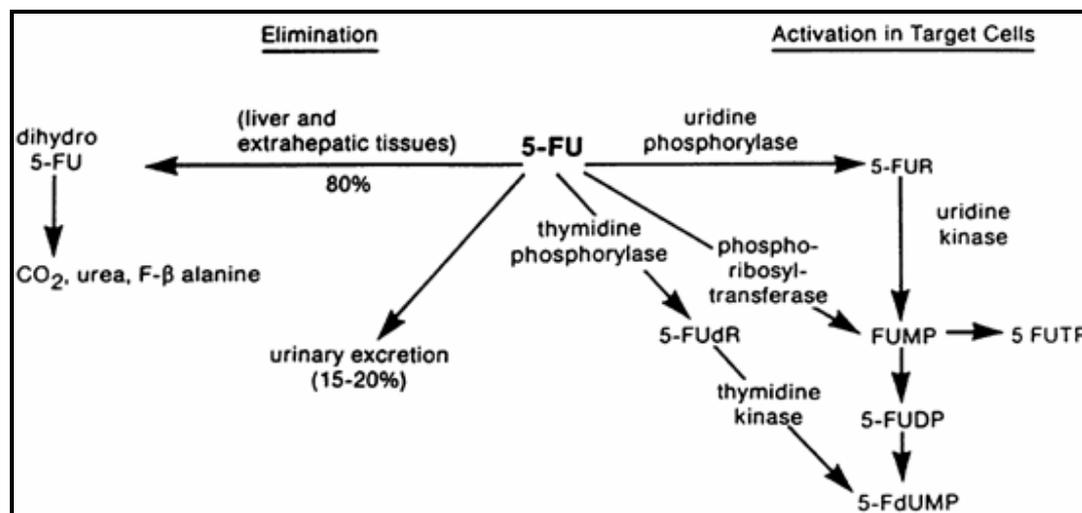
O derivado mais simples das fluoropirimidinas é o 5-Fluorouracil (5FU) – FIGURA 1 - que consiste em um análogo de uracil com um átomo de flúor no carbono 5 no lugar de um hidrogênio. A ativação do 5-FU é essencial para a sua atividade antitumoral e envolve a sua conversão a ribonucleotídeo e desoxiribonucleotídeo falsos – FIGURA 2.



**FIGURA 1: Estrutura química do 5-fluoruracil.**

Os mecanismos pelos quais o 5-FU determina lesão celular são: inibição da timidilato sintetase (TS) e incorporação ao RNA. A inibição da TS é ocasionada pela formação de desoxifluorouridina-monofosfato (FdUMP) que ao se ligar a TS evita a formação de desoxi-timidilato-monofosfato (dTMP), precursor do desoxi-timidilato-trifosfato (dTTP), nucleotídeo essencial para a síntese de DNA. A incorporação fraudulenta

desse falso nucleotídeo ao RNA com conseqüente comprometimento de suas funções se dá através da produção de fluorouridina-trifosfato (FUTP), a partir do 5FU (GREM, 2001).



**FIGURA 2: Desenho esquemático da ativação do 5-fluorouracil.** Reproduzido de De Vita, 2001.

A inibição da TS é o mecanismo responsável pela citotoxicidade precoce do 5-FU, caracterizada por sua toxicidade celular fase S específica. Após 24h da exposição à droga apresenta-se a fase tardia da sua citotoxicidade, determinada pela progressiva incorporação ao RNA. Essa fase caracteriza-se por toxicidade para células em fase G1 (MAYBAUM, 1980). A primeira fase é passível de reversão pela timidina o que não ocorre na segunda fase por razões já óbvias.

O ácido folínico intensifica a inibição da TS determinada pelo 5-FU, funcionando como cofator que forma um complexo ternário forte entre o FdUMP e a enzima, diminuindo a reversibilidade da citotoxicidade precoce pela timidina e aumentando a toxicidade do 5-FU em tumores resistentes a esse (CASCIATO, 1995).

A mielossupressão é uma toxicidade comum do 5-FU, sobretudo quando administrado por via endovenosa (EV) em bolus. Destaca-se por leucopenia e granulocitopenia, com nadir por volta do 19º dia (GREM, 1991).

A toxicidade gastrointestinal pode ser severa. É precedida por uma sensação de secura na boca, seguida por eritema, ulceração e até necrose. Pode apresentar-se em qualquer área do trato gastrointestinal (TGI), manifestando-se por: disfagia, odinofagia, pirose, diarreia, dor abdominal, proctite. Além disso, a perda da barreira protetora da mucosa facilita a disseminação bacteriana com risco de sepse. O tratamento consiste em suporte clínico: analgésicos, hidratação, antisépticos orais, anti-diarreicos, suporte nutricional, tratamento de infecções secundárias (GREM, 2001).

Outras toxicidades relacionadas com o tratamento com 5-FU são: perda de cabelo, alterações ungueais, hiperpigmentação, fotossensibilidade, flebite, síndrome de pé-mão (FABIAN, 1990; MORTIMER, 1990). Alterações neurológicas também foram relatadas, principalmente com a infusão venosa contínua, caracterizadas como distúrbios de cognição, ataxia, fraqueza muscular, etc (BYGRAVE, 1998). A cardiotoxicidade caracteriza-se por desconforto precordial, arritmias conseqüentes geralmente a espasmo coronariano (BECKER, 1999).

### **3. Mucosite oral**

#### **3.1. Definição, incidência e importância clínica**

Mucosite oral e estomatite são freqüentemente considerados sinônimos, no entanto, a primeira caracteriza-se por lesões e úlceras decorrentes de processo inflamatório que se estende da boca à região faríngeo-esofágica. A estomatite é uma inflamação dos tecidos orais que pode se apresentar ou não por lesões ulceradas e está mais relacionada a baixa higiene oral.

A mucosite oral é uma complicação bastante freqüente e limitante da terapia antineoplásica. Mucosite é relatada em 40% dos pacientes submetidos a regimes de quimioterapia contendo 5-fluorouracil, sendo toxicidade dose-limitante para o 5-FU (LOPRINZI, 1990; MIASKOWSKI, 1990 e DE CONNO, 1989). Com o avanço nas melhorias de suporte à mielossupressão, a incidência da mucosite vem aumentando, inclusive em conjunto com quimioterapia de alta dose (WILKES, 1998). A severidade da mucosite depende do tipo de patologia, dose e tipo de esquema quimioterápico utilizado, além da área irradiada e da dose, no caso de radioterapia.

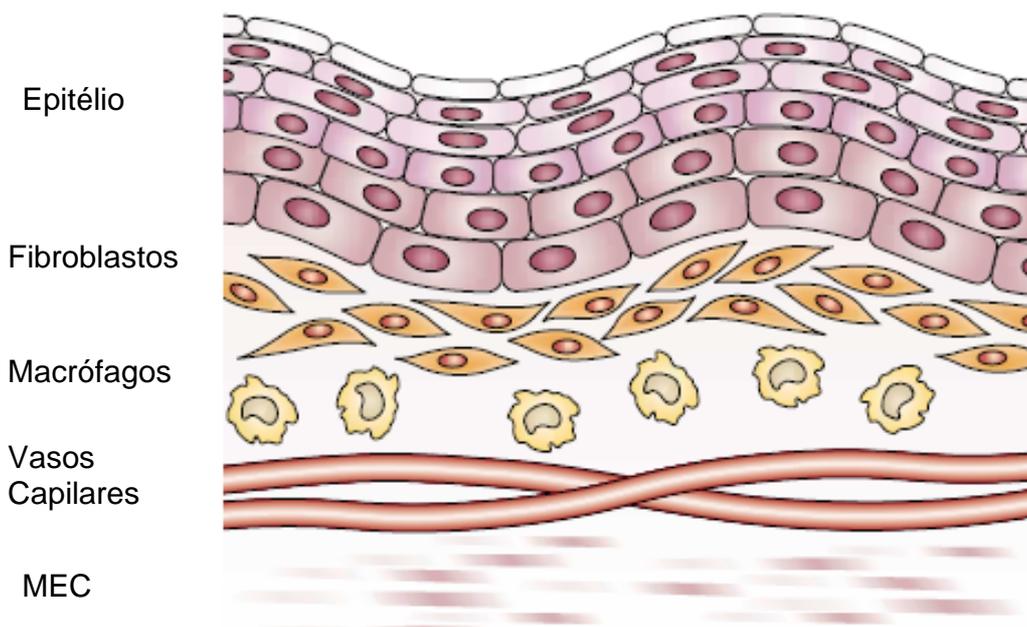
Fatores de risco ou agravantes são: tabagismo, alcoolismo, stress emocional, baixa higiene oral (CHIAPPELLI, 2005). Evidências sugerem haver uma predisposição genética ao desenvolvimento de mucosite. Polimorfismos (SNPs) em moléculas envolvidas na metabolização de alguns quimioterápicos já estão identificados. Portanto, a expressão de fenótipos que resultam na deficiência ou em defeitos de enzimas necessárias à detoxificação de algumas drogas podem tornar um indivíduo sob maior risco de mucosite (ULRICH, 2001).

Clinicamente, a mucosite oral se manifesta por eritema, descamação, ulceração, com ou sem exsudatos. A dor ocasionada por essas lesões leva o paciente a limitar a comunicação, alimentação, sono e até mesmo hidratação oral, levando-o a um estado de desnutrição, anorexia e desidratação (SONIS, 1978; CONSENSO DE COMPLICAÇÕES ORAIS DA TERAPIA ANTI-CANCER, 1990). Como consequência desse estado, esses pacientes freqüentemente necessitam de internação hospitalar, nutrição parenteral, analgesia com narcóticos, interrupções no tratamento, redução de doses, que em última instância levam a aumentos nos custos da terapia e na mortalidade, queda da qualidade de vida, diminuição da aderência ao tratamento, bem como de sua potencial eficácia (DREIZEN, 1978; SONIS, 1978 e DE CONNO, 1989). Em 35% dos pacientes com mucosite grau 3-4, o ciclo subsequente será atrasado, em 60% a dose de quimioterapia será reduzida e em 30% o tratamento será interrompido. Em regimes de dose convencionais de QT, 70% dos pacientes com esse grau de mucosite necessitarão de sondagem naso-enteral para nutrição, 60% terão febre e 62% necessitarão internação, comumente com necessidade de analgésicos narcóticos (SONIS; ELTING, 2004). Essas consequências clínicas incorrem também em impacto financeiro no tratamento oncológico. ELTING e colaboradores (2003) relatam incremento de \$ 2725 e \$ 5565 nos custos por ciclo de pacientes que apresentam mucosite oral graus 1-2 e graus 3-4, respectivamente.

### **3.2 Fisiopatologia**

A complexidade da mucosite oral tem sido melhor reconhecida mais recentemente, através dos conhecimentos de biologia molecular e da epidemiologia dessa toxicidade. Tradicionalmente, a mucosite oral fora considerada um evento relacionado exclusivamente ao epitélio e ocasionado pelos efeitos inespecíficos da quimio e/ou radioterapia (LOCKART, 1981). Acreditava-se que a ação direta desses tratamentos causava diminuição da renovação do epitélio, ocasionada por seus efeitos anti-proliferativos sobre a camada basal. Atualmente pode-se verificar a participação de outros tipos celulares na gênese da mucosite oral (FIGURA 3).

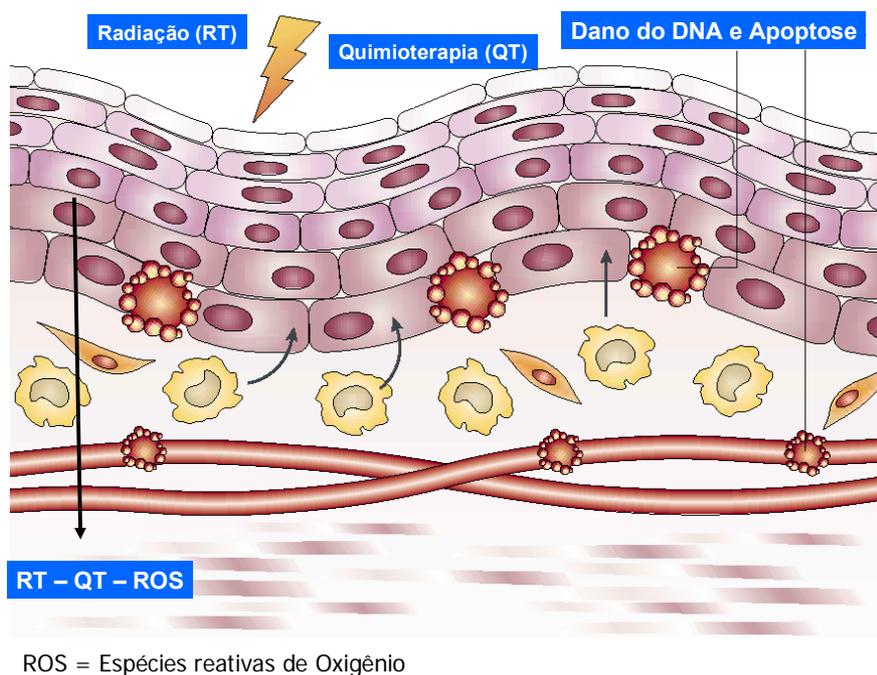
Evidências morfológicas sugerem que o dano endotelial e do tecido conectivo precede o epitelial (PARIS, 2001). Além disso, pacientes submetidos a quimioterapia com toxicidade não-hematológica têm elevados níveis séricos e tissulares de fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) e das interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6); (HALL, 1995). Agentes que causam depleção dessas citocinas promovem atenuação da mucosite em modelos animais e humanos (SONIS, 2000 e EPSTEIN, 2001).



**FIGURA 03: Desenho esquemático da mucosa oral normal.** Modificado de Nature Rev Cancer – 4(4) 277, 2004.

Um modelo de cinco etapas foi recentemente proposto por SONIS (2004) como explicação dos eventos que culminam com a instalação da mucosite oral: iniciação, geração de mensageiros intracelulares, sinalização e amplificação, ulceração com inflamação e, finalmente, cicatrização.

O evento que marca a fase de iniciação é a geração de espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS) pela quimioterapia e radioterapia. Essa hipótese foi reforçada por relatos de geração de ROS após exposição a agentes indutores de mucosite (GATE, 1999), além da reversão da mucosite após tratamento com drogas que bloqueiam radicais livres de oxigênio (CULY, 2001). Uma vez produzidos, os ROS causam lesão direta ao DNA, às membranas celulares, proteínas (FIGURA 04).

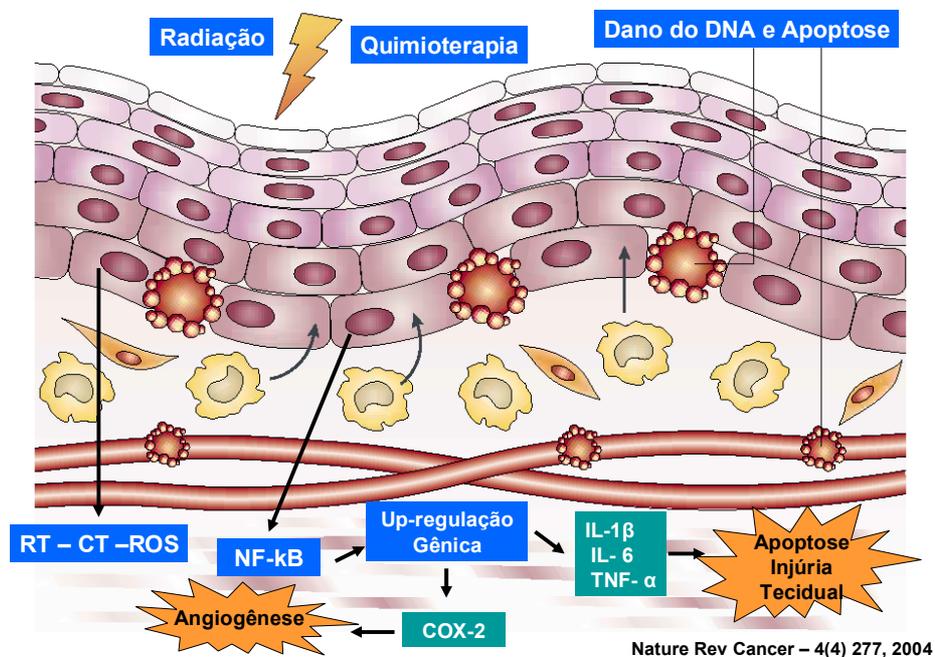


**FIGURA 04 - Desenho esquemático da fase inicial da mucosite oral.**

Modificado de Nature Rev Cancer – 4(4) 277, 2004

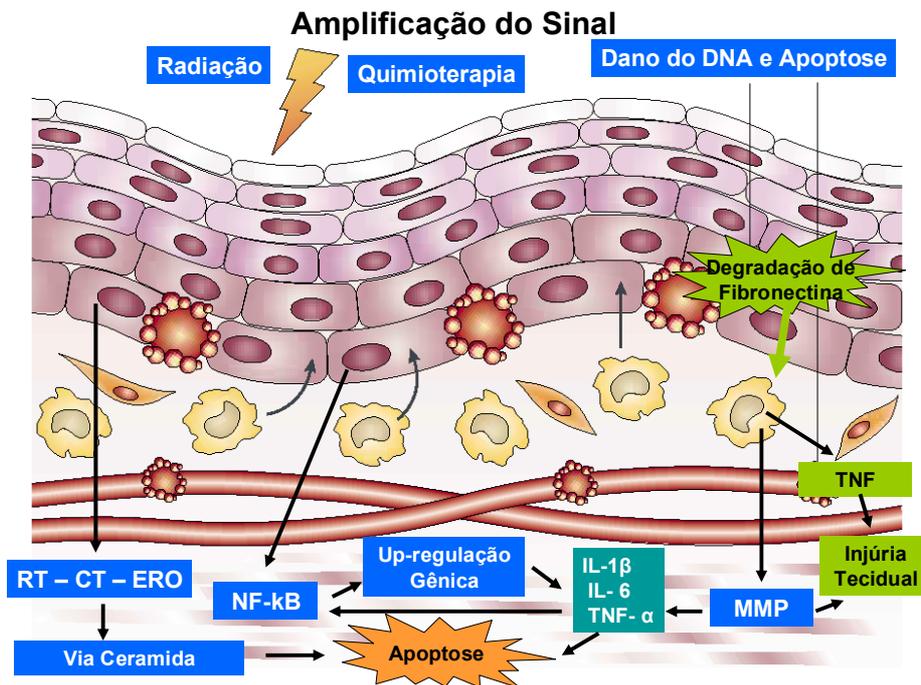
A segunda fase caracteriza-se pela geração de sinais intracelulares que culminam com a produção de fatores de transcrição. O mecanismo pelo qual ROS desencadeiam essa seqüência de eventos ainda não é compreendido (SONIS; ELTING, 2004). O fator nuclear kB (NF-kB) é um dos principais fatores de transcrição implicados na fisiopatologia da mucosite oral. Uma vez ativados esses fatores promovem a expressão de vários genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$ , expressão de moléculas de adesão, ativação da via da ciclooxigenase - 2, angiogênese, indução de apoptose. Os ROS também podem ativar a esfingomeilinase, junto com a quimioterapia podem ativar diretamente a ceramida-sintase que leva à apoptose (MADDENS, 2002). Durante essa segunda fase há quebra da fibronectina, os macrófagos

são ativados em seguida, levando à produção de mais  $TNF\alpha$  e também de metaloproteinases que promovem mais lesão tecidual (FIGURA 05).



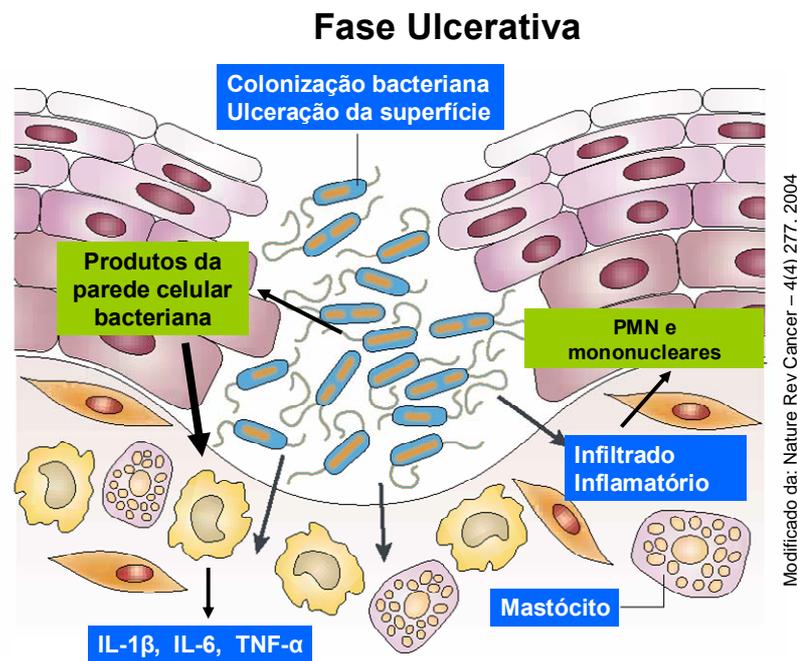
**FIGURA 05 : Desenho esquemático da segunda fase da mucosite oral**

A terceira fase é marcada pela amplificação dos eventos já desencadeados na 2ª fase e portanto, por maior expansão da lesão dos tecidos. Por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias produzidas por si só podem estimular a produção de mais citocinas, assim como de mais fatores de transcrição e ativar mais vias de apoptose, etc. Vale ressaltar que nessa fase a mucosa pode apresentar-se macro e microscopicamente normal (FIGURA 06).



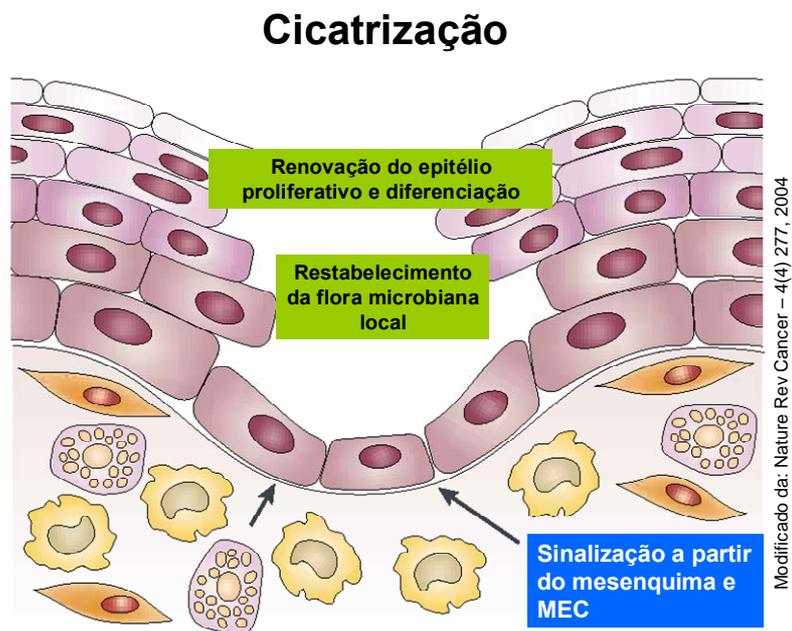
**FIGURA 06: Desenho esquemático da fase de amplificação de sinal e dano celular na mucosite oral.** Modificado de Nature Rev Cancer – 4(4) 277, 2004

A fase que marca os achados visíveis clinicamente e histologicamente decorrentes das anteriores é a quarta. Nessa já se detecta presença de infiltrado inflamatório intenso, às custas principalmente de polimorfonucleares mas também de mononucleares, e a ulceração visível da mucosa. A fase de ulceração facilita a colonização bacteriana que também contribui para a amplificação da resposta inflamatória. As principais conseqüências dessa fase são dor e infecção secundária, com todos os riscos inerentes a essas manifestações: desidratação, desnutrição, sepse e atrasos no tratamento oncológico (FIGURA 07).



**FIGURA 07: Desenho esquemático da fisiopatologia de mucosite oral (4ª fase).**

A fase final caracteriza-se pelo aspecto aparentemente normal da mucosa. A cicatrização se inicia a partir de um sinal desencadeado pela matrix extracelular que leva a proliferação epitelial, diferenciação e normalização da flora bacteriana. Embora a aparência nessa etapa seja de uma mucosa completamente restaurada, de fato algumas alterações persistem mesmo que em menor intensidade, como a angiogênese. Esse fato torna os pacientes agora sob maior risco de novos episódios de mucosite em ciclos subsequentes (FIGURA 08).



**FIGURA 08:** Desenho esquemático da fase de cicatrização da mucosite oral.

### **3. Classificação**

Para a adequada avaliação, definição da gravidade e indicação precisa de uma medida terapêutica, ajuste de dose ou continuidade do tratamento oncológico, bem como para melhor avaliação da eficácia de determinada um agente anti-mucosite no contexto de um estudo clínico é necessária a padronização de um sistema de classificação de severidade de mucosite. Tal escala deve ser objetiva, reprodutível tanto em estudos clínicos como na rotina e deve ser utilizável na eventualidade da mucosite ser decorrente tanto de radio como de quimioterapia (ou associação dos mesmos).

Uma série de modelos de escalas de mucosite são amplamente utilizadas, o que dificulta muitas vezes a interpretação e reprodutibilidade de dados de estudos clínicos. Tais escalas se baseiam na correlação de: aparência clínica da mucosa, severidade da dor e habilidade funcional do paciente, como capacidade de se alimentar ou se hidratar. As mais comumente utilizadas na rotina e na pesquisa clínica são as desenvolvidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e do National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC).

#### 4. Tratamento e prevenção

Até o momento não se estabeleceu tratamento consensualmente eficaz para a mucosite oral, devendo-se garantir ao paciente afetado tratamento sintomático, antimicrobiano se necessário e suporte nutricional. Duas revisões sistemáticas focam sobre a prevenção da mucosite oral induzida por quimioterapia. A mais antiga concluiu que a maioria das medidas avaliadas têm evidência insuficiente para que se estabeleça uma conduta padrão (KOWANKO, 1998). A outra se concentrou em pacientes com tumores de cabeça e pescoço e combinou todas as intervenções numa só análise, concluindo pelo benefício das medidas profiláticas (SUNDERLAND, 2001).

Uma meta-análise da Cochrane Library (CLARKSON, 2006) utilizou 52 “*trials*” clínicos envolvendo 3594 pacientes sob 21 intervenções diferentes para mucosite oral. A ausência de duplicidade de estudos investigando a mesma intervenção limitou a evidência e generabilidade dos tratamentos em questão. Nove das 21 intervenções demonstraram alguma evidência de benefício, embora fraco, em prevenir ou diminuir a severidade da mucosite. Uma das intervenções envolvendo tratamento com ácido fólico se mostrou pior que o placebo. Das potenciais intervenções positivas destacam-se:

- 1) Bochechos com alopurinol – evidência positiva para redução da severidade da mucosite com dados de dois pequenos estudos;
- 2) Amifostine (“*scavenger*” de radicais livres) – evidência positiva pequena para redução de risco (RR = 0.95) e diminuição de severidade (RR = 0.83). Maior base de dados envolvendo mais de 400 pacientes em 5 estudos. Não houve diferenças em relação ao grupo controle em termos de eficácia do tratamento

- oncológico e efeitos colaterais, com exceção de vômitos (RR = 5.92 para amifostine);
- 3) Antibióticos tópicos – podem ser benéficos em prevenção com RR = 0.87, baseado em 2 estudos com pacientes com câncer de cabeça e pescoço;
  - 4) Benzidamina (citoprotetor) – importante benefício em prevenção, RR = 0.67. Baixa evidência devido a apenas 1 estudo envolvendo 36 pacientes;
  - 5) GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos) – evidência em favor de redução do risco de mucosite, RR = 0.55 em três estudos com 249 participantes. Sem diferenças em termos de eficácia do tratamento oncológico e de toxicidade em relação ao grupo controle, exceto por reação cutânea local, RR = 27;
  - 6) Enzimas hidrolíticas – benefício moderado na redução da severidade da mucosite (RR = 0.49);
  - 7) Cubos de gelo durante a infusão de quimioterapia – evidência de eficácia na redução de severidade da mucosite em estudos envolvendo 166 pacientes tratados com 5-FU;
  - 8) Povidone comparada com água – mais efetiva na redução da severidade da mucosite que a água, baseado em estudo único com 40 pacientes;
  - 9) Cuidados orais – apenas 1 de dois estudos mostrou benefício na redução da severidade da mucosite, RR = 0.6. Fraca evidência

devido a estudo envolvendo apenas 30 pacientes com tumores de cabeça e pescoço.

Apesar de algumas das intervenções citadas terem apresentado algum benefício, as evidências ainda são pequenas e variáveis de tal forma que na prática clínica, tais benefícios devem ser tomados como específicos para certos tipos de tumores e certos tratamentos. Da mesma forma, percebe-se a necessidade de estudos clínicos bem desenhados e conduzidos, com número de pacientes suficientes para análise de subgrupos por tipo de doença e de agente terapêutico e com inclusão de outros parâmetros clínicos de avaliação.

Muitas são as dificuldades metodológicas em comparar ou reproduzir os estudos que abordam prevenção e/ou tratamento da mucosite oral e portanto uniformizar a conduta nesse sentido. Dentre elas estão: os pesquisadores utilizam diferentes sistemas de escores de mucosite, cada um com diferentes objetivos, sem um questionário de avaliação de qualidade de vida uniforme, variedade nos grupos profissionais que conduzem tais estudos (oncologistas clínicos, dentistas, radioterapeutas, hematologistas) e finalmente a origem empírica e não investigacional a partir da qual a maior parte dos tratamentos passaram a ser testados (RUBENSTEIN, 2004).

Baseado na situação acima descrita e na inegável importância clínica da mucosite na prática clínica, a Associação Multinacional de Cuidados Paliativos e a Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) criaram a Seção de Estudos em Mucosite em 1998 composta por experts de diversas áreas da oncologia para estudar aspectos importantes da pesquisa de mucosite. Em 2000, esse painel estabeleceu um modelo de medidas preventivas e terapêuticas baseadas em evidências em mucosite oral e intestinal. Esse painel era composto de oncologistas orais, radioterapeutas, oncologistas

clínicos, cirurgiões, patologistas, enfermeiras, dentistas, cientistas básicos, microbiologistas e epidemiologistas. Conforme as recomendações do painel para o tratamento da mucosite oral estabelecida incluem-se cuidados orais, analgesia opióide, anestésicos locais. Na prevenção da mucosite a conduta é individualizada de acordo com o tratamento oncológico. Para pacientes em radioterapia de cabeça e pescoço propôs: uso de blocos e de tratamento tridimensional, além do uso profilático de benzidamida tópica (atividade antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana). Para pacientes submetidos a quimioterapia em dose convencional a recomendação para prevenção é crioterapia em pacientes em quimioterapia com 5-FU. Para pacientes submetidos a quimioterapia com alta dose é recomendado como prevenção: laser terapia de baixa dose (LLLT) em centros especializados, com tecnologia adequada (RUBENSTEIN, 2004).

#### **4. Drogas utilizadas na abordagem terapêutica**

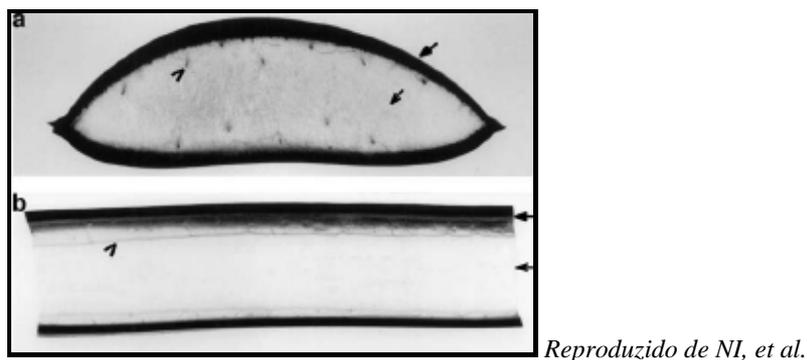
#### 4.1. Aloe vera

*Aloe vera* Linné, também conhecida como *Aloe barbadensis* Miller, pertence à família Liliaceae. É popularmente conhecida como babosa e constitui-se de uma planta com caule curto e estolonífero e raízes abundantes, longas e carnosas, cultivada principalmente na região subtropical dos Estados Unidos (SCHMID, 1991) para uso cosmético (FIGURA 09). Tem sido utilizada como fitoterápico em várias culturas (KLEIN, *et al*, 1988). A parte central de suas folhas contém uma polpa mucinosa que contém o gel de aloe vera propriamente dito. Apesar de seu uso popular amplo, pouco se conhece com precisão sobre seu mecanismo de ação e seus efeitos patofisiológicos (RAJASEKARAN, *et al*, 2006). Duas preparações são as mais utilizadas medicinalmente: o exsudato da folha (aloe) que é utilizado popularmente como laxativo e apresenta atividade antidiabética e cardioestimulatória e o gel mucogelatinoso (aloe vera) extraído do parênquima da folha (FIGURA 10) que é usado para diversas afecções cutâneas (CAPASSO, 1997; GHANNAM, 1986 e YAGI, 1982).



**FIGURA 09: Aspecto da árvore de *Aloe vera* L.**

*Aloe vera* demonstrou atividade antiinflamatória, com redução do edema e dor e cicatrizante em úlceras, queimaduras e doenças de pele de forma dose-dependente (DAVIS, 1989; PARISH, 1991 e KLEIN, 1988). Há relatos de atividade antiulcerogênica em mucosa gastrointestinal provavelmente devido às suas propriedades antiinflamatórias, citoprotetivas, cicatrizantes e de estimulador de produção de muco (MAHATTANADUL, 1995; ROBERT, 1979 e VISUTHIPANICH, 1988).



**FIGURA 10: Cortes transversal (a) e longitudinal (b) da folha de *Aloe vera* L. A parte interna mais clara representa a polpa gelatinosa, a parte escura indica a casca.**

Ratos com diabetes induzidos por streptozotocina tiveram seus níveis de glicose, colesterol e triglicérides séricos de volta a valores normais quando tratados com o gel do extrato de *Aloe vera* (300mg/kg) por via oral diariamente por 21 dias (RAJASEKARAN, et al, 2006).

Pelo menos dois componentes fenólicos de *Aloe vera* foram isolados e demonstraram atividade antioxidante, com inibição na produção de superóxido e radicais hidroxila em torno de 30 e 40%, respectivamente. Apesar disso, um desses componentes diidrocomarínicos também demonstrou aumentar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais isolados de ratos (ZHANG et al, 2005). Cultura de queratinócitos humanos estimulados com polissacarídeo de *A. barbadensis* secretam TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF e sofrem inibição na produção de óxido nítrico (CHEN, et al, 2005).

Acemanan, uma mistura de polímeros de cadeias de b-(1,4)-acetil-manan de variados tamanhos, com peso molecular (PM) de cerca de 80 KDa, constitui a maior e mais bem estudada fração de carboidratos isolados do gel de *Aloe vera* (MANNA and McANALLEY, 1993). Há relatos de que acemanan promove a cicatrização de úlceras

aftosas em humanos (GRINALAY, 1986) e de feridas de biópsia em ratos (TIZARD, 1994). Uma vez administrado a camundongos com tumores, acemannan curou completamente ou reduziu significativamente o volume tumoral (PENG, 1991). Tal atividade antitumoral deve-se provavelmente a ativação do sistema imunológico mais do que por citotoxicidade direta ao tumor. Há relatos de aumento da resposta linfocitária a aloantígenos, ativação da produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  e de NO por macrófagos, assim como aumento de sua capacidade fagocítica (WOMBLE, 1992; ZHANG, 1996 e RAMAMOORTHY, 1996). Essa atividade imunomodulatória parece ser mediada pela ativação de macrófagos, através da ligação aos receptores de manose presentes em sua superfície (TIETZE, 1982).

É relatado que *Aloe vera* pode diminuir edema induzido por carregenina e a migração de neutrófilos em ratos (VA'ZQUEZ, 1996). Em outros modelos experimentais de queimaduras apresenta atividade antiinflamatória, reduzindo a adesão de leucócitos, inibindo a produção de prostaglandina F2a e tromboxano B2 (HEGGERS, 1979). Tromboxanos e prostaglandinas podem causar agregação plaquetária, aderência de leucócitos e vasoconstricção. Há também relatos de atividade anti-bradicinina (DAVIS, 1989). Estudos “*in vivo*” demonstraram a capacidade de *Aloe vera* em induzir angiogênese (MOON, 1999).

Em um modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético a 20% verificou-se que ocorre elevação dos níveis de TNF $\alpha$  através da estimulação de macrófagos residentes. TNF $\alpha$  estimula a expressão no endotélio e no neutrófilo de moléculas de adesão como ICAM-1 e LFA-1 (CD11a / CD18), respectivamente. Essas moléculas teriam papel importante no processo inflamatório em questão, uma vez que promoveriam migração de neutrófilos para o sítio de inflamação, ampliando assim o processo inflamatório

(KONTUREK, 2000). Além disso verifica-se que a administração de ácido acético também causa precoce diminuição dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória que age inibindo a produção de TNF $\alpha$  por macrófagos (FIORENTINO, 1991). Nesse modelo, demonstrou-se que *Aloe vera*, assim como sucralfato reduziram a inflamação e promoveram a cicatrização gástrica (evidenciados à histopatologia como proliferação epitelial, alongação e dilatação das glândulas oxínticas). Eamlamnam *et al* (2006) demonstraram que esse efeito parece estar relacionado à estimulação pelo *Aloe vera* da produção de IL-10 que, por sua vez, causou redução nos níveis de TNF $\alpha$  nos dias 1 e 8 após a indução da úlcera. Há também relatos de um efeito citoprotetor do *Aloe vera* na mucosa gástrica através da produção de prostaglandinas endógenas (ROBERT, 1979).

Outro polissacarídeo recentemente isolado, com peso molecular de 4 a 7 milhões de Da e com potente atividade imunomodulatória é o aloride (PUGH, 2001). Alguns autores atribuem a atividade do acemanan à presença no mesmo de resíduos de aloride. Aparentemente formas menores de polissacarídeos acetilados, conhecidos como MAP (do inglês: Modified Aloe Polissacarideo) têm sido isolados do gel de aloe tratado com celulase e apresentam atividade imunomodulatória bem mais potente que os polissacarídeos nativos (QUI, 2000). Parece que MAPs com peso molecular maior que 400Kda têm atividade imunológica marginal, enquanto aqueles com PM entre 5 a 400 Kda apresentam uma maior potência imunomodulatória, caracterizando a relação entre o tamanho da molécula e sua atividade biológica. Outro dado importante é que moléculas menores apresentam obviamente maior biodisponibilidade (IM, 2005).

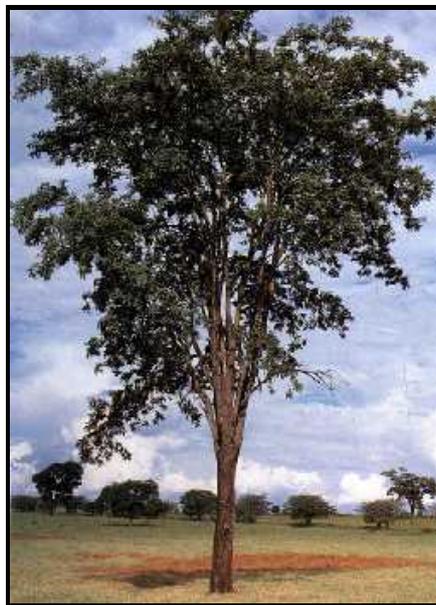
Acredita-se que o gel contenha mais de 200 componentes, vários desses ou uma mistura dos mesmos foram implicados como os responsáveis pela sua atividade biológica e efeitos em cicatrização (REYNOLDS, 2004). As diferentes formas de apresentação

derivadas da mucilagem das folhas de *Aloe vera* L disponíveis são estabilizadas e preparadas por diversos métodos desde extração por solvente sob condições extremas até processos de extração por secagem em baixas temperaturas. O produto resultante é variável em relação à sua composição e ao comprometimento da propriedade cicatrizante da droga “*in natura*” (ROBBERS, 1996). DORNELES *et al* (2003) determinaram que o mucílago de babosa a 50%, obtido por processo de dissolução da mucilagem com moagem, aquecimento e filtragem sob pressão favorece a contração de feridas em modelo de feridas experimentais em coelhos. Já a solução de mucilagem seca a 0,25%, obtida por concentração da mucilagem por “*freeze-dried*” favore a reepitelização das lesões anteriormente citadas.

Apesar das evidências pré-clínicas que demonstram uma importante atividade antiinflamatória e cicatrizante, a experiência clínica em literatura é bastante rara e não confirma os dados experimentais em complicações do tratamento oncológico. Williams e colaboradores (1996) falharam em demonstrar prevenção de dermatite em pacientes com câncer de mama sob tratamento com radioterapia, tratados com aplicação tópica de *Aloe vera*. Da mesma forma o uso profilático de uma solução de *Aloe vera* em bochechos por pacientes submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço, em um estudo duplo-cego, randomizado, não evitou a mucosite oral e suas consequências nesses pacientes (SU, 2004). As críticas aos estudos clínicos que testaram os efeitos da babosa estão relacionadas à não padronização da escala de escores utilizada, bem como, à não padronização da amostra da planta, a época de sua coleta, seus métodos de preparação, extração e concentração (importância citada anteriormente), e ao fato de que a aplicação tópica ou através de bochechos pelos próprios pacientes pode ser comprometida por erros de utilização e falta de aderência, atrapalhando a disponibilidade e atividade da droga.

#### 4.2. Aroeira-do-sertão

A *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. pertence à família Anacardiaceae e é uma árvore típica da caatinga do Nordeste do Brasil, especialmente Ceará. A árvore tem altura de 06 a 14m na caatinga e cerrado, podendo atingir até 25 m em solos mais férteis (FIGURA 11). É bastante explorada devido a sua madeira extremamente resistente e durável, sendo utilizada na construção civil, marcenaria e carpintaria (LORENZI, 1992). Devido a superexploração encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (MENDONÇA e LINS, 2000). Vulgarmente conhecida como “Aroeira-do-sertão”, o extrato aquoso da entrecasca dessa planta é popularmente utilizado no tratamento de inflamações ginecológicas, bem como afecções de trato urinário, respiratório e gastrointestinal.



**FIGURA 11:** Foto ilustrativa da árvore da aroeira-do-sertão

Vários trabalhos já demonstraram a potente atividade antiinflamatória e analgésica dos extratos aquosos e hidroalcoólicos da *M. urundeuva* em modelos experimentais de inflamação aguda e subaguda (Menezes, 1986), bem como sua atividade antidiarréica e anti-ulcerogênica (MENEZES, 1988 e VIANA, 1997). Rodrigues *et al*, 2000 demonstraram diminuição no edema e exsudato inflamatório, com aumento significativo na regeneração epitelial colônica de ratos submetidos à colite induzida por ácido acético e tratados com enemas contendo extrato de aroeira.

A aroeira demonstrou ser uma droga segura. A toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico da planta foi avaliada em estudos pré-clínicos. Os principais efeitos observados após administração intra-peritoneal em ratos (doses de 50 mg a 1,6g/kg de peso) foram: ptose, piloereção e diminuição da atividade motora espontânea. O uso de doses acima de 1,6g/ kg i.p. levou a depressão, seguida de coma e morte por parada respiratória num intervalo de 48 horas. A administração por via oral em doses de até 5g/kg de peso não determinou qualquer alteração comportamental. A dose letal 50 (DL50) foi de 2,2g/ kg de peso. O extrato aquoso teve avaliação toxicológica realizada em cães e ratos. A DL 50 foi de mais de 5g e 760mg/ kg de peso após administração oral e i.p., respectivamente, portanto não houve novamente toxicidade observada após a administração oral. Cães submetidos a tratamento de 200mg/kg/dia por 30 dias não apresentaram alterações comportamentais, de peso, hematológicas ou de mortalidade. Em termos de toxicidade crônica a administração v.o (200 a 400mg/Kg) do extrato em ratos durante 90 dias não determinou alteração comportamental. Também não houve alteração no peso corpóreo nem de parâmetros hematológicos ou dos níveis sanguíneos da glicemia. A mortalidade foi de 20, 30 e 10% para as doses de 200 e 400mg/ kg de peso e grupo

controle, respectivamente. Não se detectaram lesões patológicas associadas com a droga nos órgãos examinados (Viana *et al*, 1995).

O fracionamento cromatográfico do extrato de aroeira resultou no isolamento de 07 frações, sendo duas com atividade antiinflamatória: F (8-13) e F (18). A primeira em questão mostrou tratar-se de uma mistura chalcônica e a segunda continha predominantemente taninos catéquicos (VIANA, 1997).

O isolamento dos componentes da fração chalcônica revelou a presença de ésteres de três novas chalconas diméricas. A primeira ou *Urundevina A*, sob nome químico de 2'-hidroxi, 4, 4',5, trimetoxichalcona (8 – 8'', 2 – 7'') – 2'', 4''-dihidroxi-4''' –metoxi-cis-7'', 8''-dihidroxi-chalcona e a *Urundevina B* sob nome químico de 2'-hidroxi, 4, 4',5, trimetoxichalcona -(8 – 8'', 2 – 7'') – 2'', 4''-dihidroxi-4''' –metoxichalcona e *Urundevina C* (Bandeira, 2002). As chalconas e dihydrochalconas pertencem à classe dos flavonoides que, além de sua atividade antioxidante apresentam a capacidade de fortalecer a parede vascular, facilitando a circulação e atividade antiinflamatória, através da inibição da ciclo e da lipooxigenase (Zuanazzi, 1999). Daí o uso popular da aroeira em tratar hemoptise, varizes, epistaxes.

Culturas de macrófagos ativadas com zymosan sofrem potente inibição da liberação de ânion superóxido pelo tratamento com 4-dimethylamino-3', 4'- dimethoxychalcona (CH11), além disso há prevenção da morte celular na presença de stress oxidativo. As CH11 reduzem a expressão de iNOS (NO sintase induzida) nos macrófagos ativados e dos níveis de nitrito no sobrenadante das culturas expostas ao zymosan. No modelo de bolsa de ar em camundongos a presença de CH11 também promoveu redução da produção de superóxido, bem como nos níveis de prostaglandina E2 (PGE2), leucotrieno B4 (LTB4) e TNF $\alpha$  após injeção de zymosan. Tanto após injeção local como após administração v. o., as

CH11 inibiram o edema de pata induzido por carragenina. (HERENCIA *et al*, 2001). Foi demonstrado que derivados das chalconas determinaram inibição da degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 e de neutrófilos induzida pelo fMLP/CB, além da inibição da liberação de superóxido por esses últimos. Esses efeitos antiinflamatórios permaneceram mesmo em camundongos adrenalectomizados (HSIEH, *et al*, 1998). A atividade de “*scavenger*” de espécies reativas de O<sub>2</sub> (ROS) das chalconas é dependente de seu padrão de hidroxilação (NISHIDA e KAWABATA, 2006). Chalconas derivadas da *M. urundeuva* administradas *i. p.* causaram significativa inibição da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais, no teste da formalina e no teste da placa quente; o edema de pata induzido por carragenina também foi inibido por esses componentes, de forma marcante após administração *i. p.* (VIANA *et al*, 2003).

O forte sabor adstringente da entrecasca da aroeira já indica por si só a presença de taninos, sendo que a maioria constituindo-se de taninos catéquicos (9,8%). Os taninos naturais estão divididos em taninos condensados e hidrolisáveis (HASLAM, 1989). Os primeiros constituem-se de oligômeros e polímeros de flavan-3-ols (derivados catéquicos), também conhecidos como protocianonidinas. Os taninos hidrolizáveis são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido elágico) e dividem-se em: galotaninos e os elagitaninos (CHUNG *et al*, 1998; KHANBABAE, *et al*, 2001) Os taninos condensados estão associados a algumas atividades biológicas como: antioxidantes, anti-alergênicos, anti-hipertensivos, antimicrobianos e antimutagênicos (SANTOS-BUELGA, 2000 e SRIVASTAVA, 2000). ISENBURG *et al*, 2004 demonstraram que o ácido tanínico é capaz de interagir com a elastina e protegê-la da degradação pela elastase. O tratamento de aorta suína com tanino melhora a resistência à degradação e calcificação em modelo experimental (ISENBURG *et al*, 2005).

**II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

## II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS:

Indiscutivelmente a mucosite é o maior desafio no manejo das toxicidades relacionadas a terapia oncológica local (RT) e sistêmica (QT). Além dos sintomas associados a essa manifestação e do seu impacto na qualidade de vida dos pacientes a mucosite afeta outros aspectos do tratamento oncológico como o seu desfecho e seus custos.

Assim como as toxicidades hematológicas do tratamento oncológico podem ser efetivamente controladas com o uso de fatores de crescimento hematopoético, o controle da mucosite oral tem se tornado cada vez mais imprescindível. No entanto, não há terapia padrão de prevenção ou controle para a mucosite.

Avanços no conhecimento da fisiopatologia da mucosite nos permitem identificar vários alvos para possíveis intervenções terapêuticas contra a mucosite mas que não interfiram com a eficácia do tratamento oncológico e que acarretem o mínimo ou nenhum efeito adverso adicional, além de baixo custo. Esses últimos aspectos são de fundamental importância considerando que garantir qualidade de vida é essencial na abordagem do paciente com câncer e o fato de já ser a terapia oncológica ainda atualmente bastante onerosa.

Evidências sugerem a participação ativa do endotélio e do tecido conectivo no dano tecidual que culmina com a mucosite oral. Mais do que isso, o dano a esses dois elementos precede o do epitélio (SONIS, 2000 e MANAKOVA, 2003). Conforme já discutido anteriormente na fisiopatologia da mucosite oral, a cascata de eventos que culminam com as manifestações clínicas de ulceração e dor envolvem inicialmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da ação da QT e/ou da RTX. Essas substâncias por sua

vez levam à produção de fatores de transcrição (representados principalmente pelo NF- $\kappa$ B) envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de metaloproteinases, expressão de moléculas de adesão e ativação de vias de apoptose. Essas citocinas mais predominantemente representadas por TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são capazes de amplificar a sua própria produção, induzir a expressão de mais fatores de transcrição, induzir apoptose, produzir proteases além de promover infiltração de neutrófilos, induzindo dano celular e amplificando-o.

Atualmente a utilização de drogas que bloqueiem ou reduzam a produção de alguns dos elementos acima citados é o desafio no tratamento e prevenção da mucosite oral. Nesse sentido temos alguns exemplos como a amifostine, que tem atividade de “*scavenger*” de radicais livres e reparação de DNA. A amifostina é uma pró-droga que, uma vez desfosforilada no interior da célula, gera thiol livre capaz de neutralizar produtos reativos derivados da ação de quimioterápicos, apresentando proteção preferencial pelo endotélio, glândulas salivares e tecido conectivo (KOUKOURAKIS, 2002). Outras drogas testadas experimentalmente com resultados positivos em mucosite oral são benzidamide (EPSTEIN, 2001) e N-acetilcisteína (BLONDER, 2001), ambas com capacidade de inibir ação dos ROS. A primeira também demonstrou inibir a produção de TNF $\alpha$  (SIRONI, 1997) e a outra demonstrou capacidade de inibir a ativação de NF- $\kappa$ B e, em consequência, de bloquear a produção de TNF $\alpha$  e IL-6 (LAPPAS, 2003). Uma outra abordagem que tem sido explorada já em estudos clínicos é a utilização da palifermina (keratinocyte growth factor 1 – KGF1) (SPEILBERGER, 2003). Essa droga é capaz de: induzir fatores de transcrição responsáveis pela produção de enzimas envolvidas na detoxificação de ROS em vários tipos celulares (BRAUM, 2002), reduzir a produção de TNF $\alpha$  e outras citocinas (PANOSKALTSIS, 2000). A oprevelcina (IL-11) também tem mostrado atividade na

redução da mucosite oral, provavelmente pela sua capacidade de inibir o gene de  $TNF\alpha$  (MOTA, 2004).

Tanto a *M. urundeuva* quanto *A. barbadensis* são plantas de grande disponibilidade, cultivo relativamente simples e pouco oneroso. Conforme já descrito anteriormente ambas possuem atividade antiinflamatória determinada em vários ensaios. *Aloe vera* demonstrou além disso atividade imunomodulatória, cicatrizante e de “scavenger” de radicais livres. Dentre suas propriedades antiinflamatórias citam-se: inibição da produção de NO, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos e produção de citocinas antiinflamatórias. A aroeira-do-sertão mostrou como atividade antiinflamatória sua capacidade de inibição da ciclo e da lipooxigenase, inibição da produção de PGE2 e LTB4, inibição da liberação de ânion superóxido, bloqueio de radicais livres e inibição da NO sintase induzida.

Diante do exposto nossos objetivos consistem em:

1. Avaliar o efeito da *M. urundeuva* na mucosite oral experimental induzida por 5-FU, através de escores macroscópicos de intensidade de mucosite, histopatologia, dosagem de mieloperoxidase e variação de massa corpórea.
2. Avaliar o efeito da *Aloe barbadensis* na mucosite oral experimental induzida por 5-FU, através de escores macroscópicos de intensidade de mucosite, histopatologia, dosagem de mieloperoxidase e variação de massa corpórea.
3. Avaliar possíveis modulações dos produtos acima na produção de  $TNF\alpha$  e NOSi nos tecidos sob efeitos dos mesmos, através da análise de sua expressão por imunohistoquímica.

**III. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1. ANIMAIS**

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas determinadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC para uso de animais. Esses foram mantidos sob controle de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante todo o período dos experimentos e tiveram todo o empenho da equipe em minimizar o número de animais, dor, sofrimento e stress dos mesmos.

Foram utilizados hamsters *Golden (Mesocricetus auratus)* predominantemente machos, com massa corporal entre 120 e 200 gramas (g), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), onde foram alojados em gaiolas em número de 5 animais em cada com alimentação e água à vontade.

#### **2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS**

- Balança analítica Ohaus AS2600
- Balança analítica Marte AL200
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- ELISA ELX 800 – Biotex
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergierstation T8.10 – Ika Labortechnik

- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000 $\mu$ l
- Microscópio binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Micrótomo Olympus
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)

### 3. DROGAS, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES UTILIZADOS

- FLUOROURACIL: ampola de 10ml (25mg/ml) (EUROFARMA)
- HIDRATO DE CLORAL 10% (REAGEN)
- HEMATOXILINA (REAGEN)
- EOSINA (MERK)
- FORMALDEIDO (ANALÍTICA)
- EXTRATO DE ALOE VERA: extrato seco 200:1, obtido por “*freeze dried*”, distribuído pela Viafarma, lote 048, fabricado em 05/2004, válido até 05/2007. Foram utilizados géis contendo *Aloe vera* a 25, 50 e 100%.
- EXTRATO DE AROEIRA DO SERTÃO (*M. urundeuva*): extrato fluido preparado a partir das entrecasas dessecadas da espécie *Myracrodruon urundeuva* coletadas em Itaitaia-CE, mantido conservado em geladeira para evitar oxidação prematura dos taninos e chalconas. Foram utilizados géis contendo aroeira a 5, 10 e 20%

- **PREPARAÇÃO DOS GÉIS:** usamos como espessante o carbopol 940 a 1% em meio aquoso, neutralizado com trietanolamina, conservado com 0,15% de uma mistura de nipagim e nipazol (18:2) e as quantidades de ativos que forem necessárias, como aroeira e *Aloe vera*.

- Solução salina:

Cloreto de sódio a 0,9% estéril

- Tampão fosfato de potássio:

Solução A \_\_\_\_\_ 988ml

Solução B \_\_\_\_\_ 12ml

Solução A:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 6,8g

Água destilada \_\_\_\_\_ 1L

Solução B:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 8,7 g

Água destilada \_\_\_\_\_ 1 L

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)

HTAB (Sigma) \_\_\_\_\_ 5 g

Tampão fosfato de potássio \_\_\_\_\_ 1 L

- Peróxido de hidrogênio 0,1%

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) \_\_\_\_\_ 1ml

Água destilada \_\_\_\_\_ 29 ml

- Solução de o-dianisidina (DDI):

O-dianisidina

(Sigma) \_\_\_\_\_ 16,7 mg

Tampão fosfato de potássio \_\_\_\_\_ 10ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ 50 microl

Água destilada \_\_\_\_\_ 90 ml

- TRIBROMO ETANOL a 25%
- ALCOOL ETÍLICO PA (ANALÍTICA)
- Anticorpo primário (goat anti-TNF) (SANTA CRUZ-BIOTECH)
- Anticorpo primário (goat anti-NOS) (SANTA CRUZ-BIOTECH)
- DAB (DAKO)
- Anticorpo secundário (anti-goat IgG) (BIOGEN)
- Peroxidade
- Xilol
- Tampão citrato
- PBS
- BSA a 5%: albumina bovina; cód. A-7906, Sigma

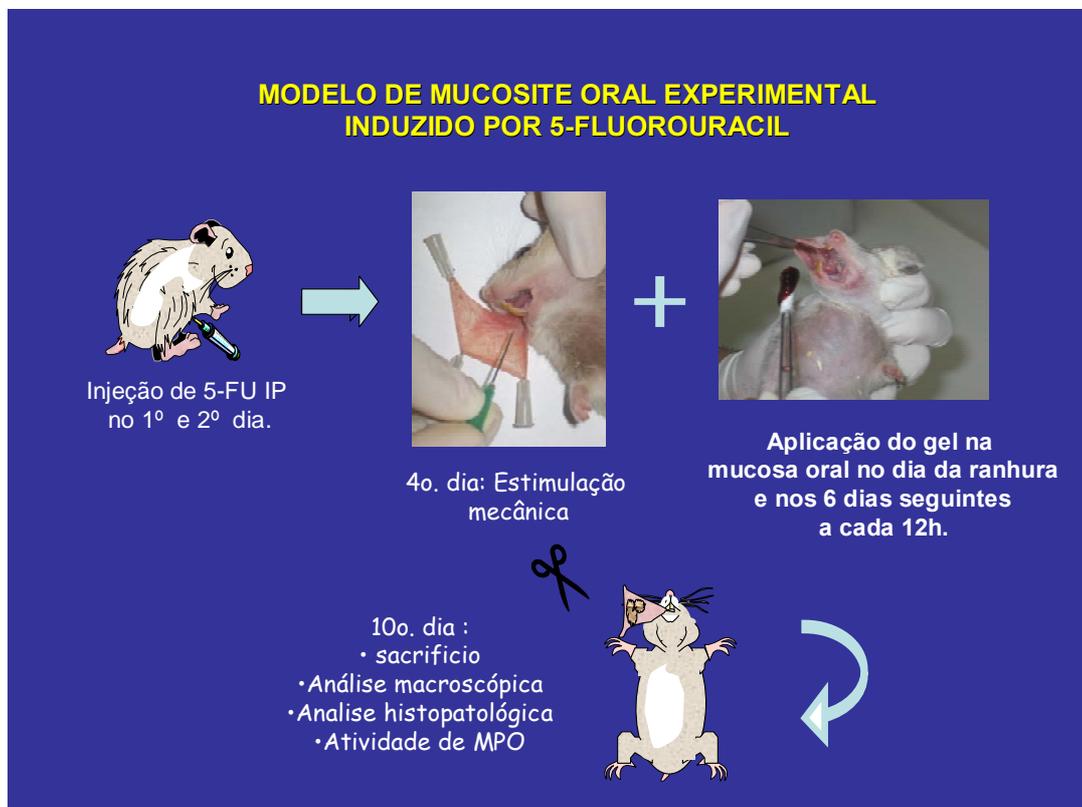
### **3. PROTOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **3. 1. Modelo de mucosite oral induzida em hamsters**

Utilizou-se o modelo de mucosite experimental, originalmente desenvolvido por SONIS *et al* 1990 e reproduzido com modificações no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC.

Os animais receberam 5-Fluorouracil (5-FU) em doses de 60 e 40 mg/Kg nos dias 1 e 2, respectivamente, por via intraperitoneal (i. p.). No quarto dia, os animais eram anestesiados com tribromo-etanol na dose de 1ml/100g de peso e em seguida tinham suas mucosas jugais direitas expostas e submetidas a escoriações com uma agulha de ponta romba (trauma mecânico- TM), de forma a potencializar a mucosite, simulando o trauma “fisiológico” da mastigação e fonação em humanos. As ranhuras foram distribuídas em número de quatro no sentido horizontal e quatro no sentido vertical em ambas as faces das mucosas (FIGURA 12).

Baseado em dados do LAFICA nos quais se verificou que o décimo dia após a primeira injeção de 5-FU coincide com o pico de atividade do processo inflamatório, esse foi escolhido como o dia para realização do sacrifício dos animais, com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos de aroeira e aloe vera. Dessa forma, no 10º dia, os hamsters eram sacrificados após overdose com Hidrato de cloral por via intraperitoneal. As mucosas jugais escoriadas e tratadas eram avaliadas, fotografadas e ressecadas, sendo divididas em parte para análise histopatológica e dosagem de mieloperoxidase.



**Figura 12: Desenho esquemático do modelo experimental de mucosite**

### **3.2. Grupos experimentais**

#### **A . Grupo controle**

Grupos de 6 animais receberam injeção intraperitoneal de 5-fluorouracil na dose de 60 e 40 mg/Kg de peso nos dias 1 e 2, respectivamente. No quarto dia após a aplicação inicial do 5-FU, os animais eram anestesiados em seguida tiveram suas mucosas jugais direitas expostas e submetidas ao trauma mecânico em suas duas faces. Após o TM, foi aplicado, com auxílio de uma pinça cirúrgica e algodão estéril, gel inerte em toda a mucosa escoriada. Tal procedimento foi repetido diariamente a intervalos de 12h a partir do dia 04 até o dia do sacrifício (dia 10). Os animais foram mantidos em jejum de água e ração por 1h após cada aplicação do gel.

#### **B. Grupos tratados com *Aloe barbadensis* Mill**

Grupos de 10 a 15 hamsters eram submetidos ao tratamento intra-peritoneal com 5-FU conforme já descrito para os grupos controle nos dias 1 e 2 dos experimentos. No 4º dia, após a realização do TM, conforme protocolo já descrito, as suas mucosas jugais ainda expostas recebiam tratamento tópico com gel de *Aloe vera* nas concentrações de 25, 50 ou 100%, para cada grupo de animais. A partir de então, tal procedimento era repetido a cada 12h diariamente até o 10º dia, quando os animais eram sacrificados. Após cada aplicação do gel, os animais permaneciam em jejum de água e ração por cerca de 1hora.

### **C. Grupos tratados com Aroeira**

Grupos de 10 a 15 animais receberam o mesmo tratamento do grupo controle nos dias 1 e 2 dos experimentos. No quarto dia após a primeira aplicação de 5-FU eram anestesiados, tinham suas mucosas jugais direitas expostas e submetidas ao TM, conforme protocolo já citado. Em seguida, as mucosas ainda expostas recebiam aplicação tópica de gel contendo *M. urundeuva* nas concentrações de 5, 10 ou 20% em ambas as faces, através de uma pinça cirúrgica envolvida com algodão. O gel era aplicado sob condições estéreis a cada 12h do 4<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia de experimento, quando então, os animais eram sacrificados. A cada aplicação seguia-se jejum de água e alimentos de 1h de duração.

### **3.3. Parâmetros avaliados**

#### **3.3.1. Análise da estrutura das mucosas jugais**

##### **A. Análise macroscópica das mucosas jugais**

No 10<sup>o</sup> dia, os hamsters eram sacrificados, tinham suas mucosas jugais direitas fotografadas e removidas. Para análise macroscópica foram observados os aspectos inflamatórios como presença, intensidade e extensão de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados por SONIS *et al* 2000.

São eles:

- **Score 0:** mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação.
- **Score 1:** presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa.

- **Escore 2:** eritema severo, vasodilatação e erosão superficial.
- **Escore 3:** formação de úlceras em uma ou mais faces, mas não afetando mais de 25% da área de superfície da bolsa. Severo eritema e vasodilatação.
- **Escore 4:** formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da bolsa.
- **Escore 5:** virtualmente completa ulceração da mucosa da bolsa. Impossível exposição da mucosa.

## **B. Análise histopatológica das mucosas jugais**

O estudo histopatológico das mucosas jugais foi realizado em cortes seriados de 5µm de espessura, ao microscópio óptico (40X e 100X). No dia do sacrifício, após a realização das fotos, as mucosas eram removidas e divididas. Uma parte foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24h, e a outra congelada a -70 ° C. Para análise microscópica eram avaliados presença e intensidade do infiltrado inflamatório celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados de 0 a 3 em nosso laboratório (LIMA, 2005), citados a seguir:

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

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

### C. Dosagem da mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como marcador quantitativo da infiltração neutrofilica em diversos tecidos acometidos por processos inflamatórios. No 10º dia após o sacrifício dos animais, esses tiveram suas mucosas jugais fotografadas, removidas e divididas sendo que a parte congelada e mantida a freezer a 70º Celsius negativos foi a utilizada para esse ensaio.

Amostras de 50 a 120 mg das mucosa jugais dos hamsters foram colocadas em tampão fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por ml) e homogeneizadas Politron Ultra-Turrax, sob condições adequadas de refrigeração. Em seguidas, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 min a 4º C, e o sobrenadante colhido. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas através de uma versão modificada do método descrito por Bradley *et al* (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como substrato para MPO. A unidade de atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água em

1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de 0-dianosidine em um composto de cor marrom.

Os resultados foram expressos como atividade de MPO/mg de tecido.

#### **D. Imunohistoquímica para iNOS**

Imunohistoquímica para iNOS foi realizada usando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al, 1981). No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas. Essas foram fixadas em formol 10% por 24h. Após, foram desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em lâminas microscópicas de poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15 min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados “*overnight*” (4° C) com anticorpo primário anti-iNOs de coelho diluído 1:100 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Em seguida, foram incubados com “biotinylated goat anti-habbit”; diluído 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavados, os cortes foram novamente incubados com o complexo conjugado “avidin-biotin-horseradish peroxidase” (Strep ABC complexo pela Vectastain<sup>R</sup> ABC Reagent e solução de substrato de peroxidase) por 30 minutos, de acordo com o protocolo da Vectastain. NOSi foi visualizada com o cromógeno 3,3’diaminobenzidine (DAB). Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostraram imunoreatividade para NOSi. Os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em

uma série de concentrações de álcool, clareados com xilol e, em seguida, a lâminula foi colocada.

### **E. Imunohistoquímica para TNF $\alpha$**

Imunohistoquímica para TNF $\alpha$  foi realizada usando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al, 1981). No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas. Essas foram fixadas em formol 10% por 24h. Após, foram desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em lâminas microscópicas de poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15 min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados “*overnight*” (4° C) com anticorpo primário anti-TNF de rato diluído 1:400 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Em seguida foram incubados com “biotinylated anti-goat IgG” , diluído 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavados, os cortes foram novamente incubados com o complexo conjugado “avidin-biotin-horseradish peroxidase” (Strep ABC complexo pela Vectastain<sup>R</sup> ABC Reagent e solução de substrato de peroxidase) por 30 minutos, de acordo com o protocolo da Vectastain. TNF $\alpha$  foi visualizado com o cromógeno 3,3’diaminobenzidine (DAB). Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostraram imunoreatividade para TNF. Os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em uma série de concentrações de álcool, clareados com xilol e, em seguida, a lâminula foi colocada.

### **3.3.2. Análise das alterações sistêmicas nos animais**

#### **A. Análise da variação de massa corpórea**

Para avaliação ponderal, os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental (10 dias). Os valores encontrados foram expressos em variação de peso em relação ao peso inicial (antes da injeção de 5-FU).

#### **4. Análise estatística**

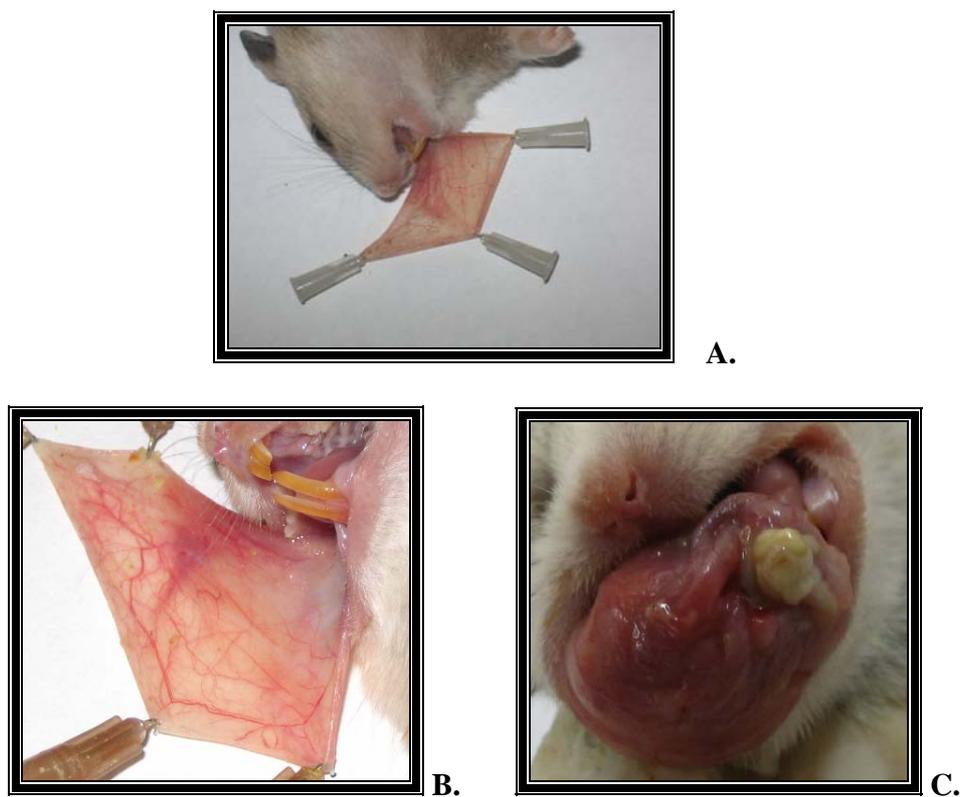
A maioria dos resultados foi expressa como Média acompanhada pelo seu erro padrão (Média +/- EPM). Para comparação entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (Anova) e teste de Bonferroni. Nas análises macroscópicas e histopatológicas os dados foram expressos como Mediana, acompanhada de respectivos valores extremos do rol de dados. Os testes estatísticos aplicados nesse caso foram os de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todos os casos foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$ .

**IV. RESULTADOS**

## **IV. RESULTADOS**

### **1. Mucosite oral em hamsters**

Lima (2003) demonstrou que a administração de 5-FU, seguida por trauma mecânico nas mucosas jugais causa lesão significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada tanto com animais normais como com os animais submetidos somente a trauma mecânico. As lesões tornam-se significantes somente a partir do 5º dia após a quimioterapia, ou seja, no dia seguinte ao trauma mecânico. Por volta do 10º dia após a quimioterapia as lesões atingiram o pico máximo de intensidade, tanto à macroscopia quanto à microscopia, sendo significativamente mais intensas que nos animais normais ou submetidos somente ao TM. Aos 14 dias após a aplicação do 5FU a mucosa já mostra sinais de recuperação em escores similares ao normal, alcançados no 16º dia. A dosagem de mieloperoxidase nos tecidos lesados confirmou a significativa maior atividade inflamatória nas mucosas dos animais tratados com 5-FU e TM em relação aos animais normais ou àqueles submetidos somente a trauma mecânico. A perda ponderal variou temporalmente conforme a intensidade da mucosite nos animais que receberam tratamento com 5-FU. Os dados acima citados foram reproduzidos em nossos experimentos (FIGURA 13).



**Figura 13: Aspecto macroscópico de mucosas jugais de animais submetidos a mucosite oral.** Aspecto das mucosas jugais de hamsters normais (A); hamsters submetidos ao tratamento com salina a 0,9% i.p. e trauma mecânico (B) e dos hamsters submetidos a tratamento com 5-FU i.p. e trauma mecânico (C). A mucosite oral foi induzida através de injeções de 5-FU e trauma mecânico (C) ou salina 0,9% sem (A) e com (B) trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. No décimo dia os hamsters foram então sacrificados e devidamente fotografados.

## **2. Efeito dos tratamentos farmacológicos nos grupos experimentais**

### **2. 1. Tratamento com *Aloe vera***

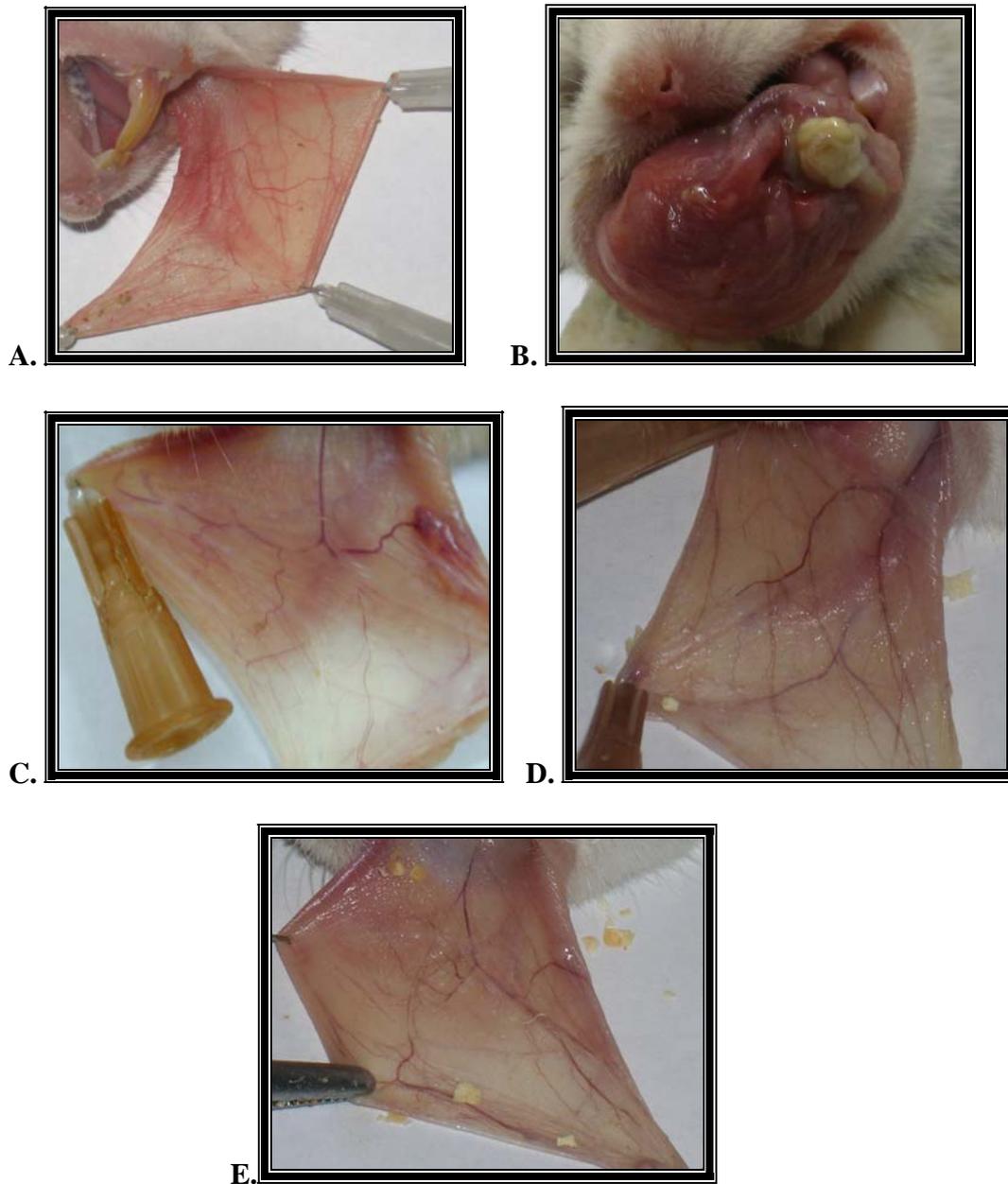
#### **2. 1. 1. Efeito do *Aloe vera* sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral**

A TABELA 1 mostra o efeito do tratamento tópico com *Aloe vera* nas concentrações de 25, 50 e 100%, ou gel base inerte aplicados duas vezes ao dia na mucosa jugal a partir do 4º dia até o 10º dia do protocolo experimental. Observou-se que a babosa foi capaz de inibir (escore 1) a mucosite oral em relação aos animais tratados com gel inerte (escore 4), de forma significativa ( $p < 0,01$ ) e, em todas as concentrações testadas, as alterações relativas a mucosite oral experimental. Na FIGURA 14 pode-se verificar esse aspecto macroscópico por meio de fotos realizadas no décimo dia de experimento em animais normais (A), animais submetidos a ação do 5-FU tratados com gel inerte (B) e animais tratados com babosa a 25 (C), 50 (D) e 100% (E).

**TABELA 1: Efeito de aloe vera (ALOE) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-Fluorouracil**

	Tratamento			
	Gel base	ALOE 25%	ALOE 50%	ALOE 100%
<b>Escores</b>	<b>4 (2-5)</b>	<b>1 (0-5)*</b>	<b>1 (0-3)*</b>	<b>1 (0-4)*</b>

A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel de ALOE tópico a 25, 50 e 100% ou gel inerte (controle) 2 vezes por dia a partir do 4º após a quimioterapia até o décimo dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters. \*  $P < 0,001$  representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) dos animais com mucosite oral tratados com *Aloe vera* em relação àqueles tratados com gel inerte (controle).



**FIGURA 14 - Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais normais (A) e animais submetidos a mucosite oral experimental e tratados com gel inerte (B), ALOE a 25 (C), 50 (D) e 100% (E). A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte, ALOE após o trauma mecânico diariamente até o décimo dia experimental, quando foram sacrificados e devidamente fotografados.**

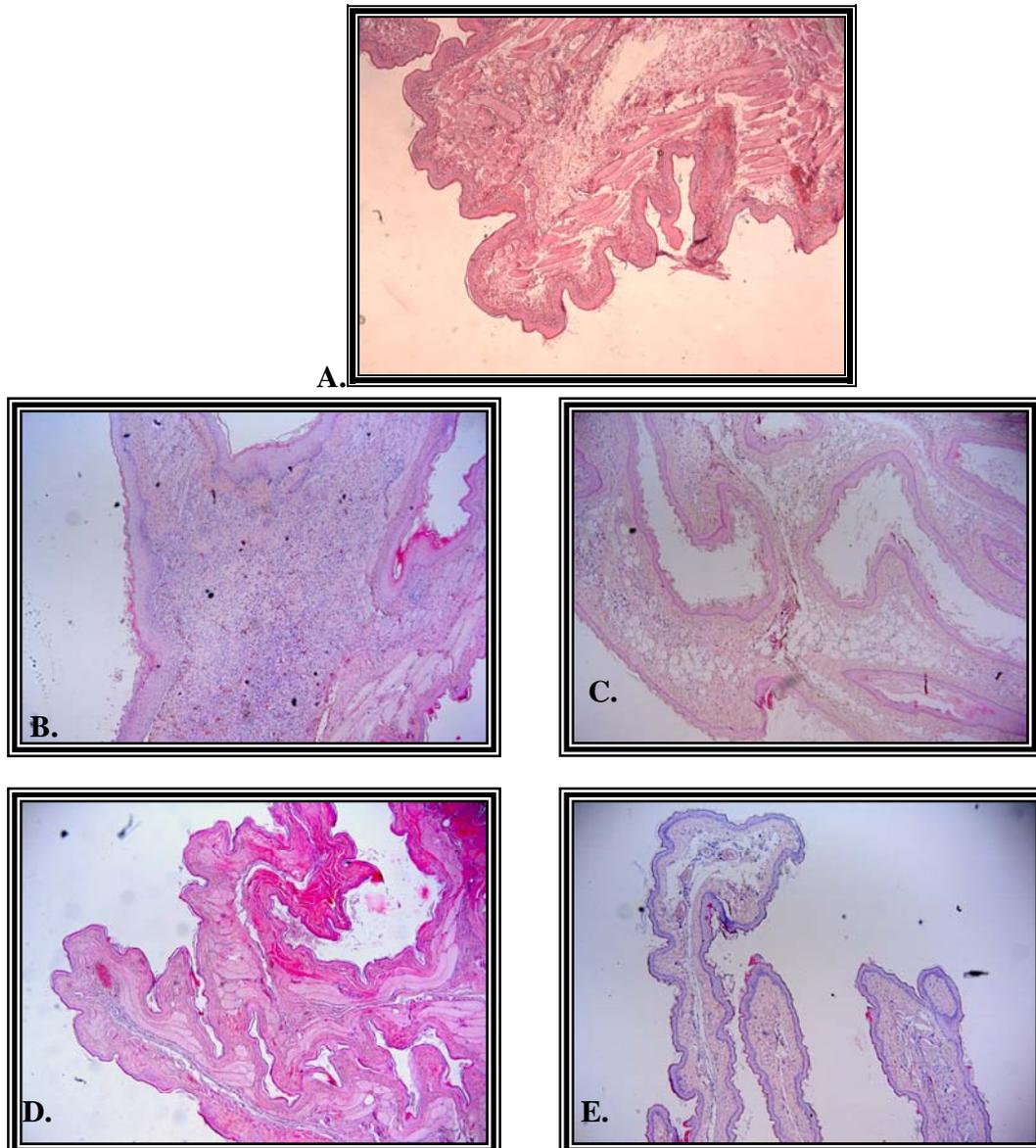
## **2. 1. 2. Efeito do *Aloe vera* sobre os aspectos histológicos observados na mucosite oral**

A TABELA 2 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral por 5-FU. Os animais receberam aplicações duas vezes por dia do 4º ao 10º dia do protocolo experimental de *Aloe vera* (ALOE) em gel (25, 50 ou 100%) ou gel inerte em suas mucosas jugais direitas e no 10º dia foram sacrificados e tiveram suas mucosas seccionadas para análise microscópica. A partir de cortes seriados das mucosas, observou-se que ALOE inibiu de forma significativa em todas as concentrações testadas as alterações histopatológicas vistas na mucosite oral experimental, quando comparadas às observadas em animais tratados com gel inerte (controle – escore 2 *versus* ALOE – escores 1, 1,5 e 1;  $p < 0,01$ ). A FIGURA 15 ilustra o aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A), com mucosite oral experimental (B) e com mucosite experimental tratada com ALOE a 25 (C), 50 (D) e 100% (E), nas quais se observam diminuição do infiltrado celular, ausência de úlceras e abscessos.

**TABELA 2: Efeito de *Aloe vera* (ALOE) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-Fluorouracil**

	Controle	Tratamento		
		ALOE 25%	ALOE 50%	ALOE 100%
<b>Escores</b>	<b>2 (2-3)</b>	<b>1 (0-3)*</b>	<b>1,5 (0-3)*</b>	<b>1 (0-3)*</b>

A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel de *Aloe vera* tópico a 25, 50 e 100% ou gel inerte (controle) 2 vezes por dia a partir do 4º após a quimioterapia até o décimo dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters. \* P<0,01 representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) dos animais com mucosite oral tratados com ALOE em relação àqueles tratados com gel inerte (controle).

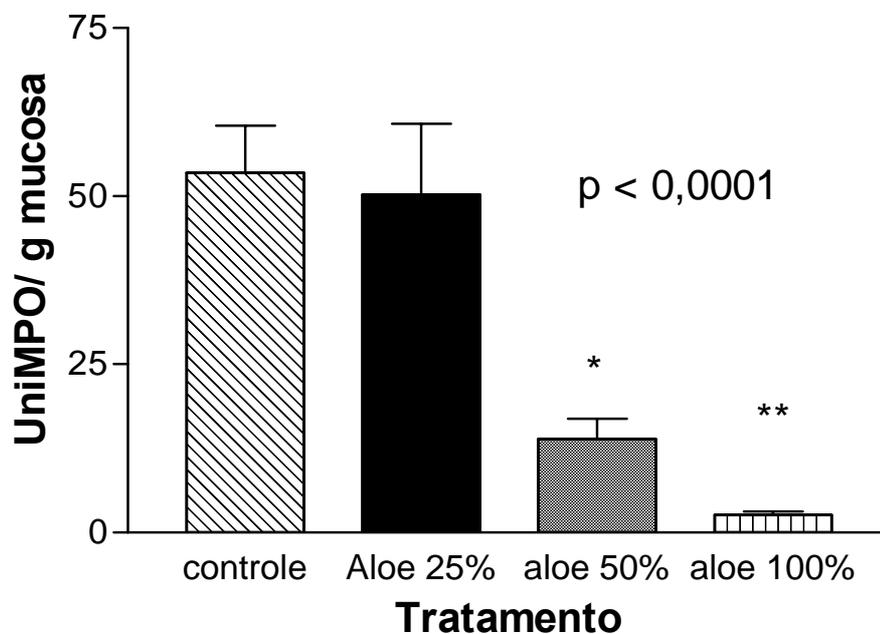


**FIGURA 15:** Aspecto microscópico (aumento de 40x) de mucosa jugal normal (A), ou com mucosite oral experimental recebendo tratamento tópico com gel inerte (B), ou ALOE a 25% (C), 50% (D) ou 100% (E). A mucosite foi induzida através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam os tratamentos acima citados do 4º ao 10º dia de experimento quando foram sacrificados, suas mucosas jugais ressecadas, devidamente processadas para HE. Nota-se em C a E significativa diminuição do infiltrado celular e de outros achados inflamatórios, bem como ausência total de abscessos, hemorragia e úlceras.

### **2. 1. 3. Efeito de *Aloe vera* sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters**

O GRÁFICO 01 mostra que o tratamento com ALOE nas concentrações de 50 e 100% reduziu significativamente a intensidade da atividade da imunoperoxidase em mucosas jugais submetidas a mucosite oral experimental com 5-FU (médias: controle – 53.48; ALOE 25% - 50.21; ALOE 50% - 13.92; ALOE 100 % - 2.59,  $p < 0,0001$ ). Dessa forma, pode-se inferir indiretamente que *Aloe vera* nessas concentrações reduziu o número de leucócitos polimorfonucleares nas mucosas jugais no 10º dia após indução de mucosite oral experimental com 5-FU quando comparado com animais tratados com gel inerte.

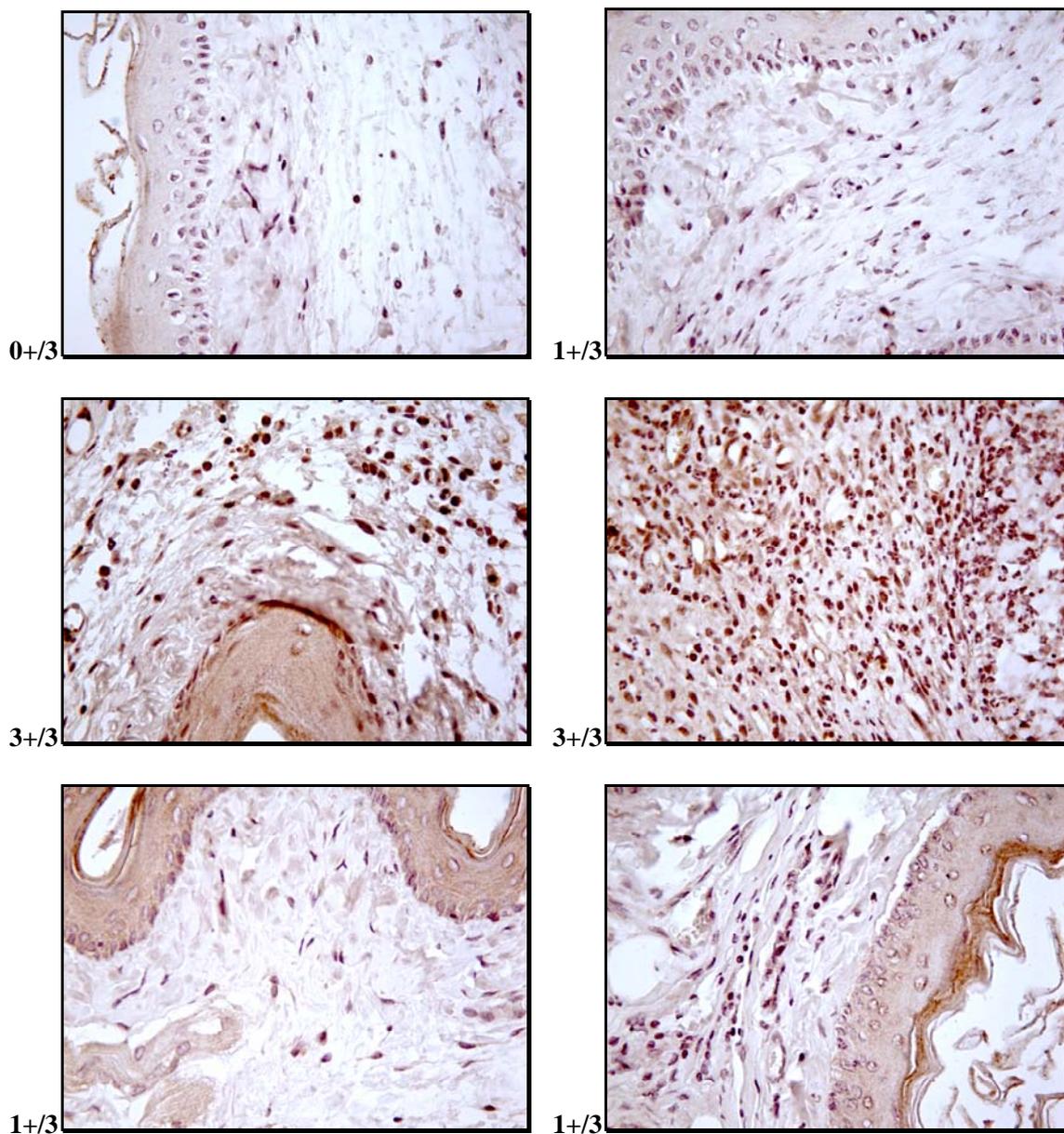
**Gráfico 01: Atividade de MPO em mucosite experimental tratada com *Aloe vera***



A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte ou gel de *Aloe vera* a 25, 50 ou 100% diariamente após o trauma mecânico. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no décimo dia e congeladas em freezer a 70 graus Celsius negativos. As barras representam Média +/- EPM da quantidade de MPO x 10<sup>6</sup> / grama de mucosa jugal. P < 0,0001 significa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral e tratamento com gel inerte (controle) em relação aos animais tratados com *Aloe vera* a 50 e 100%. O número de animais utilizados foi de no mínimo 10 (ANOVA).

#### **2. 1. 4. Efeito do gel de *Aloe vera* sobre a expressão por imunohistoquímica de NO sintase nas mucosas jugais**

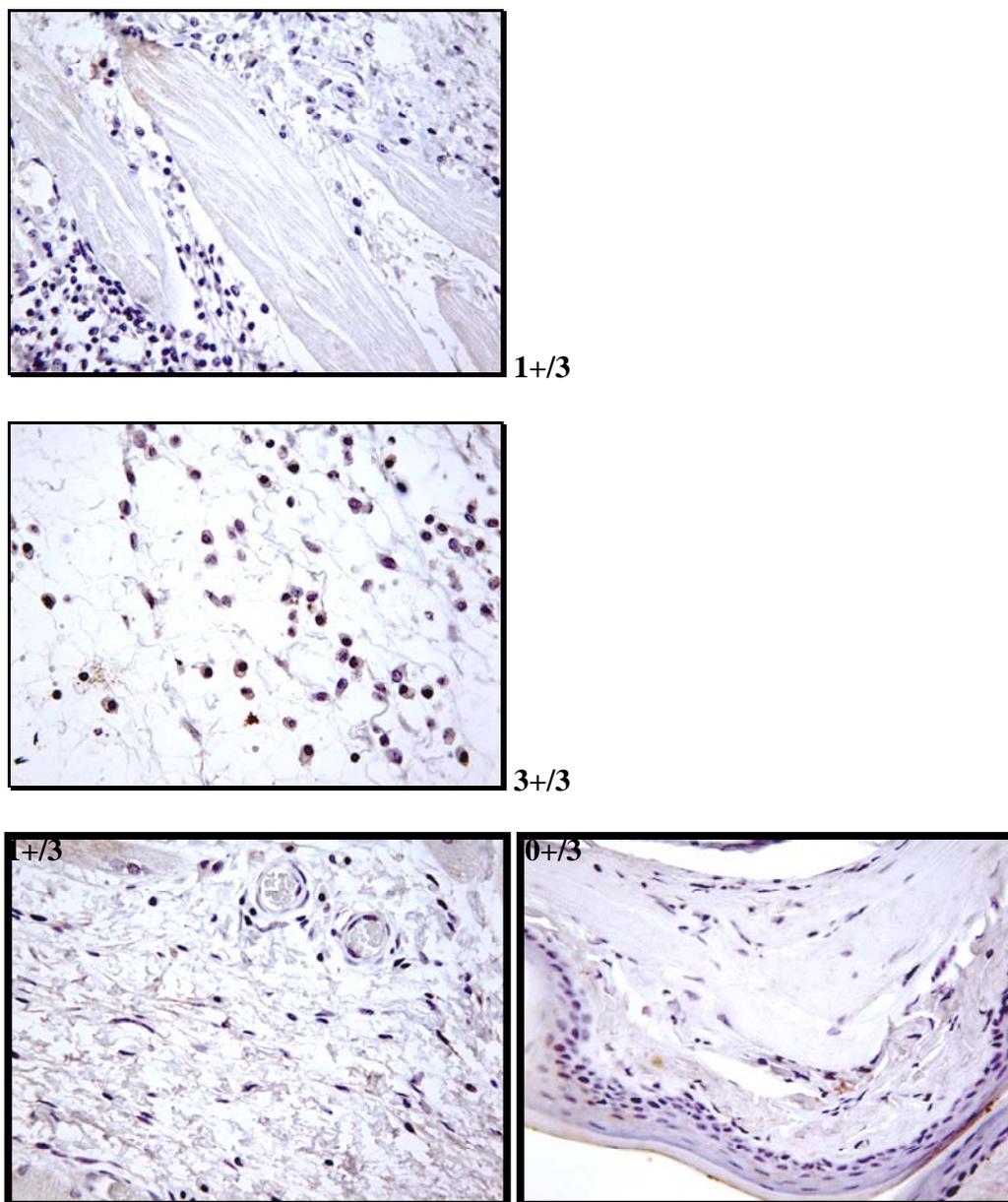
O tratamento das mucosas jugais submetidas a mucosite oral experimental induzida por 5-FU com gel de ALOE a 100% causou uma tendência a diminuição da expressão tissular de NO sintase em comparação aos animais tratados com gel base, com níveis similares aos de animais normais (animais não submetidos a mucosite oral). Esse achado pode ser verificado através da FIGURA 16.



**FIGURA 16: Fotografias da imunohistoquímica para expressão de NO sintase induzida (aumento 400X).** Acima: fotos e escores de imunohistoquímica de mucosas jugais de 2 animais normais; no meio: fotos e escores relativos a 02 animais submetidos a mucosite oral experimental com 5FU e tratados com gel inerte e abaixo: fotos e escores de animais submetidos a mucosite oral experimental e tratados com gel de *Aloe vera* a 100%.

### **2.1.5. Efeito do gel de *Aloe vera* sobre a expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$ nas mucosas jugais de animais submetidos a mucosite oral**

A expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$  em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU e tratados com gel de ALOE a 100% foi reduzida quando comparada com animais tratados com gel inerte, sendo similar à expressão tissular em animais normais (FIGURA 17).

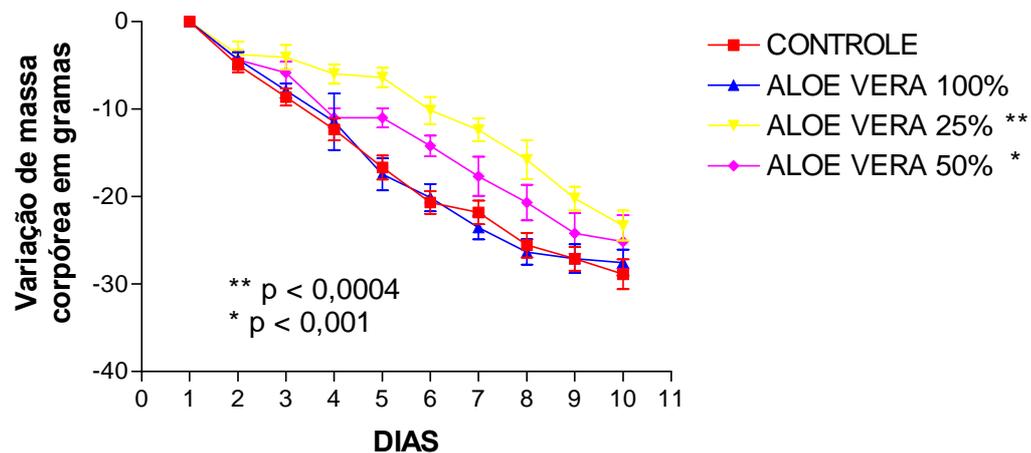


**FIGURA 17: Fotografias e escores relativos a expressão por imunohistoquímica de TNF  $\alpha$  em mucosas jugais de hamsters (aumento 400X). No topo: foto e escore relativo a animal normal; no meio: foto e escore de animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e tratado com gel inerte; abaixo: fotos e escores relativos a dois animais submetidos a mucosite oral induzida por 5FU e tratados com gel de ALOE a 100%.**

### **2. 1. 6. Efeito do gel de *Aloe vera* sobre a variação de massa corpórea dos animais submetidos a mucosite oral experimental**

Os animais submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-FU tratados com *Aloe vera* mantiveram perda ponderal quando comparados com animais normais (dados não mostrados). No entanto, quando comparados com animais com mucosite oral e tratados com gel inerte, aqueles tratados topicamente com gel de *Aloe vera* a 25 e 50% (GRÁFICO 02) apresentaram uma significativa diminuição na intensidade dessa perda (Médias - controle -16,67g; ALOE 100% -16,68g; ALOE 50% -13,42g e ALOE 25% - 10,21,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0004$ , respectivamente).

**GRÁFICO 02 : Efeito do gel de *Aloe vera* sobre a variação de massa corpórea de animais submetidos a mucosite oral**



A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte (controle) ou gel de ALOE a 25, 50 ou 100% diariamente do D4 ao D10. Os pontos representam Média $\pm$  EPM da variação de massa (g), calculada através da diferença das massas dos animais durante 10 dias, em relação às suas massa originais. \*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,0004$  representa diferenças estatísticas dos animais submetidos a tratamento com gel inerte e animais submetidos a tratamento com ALOE a 50 e 25%, respectivamente. O número de animais utilizados em cada ponto foi de no mínimo 6 (ANOVA).

## **2.2. Tratamento com *M. urundeava***

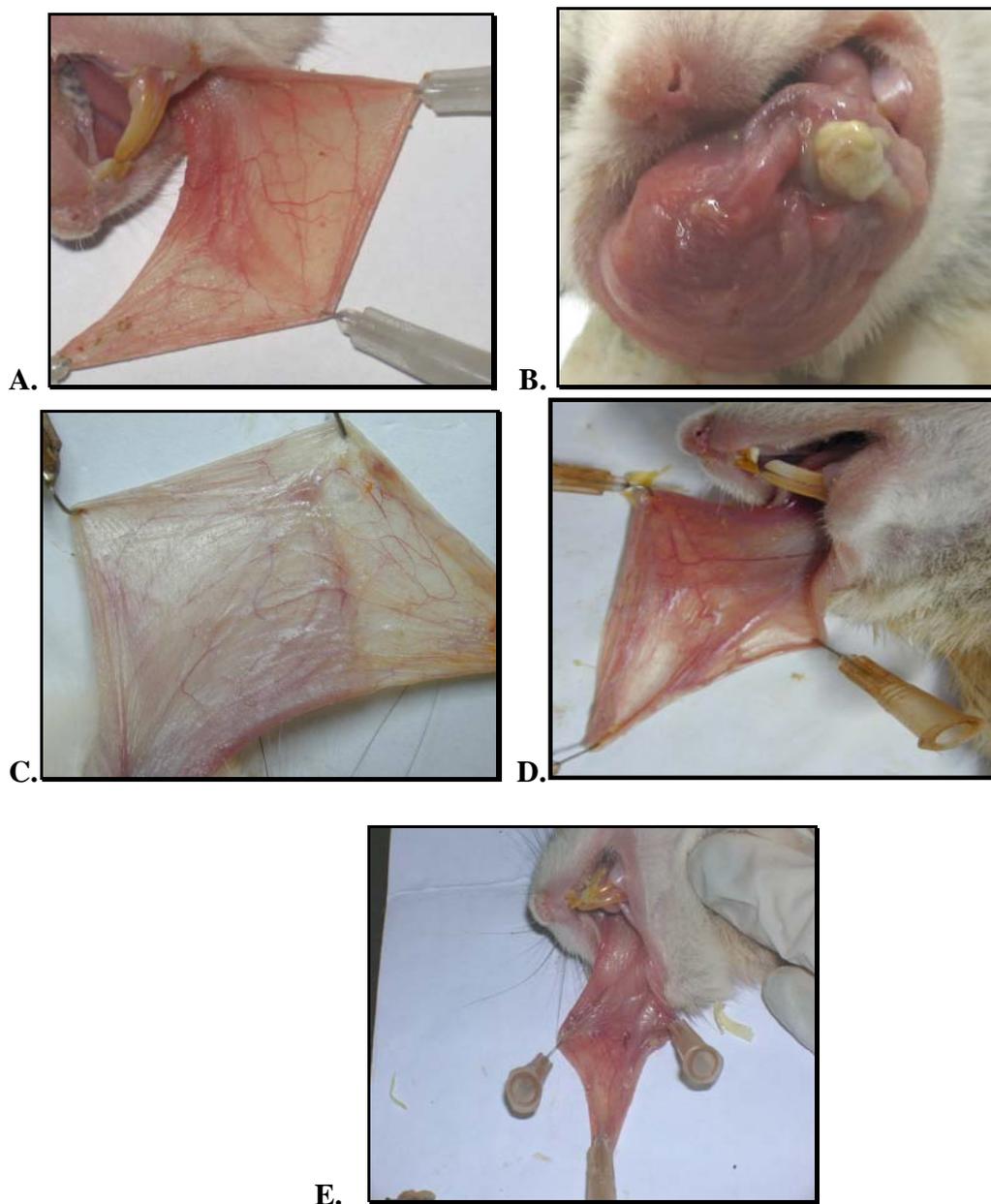
### **2.2.1. Efeito do *M. urundeava* sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

A TABELA 03 mostra o efeito do tratamento com gel de *M. urundeava* nas concentrações de 5, 10 e 20% ou com gel inerte (controle) administrados topicamente nas mucosas jugais 2 x dia diariamente desde o trauma mecânico até o sacrifício. Observa-se que a aroeira (AR) foi capaz inibir a mucosite oral de forma significativa ( $p < 0,01$ ) e de forma inversamente dose-dependente as principais alterações características da mucosite oral experimental, no caso representadas por hemorragia, úlceras e abscessos. Na FIGURA 18 ilustram-se, através de fotografias tiradas no dia 10, os aspectos macroscópicos das mucosas jugais de hamsters normais (A), hamsters submetidos a mucosite oral e tratados com gel inerte (B) e hamsters submetidos a mucosite oral e tratados com AR nas concentrações de 5 % (C), 10% (D) e 20% (E).

**TABELA 03: Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-Fluorouracil**

	Controle	Tratamento		
		AR 5%	AR 10%	AR 20%
Escores	4 (2-5)	2 (0-5)*	3 (0-5)*	2 (0-5)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel de aroeira tópico a 5, 10 e 20% ou gel inerte (controle) 2 vezes por dia a partir do 4º após a quimioterapia até o décimo dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters. \*  $P < 0,01$  representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) dos animais com mucosite oral tratados com aroeira em relação àqueles tratados com gel inerte (controle).



**FIGURA 18: Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais normais (A) e animais submetidos a tratamento com 5-FU e trauma mecânico seguido por: gel base (B); gel de aroeira a 5% (C); gel de aroeira a 10% (D) e gel de aroeira a 20% (E).** A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte ou gel de aroeira após o trauma mecânico diariamente até o décimo dia experimental, quando foram sacrificados e devidamente fotografados.

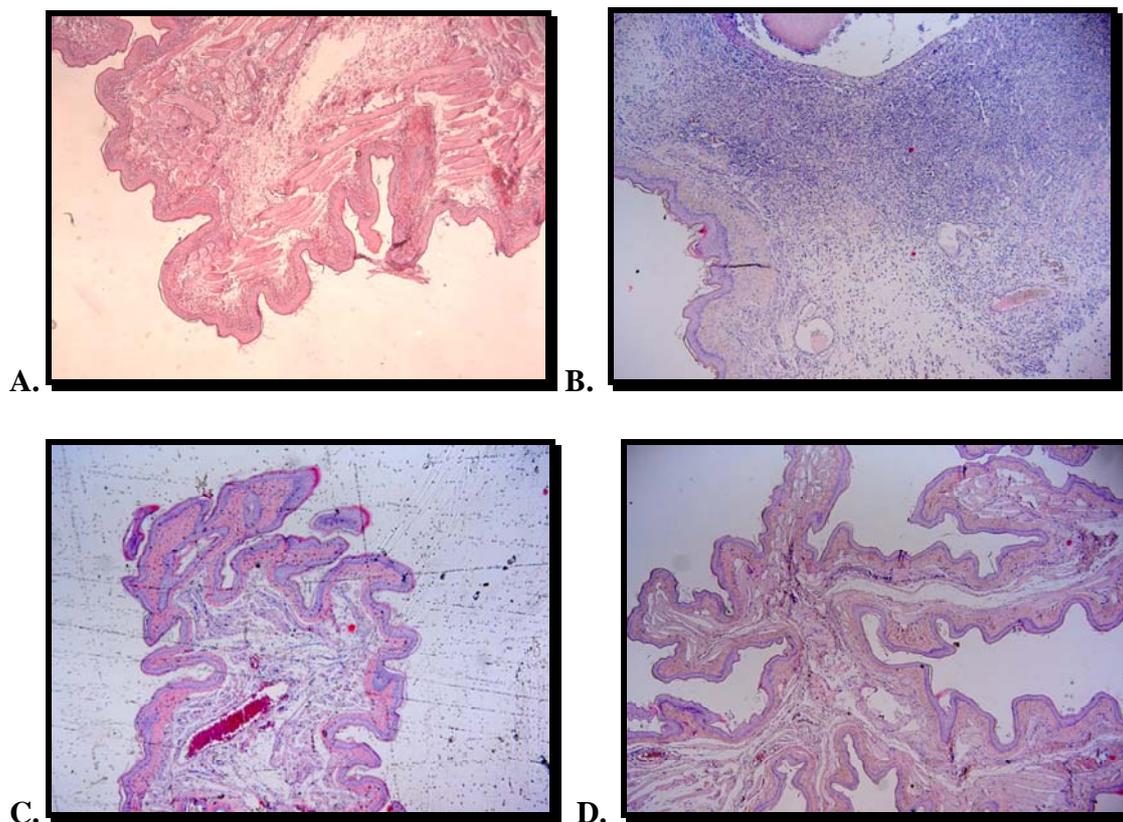
### **2.2.2. Efeito de *M. urundeuva* sobre as alterações histopatológicas observadas na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

A TABELA 04 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil. Os animais receberam gel inerte (controle) ou gel de aroeira (AR) nas concentrações de 5, 10 ou 20% duas vezes por dia, diariamente desde o trauma mecânico até o décimo dia (sacrifício). A partir de cortes seriados das mucosas retiradas observou-se que o tratamento com aroeira reduziu de forma inversamente dose-dependente as alterações histopatológicas relativas à mucosite oral experimental quando comparadas com animais submetidos à mucosite e tratados com gel inerte (controle). A FIGURA 19 ilustra através de fotomicrografia os aspectos histológicos de mucosa de animal normal (A), animais submetidos à mucosite experimental e tratados com gel inerte (B) e animais tratados com gel de AR a 5% (C) e 10% (D). Observam-se principalmente, redução do edema e do infiltrado celular, além de outras características analisadas nos animais tratados com gel de aroeira a 5 e a 10%, mas não nos animais tratados com gel inerte e aroeira a 20%.

**TABELA 04: Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-Fluorouracil**

	Controle	Tratamento		
		AR 5%	AR 10%	AR 20%
Escores	2 (2-3)	1,5 (0-2)*	1 (0-3)*	1 (0-3)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através da injeção de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel de aroeira tópico a 5, 10 e 20% ou gel inerte (controle) 2 vezes por dia a partir do 4º após a quimioterapia até o décimo dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters. \*  $P < 0,01$  representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) dos animais com mucosite oral tratados com aroeira em relação àqueles tratados com gel inerte (controle).

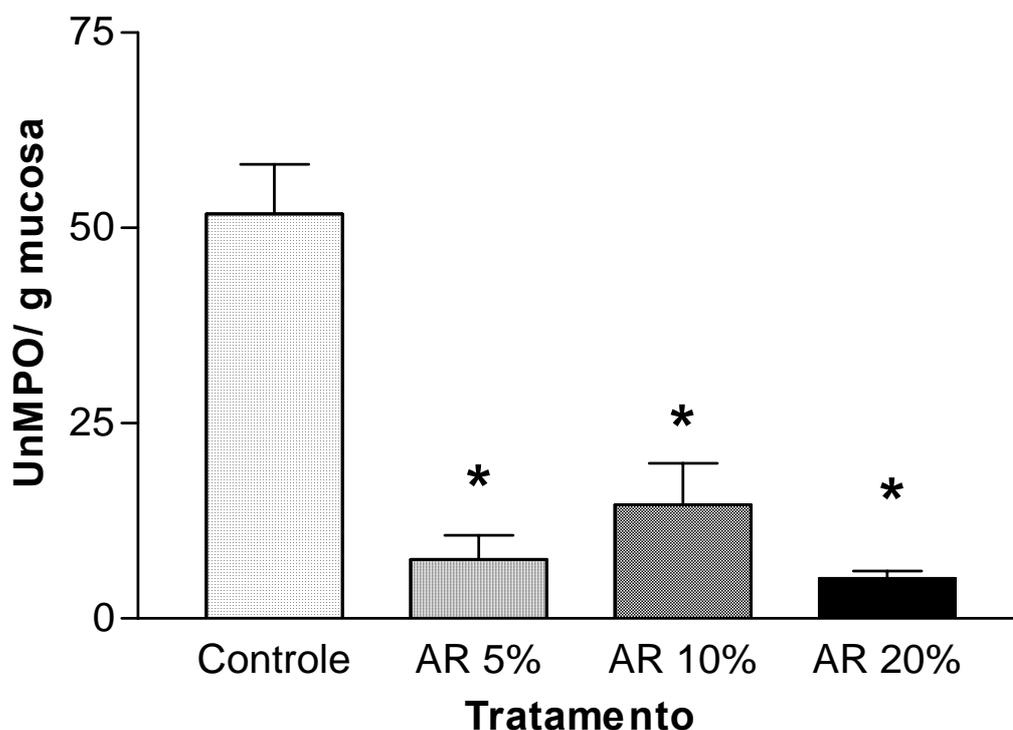


**FIGURA 19:** Aspecto microscópico (aumento de 40x) de mucosa jugal normal (A), ou com mucosite oral experimental recebendo tratamento tópico com gel inerte (B), ou AR a 5% (C) e 10% (D). A mucosite foi induzida através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam os tratamentos acima citados do 4º ao 10º dia de experimento quando foram sacrificados, suas mucosas jugais ressecadas, devidamente processadas para HE. Nota-se em C e D significativa diminuição do infiltrado celular e de outros achados inflamatórios, bem como ausência total de abscessos, hemorragia e úlceras conforme pode-se verificar em B.

### **2.2.3. Efeito de *M. urundeuva* sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observados na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**

O GRÁFICO 03 mostra que o tratamento com *M. urundeuva* em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20%) reduziu significativamente a intensidade da atividade da mieloperoxidase em mucosas jugais submetidas a mucosite oral experimental com 5-FU (médias: controle – 51.79; AR 5% - 7.59; AR 10% - 14.6; AR 20 % - 5.44,  $p < 0,001$ ). Dessa forma, pode-se inferir indiretamente que *M. urundeuva* nessas concentrações reduziu o número de leucócitos polimorfonucleares nas mucosas jugais no 10º dia após indução de mucosite oral experimental com 5-FU quando comparado com animais tratados com gel inerte.

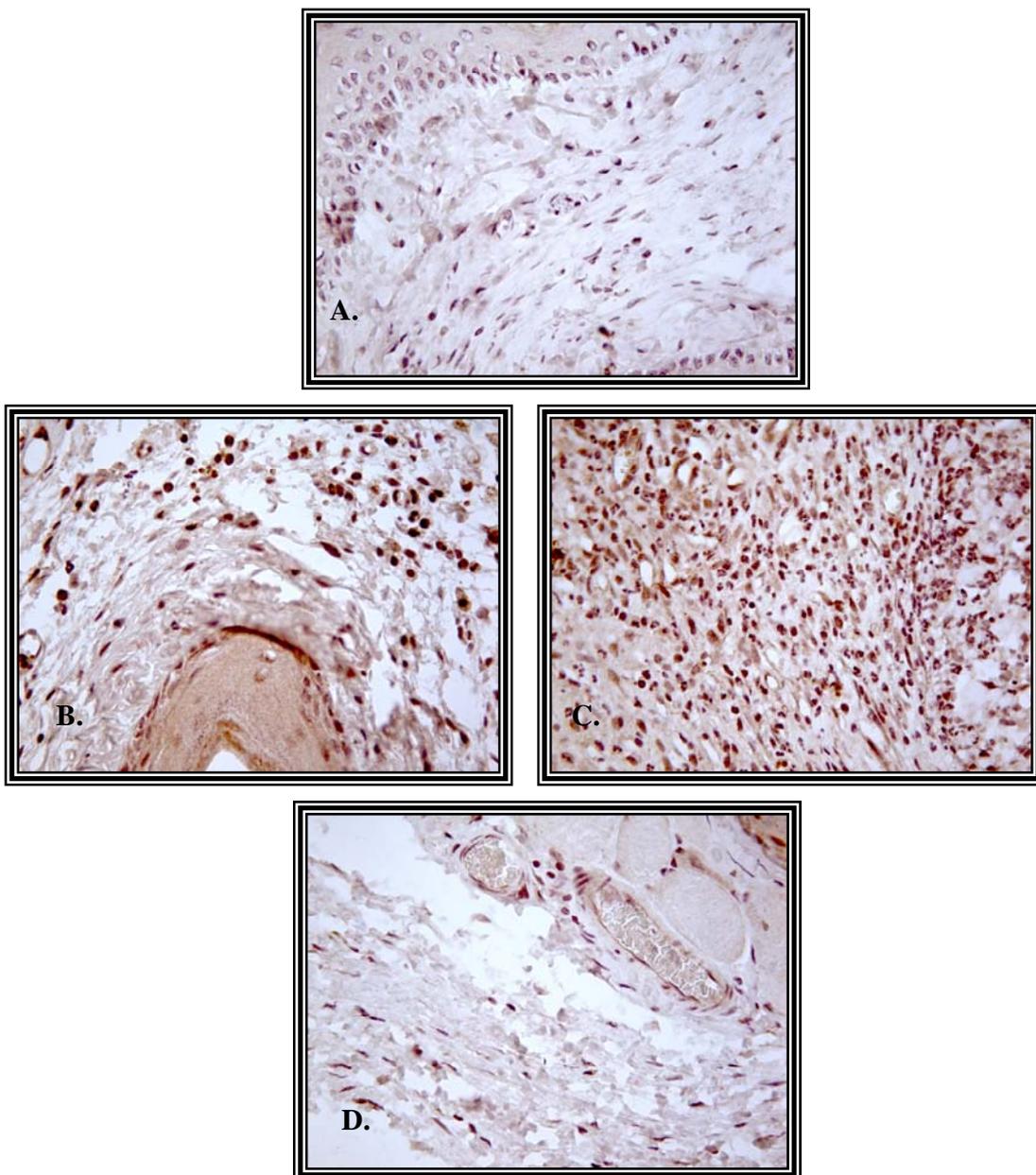
### Atividade de MPO em mucosite experimental tratada com AROEIRA



**GRÁFICO 03:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte ou gel de aroeira (AR) a 5, 10 ou 20% diariamente após o trauma mecânico. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no décimo dia e congeladas em freezer 70 graus Celsius negativos. As barras representam Média +/- EPM da quantidade de MPO x 10<sup>6</sup> / grama de mucosa jugal. P <0,001 significa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral e tratamento com gel inerte (controle) em relação aos animais tratados com AR. O número de animais utilizados foi de no mínimo 12 (ANOVA).

#### **2.2.4. Efeito do *M. urundeuva* sobre a expressão por imunohistoquímica de NO sintase**

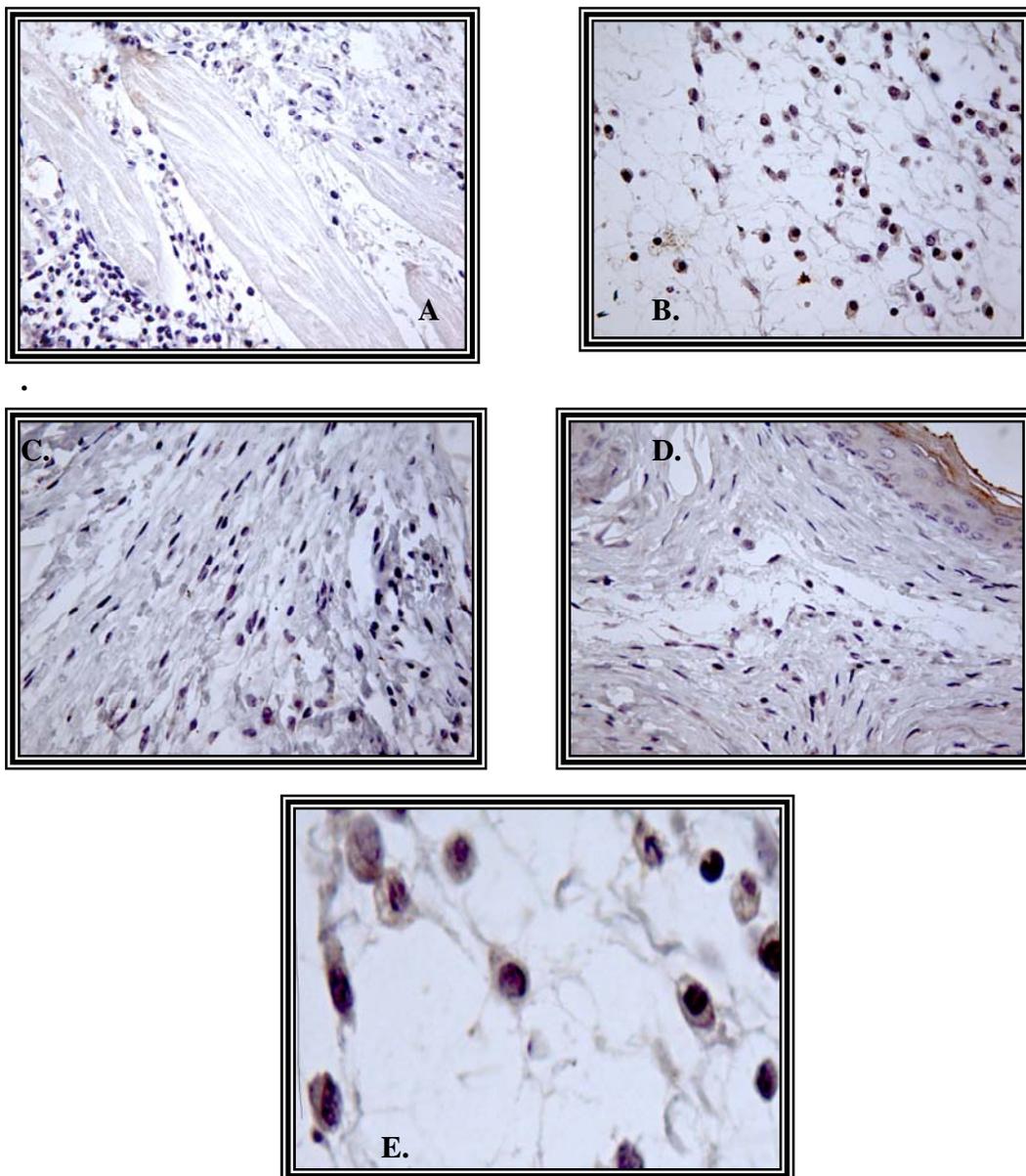
O tratamento das mucosas jugais submetidas à mucosite oral experimental induzida por 5-FU com gel de aroeira a 5% promoveu uma diminuição moderada da expressão tissular de NO sintase em comparação aos animais tratados com gel base, com escores similares aos de animais normais (animais não submetidos a mucosite oral). A FIGURA 20 ilustra as características imunohistoquímicas da mucosa jugal de animais normais (A), animais submetidos à mucosite oral experimental e tratados com gel inerte (B e C) e animais submetidos à mucosite oral e tratados com gel de aroeira a 5%.



**FIGURA 20: Fotografias da imunohistoquímica para expressão de NO sintase (aumento 400X).** Em A fotos da expressão de NOSi por imunohistoquímica em mucosas jugais de animais normais (escore: 1+/3); em B e C fotos relativas a dois animais submetidos à mucosite oral experimental com 5FU e tratados com gel inerte (escores 3+/3 e 3+/3) e em D foto de animal submetido à mucosite oral experimental e tratado com gel de *M. urundeuva* a 5%. Análise realizada em mucosas de 5 animais em cada grupo.

### **2.2.5. Efeito de *M. urundeuva* sobre a expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$**

A expressão por imunohistoquímica de TNF $\alpha$  em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU e tratados com gel de aroeira a 5% foi reduzida quando comparada com animais tratados com gel inerte, sendo similar à expressão tissular em animais normais. Na FIGURA 21 podem-se visualizar tais observações, incluindo o detalhe (E) da expressão de TNF em leucócitos presentes na mucosa jugal de animal submetido à mucosite oral experimental e tratado com gel inerte.

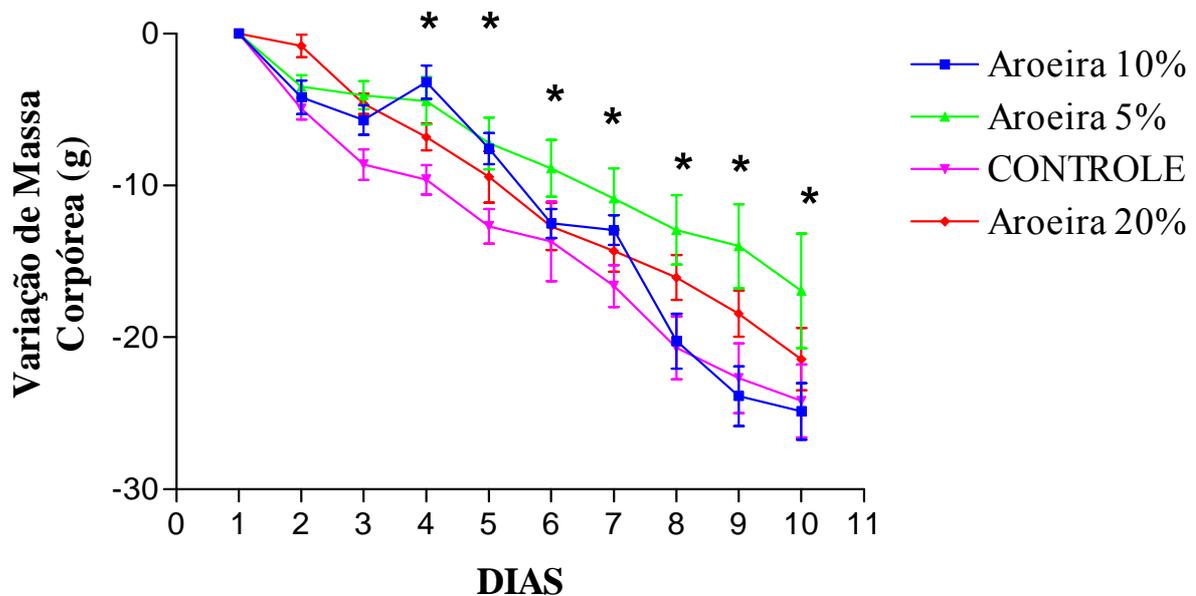


**FIGURA 21: Fotografias e escores relativos à expressão por imunohistoquímica de TNF  $\alpha$  em mucosas jugais de hamsters (aumento 400X).** Em **A**, foto relativo a animal normal (escore 1+/3); em **B** e **E** (detalhe) fotos da mucosa jugal de animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e tratado com gel inerte (escore 3+/3); em **C** e **D** fotos relativas a dois animais submetidos à mucosite oral induzida por 5FU e tratados com gel de AR a 5% (escores 0+/3 e 1+/3, respectivamente).

### **2. 2. 6. Efeito de *M. urundeuva* sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral**

Todos os animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-FU apresentam importante perda ponderal em relação aos animais normais com diferença significativa do ponto de vista estatístico (dados não mostrados). Quando tratados com gel tópico de aroeira mantiveram tal perda ponderal. No entanto, quando comparados com animais com mucosite oral e tratados com gel inerte, aqueles tratados topicamente com gel de AR a 5 % (GRÁFICO 04) apresentaram uma significativa diminuição na intensidade dessa perda (Médias - controle  $-11,38g \pm 2,48$ ; AR 5%\*  $-8,27g \pm 1,7$ ; AR 10%  $-11,51g \pm 2,82$  e AR 20%  $-11,39$ ,  $p < 0,0002$ ).

**Varição de Massa Corpórea de Hamsters Submetidos a Mucosite Oral Experimental e Tratados com *M. urundeuva***



**GRÁFICO 04:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel inerte (controle) ou gel de AR a 5, 10 ou 20% diariamente do D4 ao D10. Os pontos representam Média $\pm$  EPM da variação de massa (g), calculada através da diferença das massas dos animais durante 10 dias, em relação às suas massa originais. \*  $p < 0,0002$  representa diferenças estatísticas dos animais submetidos a tratamento com gel inerte e animais submetidos a tratamento com AR a 5%. O número de animais utilizados em cada ponto foi de no mínimo 16 (paired t test).

**V. DISCUSSÃO**

## V. DISCUSSÃO

Baseado nos conhecimentos sobre o ciclo celular e a cinética celular sabe-se que, no tratamento oncológico baseado em quimioterapia, dose e esquema de administração são importantes fatores implicados na eficácia. Vários estudos “*in vivo*” com diversas drogas utilizadas em modelos tumorais, demonstraram haver uma relação entre a magnitude da dose e o número de células tumorais mortas (FREI, 1980). Dessa forma, modificações da dose-intensidade de um esquema terapêutico afetam o volume de células erradicadas. Dose-intensidade (DI) é uma medida da quantidade de droga administrada por unidade de tempo ( $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ). Conceitos mais recentes têm cogitado que aumentos na DI possam se correlacionar também com aumento nas taxas de resposta e sobrevida. A DI pode ser incrementada através do aumento na quantidade de droga dada por ciclo (dose escalonamento) ou por diminuição do intervalo entre os ciclos (dose-dense) (NORTON, 1997). Tais conceitos são embasados pela hipótese de Goldie-Coldman que postula que quanto mais precoces e maiores as doses das drogas contidas em um tratamento, maior a efetividade desse em prevenir o surgimento de clones resistentes, bem como em erradicar a doença (COLDMAN et al, 1987). A DI também é baseada na hipótese de Norton-Simon que defende a idéia de que tumores menores crescem mais rápido do que tumores maiores (NORTON, 1997). Assim, a citorredução induzida por um esquema de quimioterapia leva a maiores taxas de recrescimento celular nos intervalos entre os ciclos.

Vale ressaltar que na estratégia terapêutica oncológica em qualquer situação visa-se manter a qualidade de vida, principalmente nos casos em que não há expectativa de cura da doença de base.

A toxicidade medular (sobretudo leucopenia e plaquetopenia) e a toxicidade sobre as mucosas são os principais limitantes à dose-intensidade de um esquema quimioterápico e à qualidade de vida do paciente submetido a esse. Em pacientes submetidos à quimioterapia em altas doses, a imunossupressão e a mucosite são importantes fatores relacionados à mortalidade. O uso apropriado de fatores de crescimento hematopoiéticos (G-CSF, eritropoetina, interleucina), têm tornado possível o suporte hematológico no caso tanto de regimes de quimioterapia de altas doses ou convencional (NCCN Practice Guidelines, 2006). No entanto, no que se refere à mucosite, seja intestinal ou oral, pouco se tem avançado em termos de eficácia em prevenção ou tratamento.

Uma série de agentes antineoplásicos são relacionados ao desenvolvimento de mucosite oral, tais como: fluoropirimidinas, methotrexate, antraciclina, taxanes, etc. A mucosite oral é responsável por tornar o paciente incapaz de alimentar-se, de causar dor com necessidade de analgésicos opióides, dificultar a sua comunicação, de propiciar infecções que o põe sob risco direto de morte e de atrasar e comprometer a eficácia de seu tratamento oncológico (BOOTH, 2001). O tratamento para mucosite oral induzida pela quimioterapia antineoplásica permanece paliativo. Os principais objetivos são: analgesia, assepsia, nutrição, hidratação. A mucosite oral parece ser consequência de um processo multifatorial, envolvendo o epitélio, endotélio, tecido conectivo, neutrófilos e macrófagos (SONIS, 2004). Intervenções terapêuticas tendo como alvos os elementos acima citados constituem os principais objetivos de pesquisadores no assunto.

O desenvolvimento de mucosite oral em hamsters, através de injeções de 5-fluorouracil e trauma mecânico foi obtido inicialmente por SONIS *et al* e serviu de arma experimental de estudo dos mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento, além da modulação de seu desenvolvimento. Lima realizou modificações em tal modelo e também

foi capaz de induzir mucosite em hamsters, evidenciada por lesões das mucosas jugais dos mesmos observadas a partir do 5º dia da quimioterapia, atingindo pico de intensidade no 10º dia, e iniciando sua regressão a partir do 12º dia e cessando no 16º dia após a injeção de 5-FU. Tais observações foram corroboradas por achados coincidentes de histopatologia das mucosas. Tal modelo se correlaciona com o curso da mucosite em humanos, o que permite seu uso em estudos de abordagens terapêuticas para essa complicação.

Tendo como base o modelo experimental de mucosite acima citado, avaliamos os efeitos de duas plantas medicinais amplamente utilizadas na medicina popular e com algumas evidências científicas de eficácia em algumas das indicações: *M. urundeuva* Allemão e *A. barbadensis* Miller. Utilizamos o décimo dia (pico de intensidade da mucosite) como base para análise dos possíveis efeitos dessas substâncias na inibição da mucosite oral.

Sabe-se que na gênese da mucosite oral induzida por quimioterapia e/ou radioterapia, além do dano ao DNA levando à lesão direta das células da camada basal da mucosa, um dos tipos de lesão indireta desencadeada pela QT e RT é a determinada pela produção de espécies reativas de oxigênio que, além de determinarem por si só lesão tecidual (oxidação de proteínas, DNA e lipídeos), estimulam a produção em vários tipos de células da mucosa (não só epitélio) de fatores de transcrição como p53, NRF2 e NF-kB (SONIS, 2004). O mais relevante deles, NF-kB está associado a ativação de mais de 200 genes, entre eles: proteínas reguladoras de apoptose, expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Essas citocinas amplificam esse processo estimulando a expressão de NF-kB em outras células, levando à ativação de vias de apoptose, produção de metaloproteinases, produção da ciclooxigenase, etc. Além disso, essas citocinas têm atividade pró-inflamatória e podem ativar mais de uma via de apoptose.

O TNF $\alpha$  especificamente está associado à ativação de macrófagos, indução de apoptose, expressão de NOSi e COX com produção de NO e de mediadores inflamatórios que em última análise levam a dano tecidual direto ou através da migração de neutrófilos, cujas enzimas determinam lesão, amplificando ainda mais o sinal inflamatório.

LEITÃO *et al* (2006) demonstraram a participação do óxido nítrico na fisiopatologia da mucosite oral experimental e que o aumento na expressão de NOSi é a principal origem da hiperprodução de NO nesse modelo. Uma vez produzido, NO está associado ao aumento de infiltração neutrofílica, dano tecidual e amplificação do processo inflamatório através do estímulo à maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Uma das hipóteses levantadas para tal dano seria a de que o NO interaja quimicamente com ROS gerando peroxinitrito. Além disso, o NO exerceria atividade citotóxica através da formação complexos nitrosil-thiol com enzimas envolvidas com síntese de DNA, ciclo de Krebs e função mitocondrial. A expressão de NOSi também é determinada pela presença de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

O presente trabalho demonstrou que *Aloe vera* em forma de gel aplicada topicamente 2 vezes por dia, nas concentrações de 25, 50 e 100% nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil, do quarto ao décimo dia após a administração do quimioterápico foi capaz de inibir de forma significativa a mucosite em relação aos animais submetidos ao mesmo tratamento contendo apenas gel inerte. Tal efeito se caracterizou pela inibição da formação de úlceras, hemorragias e abscessos e foi corroborada pelos achados histopatológicos das mucosas jugais avaliadas no estudo. Esses achados se caracterizaram pela diminuição do infiltrado celular inflamatório, ausência de áreas de ulceração ou abscessos.

Ao analisarmos a medida da atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais dos hamsters, verificamos que os animais tratados com gel de *Aloe vera*, nas concentrações de 50 e 100%, apresentavam significativa redução dos níveis dessa enzima, sugerindo que *Aloe vera* foi capaz de inibir o infiltrado inflamatório neutrofilico na mucosa afetada. O tratamento com gel de *Aloe vera* também determinou uma diminuição da expressão tecidual de óxido nítrico sintase induzida e de TNF $\alpha$ .

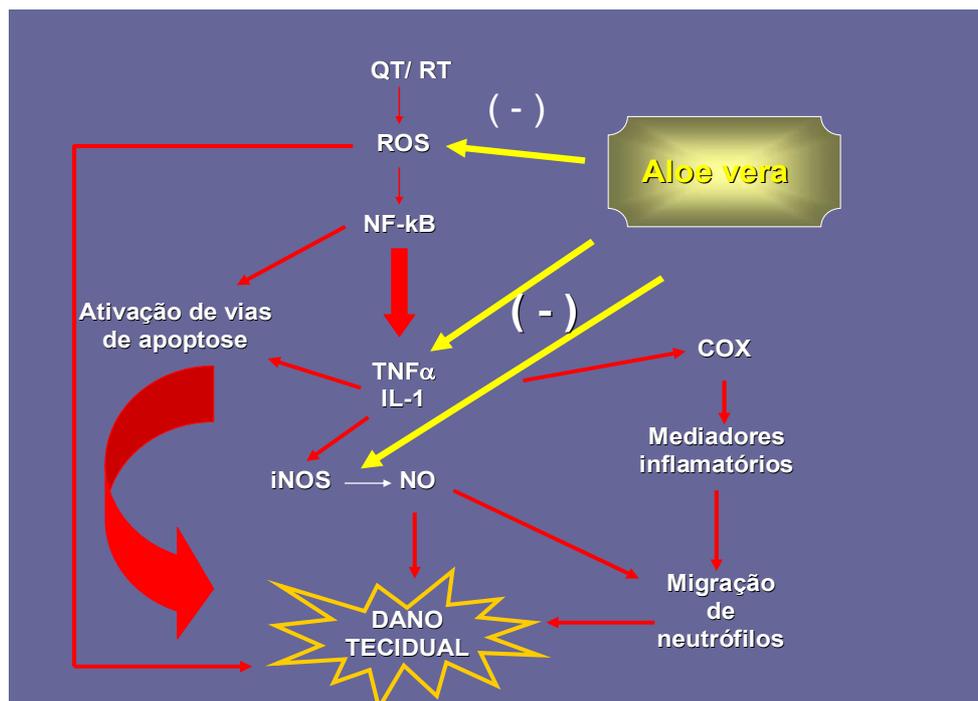
A *Aloe barbadensis* (*Aloe vera* L) constitui a espécie de Aloe mais amplamente utilizada como cosmético, como medicamento e como suplemento nutricional. Tem sido utilizada em distúrbios gastrointestinais e afecções cutâneas, como queimaduras. Enquanto a sua eficiência como purgativo é atribuído a atividade de antraquinonas, o seu efeito cicatrizante é atribuído a seus componentes polissacarídeos (ELSOHLY et al, 2004). Várias atividades biológicas lhe são atribuídas, dentre elas: antibactericida, cicatrizante, antioxidante, anti-viral, anti-tumoral, antiulcerogênica. Os polissacarídeos que compõem a polpa gelatinosa de suas folhas: galactans, manans, arabinan, e outros são os principais implicados nessas atividades. Manan é o polissacarídeo mais estudado e por ser parcialmente acetilado recebeu a denominação de Acemanan. Devido à sua atividade modulatória sobre macrófagos e capacidade de acelerar a cicatrização, já é utilizado comercialmente para tratamento de fibrossarcomas em cães e gatos e em cremes para queimaduras (PENG, 1991 e Zhang, 1996). Em modelo de edema de orelha de ratos foi demonstrada potente atividade anti-inflamatória de um glucosil-cromono isolado de *Aloe vera* L por HPLC de fase reversa (HUTTER, 1996). Algumas frações dos extratos de *Aloe vera* demonstraram atividade anti-inflamatória (VAZ'QUEZ, 1996) e a capacidade de bloquear a expressão de NOSi e de TNF $\alpha$  em diversos tipos celulares (TALMADGE, 2004). Em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por ácido acético, *Aloe vera*

promoveu efeito anti-ulcerogênico provavelmente através da inibição da produção de  $\text{TNF}\alpha$ , ação mediada pela produção de IL-10, citocina antiinflamatória (EAMLAMNAM, 2006).

Além disso *Aloe vera* apresenta comprovada atividade anti-oxidante, com potencial similar ao de  $\alpha$ -tocoferol em experimentos de homogenatos de cérebros de ratos (LEE, 2000). *Aloe* demonstrou atividade anti-oxidante através de inibição dos níveis de citocromo p450 e citocromo b5 (SINGH, 2000). Demonstrou também atividade peroxidase e superóxido-dismutase (SABEH, 1996).

Clinicamente testada, *Aloe vera* colaborou para a inibição clínica e histopatológica de colite ulcerativa leve a moderada quando utilizada por via oral durante quatro semanas (LANGMEAD, 2004). Alguns dados de estudos com *Aloe vera* têm demonstrado resultados muitas vezes conflitantes no que se refere à sua atividade antiinflamatória. Isso tem sido associado à grande variedade das amostras obtidas da planta, dos métodos de preparação das mesmas e dos métodos utilizados para isolamento de seus componentes. Amostras obtidas em diferentes fases do desenvolvimento da planta, bem como a preparação e isolamento podem promover a predominância de um componente sobre outro com atividade antagônica (TURNER, 2004 e NI, 2004).

Pelos dados apresentados podemos sugerir que o gel de *Aloe vera* nas concentrações de 50 e 100% determinaram inibição da mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil tanto macroscopicamente como pela histopatologia e que tal inibição pode dar-se por sua atividade anti-oxidante e por sua atividade antiinflamatória, através da inibição de  $\text{TNF}\alpha$  e NOSi (FIGURA 22).



**FIGURA 22:** Modelo hipotético dos mecanismos de ação de *Aloe vera* na inibição da mucosite oral experimental.

Na análise de dados relativos aos efeitos de *M. urundeuva* (aroeira-do-sertão) sobre a mucosite oral experimental induzida por 5-FU, quando utilizada topicamente sob forma de gel nas concentrações de 5, 10 e 20%, 2 vezes por dia do quarto ao nono dia de experimento verificamos uma inibição significativa dos escores macroscópicos de mucosite oral pela droga nas concentrações de 5 e 10%, mas não com 20% quando comparados com animais tratados com gel inerte. Esses animais apresentavam mucosas caracterizadas por achados de hiperemia, vasodilatação, sem úlceras extensas ou abscessos. Esses resultados foram corroborados pelas análises histopatológicas das mucosas jugais, que demonstraram ausência de úlceras, abscessos e redução do infiltrado inflamatório em favor do grupo tratado com aroeira nas concentrações de 5 e 10%.

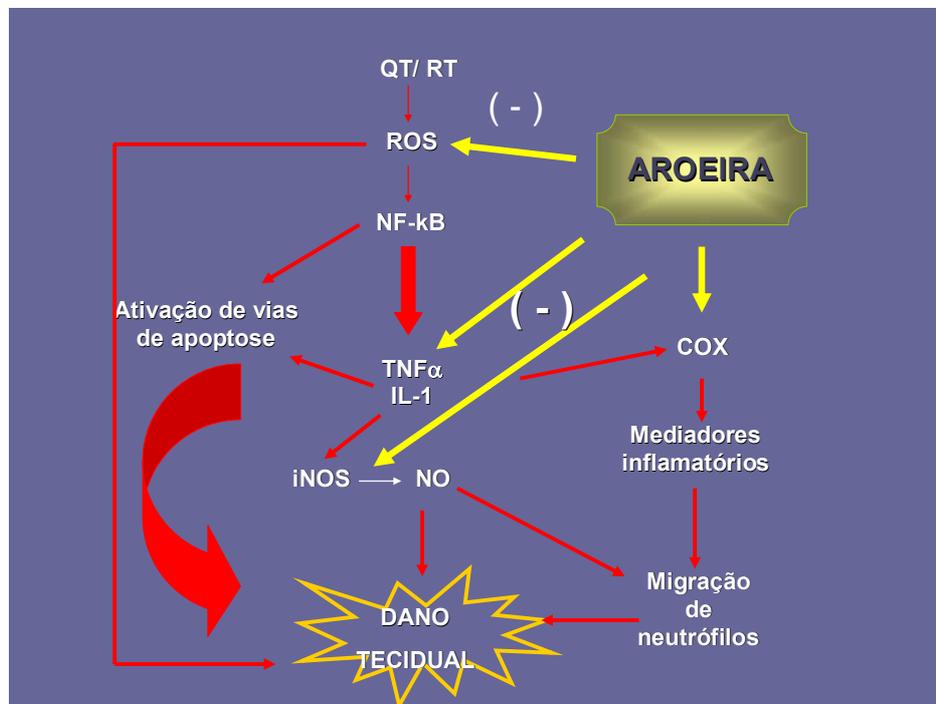
De forma surpreendente, verificamos significativa redução dos níveis de atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais dos animais tratados com aroeira em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20%) em relação aos animais controle. Esse dado sugere fortemente uma modulação negativa da aroeira sobre o infiltrado inflamatório, mesmo nos animais que não apresentaram escores macroscópicos e microscópicos de mucosite compatíveis com a inibição.

Analisamos a expressão de NOSi e de TNF $\alpha$  nas mucosas dos animais tratados com gel de aroeira a 5% e comparamos com animais normais (sem mucosite) e animais controle (com mucosite). Tanto a expressão de NOSi como TNF $\alpha$  (menos evidente) foi reduzida nos animais tratados com aroeira.

De fato a aroeira tem ampla evidência de atividade antiinflamatória, analgésica, anti-ulcerogênica e antioxidante em modelos experimentais. Pouco se sabe, no entanto, dos mecanismos pelos quais exerce tais efeitos, sobretudo o antiinflamatório. Atribui-se a 02 componentes da aroeira as suas atividades biológicas: os taninos e as chalconas. Às

chalconas, como flavonoides, são atribuídas a capacidade de inibir enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides (ciclo e lipooxigenase e fosfolipase A2), enzimas envolvidas nas vias intracelulares ativadas por citocinas, inibição da síntese de moléculas de adesão (MANTHEY, 2001) e inibição da síntese de TNF $\alpha$  (HERENCIA, 2001). Além disso, as chalconas possuem propriedade anti-oxidante verificada pela inibição da peroxidação lipídica em ratos (RODRIGUEZ, 2001), inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (MIRANDA, 2000) e pela inibição da oxidação de DNA (DESMARCHELIER, 1999). Os taninos também são componentes ativos da *M. urundeuva*. Caracterizam-se principalmente por sua potente atividade anti-oxidante. Taninos isolados de *Myracrodruon urundeuva* também demonstraram atividade antiinflamatória e analgésica em modelos animais de cistite hemorrágica, edema de pata induzido por carragenina e dextran, modelo de contorções abdominais e teste da formalina (VIANA, 1997). O ácido tanínico é um potente inibidor da síntese de NO (SRIVASTAVA, 2000). VIANA *et al* também demonstraram que taninos bloqueiam a migração de neutrófilos induzida por fMLP e carragenina.

Tendo em vista os resultados apresentados sobre os efeitos de *M. urundeuva* nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental, juntamente com as evidências de seus possíveis mecanismos de ação podemos sugerir que a inibição da mucosite oral induzida pela referida planta pode ser causada por sua ação direta sobre os ROS (anti-oxidante), como sobre a produção/inibição de TNF $\alpha$  e NOSi, sobre a produção de eicosanoides e migração neutrofilica (atividade antiinflamatória) – FIGURA 23.



**FIGURA 23:** Modelo hipotético dos mecanismos de inibição da mucosite oral experimental pela *M. urundeuva*.

Outra provável evidência dos efeitos benéficos tanto de *Aloe vera*, como *M. urundeuva* sobre a mucosite oral experimental foi a redução na intensidade da perda ponderal dos animais tratados com essas drogas (Aloe nas concentrações de 25 e 50% e de aroeira na concentração de 5%) em relação aos animais controles. A inibição completa dessa perda ponderal não seria esperada, tendo em vista que além da limitação na ingestão oral pela dor induzida pela mucosite oral, os animais também apresentam diarreia (dados não mostrados) e estão sujeitos a infecções que limitam bastante sua adequada nutrição.

**VI. CONCLUSÕES**

## VI. CONCLUSÕES:

1. Demonstramos que o gel do extrato de *Aloe vera* L inibiu de forma significativa nas doses testadas a intensidade das lesões relativas à mucosite oral experimental em hamsters tanto macroscopicamente como microscopicamente. A inibição da mucosite oral experimental induzida pelo extrato de *Aloe vera* L foi associada à redução na atividade da mieloperoxidase, sugerindo que determina inibição da migração de neutrófilos à mucosa. O tratamento com *Aloe vera* causou impacto na nutrição dos animais, uma vez que tiveram menor perda ponderal que os animais controle.

2. O tratamento tópico com extrato de *M. urundeuva* sob forma de gel determinou inibição da intensidade da mucosite oral experimental induzida por 5-FU, evidenciada pelos escores macro e microscópicos das mucosas. Parte do efeito inibitório da *M. urundeuva* sobre mucosite oral parece se relacionar com a inibição da migração de neutrófilos, tendo em vista que os níveis de MPO nos tecidos encontram-se reduzidos nos animais tratados com a referida droga. Os efeitos de *M. urundeuva* se refletiram em uma menor perda ponderal nos animais tratados com gel a 5% em relação aos controles.

3. *Aloe vera* L promoveu redução da expressão de TNF  $\alpha$  e NOSi nas mucosas jugais tratadas sugerindo que seu efeito sobre a mucosite está relacionada a inibição de citocinas e de NO implicadas no processo de mucosite oral. Também parte do efeito anti-mucosite de *M. urundeuva* se deve à inibição da produção tecidual de TNF $\alpha$  e NOSi, diminuindo o processo inflamatório, dano tecidual e amplificação do processo.

**VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

American Cancer Society. **Statistics for 2006**. In: [www.cancer.org/docroot/STT/stt\\_o.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_o.asp). Acesso em 28/07/2006.

BACARAT FF, FERNANDES HJ, SILVA MJ. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Roca (2000).

BANDEIRA, MAM. Contribuição do conhecimento químico de plantas do nordeste, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(syn. *Astronium urundeuva* Engl.), aroeira-do-sertão. Fortaleza: UFC, 1993. 205p. (Dissertação, Mestrado em química orgânica).

BANDEIRA MAM. Aroeira-do-sertão (*M. urundeuva* Allemão): constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta. (Ph.D Thesis). Universidade Federal do Ceará, 2002. 324p.

BECKER K, ERKENBRECHT JF, HAUSSINGER D, *et al.* Cardiotoxicity of the antiproliferative compound fluorouracil. **Drugs**, v. 57, p. 475-484, 1999.

BLIJHAM GH. Prevention and treatment of organ toxicity during high-dose chemotherapy: an overview. **Anti-Cancer Drugs**, v. 4, p. 527-533, 1993.

BLONDER, J. *et al.* Topical bioadhesive antioxidants reduce the severity of experimental radiation induced oral mucositis. **ASCO Proc.**, abstract 1606, 2001. (Meeting abstract).

BOYER M. Importância do equilíbrio entre a toxicidade e a eficácia da quimioterapia. **Am. J. Cancer**, v.4, n. 27, p. 127-136, 2005.

BRADLEY PP, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BRAUM, S. *et al.* Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. **Mol. Cell. Biol.** v. 22, p. 5492-5505, 2002.

BYGRAVE HA, GEH JI, JANI Y, *et al.* Neurological complications of 5-fluorouracil chemotherapy. Case report and review of the literature. **Clin. Oncol.** v. 10, p. 334-336, 1998.

CAPASSO F, GAGINELLA TS. Laxatives: a practice guide. Milan: Springer Italia, 1997.

CASCIATO DA, LOWITZ BB. **Manual of clinical oncology**. 3ª edição. Little, brown and company, 1995.

CHEN XD, HUANG LY, WU BY, JIANG Q, WANG ZC, LIN XH. Effect of aloe vera polysaccharide on the release of cytokines and nitric oxide in cultured human keratinocytes. **Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v. 7, n. 5, p. 296-8, 2005.

CHIAPPELLI F. The molecular immunology of mucositis: implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments. **eCAM**, v. 2, n. 4, p. 489-494, 2005.

CHUNG KT, WONG TY, HUANG YW, LIN Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CLARKSON JE, WORTHINGTON HV, EDEN OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (**Cochrane Review**). Em: The Cochrane Library, n. 1, 2006. Oxford: Update Software.

COLDMAN AJ, GOLDIE JH. Impact of dose-intense chemotherapy on the development of permanent drug resistance. **Semin. Oncol.**; v. 14, p. 29-33, 1987. (Suplemento 4).

Consensus Development Conference on Oral Complications of Cancer Therapies. Diagnosis, prevention and treatment. **JNCI Monogr.**, v. 9, p. 3-8, 1990.

CULY C, SPENCER C. Amifostine: an update on its clinical status as cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. **Drugs**, v. 61, p. 641-684, 2001.

DAVIS RH, LEITNER MG, RUSSO JM, BYRNE ME. Wound healing. Oral and topical activity of *Aloe vera*. **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.**, v. 79, p. 559-562, 1989.

DE CONNO F, RIPAMONTI C, SBANATTO A, *et al.* Oral complications in patients with advanced cancer. **J. Palliat. Care**, v. 5, p. 7-15, 1989.

DESMARCHELIER C, ROMÃO RL, COUSSIO J, CICCIA G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the Caatinga region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DORNELES D, WOUK AF, PONTAROLO R, OLIVEIRA AB. Efeito de *Aloe vera* Linné sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. **Visão acadêmica**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 2003.

DREIZEN S. Stomatotoxic effects of cancer therapy. **J. Prosthet. Dent.** , v. 40, p. 650-655, 1989.

EAMLAMNAM K, PATUMRAJ S, VISEDOPAS N, THONG-NGAM D. Effects of *Aloe vera* and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World J. Gastroenterol.** , v. 12, n. 13, p. 2034-2039, 2006.

ELSOHLY MA, GUL W, MURPHY TP. Analysis of the anthraquinones aloe-emodin and aloin by gas chromatography/mass spectrometry. **Int. Immunopharmacology**; v. 4, p. 1739-1744, 2004.

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

EPSTEIN JB, SILVERMAN S JR, PAGGIARINO DA, *et al.* Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Cancer**; v. 92, p. 875-885, 2001.

EPSTEIN, J. B. *et al.* Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Cancer**, v. 92, p. 875–885, 2001.

ESTIMATIVA /2006. Incidência de Câncer no Brasil. INCA- Ministério da Saúde, 2005.

FABIAN CJ, MOLINA R, SLAVIK M, *et al.* Pyridoxine therapy for palmar-plantar erythrodysesthesia associated with continuous 5-fluorouracil infusion. **Invest. New Drugs**; v. 8, p. 57-63, 1990.

FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O’GARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**; v. 147, p. 3815-3822, 1991.

FREI E. , 3ª edição, CANELLOS GP. Dose: a critical factor in cancer chemotherapy. **Am J Med**,v. 69, p. 585-594, 1980.

GATE L, PAUL J, BA GN, TEW KD, TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Pharmacother.** , v. 53, p. 169-180, 1999.

GHANNAM N, KINGSTON M, AL-MESHAAL IA, TARIQ M, PARMAN NS, WOODHOUSE N. The antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. **Horm. Res.** , v. 24, p. 288-294, 1986.

GREM JL. 5-Fluoropyrimidines. Em: **Cancer Chemotherapy & Biotherapy – Principles and Practice**. 3ª edição, 2001, cap. 8; p. 185-264; Eds. Bruce A. Chabner e Dan L. Longo/Lippincott Williams & Wilkins.

GREM JL, MCATEE N, MURPHY RF, *et al.* A pilot study of interferon alfa-2 in combination with fluorouracil plus high-dose leucovorin in metastatic gastrointestinal carcinoma. **J. Clin. Oncol.** ; v. 9, p. 1811-1820, 1991.

GRINALAY D. , REYNOLDS T. . The aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **J. Ethnopharmacol.** , v. 16, p. 117-151, 1986.

HALL, PD, BENKO H, HOGAN KR, STUART RK. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 concentrations on nonhematological toxicity and hematological recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp. Hematol.** ; v. 23, p. 1256-1260, 1995.

HASLAM E. , LILLEY T.H., CAI Y., MARTIN R., MAGNOLATO D. Tradicional herbal medicines – the role of polyphenols. **Planta Med.** , v. 55, n.1, p.1-8, 1989.

HEGGERS JP, LOY G, ROBSON MC. Histological demonstration of prostaglandin and thromboxanes in burned tissue. **J. Surg. Res.** , v. 28, p. 110-117, 1979.

HERENCIA F, FERRANDIZ ML, UBEDA A, GUILLÉN I, DOMINGUEZ JN, CHARRIS JE, LOBO GM E ALCARAZ MJ. 4-DIMETHYLAMINO-3', 4'-DIMETHOXYCHALCONE downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. **Free Radic. Biol. Med.** , v. 30, p. 43-50, 2001.

HSIEH HK, LEE TH, WANG JP, WANG JJ, LIN CN. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. **Pharm. Res.** , v. 15, p. 39-46, 1998.

HUTTER JA, SALMAN M, STAVINOHA WB, SATSANGI N, WILLIAMS RF, STREPER RT, WEINTRAUB ST. Antiinflammatory C-Glucosyl Chromone from *Aloe barbadensis*. **J. Nat. Prod.** , v. 59, p. 541-543, 1996.

IM SA, OH ST, SONG S, KIM MR, KIM DS, WOO SS, JO TH, PARK YI, LEE CK). Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **Int. Immunopharmacol.** , v. 5, p. 271-279, 2005.

ISENBURG JC, SIMIONESCU DT, SIMIONESCU A, DAVIES N, HUMAN P, ZILLA P. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. **Biomaterials**, v. 25, n.16, p. 3293-302, 2001.

ISENBURG JC, SIMIONESCU DT, VYAVAHARE NR. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall. **Biomaterials**, v. 26, n.11, p. 1237-45, 2005.

KAUFMAN DC AND CHABNER BA. Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. Em: **Cancer Chemotherapy & Biotherapy – Principles and Practice**. 3ª edição, 2001, cap. 01 p. 1-16; Eds. Bruce A. Chabner e Dan L. Longo/Lippincott Williams & Wilkins.

KHANBABAEE K, VAN TEE T . Tannins: classification and definition. **Natural Product Report**, v.18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KLEIN AD, PENNEYS N. *Aloe vera*. **J. Am. Acad. Dermatol.** , v. 18, p. 714-20, 1988.

KONTUREK PC, DUDA A, BRZOZOWSKI T, KONTUREK SJ, KWIECIEN S, DROZDOWICZ D. *et al*. Activation of genes for superoxido dismutase, interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. **Scand J Gasroentrol**; v. 35, p. 452-463, 2000.

KOUKOURAKIS, M. I.. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. **Anticancer Drugs**, v. 13, p. 181–209, 2002.

KOWANKO I, LONG L, HODGKINSON B, EVANS D. The effectiveness of strategies for preventing and treating chemotherapy and radiation induced oral mucositis in patients with cancer. p. 1-84. Adelaide, S. Austrália, Austrália: Joana Briggs Institute for Evidence Based Nursing and Midwifery, 1998.

LANGMEAD L, FEAKINS RM, GOLDTHORPE S, HOLT H, TSIRONI E, DE SILVA A, JEWLL DP, RAMPTON DS. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral aloe vera gel for active ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol. Ther.**; v. 19, p. 739-747, 2004.

LAPPAS, M., PERMEZEL, M. & RICE, G. E. *N*-acetyl-cysteine inhibits phospholipids metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor- $\kappa$ B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes *in vitro*. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 1723–1729, 2003.

LEE KY, WEINTRAUB ST, YU BP. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. **Free Radic. Biol. Med**, v. 28, n. 2, p. 261-265, 2000.

LEITÃO RFC, RIBEIRO RA, BELLAGUARDA EAL, MACEDO FDB, SILVA LR, ORIÁ RB, VALE ML, CUNHA FQ E BRITO GAC. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.** , 31 de agosto, 2006. (ainda não disponível em Pubmed).

LIMA V, BRITO GAC, CUNHA FQ, REBOUÇAS CG, *et al*. 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, p. 210-217, 2005.

LOCKART PB, SONIS ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histological study. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**; v. 7, p. 1019-1025, 1981.

LODISH H, BERK A, MATSUDAIRA P, KAISER CA, KRIEGER M, SCOTT MP, ZIPURSKY SL E DARNELL J. **Molecular Biology of the Cell.**, W. H. Freeman and Company: New York, NY. 5a. edição, 2004.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D E DARNELL J. **Cancer em: Biologia Celular e Molecular**, 4ª edição, 2000, p. 1055-1084; W. H. Freeman and Company.

LOPRINZI CL, DOSE AM. Studies on prevention of 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **NCI Monogr.** , v. 9, p. 93-94, 1990.

LORENZI H. **Árvores Brasileiras**. São Paulo: Plantarum, p. 352, 1992.

MADDENS S, CHARRUYER A, PLO I, *et al.* Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**; v. 100, p. 1294-1301, 2002.

MALIK S, WAXMAN J. Cytokines and cancer. **Br. Med. J.** ; v. 305, p. 265-267, 1992.

MANAKOVA, S. *et al.* Ara-C induces apoptosis in monkey fibroblast cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 17, p. 367-373, 2003.

MANNA S, MCANALLEY BH. Determination of the position of *O*-acetyl group in a  $\beta$ -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydr Res.** , v. 241, p. 317-9, 1993.

MANTHEY JA, GROHMANN K, GUTHRIE N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 135-153, 2001.

MAYBAUM J, ULLMAN B, MANDEL HG. Regulation of RNA- and DNA-directed actions of 5-fluoropyrimidines in mouse T-lymphoma (s-49) cells. **Cancer Res.** , v. 40, p. 4209-4215, 1980.

MENDONÇA MP, LINS LV. Lista vermelha de ferramentas para proteger espécies ameaçadas. Em: **Lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas**. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica. Belo Horizonte; p. 13-33, 2000.

MENEZES MAS. Atividade antiinflamatória e antiulcerogênica de *Astronium urundeuva* Engl. (Dissetação, Mestrado em Farmacologia), Fortaleza, UFC, 1986. Middleton E Jr.: Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv. Exp. Biol.** ; v. 439, p. 175-182, 1988.

MHATTANADUL S. Antigastric ulcer properties of *Aloe vera*. **Songklanakarín J. Sci. Technol.** ; v. 18, p. 49-57, 1995.

MIASKOWSKI C. Management of mucositis during therapy. **NCI Monogr.** ; v. 9, p. 95-98, 1990.

MIRANDA CL, STEVENS JF, IVANOV V, MCCALL M, FREI B, DEINZER ML, BUHLER DR. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavonoids in vitro. **J. Agric. Food Chem.** , v. 48, p. 3876-3884, 2000.

MOON EJ, LEE YM, LEE OH, LEE MJ, LEE SK, CHUNG MH, PARK YI, *et al.* A novel angiogenic factor derived from *Aloe vera* gel: beta-sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**; v. 3, p. 117-123, 1999.

MORTIMER JE, ANDERSON I. Weekly fluorouracil and high-dose leucovorin. Efficacy and treatment of cutaneous toxicity. **Cancer Chemother. Pharmacol.**; v. 26, p. 449-452, 1990.

MOTA MLS. Avaliação dos efeitos do agente citoprotetor amifostina na mucosite oral e disfunção da barreira intestinal: modelos experimentais em ratos e em pacientes portadores de cancer submetidos à quimioterapia antineoplásica. Fortaleza-UFC, 2004 (Dissertação de Doutorado em Farmacologia).

National Cancer Institute. Cancer Therapy Evaluation Program forms and templates: Generic CTC version 2.0. Data collection form. Available from URL: [http://ctep.cancer.gov/forms/ctc\\_genatacol.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/ctc_genatacol.pdf) (acessado em Agosto de 2006).

NI Y, TURNER D. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L leaf pulp. **Inter. Immunopharm.**; v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NORTON LA. A Gompertzian model of human breast cancer growth. **Cancer Res.**, v. 48, p. 7067, 1988.

NORTON L, DAY RS. Potential innovations in scheduling in cancer chemotherapy. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. **Important advances in oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v. 57, 1991.

NORTON L. Evolving concepts in the systemic drug therapy of breast cancer. **Semin. Oncol.** , v. 24, p. S10-3 – S10-10, 1997. (Suplemento 10).

PANOSKALTSIS-MORTARI, A. *et al.* Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of conditioning-induced tissue injury. **Blood**, v. 96, p. 4350-4356, 2000.

PARIS F, FUKS Z, ZANG A, *et al.* Endothelial apoptosis as primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science**; v. 293, p. 293-297, 2001.

PARISH LC, WITKOSKI JA, MILIKAN LE. *Aloe vera*: its chemical and therapeutic properties. **Int. J. Dermatol.**; v. 30, p. 679, 1991.

PENG SY, NORMAN J, CURTIN G, CORRIER D, MCDANIEL HR, BUSBEE D. Decreased mortality of Norman Murine Sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. **Mol. Biother.** ; v. 3, p. 79-87, 1991.

PUGH N, ROSS SA, ELSOHLY MA, PASCO DS. Characterization of aloride, a new high-molecular-weight polyssaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. **J. Agric. Food Chem.** , v. 49, p. 1030-1034, 2001.

QUI Z, JONES K, WYLIE M, ORNDORFF S. Modified *Aloe barbadensis* polysaccharide with immunoregulatory activity. **Planta Med.** , v. 66, p. 152-156, 2000.

RAJASEKARAN S, RAVI K, SIVAGNANAM K, SUBRAMANIAN S. Beneficial effects of *ALOE VERA* leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. **Clinical and Experimental Pharmacol. and Physiol.** , v. 33, p. 232-237, 2006.

RAMAMOORTHY L, KEMP MC, TIZARD IR. Acemannan, a b-(1, 4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. **Mol Pharmacol.** , v. 50, p. 878-884, 1996.

REYNOLDS T. Aloes the genus aloe; CRC press: Boca Raton, 2004.

ROBBERS JE, SPEEDE MK, TYLE VE. Pharmacognosy and **Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 53-54, 1996.

ROBERT A, NEZAMIS JE, LANCASTER C, HANCHAR AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRIGUES LV, FERREIRA FV, REGADAS FSP, MATOS D E VIANA GSB.. Morphologic and Morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira do sertão). **Phytother. Res.** , v. 16, p. 267-272, 2000.

RODRIGUES RJ, MIRANDA CL, STEVENS JF, DEINZER ML, BUHLER DR. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipidic peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. **Food Chem. Toxicol.** , v. 39, p. 437-445, 2001.

RUBENSTEIN EB, PETERSON DE, SCHUBERT M, KEEFE D, MCGUIRE D, *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Cancer Therapy-Induced oral and Gastrointestinal Mucositis. **Supplement to Cancer**; v. 100, n. 9, p. 2026-2046, 2004.

RUTMAN RJ, CANTAROW A, PASCHKIS KE. Studies on 2-acetyl-aminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C<sup>14</sup> by pre-neoplastic rat liver. **Cancer Res.** , v. 14, p. 119-126, 1954.

SABEH F, WRIGHT T, NORTON SJ. Isozymes of superoxide dismutase from *Aloe vera*. **Enzyme Protein**, v. 49, n. 4, p. 212-221, 1996.

SANTOS-BUELGA C, SCALBERT A. **J. Sci. Food Agric.** , v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SCHMID R. An old medicinal plant: Aloe vera. **Parfümerie and kosmetik**, v. 72, n. 3, p. 146-150, 1991.

SCHWATZ GK. Development of cell cycle active drugs for the treatment of gastrointestinal cancer: a new approach to cancer therapy. **J. Clin. Oncol.** , v. 23, n. 20, p. 4499-4508, 2005.

SINGH RP, DHANALAKSHMI S, RAO AR. Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. **Phytomedicine**, v. 7, p. 209-219, 2000.

SIRONI M. *et al.* Benzydamine inhibits the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemotactic protein-1 by *Candida albicans*-stimulated human peripheral blood cells. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 27, p. 118-122, 1997.

SRIVASTAVA RC, HUSAIN MM, HASAN SK, ATHAR M. Green tea polyphenols and tannic acid as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. **Cancer Lett.** , v. 153, p. 1-5, 2000.

SONIS ST. A biological approach to mucositis. **J. Support Oncol.** , v. 2, p. 21-36, 2004.

SONIS ST, ELTING LS, FEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M, BEKELE BN, *et al.* Perspectives on Therapy-Induced Mucositis: Pathogenesis, measurement, epidemiology and consequences for patients. **Cancer supplement**, v. 100, n.9, p. 1995-2025, 2004.

SONIS ST, PETERSON RL, EDWARDS LJ, LUCEY CA, WANG L, MASON L *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**, v. 36, p. 373-381, 2000.

SONIS ST, SONIS AL, LIEBERMAN A. Oral complications in patients receiving treatment for malignancies other than the head and neck. **J. Am. Dent. Assoc.** , v. 97, p. 486-472, 1978.

SU CK, MEHTA V, RAVIKUMAR L, SHAH R, PINTO H, *et al.* Phase II double-blind randomized study comparing oral aloe vera versus placebo to prevent radiation-related mucositis in patients with head-and-neck neoplasms. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** , v. 60, n. 1, p. 171-177, 2004.

SUNDERLAND SE, BROWMAN GP. Prophylaxis of oral mucositis in irradiated head-and-neck cancer patient: a proposed classification scheme of interventions and meta-analysis of randomized controlled trials. **Inter. J. Rad. Oncol.** , v. 49, n. 4, p. 917-930, 2001.

VALLE LBS, *et al.* Farmacologia Integrada. São Paulo: Atheneu, 1999.

VA'ZQUEZ B, AVILA G, SEGURA D, ESCALANTE B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **J. Ethnopharmacol.** , v. 55, p. 69-75, 1996.

VIANA GSB, BANDEIRA MAM, MATOS FJ. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189-195, 2003.

VIANA GSB, MATOS FJA, BANDEIRA MAM, RAO VSN. AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. 2ª Edição, Fortaleza: ed. UFC, 1995.

VIANA GSB, BANDEIRA MAM, MOURA LC, SOUZA FILHO MVP, MATOS FJA, RIBEIRO RA. Analgesic and antiinflammatory effects of the tanin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytother. Res.** , v. 11, p. 118-122, 1997.

VISUTHIPANICH W. Histochemical and pathological changes in rat gastric mucosa following *Aloe vera* gel and cortisol administration. M Sc. Thesis in Anatomy, Bangkok, Faculty of science, *Mahidol university*, 1988.

TALMADGE J, CHAVEZ J, JACOBS L, MUNGER C, CHINNAH T, CHOW JT, WILLIAMSON D, YATES K. Fractionation of *Aloe vera* L inner gel, purification and molecular profiling of activity. **Inter. Immunopharm.** , v. 4, p. 1757-1773, 2004.

TIETZE C, SCHLESINGER PH, STAHL P. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles on receptor cycling. **J. Cell. Biol.**; v. 92, p. 417-424, 1982.

TIZARD IR, BUSBEE D, MAXWELL B E KEMP MC. The effect of acemannan on wound healing in young and old rats. **Wounds**, v. 6, p. 201-209, 1994.

Turner CE, Williamson DA, Stroud PA, Talley DJ (2004). Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *Inter Immunopharm*; vol 4; p. 1727-1737.

ULRICH CM, YASUI Y, STORB R, *et al.* Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. **Blood**, v. 98, p. 231-234, 2001.

WATSON JD, BAKER TA, BELL SP, GANN A, LEVINE M, LOSICK R. Molecular Biology of the Gene, cap. 7. Peason Benjamin Cummings; CSHL Press. 5a. edição, 2004.

WILKES JD (1998). Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. **Seminars in Oncol.** , v. 25, n. 5, p. 538-551.

WILLIAMS MS, BURK M, LOPRINZI CL, HILL M, SCHOMBERG PJ, NEARHOOD K, O'FALLON, JR, *et al.* Phase III double-blind evaluation of an Aloe vera gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** , v. 36, n. 2, p. 345-349, 1996.

WOMBLE D, HELDERMAN JH. The impact of acemannan on the generation and function of cytotoxic T-lymphocytes. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** , v. 14, p. 63-77, 1992.

World Health Organization. WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organization, 1979.

YAGI A, SHIBATA S, NISHIOKA I, IWADARE S, ISHIDA Y. Cardiac stimulant action of constituents of Aloe saponaria. **J. Pharm. Sci.** , v. 71, p. 739-741, 1982.

ZHANG XF, WANG HM, SONG YL, NIE LH, WANG LF, LIU B, SHEN PP AND LIU Y. Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. **Bioorg Medic Chem Letters**, v. 16, p. 949-953, 2006.

ZHANG L, TIZARD IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**; v. 35, p. 119-128, 1996.

ZUANAZZI JAS Flavanóides. Em: **Farmacognosia, da planta ao medicamento** (Cláudia MO Simões, Eloir P Schenkel, Grace Grosmann, João Carlos P Melo, Lílían A Mentz, Pedro R Petrovick) eds. UFRGS, p 489- 516, 1999.