



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

**EFEITO DE PROTEASES ISOLADAS DA FRAÇÃO LPII DO LÁTEX DE *Calotropis*
procera NA PREVENÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA – CE
2019**

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

EFEITO DE PROTEASES ISOLADAS DA FRAÇÃO LP II DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NA PREVENÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

**FORTALEZA – CE
2019**

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

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

- R154e Rangel, Gisele de Fátima Pinheiro.
Efeito de proteases isoladas da fração LPII do látex de *Calotropis procera* na prevenção da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / Gisele de Fátima Pinheiro Rangel. – 2019.
96 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. *Calotropis procera*. 2. látex. 3. quimioterapia. 4. irinotecano. I. Título.

CDD 615.1

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

EFEITO DE PROTEASES ISOLADAS DA FRAÇÃO LPII DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NA PREVENÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Karoline Sabóia Aragão
Centro Universitário Estácio

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus,

À minha mãe, por seu amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que é a minha força, esperança e alicerce.

À minha mãe, **Sidenia**, por ser esse exemplo de mulher guerreira, determinada, amorosa, que se dedicou integralmente para dar a melhor oportunidade aos filhos. Por tudo isso, a senhora é a grande responsável por eu estar aqui hoje. Obrigada por seu imenso amor e apoio.

À meu pai, **Francisco**, por seu amor, carinho, atenção e por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, **Paulo César e Ana Vivian**, pelo companheirismo, cumplicidade e por viverem comigo cada conquista. Ao meu cunhado, **Manoel Neto**, por sua amizade e por me encorajar sempre. À minha sobrinha, **Isis**, por me fazer a tia mais feliz desse mundo.

Ao **Kirally**, que nunca poupou esforços para me ajudar e me deu apoio incondicional em todas as etapas dessa caminhada.

Aos meus avós, tios, primas e amigas, pela torcida e apoio em todos os momentos, vocês me fazem muito feliz.

À minha orientadora, Prof^a Dra. **Nylane Nunes**, por exercer muito mais do que uma orientação científica, mas por ser exemplo de amizade, humildade amor ao próximo e justiça. Agradeço pela oportunidade, confiança, carinho e por seus ensinamentos preciosos. Essa caminhada se torna muito mais leve quando temos a sua companhia.

Às professoras Doutoras **Deisy Wong, Renata Leitão e Sandra Nunes**, por suas relevantes contribuições na banca de qualificação. Em especial, À Professora Renata Leitão pelas avaliações histopatológicas e de imunohistoquímica e a Deisy Wong por sua gentileza, paciência e indispensáveis contribuições na biologia molecular e discussão de resultados desse trabalho.

Aos professores Doutores **Márcio Ramos** e **Karoline Sabóia** por prontamente aceitarem o convite para participar da banca desta dissertação e por suas valiosas contribuições. Acima de tudo, vocês fazem parte da minha história.

Ao professor Dr. Márcio Viana Ramos pela colaboração e parceria na realização de todo este trabalho, desde o isolamento das proteínas às incansáveis discursões dos resultados.

À minha prima, **Rachel Sindeaux**, que me levou para conhecer o laboratório e abriu essa grande oportunidade na minha vida. Seu incentivo foi essencial.

As queridas amigas da pós-graduação: **Luana David**, por ter me passado o modelo de mucosite detalhadamente e com tanto carinho, pelo companheirismo e parceria em todos os experimentos e na vida; **Tamiris Goebel**, por ter se tornado essa amiga-mãe, por todos os conselhos e contribuições nos experimentos; **Marília Nunes** e **Kayanny Ferreira** por total ajuda nos experimento com cultura de células e por serem essas pessoas cheias do espírito santo que espalham amor por onde passam; **Fernanda Soares** e **Taiana Pierdoná** pela disponibilidade e por tornarem os momentos no laboratório tão agradáveis; **Larisse Marques**, **Patrícia Luz**, **Kalyan Nogueira**, **Ingrid Samantha** e **Daniele Teixeira**, por terem me incentivado a seguir na pesquisa e por repassarem tantos conhecimentos em minha iniciação científica.

Ao Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso, sob coordenação do Professor **Pedro Magalhães** e, em especial, aos pós-graduandos **Alfredo** e **Karine** que me deram total auxílio no experimento de contratilidade intestinal.

As alunas do LAFICA, **Renata** e **Aurilene**, pela amizade, convívio e ensinamentos em biologia molecular.

Aos estudantes de iniciação científica: **Liviane**, **Anderson**, **Suzy**, **Débora**, **Rebeca**, **Brenda**, **Carol**, **Gracinha** e **Rafael** por contribuírem na execução deste trabalho e por se dedicarem ao nosso laboratório.

Aos técnicos de laboratório: **Patrícia Sâmara, Manoel Serra Azul, Júnior** (morfologia) pela constante ajuda, competência e amizade.

Aos funcionários **Célia, Laura, Gabriela, Wesley, Adalto, Moreira** e demais funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do NPDM, pela atenção e prestatividade.

À **CAPES** e **CNPq**, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral comum do irinotecano (CPT-11), quimioterápico usado para o tratamento do câncer colorretal metastático. Cerca de até 80% dos pacientes tratados com irinotecano desenvolvem algum grau de MI. *Calotropis procera* é uma planta laticífera que tem apresentado um potencial anti-inflamatório em diversos modelos animais. **Objetivo:** Investigar o potencial farmacológico de uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (LP11), sobre as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais associadas à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. **Métodos:** Camundongos Swiss machos (25-30 g) receberam irinotecano (75 mg/kg, i.p.) ou salina (0,9%,i.p.) uma vez ao dia durante quatro dias. Nos outros grupos experimentais, LP11 (5 mg/kg; i.v) e LP11 acrescida com inibidor de proteases (IAA), LP11 + IAA (1, 5 ou 25 mg/kg, i.v) foram injetados uma hora antes. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia do protocolo experimental, sendo coletadas amostras de sangue periférico para contagem de leucócitos, e de duodeno para análise da contratilidade intestinal, alterações histopatológicas, e dosagem de MPO, GSH, MDA, citocinas (IL-1 β , IL-6, KC e IL-10), expressão de COX-2 e NF-kB. Foram avaliados também os escores de diarreia e alterações do comprimento do intestino delgado. Além disso, os animais foram avaliados diariamente quanto à massa corporal e da sobrevivência. Para estatística utilizou-se ANOVA/Teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn. $p < 0,05$ foi aceito. **Resultados:** A fração proteica LP11 não alterou os parâmetros funcionais, como diarreia, comprimento intestinal e sobrevivência, apesar de reduzir a concentração de MPO, demonstrando sua atividade anti-inflamatória. Enquanto que o tratamento com LP11 acrescido de iodoacetamida, inibidor de atividade proteolítica, demonstrou efeitos positivos ao prevenir a diarreia, alterações na morfologia e função intestinal, aumento da sobrevivência, reduziu a concentração de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, KC) e expressão de COX-2 e NF-Kb, aumentou a citocina anti-inflamatória (IL-10), associados a efeitos antioxidantes, demonstrados pelo aumento da concentração de GSH e redução de MDA. **Conclusão:** O efeito das proteínas isoladas do látex de *C.procera* na MI por CPT-11 se deve em parte às suas proteases, entretanto, a atividade proteolítica destas proteínas parece estar modulando de forma negativa o seu efeito farmacológico.

Palavras-chave: *Calotropis procera*, látex, quimioterapia, irinotecano.

ABSTRACT

Effect of isolated proteases of subfraction LP11 of *Calotropis procera* latex protein on intestinal mucositis induced by irinotecan in mice.

Intestinal mucositis (IM) is a common side effect of irinotecan (CPT-11), is chemotherapeutic used for the treatment of metastatic colorectal cancer. About 80% of irinotecan-treated patients develop some degree of MI. *Calotropis procera* is a latiferous plant that has an anti-inflammatory potential in several models. **Objective:** To investigate the pharmacological potential of an isolated fraction of *Calotropis* latex (LP11), on the morphological changes, inflammation and forms associated with intestinal mucositis induced by irinotecan in mice. **Methods:** Swiss male mice (25-30 g) received irinotecan (75 mg / kg, i.p.) or saline (0.9%, i.p.) once daily for four days. In other experimental groups, LP11 (5 mg / kg; i.v) and LP11 plus protease inhibitor (IAA), LP11 + IAA (1, 5 or 25 mg / kg, i.v) were injected one hour earlier. The animals were euthanized in the experimental protocol, and peripheral blood samples were collected for leukocyte counts and duodenum for analysis of intestinal contractility, histopathological changes, and MPO, GSH, MDA, cytokines (IL-1 β , IL-6, KC and IL-10), expression of COX-2 and NF- κ B. Diarrhea scores and changes in the length of the small intestine were also evaluated. In addition, the animals were heavily criticized for body mass and survival. Statistical analysis ANOVA / Bonferroni test or Kruskal Wallis / Dunn test was used. $p < 0.05$ was accepted. **Results:** The protein fraction of LP11 did not alter the relative parameters, such as diarrhea, intestinal length and survival, although it reduced the MPO concentration, demonstrating its anti-inflammatory activity. Influence of LP11 IAA to inhibition growth, inhibition of proteolytic activity, increased survival and intestinal function, increased survival, reduced concentration of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, KC) COX-2 and NF- κ B, increased an anti-inflammatory protein (IL-10), associated with antioxidants, demonstrated by the increase of GSH concentration and reduction of MDA. **Conclusion:** The effect of proteins isolated from *C.procera* latex on IM by CPT-11 is the protease protein, however, a proteolytic activity of proteins appears to be modulating the negative form of its pharmacological effect.

Key words: *Calotropis procera*, latex, chemotherapy, irinotecan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma*.....	14
Figura 2	Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11).....	15
Figura 3	Metabolismo do cloridrato de irinotecano (CPT-11).....	17
Figura 4	Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	20
Figura 5	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br. A.....	24
Figura 6	Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i>	28
Figura 7	Esquema de fracionamento do látex da planta <i>Calotropis procera</i> ..	33
Figura 8	Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite.....	35
Figura 9	Representação do grau de diarreia apresentada em animais tratados com irinotecano.....	37
Figura 10	Figura esquemática de avaliação funcional intestinal <i>ex vivo</i>	40
Figura 11	O tratamento com LPII não altera a perda de massa corpórea em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	46
Figura 12	O tratamento com LPII não altera a taxa de sobrevivência em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	47
Figura 13	LPII não reduz o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.....	49
Figura 14	O tratamento com LPII não altera a redução do comprimento intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	50
Figura 15	O tratamento com LPII reduz a atividade MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	51
Figura 16	O tratamento com LPII IAA não altera a perda ponderal em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	52
Figura 17	O tratamento com LPII IAA aumenta a sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	53
Figura 18	O tratamento com LPII IAA não altera o perfil leucocitário de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	54
Figura 19	LPII IAA nas doses de 5 e 25 mg/kg foram capazes de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.....	55
Figura 20	A fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> reduz a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	56
Figura 21	O tratamento com LPII IAA (5 mg/kg) controla a redução do comprimento intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	57
Figura 22	O tratamento com LPII IAA reduz a atividade MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	58
Figura 23	Efeito da fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> nas	

	alterações microscópicas do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	60
Figura 24	Efeito da fração proteica LP11 IAA de <i>Calotropis procera</i> nos escores de avaliação microscópica do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	61
Figura 25	Efeito da fração proteica LP11 IAA de <i>Calotropis procera</i> sobre alterações morfológicas do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	61
Figura 26	Fração proteica LP11 IAA de <i>Calotropis procera</i> as concentrações de IL-1 β , IL-6, KC e aumenta os níveis de IL-10 no duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	63
Figura 27	Produção de citocina IL-10 em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com o LP11 IAA incubado por 24h.....	64
Figura 28	Efeito de LP11 IAA na imunomarcagem de COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	66
Figura 29	LP11 IAA reduz a porcentagem de área imunomarcada para COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	67
Figura 30	Efeito de LP11 IAA na imunomarcagem de NF-kB no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	68
Figura 31	LP11 IAA reduz a porcentagem de área imunomarcada para NF-kB no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	69
Figura 32	Fração proteica LP11 IAA de <i>Calotropis procera</i> aumenta os níveis de GSH e reduz os de MDA no duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Escores de avaliação da diarreia em camundongos.....	37
Tabela 2	– Sistema de escores de Woo.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
CE	Enzima carboxilesterase
CPT-11	Cloridrato de Irinotecano
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DAMPs	Padões Moleculares Associados ao Dano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de Diferenciação Mieloide 88
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NPC	7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina
NRL	Receptores do tipo NOD
OMS	Organização Mundial de Saúde
P450	Citocromo P450
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PARs	Receptores Ativados por Proteases
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotencina
TGI	Trato gastrointestinal
TLR2	Receptor Toll like tipo 2
TLR4	Receptor Toll like tipo 4
TLR9	Receptor Toll like tipo 9
TLRs	Receptores do tipo toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UGT1A1	Uridina 5' difosfato-glicuronosil-transferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Uso do Irinotecano (CPT-11) no tratamento do Câncer colorretal...	14
1.2	Mucosite intestinal por antineoplásico.....	18
1.3	Látex.....	22
1.4	<i>Calotropis procera.....</i>	23
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Fármacos, reagentes, materiais.....	32
4.2	Aspectos éticos.....	32
4.3	Espécie vegetal.....	32
4.3.1	<i>Coleta e Isolamento das proteínas.....</i>	32
4.3.2	<i>Obtenção das subfrações de LP por Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose.....</i>	33
4.4	Animais.....	34
4.5	Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	34
4.5.1	Grupos experimentais e protocolos de tratamento.....	35
4.6	Parâmetros avaliados.....	36
4.6.1	<i>Análise ponderal.....</i>	36
4.6.2	Análise da sobrevivência.....	36
4.6.3	Contagem de leucócitos totais.....	36
4.6.4	Avaliação da diarreia.....	36
4.6.5	Medida do comprimento do intestino delgado.....	37
4.6.6	Análise histopatológica e morfométrica da mucosa intestinal.....	38
4.6.7	Avaliação da contratilidade do duodeno <i>ex vivo</i>	39
4.6.8	Avaliação do processo inflamatório	40
4.6.8.1	<i>Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....</i>	40
4.6.8.2	<i>Quantificação de citocinas IL-1β, IL-6, IL-8 (KC) e IL-10 no intestino....</i>	41
4.6.8.3	<i>Imunohistoquímica.....</i>	42
4.6.9	Cultura de células.....	42

4.6.9.1	<i>Cultivo celular</i>	42
4.6.9.2	<i>Dosagem de Citocina (IL-10) por ELISA</i>	43
4.6.10	<i>Avaliação do estresse oxidativo</i>	44
4.6.10.1	<i>Determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	44
4.6.10.2	<i>Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)</i>	45
4.7	Análise estatística	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Efeito da fração proteica de <i>Calotropis procera</i> , LPII, sozinha sobre a mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.....	46
5.2	Efeito dose-resposta da fração proteica LPII IAA sobre a mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.....	47
5.3	Efeitos da fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> sobre as alterações histológicas e morfológicas induzidas por CPT-11.....	58
5.4	Efeitos da fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> sobre a dosagem de citocinas IL-1 β , IL-6, KC e IL-10 em segmentos de duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	61
5.5	Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW264.7.....	63
5.6	Efeito da fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> sobre a expressão de COX-2 e NF-kB em segmentos de duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.....	65
5.7	Efeito da fração proteica LPII IAA de <i>Calotropis procera</i> nos níveis de GSH e MDA na mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.....	70
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – Materiais utilizados no estudo	90
	ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética	93


1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso do Irinotecano (CPT-11) no tratamento do Câncer colorretal

O câncer é um termo universal usado para denominar um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que se multiplicam além de seus limites habituais e tem a capacidade de invadir partes adjacentes do corpo e/ou espalhar-se para outros órgãos, podendo acometer qualquer parte do organismo, sendo no momento, a segunda causa de óbito no mundo (OMS, 2018).

Em nosso país, estima-se que para cada ano do biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil), ocorrerão 420 mil novos casos de câncer. Conforme ilustrado na **figura 1**, haverá 17.380 novos casos de câncer colorretal (CCR) em homens e 18.980 em mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de neoplasia ocupa a terceira posição nos homens e a segunda nas mulheres na região Nordeste do país. Para a mortalidade, foram estimados 15.415 casos em ambos os sexos, a maioria em países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) baixo, onde o prognóstico da doença é ruim. A sobrevida média cumulativa de CCR em 5 anos é de 40-50%, não havendo grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (INCA, 2015).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Próstata	68.220	31,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Estômago	13.540	6,3%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Estômago	7.750	3,8%
Esôfago	8.240	3,8%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Bexiga	6.690	3,1%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.390	3,0%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Leucemias	5.940	2,8%			Leucemias	4.860	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%					

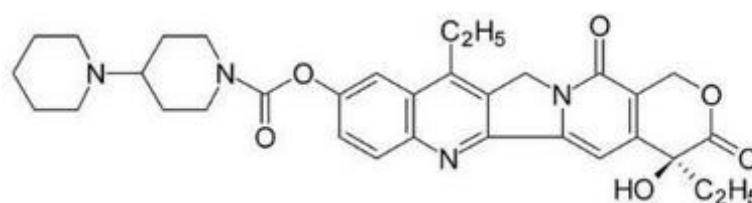
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

A terapêutica antineoplásica tem avançado a ponto de melhorar o prognóstico de vários tumores, contudo, os pacientes oncológicos continuam sofrendo em demasia com os efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia e radioterapia. Além disso, o conhecimento ainda insatisfatório da patogênese de boa parte dessas reações adversas se reflete na limitação de opções terapêuticas protetoras (BOSSI *et al.*, 2015). Conseqüentemente, efeitos adversos graves levam muitas vezes à interrupção da quimioterapia ou radioterapia, comprometendo a eficácia global do tratamento oncológico (BOSSI *et al.*, 2015).

O irinotecano (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonitoxicamptotecina ou CPT-11 (**Figura 2**) é um derivado semi-sintético e solúvel da camptotecina. Essa substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall *et al.*, em 1966, de uma planta nativa na China e no Tibet, *Camptotheca acuminata*, conhecida como xi shu (árvore feliz). Contudo, em decorrência da sua toxicidade, somente em 1996 a comercialização teve início, quando foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e foram sintetizados derivados com menor toxicidade, topotecano e irinotecano (ALIMONTI *et al.*, 2004; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

Figura 2 – Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11).



Fonte: RABBA *et al.*, 2011.

O irinotecano é um inibidor seletivo da topoisomerase I, enzima que atua sobre a replicação e transcrição da fita dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA) sem alterar sua sequência de nucleotídeos. Sua função baseia-se na diminuição da tensão da torção do DNA, através da ruptura reversível em uma das cadeias do DNA durante o processo de replicação. Com isso, o irinotecano, assim como outras camptotecinas, cessa a religação dessas fitas, levando a quebra da cadeia de DNA durante a replicação, o que bloqueia a divisão celular, especificamente na fase S (DOODS *et al.*, 1998; ALIMONTI *et al.*, 2004). A topoisomerase I é expressa em todas as células,

contudo, os níveis dessa enzima são mais elevados em tecidos com câncer, principalmente no cólon, próstata, ovário, esôfago e cérebro, tornando-a um alvo para a quimioterapia antitumoral (CHAMPOUX, 2001; ALMEIDA, *et al.* 2017).

O irinotecano é usado como agente único ou combinado com outros protocolos para tratamento de primeira e segunda linha do câncer colorretal metastático (DOODS *et al.*, 1998; ROSATI *et al.*, 2002; CHESTER *et al.*, 2003). Além disso, tem mostrado efeitos sobre outros tipos de cânceres como o câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgkin's (RIBRAG *et al.*, 2003), pulmão (ROCHA-LIMA *et al.*, 2007), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2001), mama (PEREZ *et al.*, 2004), colo do útero (IRVIN *et al.*, 1998) e de estômago (AJANI, 2005). E em 1998, foi aprovado pelo FDA para ser utilizado no tratamento do carcinoma colorretal metastático que progrediu após quimioterapia padrão com 5-Fluorouracil (CUNNINGHAM *et al.*, 1998).

No tratamento de câncer colorretal metastático, os esquemas de primeira linha comumente incluem fluoropirimidinas (5-FU ou capecitabina) juntamente com leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX e FLOX) ou irinotecano (FOLFIRI e IFL) (RIBEIRO *et al.*, 2016).

FARMACOCINÉTICA DO IRINOTECANO

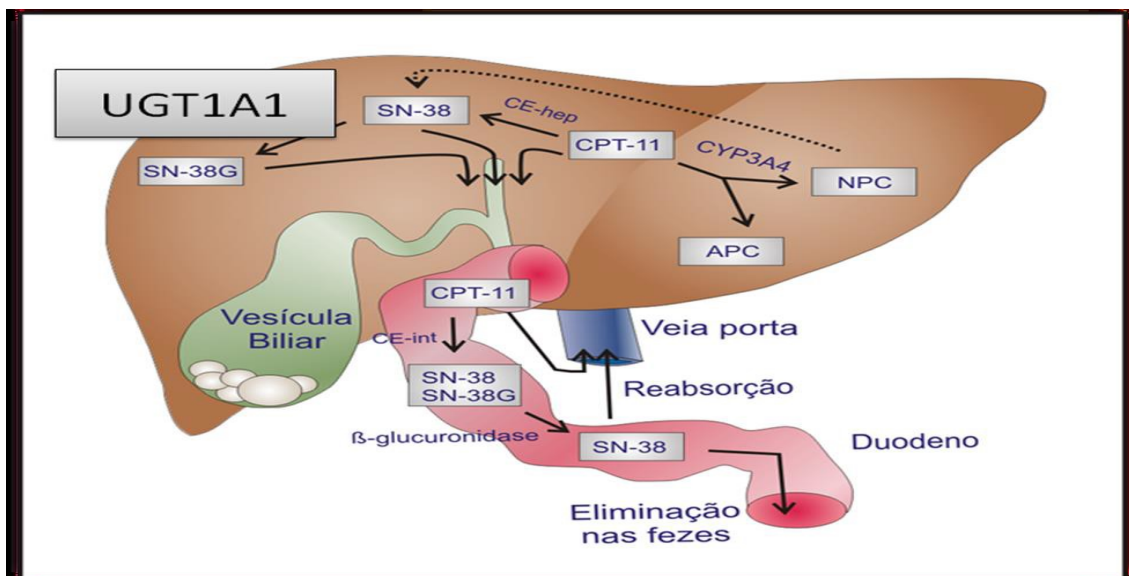
CPT-11 é uma pró-droga que após metabolização hepática é convertida ao seu metabólito ativo, SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), pela enzima carboxilesterase (CE), sobretudo hCE2. Estudos *in vitro* indicam que o SN-38 é 100 a 1.000 vezes mais ativo que o CPT-11 (RIVORY *et al.*, 1996; XIE *et al.*, 2002; KOIZUMI *et al.*, 2006). A CE encontra-se presente essencialmente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. O SN-38 é formado a partir do irinotecano por clivagem da ligação de carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina, presente na posição C-10 da molécula de irinotecano, mediada por uma carboxilesterase (GUICHARD *et al.*, 1999; ALIMONTI *et al.*, 2004). Além disso, a meia vida ($t_{1/2}$) do CPT-11, sob a forma de lactona, é de aproximadamente 6,8 horas (5 a 9,6 horas), enquanto que a $t_{1/2}$ do SN-38 é de aproximadamente 11,05 horas (9,1 a 13 horas) (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

O metabolismo do irinotecano é principalmente hepático por uma enzima do sistema P450, CYP3A4, que gera metabólitos inativos como APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]- carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-

amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN *et al.*, 2004). O NPC é metabolizado completamente em SN-38 por esta enzima, contribuindo na atividade e toxicidade do CPT-11 *in vivo* (RIVORY *et al.*, 1996; DODDS *et al.*, 1998; MATHIJSEN *et al.*, 2004). Por fim, após a conversão do irinotecano a SN-38, ocorre glucuronidação hepática da enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-8 GT) – UGT1A1, com formação de glucuronídeos de SN-38 (SN-38G), inativos (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN *et al.*, 2004).

A eliminação do CPT-11 ocorre principalmente pelas fezes (60-70%), sendo também excretada pela bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI *et al.*, 2004). CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile através das proteínas de transporte MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) e MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) e dirigem-se ao intestino delgado. No intestino, uma parte é excretada pelas fezes; outra parte pode ser re-transformada em SN-38 por β -glucuronidase bacterianas (como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) (TAKASUNA *et al.*, 1996; XIE *et al.*, 2002) (**Figura 3**).

Figura 3 – Metabolismo do cloridrato de irinotecano (CPT-11).



No fígado, o irinotecano pode ser metabolizado pelas carboxilesterases hepática 1 e 2 (hCE) a SN-38. Este, por sua vez, é depurado pela UGT1A1/7 a glicuronídeos de SN-38 (SN38G), desprovido de atividade biológica. Sob ação da enzima CYP3A4, o CPT-11 é também convertido nos seus metabólitos inativos: APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) e NPC (7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin). O APC pode ser metabolizado pela hCE, formando mais SN-38. Todos esses compostos ativos e inativos são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. O irinotecano e SN-38 podem ser reabsorvidos no intestino, onde retornam ao fígado pela veia porta, em um processo denominado recirculação entero-hepática. Fonte: Ribeiro, R.A. Concurso para provimento ao cargo de professor titular de Farmacologia Geral, 2011.

1.2 Mucosite intestinal por irinotecano

Mucosite é o termo clínico usado para descrever as alterações ocasionadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato gastrointestinal (TGI) de maneira global ou localizada (cavidade oral – mucosite oral ou mucosa intestinal – mucosite gastrintestinal). De forma geral, aproximadamente 40% dos pacientes em quimioterapia antineoplásica, utilizando doses padrão e 60% dos que recebem altas doses apresentam algum grau de mucosite (GIBSON *et al.*, 2013; PETERSON *et al.*, 2011). Entretanto, quando a quimioterapia é realizada em altas doses e associada à radioterapia, para o transplante de células tronco hematopoiéticas, a incidência de mucosite pode atingir até 100%, afetando mais de dois milhões de pessoas no mundo a cada ano (PETERSON *et al.*, 2011; GIBSON *et al.*, 2013). Em ensaios clínicos, até 80% dos pacientes que receberam irinotecano manifestaram mucosite, comumente associado à diarreia (BLEIBERG; CVITKOVIC, 1996).

A toxicidade da quimioterapia decorrente da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do TGI, afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes com câncer provocando diarreia, sangramento, náuseas, vômitos, dor abdominal, desnutrição, infecções e sepse devido à translocação bacteriana, desidratação e fadiga, aumentando a necessidade de hospitalização. Desta forma, a mucosite induzida por drogas antineoplásicas é um importante e dispendioso efeito colateral muitas vezes dose-limitante (GIBSON; KEEFE, 2006; PETERSON *et al.*, 2011).

Dentre os pacientes que apresentam mucosite, 35% sofrem atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30%, a descontinuação do tratamento. De modo geral, 60% apresentam febre e requerem hospitalização (KEEFE *et al.*, 2007). Em pacientes com câncer colorretal metastático, especificamente, que recebem regimes de quimioterapia comuns, têm um alto risco de desenvolver diarreia (16%). Ainda assim, nos protocolos que envolvem a associação de leucovorin, 5-FU, irinotecano e oxaliplatina (FOLFIRINOX), desenvolvem um quadro de diarreia grave que pode ser observado em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007).

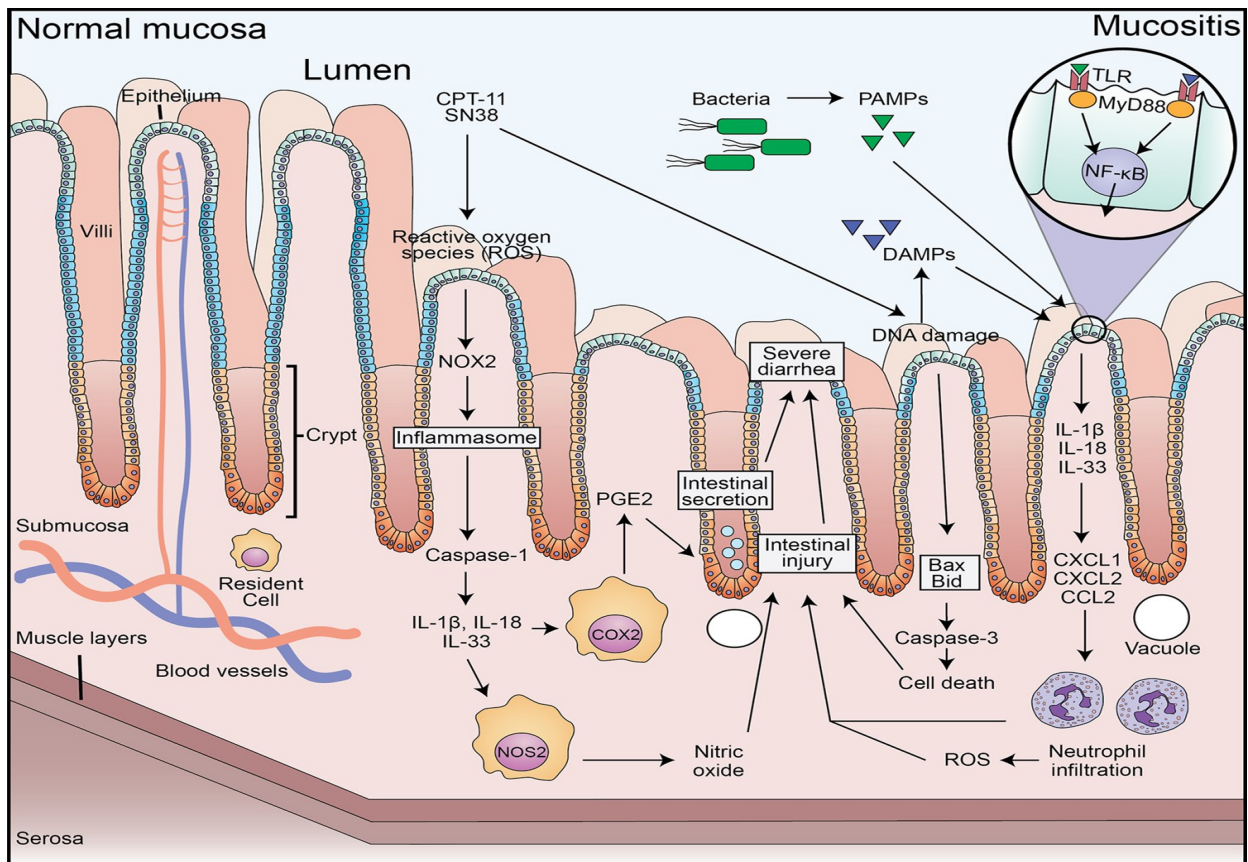
A diarreia decorrente ao uso do irinotecano ocorre por dois mecanismos

diferentes, fase inicial e tardia. A diarreia inicial ocorre até 24 horas após a administração do irinotecano, possui uma fisiopatologia colinérgica, sendo controlada com o uso de atropina administrada de maneira profilática (DODDS *et al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999; DODDS *et al.*, 2001; GANDIA *et al.*, 1993). A diarreia tardia ocorre principalmente entre o sexto e o décimo dia após a administração do quimioterápico, possui alta incidência, em torno de 82% (SALIBA *et al.*, 1998), sendo esta de graus 3 e 4 (> 7 episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior a 24h) em aproximadamente 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007). Sua etiologia é complexa e parece envolver mudanças na absorção de fluidos e eletrólitos, disfunção motora intestinal e inflamação da membrana mucosa do TGI (KEEFE *et al.*, 2007). Seu tratamento baseia-se em um paliativo, loperamida, um fármaco opioide não analgésico de ação periférica que reduz a motilidade intestinal, controlando assim os episódios diarreicos (KEEFE *et al.*, 2014) sem afetar a lesão intestinal subjacente (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Porém, em casos mais graves de mucosite, como graus 3 e 4, a loperamida não é eficaz (GIBSON; KEEFE, 2006).

Além disso, a neutropenia, que representa uma alta incidência de 23% (ENZINGER *et al.*, 2005) a 43% dos pacientes (ROSATI *et al.*, 2002) como efeito da quimioterapia, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (RUBENSTEIN *et al.*, 2004; KRISHNA *et al.*, 2011). Esses dados refletem o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes com câncer. Por isso, esse efeito adverso tem o potencial de interferir diretamente na eficácia do tratamento, aumentando os custos com a terapia e apresentando um grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes.

Há mais de 10 anos os mecanismos patogênicos da mucosite intestinal vêm sendo investigados em modelo animal, sobretudo em colaboração do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) que padronizou e aprimorou modelos experimentais de forma a contribuir com a elucidação das vias pelas quais esta se desenvolve, o mecanismo relacionado à indução da MI por irinotecano encontra-se resumido na **Figura 4**.

Figura 4 - Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Fonte: Ribeiro, *et al.*, 2016.

Nesse contexto, observou-se que a administração de irinotecano na dose de 75mg/kg em camundongos resulta em uma significativa perda ponderal, diarreia grave, leucopenia, diminuição das vilosidades intestinais e perda da arquitetura das criptas, aumento de infiltrado inflamatório na lâmina própria duodenal e de contratilidade da musculatura lisa intestinal. Verificou-se também que as citocinas TNF- α , IL-1 β e KC (quimiocina murina análoga à IL-8 humana), IL-18 e IL-33 apresentaram-se elevadas no intestino de animais tratados com irinotecano, e que a utilização de inibidores de citocinas (pentoxifilina e talidomida) reduz significativamente os danos intestinais, assim, tornaram-se importantes mediadores na patogênese da mucosite intestinal (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2016). Posteriormente, Logan e colaboradores (2008) caracterizou as alterações morfológicas induzidas pelo irinotecano em mucosa oral (atrofia epitelial), jejuno (achatamento dos vilos e criptas) e cólon (encurtamento de criptas) de ratos, com expressão

imunohistoquímica aumentada de NFκB, IL-1β, TNF-α e IL-6 na mucosa do trato gastrointestinal, principalmente nas horas seguintes à administração do irinotecano.

Outro aspecto relevante é que as respostas inflamatórias intestinais mediadas por irinotecano parecem ser desencadeadas pelo estresse oxidativo, uma vez que as espécies reativas de oxigênio (EROS) são capazes de desencadear uma resposta inflamatória através da ativação de um complexo citoplasmático multiproteico, denominado inflamassoma, composto por receptores semelhantes à NOD (NLR), que reconhecem moléculas associadas ao dano e ativam a caspase-1, que por sua vez, cliva a pró-IL1β e a pró-IL-18 para suas formas operacionais (CASSEL *et al.*, 2008; SCHRODER *et al.*, 2010). Diante disso, Lima-Júnior e colaboradores (2014), avaliaram o envolvimento da IL-18 e caspase-1 em camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano, através da deleção gênica para IL-18 ou caspase-1 e o tratamento de animais selvagens com IL18 bp, proteína ligante a IL-18, no qual ocorreu a prevenção do desenvolvimento da diarreia, do aumento nos níveis de mieloperoxidase (MPO) e da imunomarcagem para óxido nítrico sintase reduzida (iNOS). Esse último também foi investigado ao utilizar animais *knockout* para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou tratados com aminoguanidina, um inibidor desta enzima. Em ambas, ocorreu prevenção da redução da razão vilo/cripta, redução do desenvolvimento da lesão intestinal, assim como o aparecimento de diarreia (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Arifa e colaboradores (2014) evidenciaram o envolvimento do estresse oxidativo no presente modelo ao demonstrar que o tratamento com irinotecano em animais *knockout* para Gp91phox e o tratamento com apocinina reduziram o estresse oxidativo e a lesão da mucosa intestinal. Além disso, a apocinina diminuiu significativamente a ativação de caspase-1 e produção de IL-1β e IL-18 no íleo. Esses resultados revelam que NOX-2 medeia à ativação do inflamassoma e a produção das citocinas supracitadas, que cursam com lesão tecidual durante a mucosite induzida por irinotecano em camundongos.

Somado a isso, sabendo que a microbiota tem papel fundamental na patogênese da mucosite (STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010; PEDROSO, 2014, 2015); Wong e colaboradores (2015) avaliaram a presença de translocação bacteriana sistêmica e hepática em camundongos tratados com CPT-11, sugerindo relação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) nessa doença. O estudo do papel dos receptores de padrão TLR2 e TLR9 e da proteína adaptadora

MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88) se baseou na ativação da resposta imune inata no intestino, provocada por receptores de reconhecimento de patógenos, incluindo receptores do tipo toll-like (TLRs), que são capazes de reconhecer PAMPs e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). A fim de investigar essa via, utilizaram-se camundongos *knockout* para TLR2, TLR9 ou MyD88. E de forma interessante, animais com deleção gênica para TLR2 ou MyD88 e tratados com irinotecano apresentaram uma prevenção do dano intestinal. Por outro lado, a deleção do TLR9 modulou a diarreia, sem, todavia, alterar a resposta inflamatória. Isso indica que os mecanismos de diarreia e inflamação associados à mucosite possuem vias distintas.

O manejo da mucosite intestinal induzida por quimioterápico limita-se principalmente aos cuidados de suporte à diarreia. Contudo, é necessário um controle efetivo da mucosite ao buscar novas abordagens terapêuticas. Recentemente, Alencar e colaboradores (2017), avaliaram o efeito de uma fração proteica extraída do látex de *Calotropis procera* (LP) no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, o tratamento endovenoso com LP atuou como modulador da resposta inflamatória ao reduzir MPO, expressão de TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 e NF- κ B, apresentou atividade antidiarreica, sendo capaz ainda de aumentar a sobrevida dos camundongos.

1.3 Látex

Látex é o termo usado para descrever um líquido com aspecto leitoso que é exsudado de plantas que sofreram alguma injúria mecânica (PICKARD, 2008). Em geral, contém em solução ou suspensão uma variedade de substâncias e/ou componentes celulares, entre os quais núcleos, mitocôndrias, ribossomos, ácidos nucléicos, carboidratos, metabólitos secundários como: poli-isopreno, terpenóides, alcaloides, borracha, cardenólidos, compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonoides, bem como várias proteínas e enzimas tais como proteases, quitinases e glucosidases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986; AGRAWAL; KONNO, 2009).

O látex é constituído de uma grande diversidade de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. Relata-se a ocorrência de muitas proteases no látex que são sintetizadas nas suas formas inativas e ativadas após a planta sofrer uma injúria mecânica. Essas enzimas parecem estar

relacionadas com o processo de coagulação do látex, dessa forma tendo um papel indireto na defesa da planta (SILVA *et al.*, 1997; AZARKAN *et al.*, 2003). Contudo, podem também atuar diretamente sobre patógenos e insetos, como demonstrado por Konno *et al.* (2004) ao mostrar que papaína protege plantas de *C. papaya* contra o ataque de espécies de insetos da ordem Lepdoptera.

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

C. procera, é uma planta oriunda da Índia e África Tropical cujo gênero pertence a subfamília Asclepiadoideae da família Apocynaceae, é um arbusto perene, que pode alcançar 3,5 metros de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são globosos, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescência fasciculadas terminais (Figura 5). É conhecida popularmente como: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortência (CE), paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG) (**Figura 5**) (KISSMANN; GROTH, 1999; LORENZI; MATOS, 2002).

O látex de *C. procera* é muito utilizado popularmente para diversos fins, dentre esses: anti-helmíntico, fungicida, antissifilítico, expectorante, tratamento de hanseníase, asma brônquica, doenças de pele e na coagulação do leite para a produção de queijo (KIRTIKAR; BASU, 1935; WATT; BREYERBRANWIJK, 1962; LARHSINI *et al.*, 1997).

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

Curiosamente, o estudo de frações laticíferas para coagulação do leite revelou que as peptidases de *C. procera* demonstraram potencial como alternativa

ao uso da quimosina comercial animal, na produção de queijo coalho (LEITE, H. B, 2016).

Figura 5 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **A**: Inflorescência; **B**: Fruto globoso; **C**: Sementes ligadas a fios de seda; **D**: Planta jovem de *C. procera*.



Fonte: EIN GEDI, 2009.

1.4.1 Propriedades farmacológicas de *Calotropis procera*

C. procera é uma muito utilizada na medicina popular, principalmente na Índia, por apresentar diversas propriedades curativas já citadas (WARRIER *et al.*, 1994). Estudos demonstram que o produto da extração do látex íntegro de *C. procera* com solvente orgânico possui atividade antibacteriana (SHUKLA; KRISHNAMURTI, 1961; LARHSINI *et al.*, 1997), molusquicida (HUSSEIN *et al.*, 1994) e esquistossomicida (SHARMA; SHARMA, 2000). Ensaio preliminares evidenciaram que o extrato orgânico apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al.*, 2005) e larvicida (MASHLAWI; ELSHEIKH, 2017).

Dentre a diversidade das atividades farmacológicas relevantes desta planta,

estudada há mais de 20 anos por nosso grupo de pesquisa, grande parte desta está relacionada ao seu látex, os resultados são consistentes e demonstram um grande potencial farmacológico destas proteínas em diferentes modelos experimentais: ações antinociceptivas (SOARES *et al.*, 2005) e anti-inflamatórias através da modulação dos níveis de NO e citocinas pró-inflamatórias (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006), quando LP foi administrado por via oral, não induziu a síntese de IgA ou IgE em animais, (RAMOS *et al.*, 2007), efeito na quimiotaxia de neutrófilos, inibindo a adesão e o rolamento destas células no endotélio vascular de camundongos (RAMOS *et al.*, 2009), inibição dos efeitos letais provocados pela infecção bacteriana sistêmica induzida por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em camundongos (OLIVEIRA, 2010; LIMA-FILHO *et al.*, 2010), atividades homeostáticas sobre a coagulação em animais sépticos (RAMOS *et al.*, 2012), efeitos contra a hiperalgesia inflamatória em ratos (KUMAR *et al.*, 2011), ações anticonvulsivantes (LIMA *et al.*, 2012), antitumorais e citotóxicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007), atividade cicatrizante em feridas (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Adicionalmente, apresenta efeito hipoglicemiante (NETO *et al.*, 2013).

Recentemente, foi elaborada uma biomembrana composta da fração proteica de LP, tornando-se um tratamento inovador no tratamento de úlceras plantares, em humanos, reduzindo o tempo de cicatrização, além de promover o desbridamento do tecido desvitalizado, bem como o aumento do tecido reepitelizado (NUNES, 2018).

Proteases do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Protease, peptidase, proteinase ou enzimas proteolíticas são nomes dados para as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Estas compreendem uma família de enzimas que hidrolisam substratos proteicos ou peptídicos no processo de degradação de proteínas intracelulares, essencial para o funcionamento normal de todas as células (MANTLE; PREEDY, 2002).

As proteases estão presentes em todas as plantas, animais, microrganismos e em adição ao seu papel na degradação de proteínas e digestão, além da atividade proteolítica, estas enzimas também podem funcionar como moléculas sinalizadoras que regulam processos fisiopatológicos vitais, incluindo mecanismos de inflamação, hemostasia, dor, reparação, ritmos circadianos, senescência celular e morte celular programada. Além disso, estão envolvidas na maturação, degradação e reconstrução de proteínas em resposta a vários estímulos externos e também,

desempenham uma função de manutenção ao remover proteínas anormais deformadas (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

Além de seus importantes papéis fisiológicos, as proteases cisteínicas vegetais também receberam atenção especial nas indústrias de alimentos e biotecnologia devido à sua propriedade de serem ativas em uma ampla faixa de temperaturas e pHs. Assim, diante dessas características, a aplicação de enzimas proteolíticas, como agentes terapêuticos têm sido extensivamente estudadas. Neste contexto, dentre as proteases de plantas, as cisteínicas são as mais estudadas e existem evidências de que estas enzimas exerçam propriedades semelhantes às proteases serínicas de mamíferos. Muitos estudos têm sido realizados com as enzimas papaína (látex de mamão) e a bromelina (do abacaxi) e vários resultados descritos na cicatrização de feridas de mamíferos, imunomodulação, problemas digestivos e alterações neoplásicas, e até na tecnologia de alimentos como amaciante de carne (BATKIN *et al.*, 1998; WALD *et al.*, 1998; MAURER, 2001; RAWDKUEN, 2011).

A principal atividade proteolítica do látex de *Calotropis procera* está associada a proteases cisteínicas. Dubey e Jagannadham (2003) descreveram a primeira peptidase cisteínica purificada do látex de *C. procera*, denominada proceraina, esta exibiu uma alta estabilidade em níveis de temperaturas e pH e apresentou uma sequência aminoácido N-terminal. Em seguida, foi purificada a proceraina B, com propriedades semelhantes às da procaína. Singh e Dubay (2010) propuseram que a proceína B pode auxiliar na digestão de proteínas alimentares.

Recentemente, Ramos e colaboradores (2013) purificaram três proteases, denominadas CpCP-1, CpCP-2 e CpCP-3, cuja sequência de aminoácidos da região N-terminal foi idêntica para as três enzimas, sendo constituída de 30 resíduos de aminoácidos. Em testes biológicos foram capazes de inibir fortemente a germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloesporioides* e também exibiram atividade de coagulação plasmática por um mecanismo do tipo trombina, tornando-se ferramentas potenciais para ativar a cascata de coagulação sob condições fisiológicas adversas, como sangramento; dengue hemorrágica ou hemofilia.

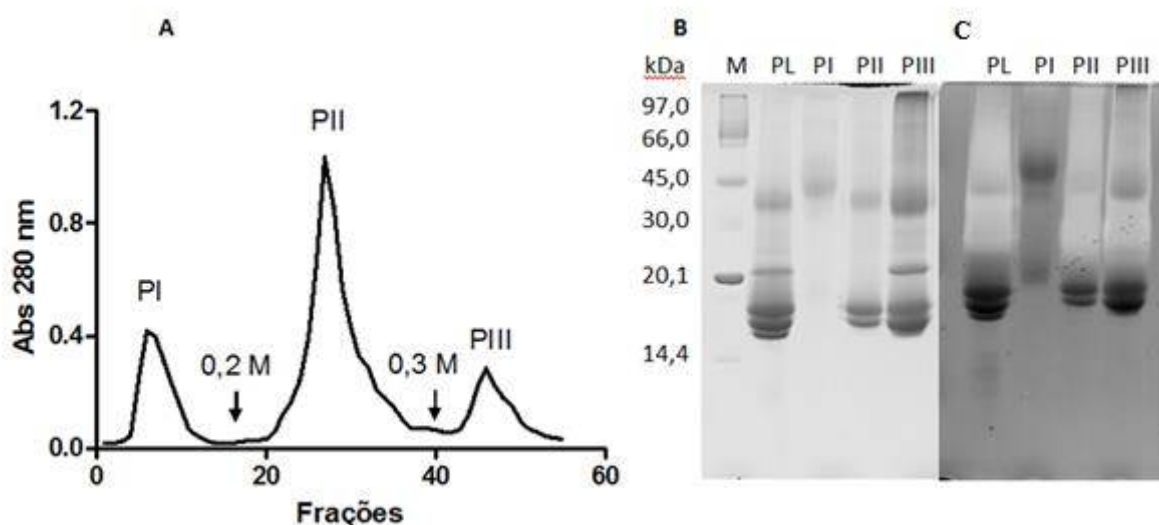
Ramos e colaboradores (2009) ao estudarem a fração proteica do látex de *C. procera* realizou o fracionamento por cromatografia de troca iônica, em três subfrações denominadas LPI, LPII e LPIII dentre elas, a fração LPII mostrou-se

rica em proteases cisteínicas, bem como LPIII também apresenta essas proteases em sua composição (**Figura 6**) (FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009). Quando estas subfrações foram avaliadas quanto ao efeito anti-inflamatório, foi observado que LPI foi a mais efetiva em inibir a migração de neutrófilos e a que mais elevou os níveis séricos de óxido nítrico, apresentando desta forma o mais potente efeito anti-inflamatório dentre as três subfrações proteicas no modelo de peritonite (VIANA *et al.*, 2015).

Contudo, dentre as três frações de LP, apesar de LPIII também apresentar proteases em sua composição, LPII foi escolhida por apresentar o maior pico proteases cisteínicas (FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009), por ter apresentado atividade anti-inflamatória e reguladora da coagulação sanguínea em animais infectados com *Salmonella* (RAMOS *et al.*, 2012). E somado a isso, recentemente Ramos *et al.* (2012) demonstraram a presença de uma osmotina de 22kDa em LPII (CpOsm), esta demonstrou interessante atividade antifúngica contra *Fusarium solani*, *Neurospora sp*, *Colletotrichum* (FREITAS, 2011). No entanto, o seu potencial farmacológico ainda é pouco conhecido, principalmente no que diz respeito a sua ação anti-inflamatória.

Em trabalhos recentes foi demonstrado, que LPII com iodoacetamida, um inibidor da atividade proteolítica, diminuiu a resposta inflamatória da mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters através de supressão da indução de mediadores pró-inflamatórios (FREITAS *et al.*, 2012). Esta fração proteica também apresentou atividade anti-inflamatória em modelo murinho de infecção por *Salmonella*, tal efeito foi associado à redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e confirmadas com a inibição da migração de leucócitos para o foco infeccioso (RALPH, 2017).

Figura 6 - Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex da *Calotropis procera*.



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

2. JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal induzida por irinotecano continua a ser uma complicação ameaçadora da vida de pacientes que utilizam essa classe de antineoplásicos. Apesar de a terapia oncológica ter avançado, a resolutividade dos efeitos colaterais advindos desta prática se constitui, muitas vezes, o principal obstáculo à conduta terapêutica avaliada como ideal, tornando a mucosite um efeito colateral clinicamente significativo e ainda continua sendo tema de diversos ensaios experimentais.

Assim, não há dúvidas que a toxicidade, por vezes, direcionada para um órgão específico, acarreta uma grande limitação do tratamento quimioterápico ocasionando um prejuízo substancial para o paciente, tornando fundamental a busca de meios preventivos e terapêuticos que permitam melhoria significativa da

qualidade de vida dos indivíduos acometidos, evitando a redução das doses dos quimioterápicos, ou até mesmo a interrupção temporária ou definitiva do tratamento.

Atualmente, é grande o interesse da indústria farmacêutica pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. O uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece vantagens como: existência de uma grande variedade de estruturas químicas, economia, fonte de novas moléculas para alvos moleculares complexos, considerando-se ainda o fato de ser uma fonte biológica renovável, cuja obtenção racional não causará efeitos sobre o meio ambiente. Além disso, efeitos colaterais associados à terapia convencional, justificam o crescimento destas pesquisas e o aumento na venda desses produtos. Assim, a busca de alternativas terapêuticas em recursos naturais deve ser vista como uma importante estratégia científica.

Enzimas proteolíticas de látex vegetal tornaram-se destaque na indústria farmacêutica e biotecnológica por sua propriedade de serem ativas em amplas faixas de temperatura e pH (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Devido à importância das proteases na transdução de sinal via receptores ativados por proteases (PARs), este tipo de enzima pode ser relevante também para farmacologia e toxicologia, como também, estão envolvidos na regulação da hemostasia e trombose, bem como nas respostas inflamatórias e proliferativas desencadeadas por lesão vascular. Assim, os efeitos das proteases do látex podem ser discutidos dentro da ativação de receptores ativados por proteases. Na história e medicina tradicional, a maioria das proteases de látex descritas é conhecida pela capacidade de digerir parasitas gastrointestinais e por sua atividade anti-inflamatória, mas também por sua alergenicidade (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

As proteínas terapêuticas representam 1/3 das entidades lançadas como novos medicamentos sob agentes biológicos (TANG, 2004). Tecnologias recombinantes produziram várias drogas proteicas que agora estão tornando-se facilmente disponíveis como terapêutica para o tratamento de doenças crônicas (KARVAR, 2014). As proteínas terapêuticas são cada vez mais relevantes, uma vez que provaram ser eficazes no tratamento de potenciais doenças fatais como diabetes, doenças cardíacas e câncer (HERMELING *et al.*, 2004; AKASH *et al.*, 2013a, 2013b 2013c; IBRAHIM *et al.*, 2013; KARACALI *et al.*, 2014). Curiosamente, proteínas já se mostraram eficazes, mesmo como vacinas que ajudam a estimular o mecanismo de

defesa natural do corpo para resposta imunológica (REGAN; JACKSON, 2003).

Apesar dos avanços biotecnológicos, ainda existem alguns fatores que dificultam o uso eficiente dessas valiosas terapias. Um desses é a via oral de administração, uma vez que enfrenta proteólise e/ou hidrólise no TGI, enquanto algumas drogas passam por metabolismo de primeira passagem hepática ou mostra uma distribuição fraca. Portanto, uma melhor percepção das vias de administração e os mecanismos de absorção da droga (paracelulares, transcelular e mediada por portador) são essenciais (AKASH, 2015).

Atualmente, o uso destas proteínas terapêuticas é restrita principalmente à via parenteral devido a curta meia-vida circulatória e biodisponibilidade oral (RABANEL et al., 2012). Diante disso, modificações químicas como adição de novo grupo funcional ou inibidores de proteases têm sido utilizados com sucesso para aumentar a biodisponibilidade de drogas. Contudo, existe a necessidade de um produto que não apenas proteja a proteína/peptídeo da degradação enzimática, mas também ajude a melhorar sua absorção sem alterar sua atividade biológica. Com isso, surgiram nano-portadores, que exibem altas propriedades de permeabilidade por sua faixa de tamanho e alta superfície para volume (GUPTA, 2013). Além de nanopartículas, foram elaborados peptídeos penetrantes de células (CPPs), capazes de possibilitar o transporte de carga molecular através da membrana plasmática com capacidade de promover a absorção de várias moléculas, incluindo proteínas grandes acima de 100 kiloDaltons (kDa). Proporcionando assim uma nova plataforma para o desenvolvimento de tratamentos médicos utilizando moléculas até então consideradas improváveis para terapia (DINCA, 2016).

É bem relatado na literatura que as proteínas vegetais podem apresentar atividade anti-inflamatória em diversos modelos de inflamação, inclusive no modelo de mucosite intestinal como demonstrado por Alencar e colaboradores (2017) tornando relevante a investigação da atividade de LP II neste estudo.

Diante das informações expostas e acreditando que o conhecimento popular, quando associado às pesquisas científicas, torna-se um importante aliado na prospecção de novas moléculas com propriedades farmacológicas, acredita-se que a fração proteica do látex de *C. procera* sejam detentoras de propriedades farmacológicas capazes de controlar o processo da mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos, modulando principalmente a resposta inflamatória.

Acredita-se que, por meio do presente trabalho possamos contribuir para a possibilidade de novas opções terapêutica para a toxicidade do tratamento da quimioterapia antineoplásica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar o potencial farmacológico de uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (LP11), sobre as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais associadas à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.

3.2. Específicos

- Avaliar o efeito de LP11 sobre a sobrevivência e ganho ponderal dos animais com MI induzida por CPT-11;
- Investigar o efeito de LP11 sobre as alterações morfofuncionais na MI induzida por CPT-11, através de análise morfométrica, histopatológica e avaliação do grau de diarreia, respectivamente;
- Investigar o efeito de LP11 sobre a resposta inflamatória da MI induzida por CPT-11 através da avaliação do efeito desta fração sobre: atividade da mieloperoxidase, concentração de citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-6, KC e IL-10 (ELISA) e sobre a expressão de COX-2 e NF- κ B (imunohistoquímica) no duodeno;
- Avaliar a produção da citocina IL-10 em macrófagos RAW264.7 desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) tratados com LP11 IAA;
- Investigar o efeito de LP11 sobre o estresse oxidativo na MI induzida por CPT-11 através da avaliação de: malonaldeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH) no duodeno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais

Os fármacos, reagentes e materiais que foram utilizados neste estudo encontram-se detalhados no apêndice A.

4.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo de nº 55/2017).

4.3 ESPÉCIE VEGETAL

4.3.1 Coleta e Isolamento das proteínas

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

As proteínas do látex da *Calotropis procera* foram purificadas e cedidas pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, do Laboratório de Plantas Laticíferas da Universidade Federal do Ceará, com Cadastro de Acesso ao Patrimônio Genético nº A689147.

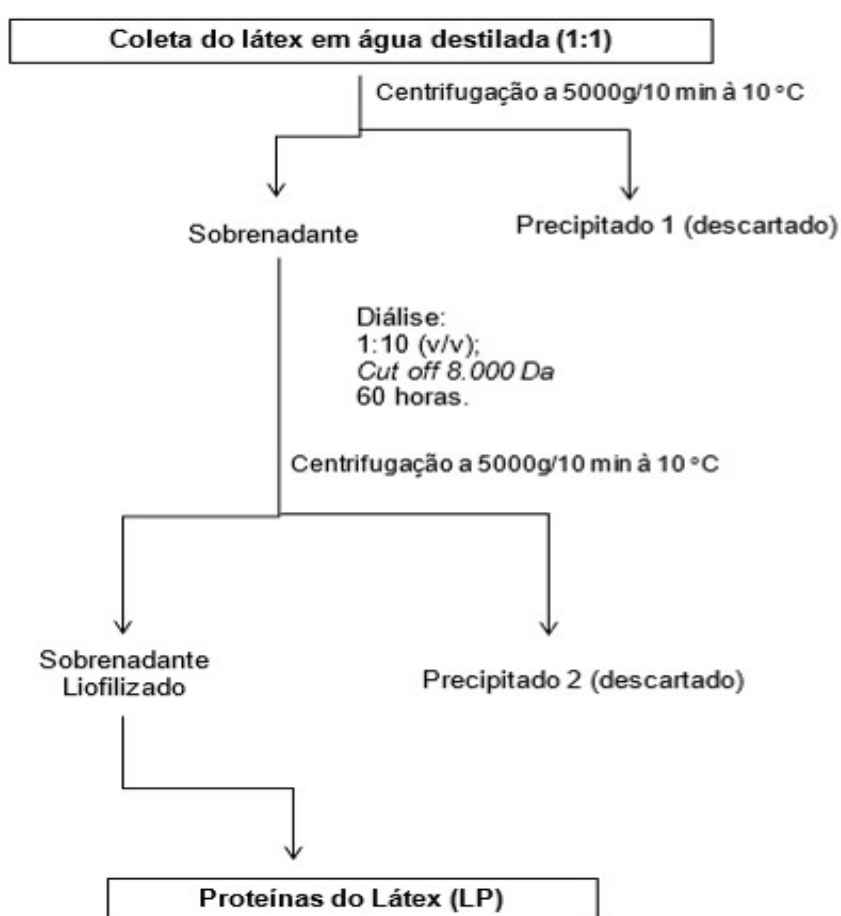
A coleta do látex ocorreu sempre no período da manhã entre 7 e 9 horas, a partir de plantas saudáveis que cresciam espontaneamente ao longo de estrada na zona urbana de Fortaleza, seguindo uma estratégia descrita por Ramos *et al.* (2010). Após incisões no ápice caulinar da planta, coleta-se o exsudado do látex, em tubos de falcon, contendo 20 ml de água destilada para finalizar em uma proporção de 1:1 (v:v). A coleta do látex em água minimiza o efeito natural da coagulação que ocorre neste fluido, logo após sua exsudação, evitando o aprisionamento de substâncias solúveis.

Em seguida, centrifugam-se as amostras (4°C, 10 minutos, 5.000 x g). Coletaram-se o sobrenadante que foi submetido à diálise contra água destilada, em membranas com capacidade de retenção de moléculas superior a 8.000 Da, durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas). Em

seguida, o líquido retido no interior das membranas foi novamente centrifugado, sob as mesmas condições anteriores e o sobrenadante liofilizado, obtendo-se um material rico em proteínas e destituído de borracha, sais, metabólitos secundários e ricas em proteínas solúveis.

As frações proteicas, obtidas por meio deste protocolo, são denominadas de proteínas do látex (LP). A sequência de eventos realizada para a obtenção das proteínas está sumarizada na **Figura 7**.

Figura 7 - Esquema de fracionamento do látex da planta *Calotropis procera*.



Fonte: Oliveira, 2011.

4.3.2 Obtenção das subfrações de LP (LPI, LPII e LPIII) por Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose

As proteínas totais do látex foram submetidas à cromatografia de troca

iônica, com a finalidade de obter frações mais puras, em coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* (14 x 2,5 cm) segundo metodologia descrita por Ramos *et al.*, (2006). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM (pH 5,0), em seguida LP (80 mg) foi dissolvido em 8 mL da solução de equilíbrio. A centrifugação foi realizada a 10.000 x *g*, a 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante obtido aplicado à coluna.

Após aplicação da amostra, as proteínas não retidas são inicialmente eluídas com a mesma solução de equilíbrio, obtendo-se desta forma o pico I (LPI). As proteínas retidas são eluídas após aplicação de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) acrescido de NaCl 0,2 M para obtenção do pico II (LPII). O pico III (LPIII) é obtido após a aplicação da solução de equilíbrio acrescida de NaCl 0,3 M. Frações de 5 mL/tubo são coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min e o conteúdo proteico determinado em 280 nm. Todas as frações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas. Além disso, a fração proteica LPII, rica em proteases cisteínas, foi tratada em uma solução de 20Mm de iodoacetamida (IAA), um inibidor específico de proteases cisteínicas, gerando a fração proteica LPII IAA, conforme descrito anteriormente (VIANA *et al.*, 2015).

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos (*Mus musculus*) machos adultos, pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura (22-25°C), exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com água e ração padrão *ad libitum*. Os protocolos utilizados estão de acordo com os Padrões de Uso de Animais Experimentais da UFC.

4.5 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano

O modelo experimental de mucosite intestinal utilizado foi descrito inicialmente por Ikuno *et al.* (1995) e adaptado por MELO *et al.* (2008) e LIMA JÚNIOR *et al.* (2012) para as condições experimentais do laboratório. Os camundongos receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de irinotecano (Trebyxan® - Bergamo), na dose de 75 mg/kg. O grupo controle recebeu salina (5mL/Kg, i.p), ao invés do irinotecano. Sete dias após a indução da mucosite, os animais foram eutanasiados.

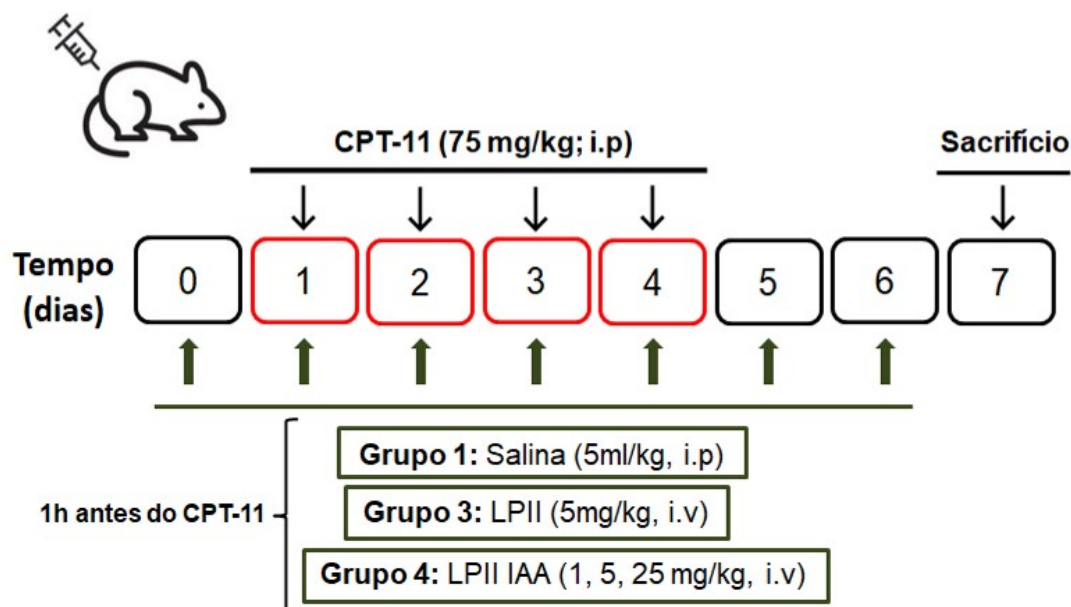
4.5.1 Grupos experimentais e protocolos de tratamento

Os animais foram divididos em quatro grupos (n= 8-12 por grupo).

- **Grupo I:** controle negativo tratado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.);
- **Grupo II:** controle positivo mucosite intestinal tratado com CPT-11 (75 mg/kg, i.p., 1x dia por 4 dias);
- **Grupo III:** mucosite tratado com uma fração proteica do látex de *Calotropis procera*, LP11 sozinha [LP11 (5mg/kg; i.v) + irinotecano (75 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p).
- **Grupo IV:** mucosite tratado com uma fração proteica do látex de *Calotropis procera*, LP11 em associação com inibidor de proteases (LP11 + IAA) nas doses de 1, 5, 25 mg/kg; i.v] + irinotecano (75 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p).

Os animais deste grupo foram subdivididos em quatro grupos os quais foram pré-tratados, 24h antes da administração do CPT-11 (dia zero) com LP11 e LP11 IAA por via endovenosa, continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de tratamento. No 7º dia os animais foram eutanasiados e o segmento do intestinal (duodeno) foi coletado para avaliar os parâmetros propostos por este estudo (**Figura 8**).

Figura 8. Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite intestinal.



Fonte: próprio autor.

4.6 PARÂMETROS AVALIADOS

4.6.1 Análise ponderal

Os animais foram pesados diariamente imediatamente antes da administração do quimioterápico, a partir do início da indução da mucosite até o sacrifício (sétimo dia). Os valores encontrados foram expressos em % de variação da massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

4.6.2 Análise da sobrevida

A mortalidade dos animais foi registrada diariamente, por sete dias, em cada grupo experimental e os resultados foram expressos como o percentual de sobrevida.

4.6.3 Contagem de leucócitos totais

No 7º dia os animais foram anestesiados com xilazina (15 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg) e, em seguida, colhidas amostras de sangue pelo plexo retro-orbital, com microcapilar heparinizado, imediatamente antes do sacrifício. Utilizou-se 20 µL de sangue diluído em 380 µL do líquido de Turk para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Moura *et al.* (1998). Os valores foram expressos em número total de leucócitos x 10³/ µL de sangue. Essa análise foi determinada para verificar o efeito do irinotecano na indução da leucopenia, um dos principais efeitos adversos.

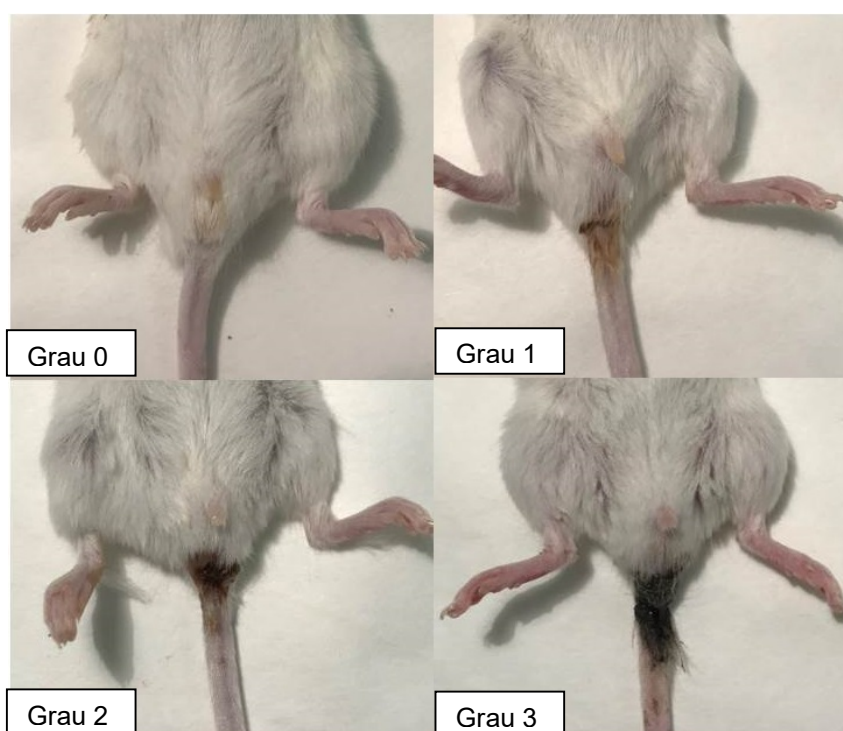
4.6.4 Avaliação da diarreia

Os eventos diarreicos apresentados após a indução da mucosite por CPT-11 foram avaliados diariamente através dos escores descritos por Kurita *et al.* (2000) (descritos na **tabela 1**). Esse parâmetro representa um indicativo de indução da mucosite, sendo o sinal mais observado na clínica (**Figura 9**). Os resultados foram expressos como medianas do grau apresentado em cada grupo experimental.

Tabela 1. Escores de avaliação da diarreia em camundongos.

ESCORE	AVALIAÇÃO DA DIARREIA
Escore 0	Fezes com aspecto normal
Escore 1	Fezes levemente alteradas, pouco umedecidas
Escore 2	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
Escore 3	Fezes úmidas com bastante sujidade perianal

Fonte: Kurita *et al.*, 2000.

Figura 9 – Representação do grau de diarreia apresentada em animais tratados com irinotecano.

Fonte: Carmo, 2019.

4.6.5 Medida do comprimento do intestino delgado

No 7º dia do protocolo experimental foi avaliado o comprimento do intestino delgado através da medida em centímetros da porção proximal do duodeno até a porção distal do íleo.

4.6.6 Análise histopatológica e morfométrica da mucosa intestinal

No sétimo dia, após o sacrifício, foram removidos 0,5 cm de duodeno proximal e fixados em formol tamponado a 10%. Após 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol tamponado, colocados imersos em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura e processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 100x e 400x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x). Em seguida, uma histopatologista avaliou a gravidade da mucosite intestinal induzida por irinotecano por meio do sistema de escores descritos por WOO *et al.* (2000) que variam de 0 a 3 (**Tabela 2**):

Tabela 2 – Sistema de escores de gravidade da mucosite intestinal (Woo *et al.*, 2000).

ESCORE	ACHADOS HISTOLÓGICOS
0	ausência de lesão;
1	mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta;
2	mais de 10% das criptas contêm células necróticas, com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes
3	mais de 10% das criptas contêm células necróticas, com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes
4	semelhante à 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura de criptas e encurtamento dos vilos.

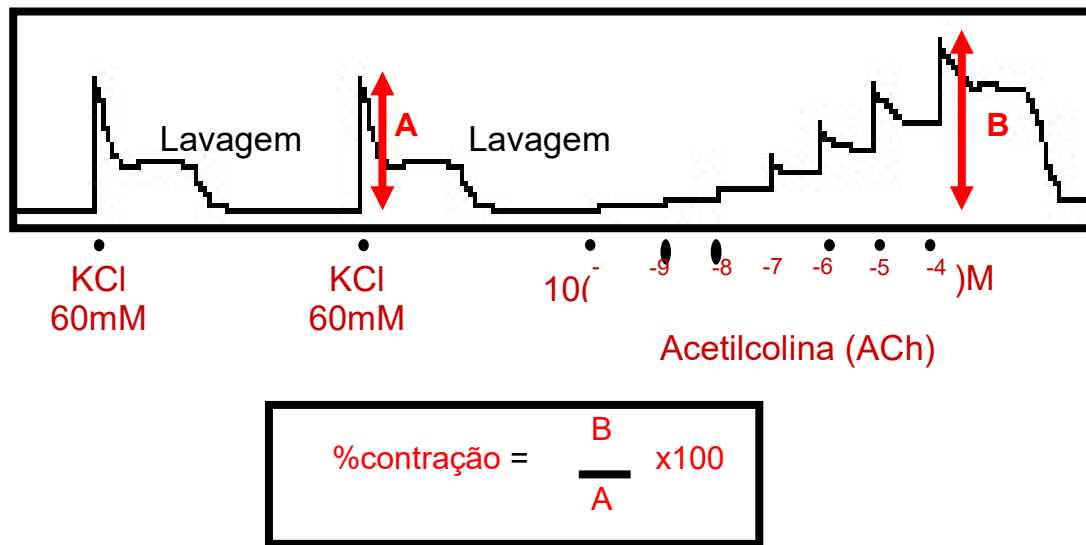
Para a análise morfométrica, as variáveis incluíram a altura dos vilos, considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilos em questão, e a profundidade das criptas (definidas como a invaginação entre os vilos adjacentes), para correlação com a capacidade absorviva (razão altura das vilosidades/profundidade das criptas). As medidas morfométricas foram calculadas

em μm e mm^2 utilizando o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

4.6.7 Avaliação da contratilidade do duodeno ex vivo

Após o sacrifício, as amostras de intestino proximais foram dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritora de Tyrode modificada (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; MgCl_2 = 0,98; CaCl_2 = 2; NaH_2PO_4 = 0,36; NaHCO_3 = 11,9; glicose= 5,5). Cada intestino foi limpo de seus tecidos adjacentes, em seguida, amarrados com linha no sentido da musculatura longitudinal, suspensos em banho de órgão (20mL de solução de Tyrode, aquecida a 37° C, pH=7,4, oxigenada continuamente com mistura carbogênica 95% O₂/5% CO₂) e conectados a um transdutor de força (ADInstruments, modelo MLT0201, EUA), apropriado para registro isométrico de contrações, conectado a um Amplificador (ADInstruments, ML845 Powerlab 4/25, EUA), para registro das contrações longitudinais da preparação. Os sinais gerados pelo transdutor foram registrados em um sistema de aquisição de dados (Chart Pro, EUA). Após calibração do sistema, foi aplicado ao tecido 1g de tensão de repouso e o tempo de equilíbrio com as condições artificiais do banho foram de 40 minutos. Duas contrações padrão (fase fásica) foram inicialmente obtidas mediante a adição de KCl 60 mM ao banho e, em seguida, feita uma curva concentração-efeito com o agonista colinérgico acetilcolina (ACh em concentrações crescentes e cumulativas variando de 10^{-10} - 10^{-4} M adicionadas ao banho pelo período máximo de 5min para cada concentração). Entre as aplicações de KCl e entre a de KCl e a primeira de ACh realizou-se a troca de solução (lavagem do preparo) permitindo-se a estabilização do padrão contrátil basal antes da adição de novo agente ao banho (Figura 10). Os dados obtidos da curva de ACh foram analisados como percentual de resposta contrátil em relação à média das contrações padrão observadas inicialmente para o KCl 60 mM.

Figura 10 - Figura esquemática de avaliação funcional intestinal *in vitro*.



Fonte: Lima Júnior, 2008.

4.6.8 Avaliação do processo inflamatório

4.6.8.1 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, foi utilizada como marcador da presença de neutrófilos no intestino e sua atividade foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. Uma porção de aproximadamente 1cm do duodeno foi coletada e incubada em 200µL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, Na EDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o "*pellet*" foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3'-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa

foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M.

Em seguida, realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1×10^5 neutrófilos/ poço/ 50 μ L). Determinou-se a absorbância em leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

4.6.8.2 Quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 (KC) e IL-10 no duodeno

As concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 (KC) e IL-10 foram determinadas em amostras do duodeno retirados no 7° dia e estocadas em freezer -80°C até o momento do ensaio através do método imunoenzimático (ELISA). Para o ensaio, o tecido coletado foi descongelado, triturados e homogeneizado em tampão PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4 e processados como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1995). O homogenato foi centrifugado por 10 min em 5000rpm e o sobrenadante imediatamente usado pelo ensaio de ELISA com anticorpos específicos para as citocinas estudadas (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, as placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com 50 μ L/poço do anticorpo de captura anti- IL1 β , anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 (4 μ g/mL, DuoSet ELISA Development kit R&D Systems Catalog DY501 e DY510 respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foram adicionadas em várias diluições e incubadas por 2h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo de detecção monoclonal biotilado anti- IL1 β , anti-IL-6, anti-IL-8 e anti-IL-10 (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-streptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Após 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a absorbância medida a 450 nm. O resultado foi expresso em picograma de citocina/mg de tecido.

4.6.8.3 Imunohistoquímica

Foram realizadas as imunohistoquímicas para COX-2 e NF- κ B nas amostras dos duodenos que foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 μ m que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilolpor cinco minutos cada. Em seguida, os cortes intestinais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho Maria (95°C).

Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Sigma Aldrich) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para COX-2 (Santa cruz, 1:100) ou NF- κ B (Abcan, 1:200) por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO). Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAS 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). Obtiveram-se de 8 a 10 campos por corte intestinal. Para quantificar as células com imunomarcagem positiva, utilizou-se o programa

ImageJ, onde foi reconhecida como imunomarcação positiva, células com citoplasma apresentando coloração marrom.

4.6.9 Cultura de células

Para este estudo, foi utilizada a linhagem de macrófago RAW 264.7, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, que foi transformada a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia murina de Abelson em camundongo macho, nível de biossegurança 2. São células com características de crescimento aderente e consideradas um modelo *in vitro* excelente para a prospecção de compostos com atividade tanto inflamatória como anti-inflamatória (FENGYANG et al., 2012; HARTLEY et al., 2008). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM (Lonza) suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma) e 90% de soro fetal bovino inativado (SBF, marca GIBCO).

4.6.9.1 Cultivo celular

Para os ensaios *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura de 37°C, expandidas e cultivadas em frasco plástico para cultura (Sarsted, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram plaqueadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por mL, manipuladas em câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2) e mantidas em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SANYO, modelo MCO-19AIC). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400). Após a formação da monocamada de células com confluência de 60% a 70%, o meio DMEM completo das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 3 mL de Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) por 2 vezes para evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida, foram adicionados 5ml de DMEM e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (SPL Life Science). O meio contendo as células foi então retirado e adicionado em falcon de 15 mL, uma alíquota foi retirada

e contada em câmara de Neubauer utilizando solução de Azul de Trypan para avaliar a viabilidade celular e possibilitar a contagem adequada do número total de células viáveis. As células em suspensão foram diluídas em meio de cultura para serem utilizadas em experimentos e/ou devolvidas a garrafa para manutenção da cultura. Quando necessário, novos *via/s* criopreservadas foram descongelados para iniciar nova cultura. Todo o resíduo produzido (líquido ou sólido) foi inativado com hipoclorito de sódio (solução comercial de 2% de cloro ativo, 1:5 hipoclorito:resíduo líquido, quando for o caso) por 18h a 24h. Após esse período, os resíduos foram esterilizados a 121°C por 30 min e descartados como lixo hospitalar.

4.6.9.2 Dosagem de Citocina (IL-10) por ELISA

Para detecção e quantificação da citocina IL-10 no sobrenadante de macrófagos estimulados, foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA. Nesse ensaio um anticorpo reconhece um antígeno para o qual é específico e a enzima covalentemente ligada ao anticorpo catalisa uma reação gerando um corante que pode ser detectado por espectrofotometria.

Procedimentos

Para detecção da citocina IL-10 foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-10 por 16h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 400µL de tampão de lavagem e bloqueadas com 300µL de BSA 1% por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras, de sobrenadantes das células RAW 264.7, e da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2h. As placas foram lavadas três vezes com 400µL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-10 em temperatura ambiente por 2 h. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 400µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente as placas foram lavadas três vezes com 400µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação foi adicionado em cada poço e incubado por 20 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 540nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso em pg/mL.

Os dados foram analisados a partir da regressão linear da curva padrão das citocinas a fim de se obter a equação da reta que permite determinar a concentração de cada citocina em função da sua absorbância. Após essas etapas, os valores das concentrações de citocinas obtidos foram interpolados e as diferenças entre os grupos analisadas por análise de variância (One-way ANOVA) seguido de teste de Dunnett utilizando o programa GraphPadPrism versão 6. O nível de significância estatístico máximo para amostras consideradas diferentes foi de 5% ($p < 0,05$). As amostras foram comparadas com os controles negativo (C-) e positivo (C+).

4.6.10 Avaliação do estresse oxidativo

4.6.10.1 Determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica nas membranas celulares foi mensurado pela determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito previamente (DRAPER; HADLEY, 1990). O teste quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido 2- tiobarbitúrico com o MDA, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda.

As amostras de tecido do duodeno foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). Em seguida, 250 μ L do homogenato foram levados ao banho de água a 37°C por 1 hora. Decorrido esse tempo, no intuito de interromper a peroxidação, adicionou-se 400 μ L de ácido perclórico 35% às amostras, que foram então centrifugadas (14000 rpm, 15 minutos, 4°C). Do sobrenadante obtido, 600 μ L foram transferidos para um microtubo, ao qual se adicionou 200 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Esta mistura foi levada ao banho de água a 95°C por 30 minutos. Após o resfriamento das amostras, as amostras foram plaqueadas e a leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas no comprimento de onda de 532 nm. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de tetrametoxi-propano (TMP) foi utilizada para calibração do método e a concentração de MDA nas amostras foi calculada através da equação da reta para a curva-padrão. Os resultados foram expressos em nmol de

MDA/g de tecido.

4.6.10.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH) é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno do pool dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NPSH) do nosso organismo. Para a determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH), o teor de NP-SH foi analisado pela técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1968), que se baseia na reação de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) com compostos de sulfidrina, e consequente desenvolvimento de coloração amarela. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e glutathiona oxidada (GSSG).

As amostras de tecido subcutâneo plantar das patas foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com solução de EDTA 0,02 M. Logo após, adicionou-se 60 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% a 40 µL de cada amostra a fim de precipitar as proteínas presentes no material biológico. O material foi então centrifugado (5000 rpm, 15min, 4°C) e 60 µL do sobrenadante obtido foi plaqueado. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de GSH foi utilizada para calibração do método. Adicionou-se 102 µL da solução de leitura (Tris-EDTA, DTNB 0,01 M) e a absorbância foi medida imediatamente em leitora de microplacas no comprimento de onda de 412 nm. A concentração de GSH nas amostras foi calculada através da equação da reta para a curva-padrão e os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism®, versão 6.01, sendo empregado o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Quando utilizado ANOVA, foi aplicado o pós-teste Bonferroni para comparações múltiplas, e quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn. Para análise da sobrevida foi utilizado o teste de Log-Rank. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

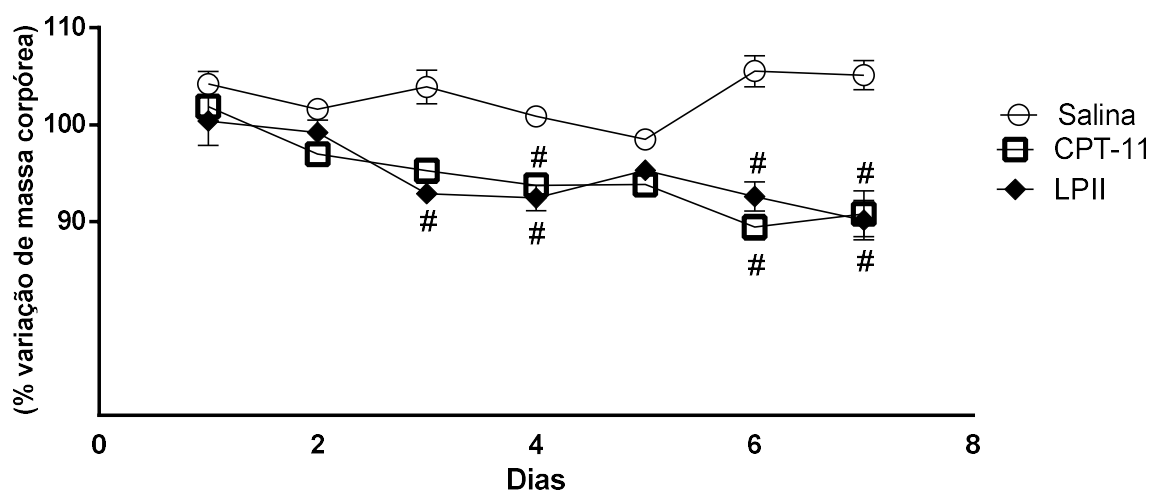
5. RESULTADOS

5.1 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LP11, sozinha sobre a mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.

5.1.1 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LP11, sobre a redução de massa corpórea induzida por CPT-11 em camundongos.

A **figura 11** mostra que o tratamento com irinotecano induz a redução de massa corporal crescente a partir do primeiro dia após o início do tratamento, tendo atingido uma perda máxima de 15,85% no sétimo dia. Semelhante a esse último, animais com mucosite intestinal, tratados com LP11, também alcançaram uma perda ponderal máxima de 15,56%. Não houve perda ponderal no grupo controle (salina).

Fig. 11 - O tratamento com LP11 não altera a perda de massa corpórea em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

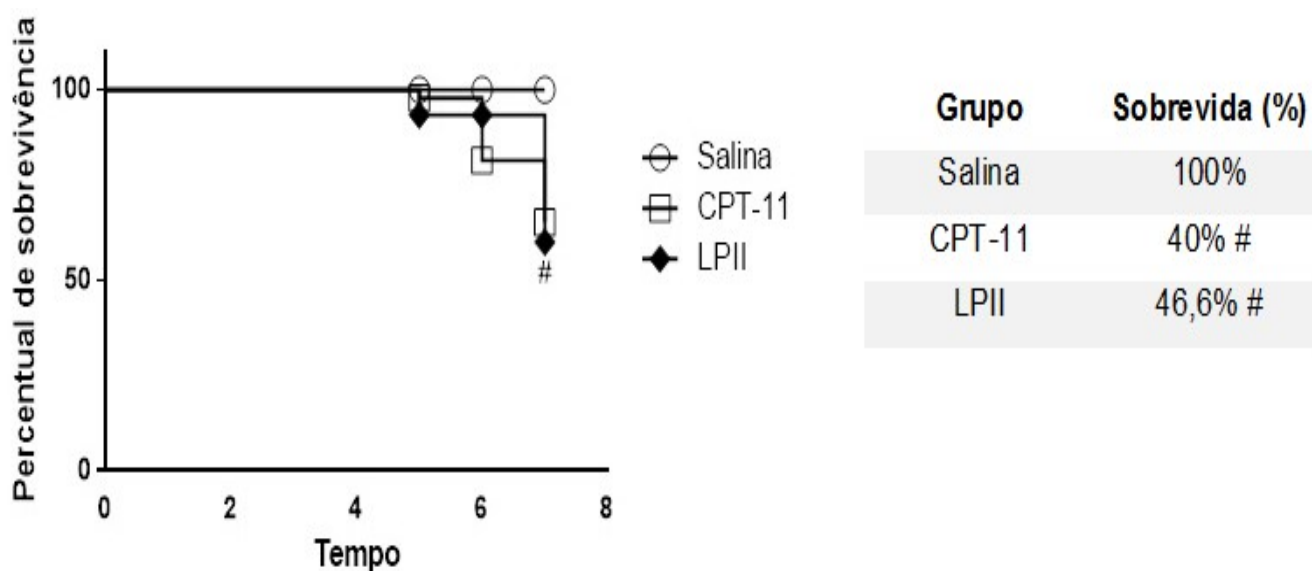


Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia), LP11 [(5 mg/kg, e.v) + Irinotecano (75 mg/kg, i.p)]. Camundongos foram pesados diariamente por 7 dias. Valores representam o percentual do peso comparado ao peso inicial. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.1.2 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LP11, na taxa de sobrevivência de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

O tratamento com irinotecano reduziu a sobrevivência dos animais em 40% no sétimo dia, comparado ao grupo controle (salina) que foi de 100%. Semelhante ao que foi demonstrado com a fração proteica LP11 teve sobrevivência de apenas 46,6%. Esse resultado elucidou que estas proteases estão envolvidas no aumento da toxicidade ao CPT-11.

Fig. 12- O tratamento com LP11 não altera a taxa de sobrevivência em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

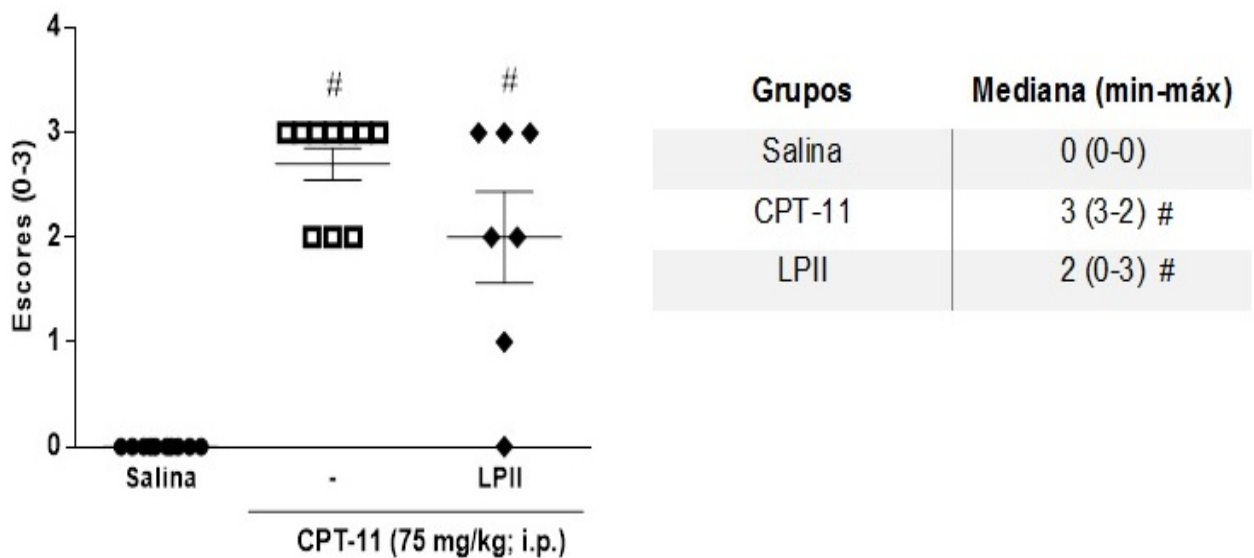


Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia), LP11 [(5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)]. Valores representam o percentual de animais vivos comparados ao primeiro dia. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. A análise estatística foi realizada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

5.1.3 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LP11, sobre os escores de diarreia induzida por CPT-11 em camundongos.

A avaliação do grau de diarreia, no sétimo dia, demonstrou que CPT-11 induziu o aumento significativo nos escores [3 (2-3)] quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina [0(0-0)]. Similar ao tratamento com CPT-11, LP11 não reduziu os escores de diarreia [2 (0-3)] (**Figura 13**).

Fig. 13 – LP11 não reduz o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.

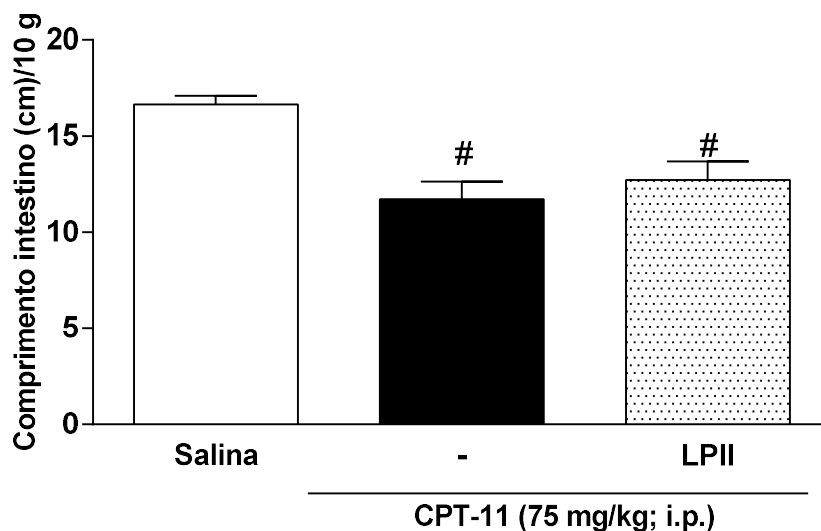


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), LP11 [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1xdia/4dias)] e avaliados quanto a diarreia no sétimo dia experimental através de escores de Kurita *et al*, (2000). Os resultados foram expressos em mediana dos valores de escores atribuídos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina. Para análise estatística utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

5.1.4 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LP11, sobre a redução do comprimento intestinal induzido por CPT-11 em camundongos.

O comprimento do intestino delgado é um parâmetro que sinaliza o índice de lesão tecidual. Após a eutanásia dos animais, foi feita a medida do comprimento do intestino delgado, que se apresentou significativamente encurtado nos animais tratados com CPT-11 (média=11,73± 2,04) e LP11 (média=16,64±0,99) comparados ao controle (média= 12,73±2,17).

Fig. 14 - O tratamento com LP11 não altera a redução do comprimento intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

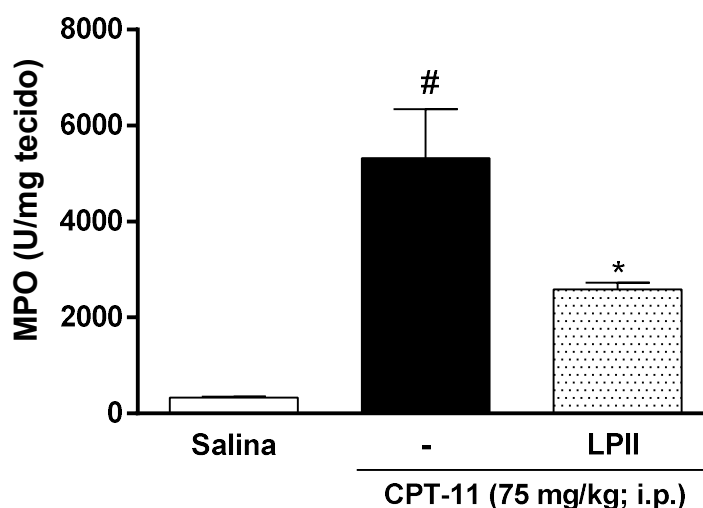


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1x/dia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1x/dia/4dias), LP11 [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1x/dia/4dias)]. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia experimental e o comprimento total do intestino delgado foi mensurado em centímetros/10g. Os valores representam a média ± EPM do comprimento do intestino delgado/10g. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.1.6 Efeito da fração proteica de *Calotropis procera*, LPII, sobre a atividade da MPO em segmento de duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.

O infiltrado inflamatório foi avaliado através da dosagem da mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, em segmentos de duodeno coletados no sétimo dia experimental. O irinotecano induziu um significativo aumento no número de neutrófilos no intestino quando comparado ao grupo controle (média=330,3±51,51). Enquanto que o tratamento com LPII (média=2584±344) foi eficiente em prevenir, significativamente, a atividade de MPO quando comparados ao tratamento apenas com CPT-11 (média=6920±1772) (**Figura 15**).

Fig. 15 - O tratamento com LPII reduz a atividade MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), LPII [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1xdia/4dias)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como média±E.P.M. de neutrófilos/mg de tecido. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

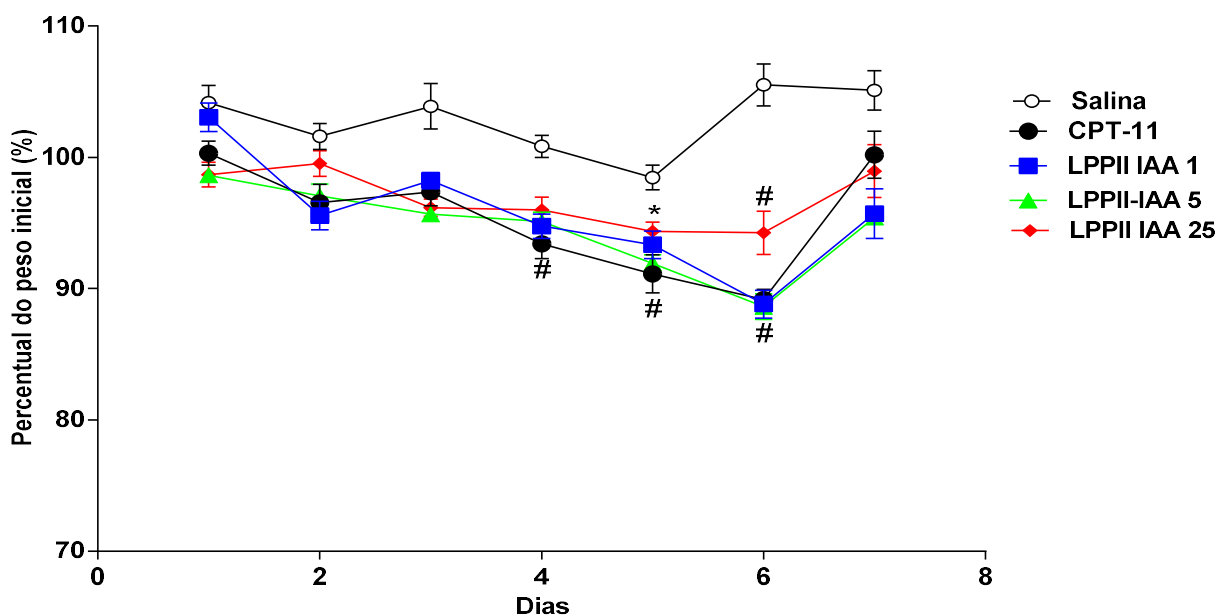
Diante dos resultados apresentados acima, demos continuidade ao estudo com a fração LPII com iodoacetamida (IAA), inibidor da atividade proteolítica de proteases cisteínicas, denominada, LPII IAA. Com o propósito de investigar se esta atividade seria responsável pelos efeitos inexistentes nos parâmetros funcionais, apesar de ter reduzido o infiltrado neutrofílico.

5.2 Efeito dose-resposta da fração proteica LPPII IAA sobre a mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.

5.2.1 Efeito dose-resposta da fração proteica LPPII IAA sobre a redução de massa corporal induzida por CPT-11 em camundongos.

Como evidenciado anteriormente, o tratamento com irinotecano induz a uma perda ponderal crescente a partir do primeiro dia após o início do tratamento (**Figura 16**), tendo atingido uma perda máxima de 15% no sétimo dia. Os animais submetidos à mucosite tratados com LPPII IAA nas doses de 1, 5 e 25 mg/kg semelhante ao tratamento com irinotecano, isoladamente, apresentaram perda ponderal atingindo o máximo de 10, 5 e 5,88% no sétimo dia, respectivamente. Apesar de, aparentemente, terem apresentado menor perda de massa corpórea, sendo essa significativa quando comparada ao tratamento com irinotecano no quinto dia na dose de 25 mg/kg, tal diferença não ocorreu nos outros dias. Não houve perda ponderal no grupo controle (salina).

Fig. 16 - O tratamento com LPPII IAA não altera a perda ponderal em animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

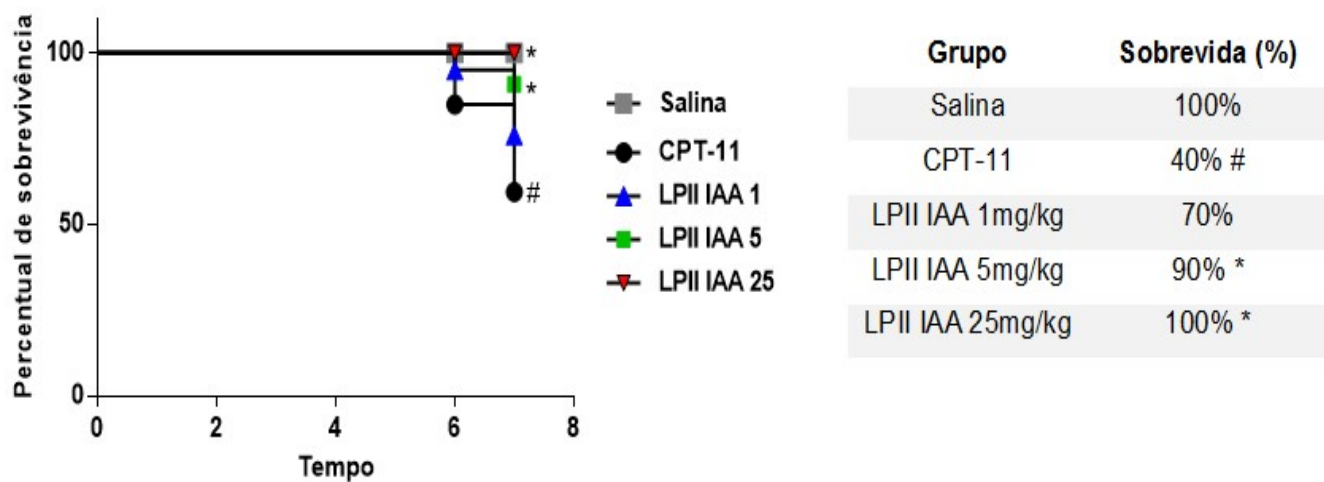


Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia), LPPII IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)]. Camundongos foram pesados diariamente por 7 dias. Valores representam o percentual do peso comparado ao peso inicial. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.2.2 Efeito dose-resposta da fração proteica LP11 IAA na taxa de sobrevivência de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

A sobrevivência dos animais que receberam apenas irinotecano foi de 40% no sétimo dia, comparado ao grupo controle tratado apenas com salina que foi de 100%. Enquanto que esse percentual aumentou para 70%, 90%, 100%, após o tratamento com LP11 IAA nas doses de 1, 5 e 25 mg/kg, respectivamente.

Fig. 17 - O tratamento com LP11 IAA aumenta a sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

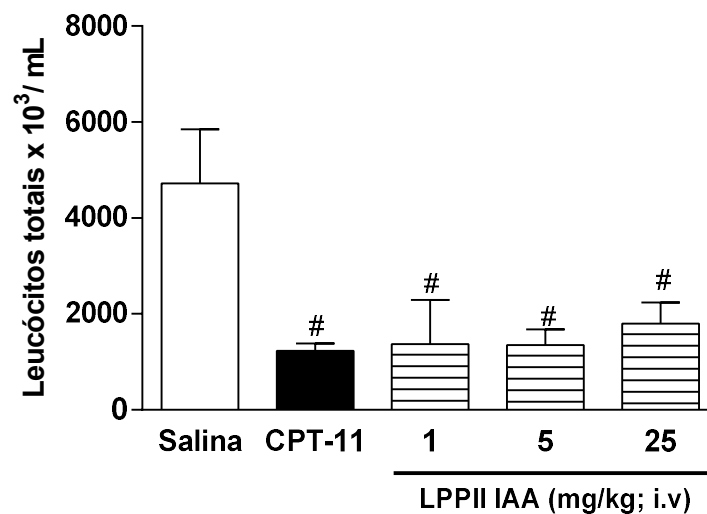


Os animais receberam Salina (5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia), LP11 IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p.)). Foram avaliados diariamente por 7 dias quanto à sobrevivência. Valores representam o percentual de animais vivos comparados ao primeiro dia. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11 e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. A análise estatística foi realizada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

5.2.3 Efeito dose-resposta da fração proteica LP11 IAA sobre a leucopenia induzida por CPT-11 em camundongos.

A leucopenia é um efeito citotóxico do tratamento com o quimioterápico, diante disso, a avaliação foi realizada através da contagem de leucócitos totais no sangue periférico dos animais. A coleta de sangue feita no sétimo dia experimental demonstrou uma acentuada diminuição de leucócitos principalmente nos animais tratados com CPT-11 (média=1227,1±153,9), LP11 IAA nas doses de 1, 5, 25 mg//kg apresentaram leucopenia (média=1371±922,3; 1350±327,3; 1794±439,8), semelhante ao tratamento com irinotecano isoladamente, comparados ao grupo controle (média=4720±1131).

Fig. 18 - O tratamento com LP11 IAA não altera o perfil leucocitário de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

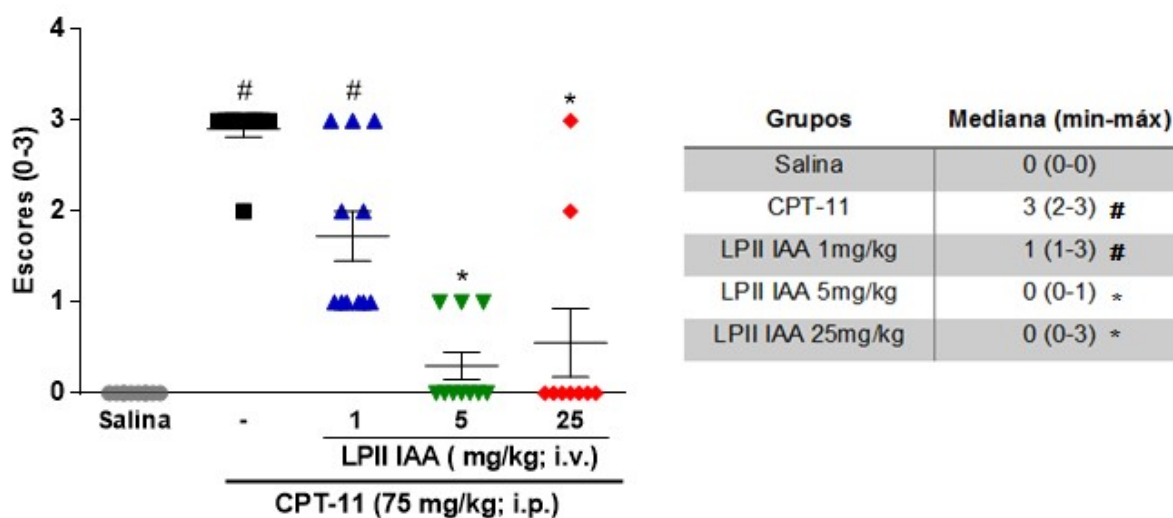


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1x/dia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1x/dia/4dias), LP11 IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)], e apresentaram significativa leucopenia no sétimo dia experimental nos grupos CPT-11, quando comparado ao grupo salina. Os valores representam a média ± EPM do número de leucócitos totais por 10³/μL. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.2.4 Efeito dose-resposta da fração proteica LPII IAA sobre os escores de diarreia induzida por CPT-11 em camundongos.

No sétimo dia, a avaliação do grau de diarreia observou-se que CPT-11 induziu o aumento significativo nos escores [3 (2-3)] quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina [0(0-0)]. O tratamento com LPII IAA na dose de 1mg/kg não apresentou diferença significativa nos escores [1 (1-3)] quando comparado aos tratados apenas com CPT-11. Contudo, LPII IAA nas doses de 5 e 25 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente o grau de diarreia [0 (0-1)] e [0 (0-3)], respectivamente, quando comparados ao CPT-11 e LPII (**Figura 19**).

Fig. 19 – LPII IAA nas doses de 5 e 25 mg/kg foram capazes de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.

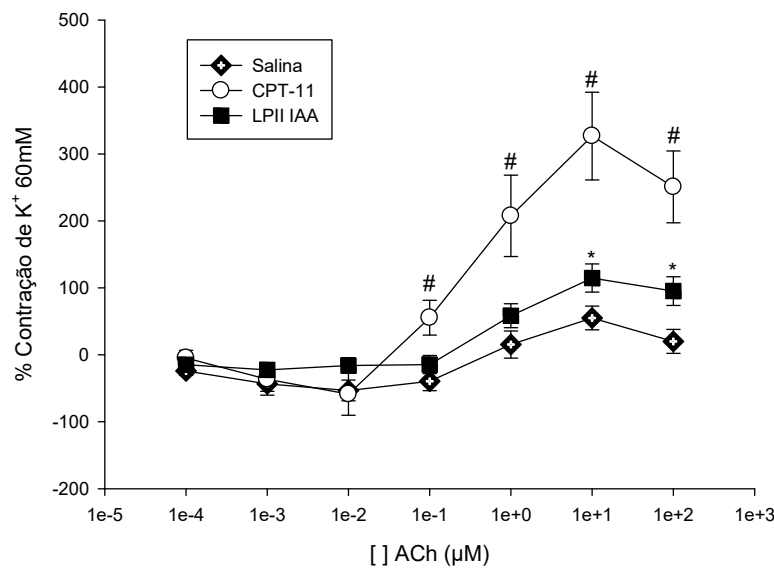


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p.1xdia/4dias), LPII IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)], e avaliados quanto a diarreia no sétimo dia experimental através de escores de Kurita *et al*, (2000). Os resultados foram expressos em mediana dos valores de escores atribuídos. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo Salina.Para análise estatística utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

5.5 Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* sobre a contratilidade intestinal em segmentos de duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.

O irinotecano induziu o aumento significativo da contratilidade intestinal duodenal ao estímulo, *in vitro*, com acetilcolina, quando comparado ao grupo controle, tratado com salina (média=55,01±43,26). No entanto, após o tratamento com LPII IAA (5mg/kg) (média=95,17±67,72), houve diminuição da responsividade a contração induzida por acetilcolina, quando comparado ao tratamento com apenas CPT-11 (média=250,8±160,9) (**Figura 20**).

Fig. 20 – A fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* reduz a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

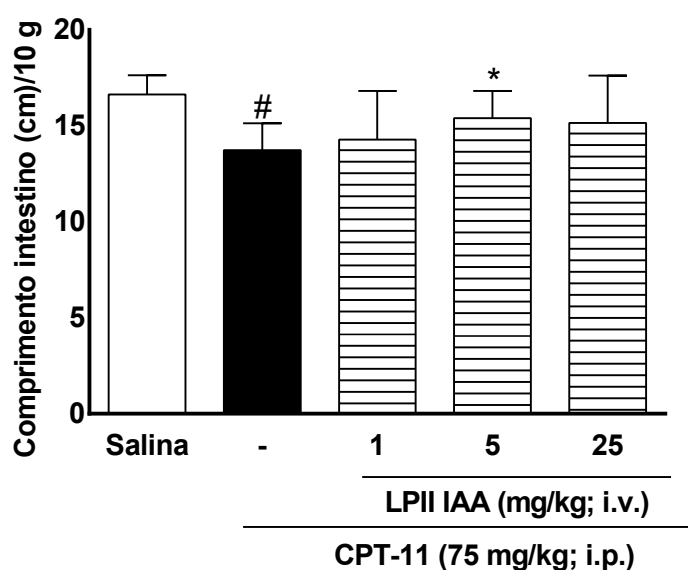


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1x/dia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1x/dia/4dias), e LPII IAA [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1x/dia/4dias)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi coletado para realização do ensaio de contratilidade *in vitro*. Os resultados foram expressos como média± E.P.M dos valores da razão obtida. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.2.6 Efeito dose-resposta da fração proteica LPII IAA sobre a redução do comprimento intestinal induzido por CPT-11 em camundongos.

Após a eutanásia dos animais, foi feita a medida do comprimento do intestino delgado, que se apresentou significativamente encurtado nos animais tratados com CPT-11 (média=13,75±1,38) e LPII IAA na dose de 1 e 25 mg/kg (média=15,42±2,54; 14,68±3,14) comparados ao controle (média= 16,64±0,99). Enquanto que, nos animais tratados com LPII IAA na dose de 5 mg/kg (média=14,84±1,50) não houve redução do comprimento intestinal em comparação ao grupo que recebeu apenas CPT-11.

Fig. 21 - O tratamento com LPII IAA (5 mg/kg) controla a redução do comprimento intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

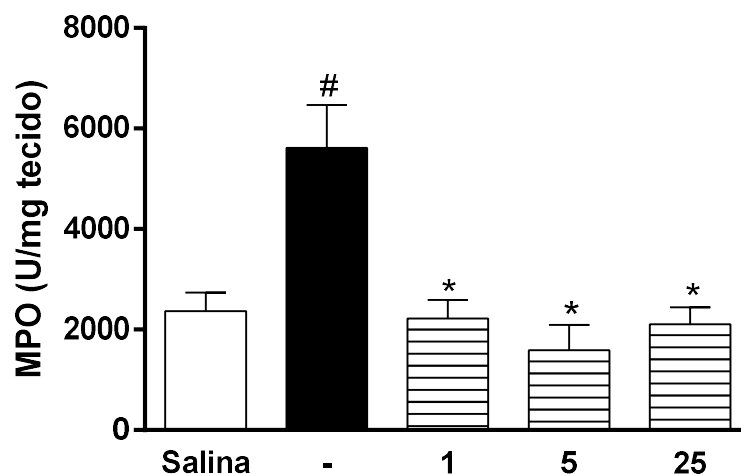


Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), LPII [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias)], LPII IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p.)). Os animais foram eutanasiados no sétimo dia experimental e o comprimento total do intestino delgado foi mensurado em centímetros/10g. Os valores representam a média ± EPM do comprimento do intestino delgado/10g. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.2.7 Efeito dose-resposta da fração proteica LPII IAA sobre a atividade de MPO em segmento de duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.

O irinotecano induziu um significativo aumento no número de neutrófilos no intestino quando comparado ao grupo controle (média=2371±1153). Enquanto que o tratamento dos animais com LPII IAA nas doses de 1, 5, 25 mg/kg (média=2223±1045; 1588±1139; 2109±1049) foram eficientes em reduzir, significativamente, a atividade de MPO quando comparados ao tratamento apenas com CPT-11 (média=5615±2700) (**Figura 22**).

Fig. 22 - O tratamento com LPII IAA reduz a atividade MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), LPII IAA [(1, 5, 25 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi removido para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como média±E.P.M. de neutrófilos/mg de tecido. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

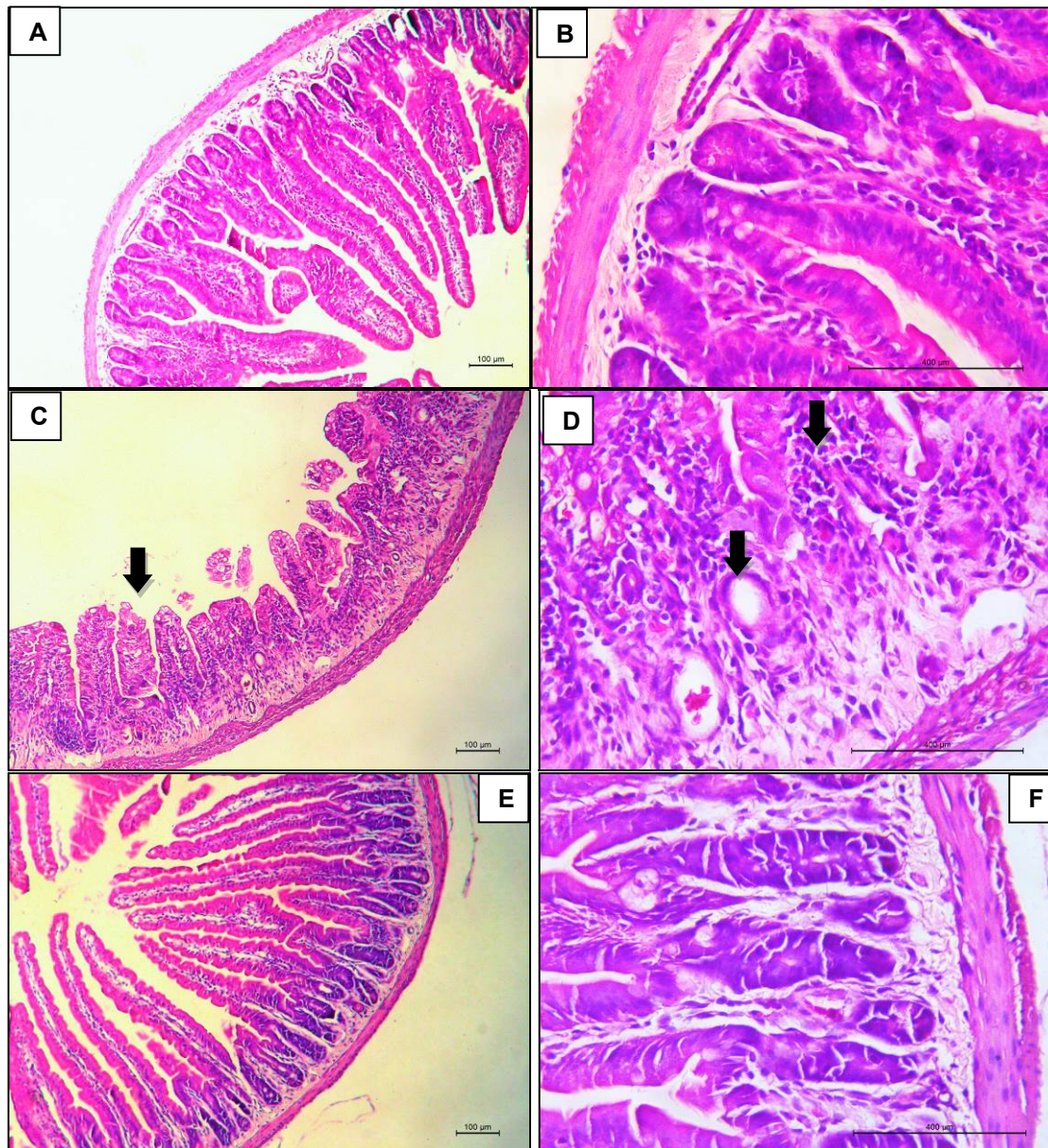
Diante dos resultados apresentados acima, demos continuidade ao estudo apenas com a fração LPII IAA na dose de 5mg/kg. Uma vez que foi a menor dose que obteve melhor resposta diante dos principais parâmetros funcionais da mucosite intestinal.

5.3 Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* sobre as alterações histológicas e morfológicas induzidas por CPT-11.

As fotomicrografias (**Figura 23**) e os escores histopatológicos (**Figura 24**) mostram que o irinotecano promoveu excessivo dano intestinal nos animais, caracterizado por redução da altura de vilos; perda da arquitetura, necrose e apoptose das criptas; intenso infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria e vacuolização das células do epitélio de revestimento. A análise histopatológica classificou em escores a extensão do dano, diante disso, CPT-11 obteve mediana de 3 (2-3), enquanto que ao grupo controle atribuiu-se 0 (0-0). Contudo, os animais submetidos a mucosite intestinal, tratados com LPII IAA, foi atribuído mediana de 1 (1-2), especificamente no segmento de duodeno, apresentando assim diferença estatística comparado tratamento com CPT-11, apenas.

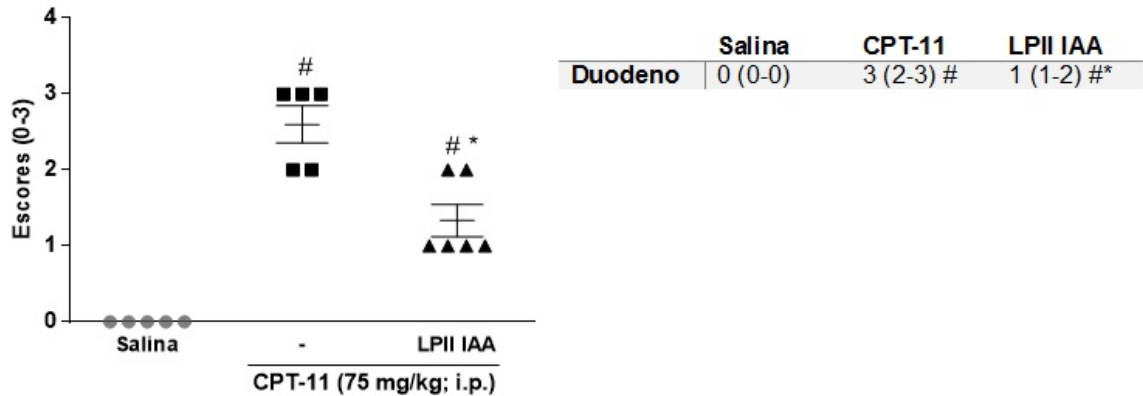
Em seguida, a análise morfométrica em tratados com CPT-11 (média=1,73±0,47), evidenciou que o antineoplásico, induziu a redução significativa na razão vilo/cripta quando comparados com o controle tratado apenas com salina (média=4,53±1,23). Enquanto que, LPII IAA (média=2,46±0,72), induziu um aumento significativo na razão vilo/cripta, indicativo de preservação destas estruturas, quando comparados ao grupo CPT-11 (**Figura 25**) o que confirma com a análise microscópica e escores de diarreia.

Fig. 23 – Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* nas alterações microscópicas do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.



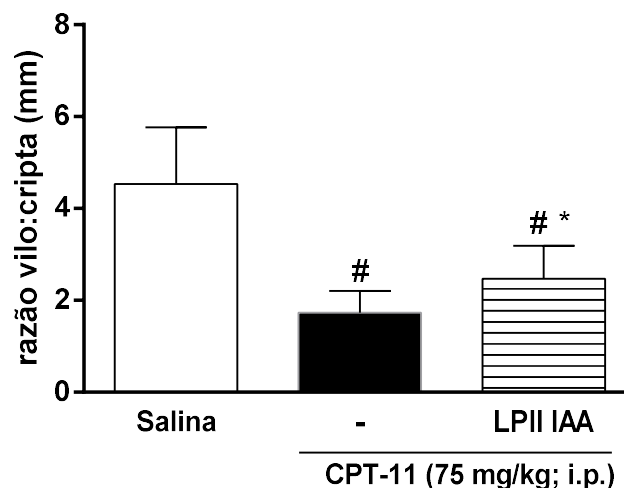
Os animais receberam Salina (5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (grupo CPT-11 i.p. + Salina; 75 mg/kg/dia), LPII IAA [(5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi coletado e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. Observam-se encurtamento de vilos, vacuolização de células e intenso infiltrado inflamatório. **Painel A:** Salina (100x); **Painel B:** Salina (400x); **Painel C:** CPT-11 (100x); **Painel D:** CPT-11 (400x); **Painel E:** LPII IAA 5 mg/kg (100x); **Painel F:** LPII IAA (400x), mostram encurtamento dos vilos, vacuolização de enterócitos, necrose de criptas e infiltrado de células polimorfonucleares (setas pretas).

Fig. 24 – Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* nos escores de avaliação microscópica do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.



Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), e LPII IAA [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1xdia/4dias)]. Após a eutanásia, o duodeno foi coletado e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para análise histopatológica. Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. Para a análise estatística utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Fig. 25 - Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* sobre alterações morfométricas do duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

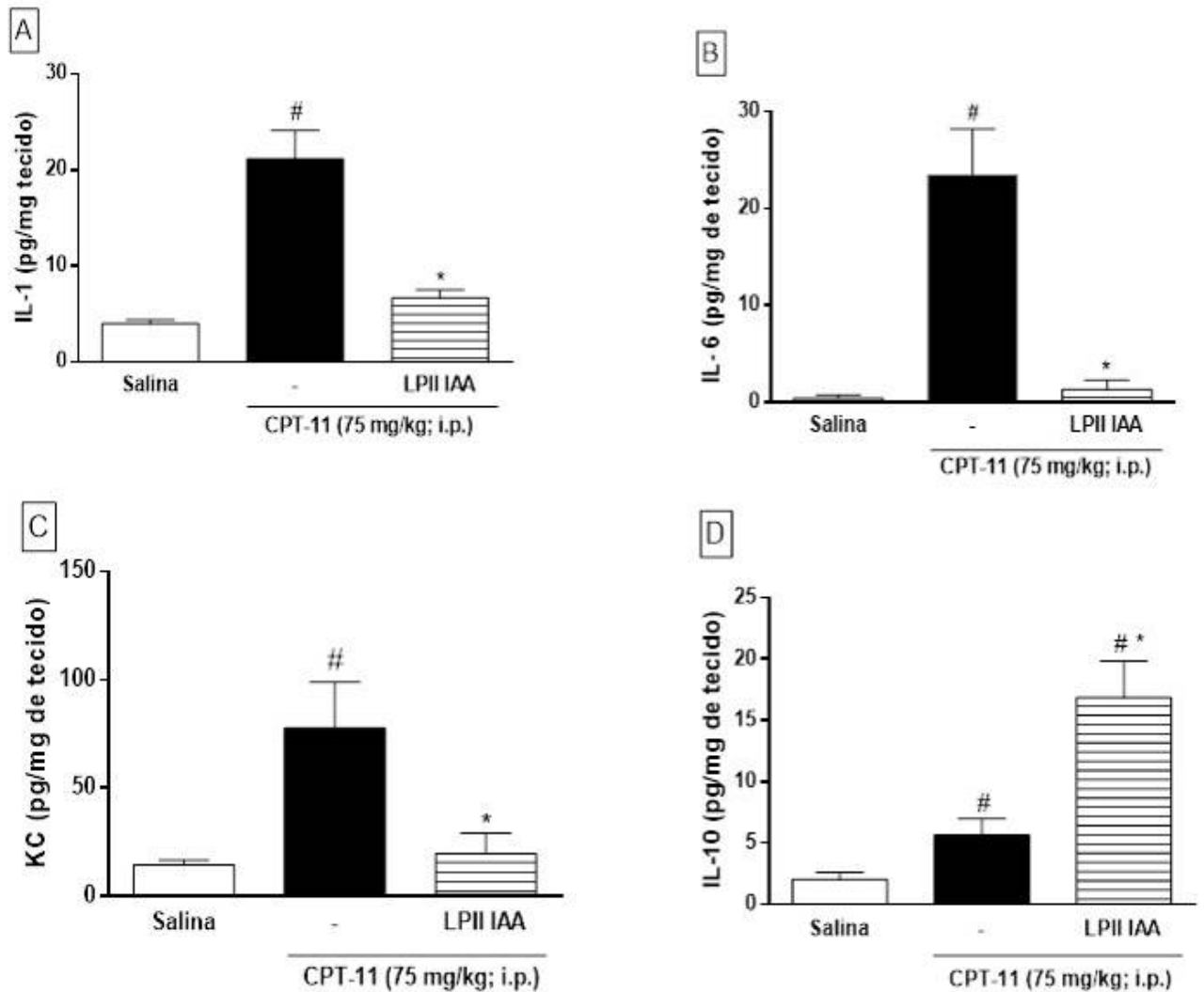


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), e LPII IAA [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1xdia/4dias)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi coletado e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica através da mensuração da altura dos vilos, profundidade das criptas e posterior razão desses valores. Os resultados foram expressos como média±E.P.M dos valores da razão obtida. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.4 Efeito da fração proteica LP11 IAA de *Calotropis procera* sobre a dosagem de citocinas IL-1 β , IL-6, KC e IL-10 em segmentos de duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

A **Figura 26** mostra que a mucosite intestinal induzida por CPT-11 aumenta significativamente as concentrações de IL-1 β , IL-6, quimiocina análoga da IL-8 humana em camundongos (KC), e reduz os níveis de IL-10 no duodeno (média IL-1 β = 21,15 \pm 7,29; IL-6= 23,48 \pm 4,73; KC= 77,76 \pm 47,47 e IL-10= 5,65 \pm 2,99) quando comparado ao grupo salina (média IL-1 β = 4,01 \pm 1,00; IL-6= 0,43 \pm 0,34 ; KC= 14,62 \pm 4,52 e IL-10= 2,04 \pm 1,27). Contudo, quando os animais foram tratados com LP11 IAA reduziu significativamente concentração dessas citocinas pró-inflamatórias e aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória, IL-10 (média IL-1 β = 6,68 \pm 2,04; IL-6= 1,38 \pm 0,96; KC= 19,83 \pm 23,07 e IL-10= 16,87 \pm 6,65), comparadas ao grupo experimental que recebeu somente CPT-11.

Fig. 26 – Fração proteica LP11 IAA de *Calotropis procera* reduz as concentrações de IL-1 β , IL-6, KC e aumenta os níveis de IL-10 no duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

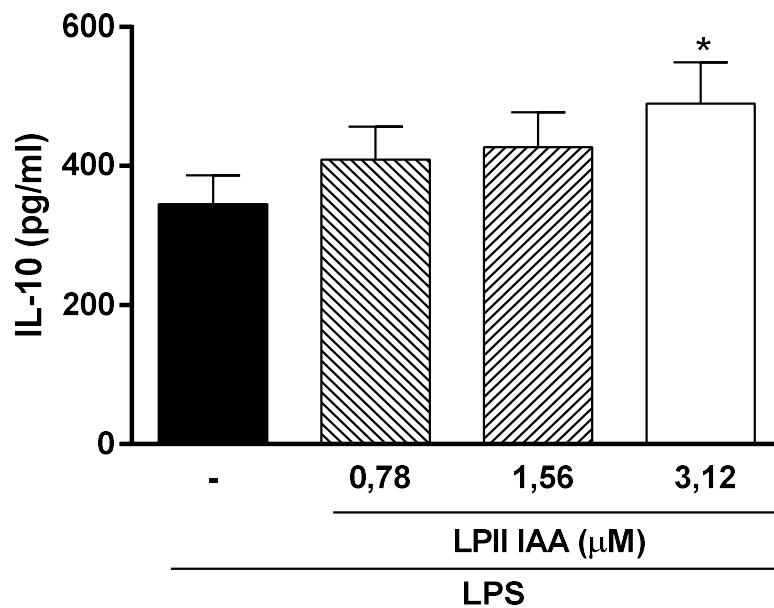


Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), e LP11 IAA [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias)]. A eutanásia foi realizada no sétimo dia experimental. Amostras de duodeno foram coletados para a determinação dos níveis teciduais das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), KC (C), IL-10 (D) por ELISA. Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{E.P.M}$ dos valores da razão obtida. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPT-11, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.5 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW264.7.

A citocina IL-10 é uma das mais importantes citocinas anti-inflamatória e é responsável pela inibição de citocinas pró-inflamatórias durante a resposta imunológica. Ela regula os sinais prolongados da inflamação. Na **Figura 27** mensuramos a presença de IL-10 no sobrenadante de macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com LPII IAA nas concentrações de 0,78, 1,56 e 3,12 μ M. Observamos que apenas a concentração de 3,12 μ M estimulou a produção de IL-10 no sobrenadante da RAW264.7.

Fig. 27 - Produção de citocina IL-10 em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com o LPII IAA incubado por 24h.



Dosagem de citocina IL-10 no sobrenadante de células tratadas com LPII IAA nas concentrações não tóxicas de 0,78, 1,56, 3,12 μ M. A concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura de célula foi medido por ELISA. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes a partir da curva padrão e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$ versus grupo LPS; LPS = lipopolissacarídeo.

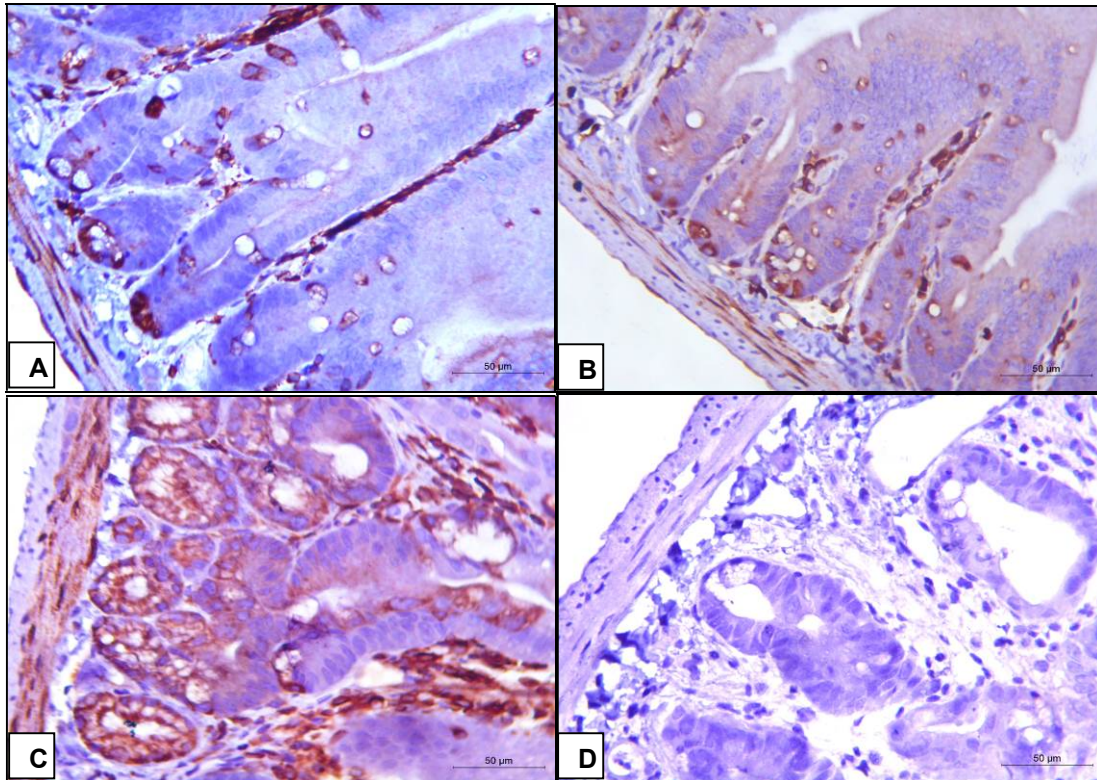
5.6 Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* sobre a expressão de COX-2 e NF-κB em segmentos de duodeno de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.

Através das figuras e gráficos, evidencia-se que o LPII IAA foi capaz de diminuir/inibir a imunomarcagem de COX-2 e NF-κB. No grupo controle negativo (painéis A; ausência de anticorpo primário) não se observa imunomarcagem.

Na **figura 28** se observa o resultado do efeito de LPII IAA na marcação de COX-2 por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. No painel B evidencia-se marcação. No grupo LPII IAA (painel C) apesar de haver marcação, está é menos intensa. Sobre a porcentagem de área marcada, o tratamento com LPII IAA foi capaz de reduzir significativamente, quando comparado ao CPT-11. No grupo controle negativo, apesar de haver marcação de células (painel A), a porcentagem de área marcada foi diferente significativamente quando comparadas ao grupo CPT-11 (**Figura 29**).

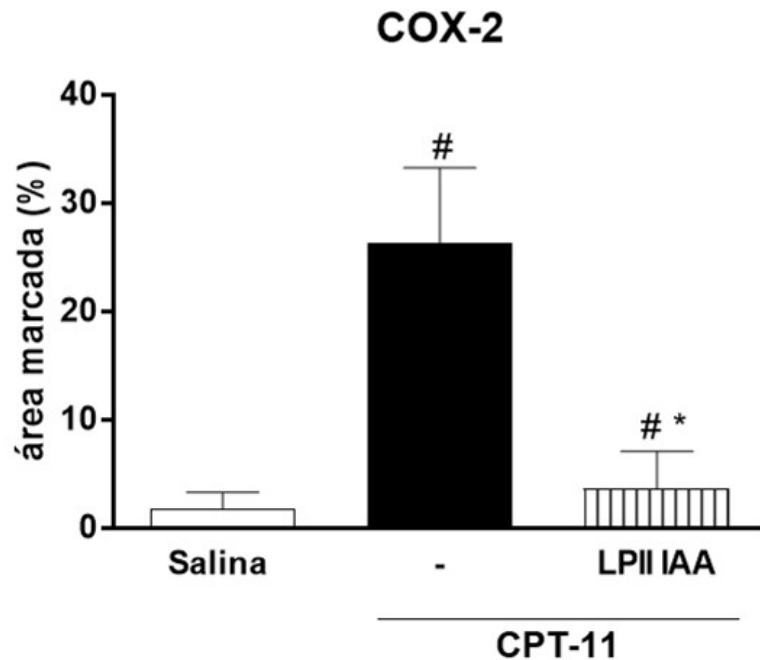
Na **figura 30** se observa o resultado do efeito do LPII IAA na marcação de NF-κB por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. Na figura 3 (painel B) observa-se intensa marcação. No grupo LPII IAA (painel C) apesar de haver marcação, está é menos intensa. Sobre a porcentagem de área marcada, o tratamento com LPII IAA foi capaz de reduzir significativamente, quando comparado ao CPT-11. No grupo controle negativo, apesar de haver marcação de células (painel A), a porcentagem de área marcada foi diferente significativamente quando comparadas ao grupo CPT-11 (**Figura 31**).

Fig. 28 - Efeito de LP11 IAA na imunomarcção de COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



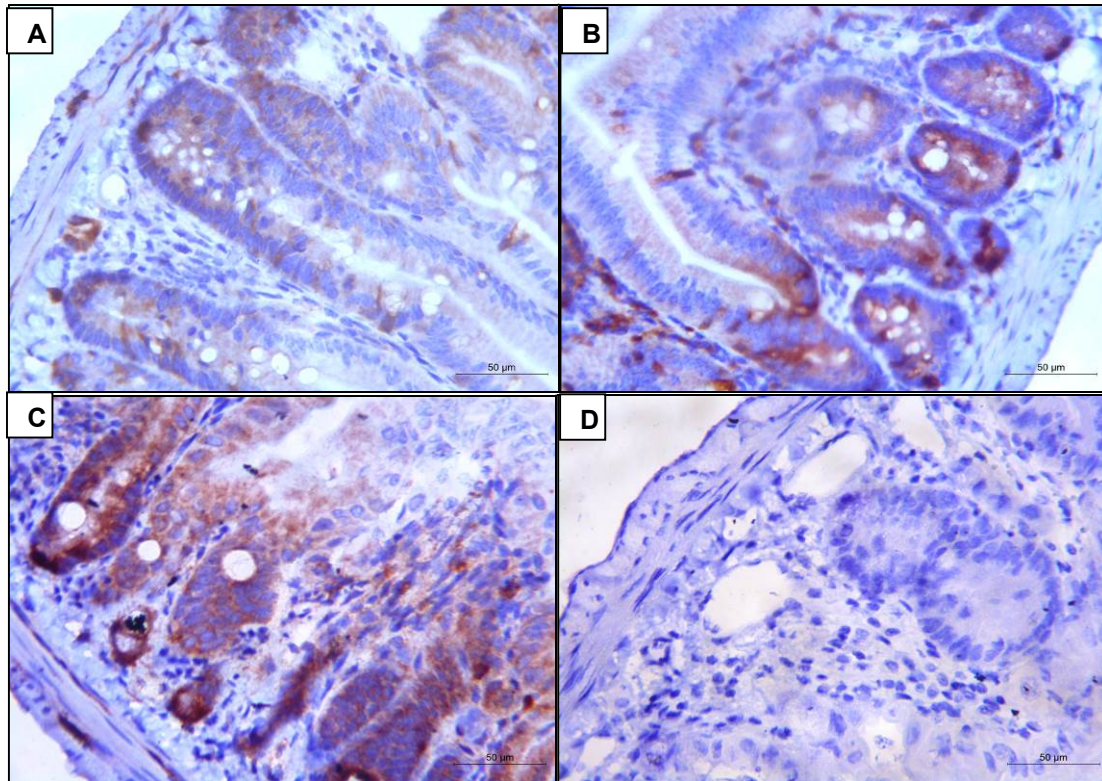
Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para COX-2. Nota-se aumento da imunomarcção para COX-2 no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que LP11 IAA diminui a imunomarcção dessa enzima (painel C) quando comparado ao grupo CPT-11. Controle negativo para imunohistoquímica (Painel D). Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm em aumento de 400x.

Fig.29 - LP11 IAA reduz a porcentagem de área imunomarcada para COX-2 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



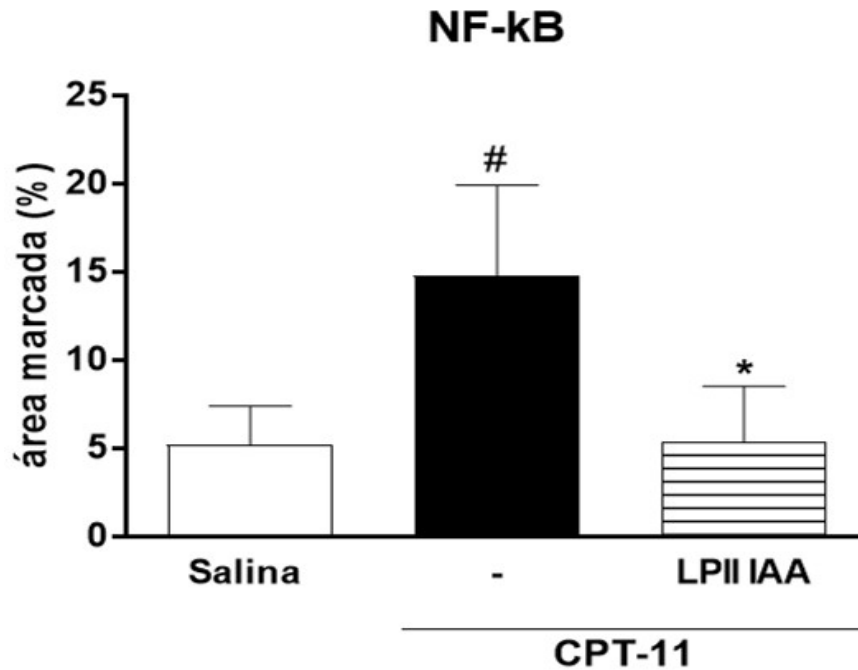
Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A porcentagem da área imunopositivas para COX-2 foram quantificadas por meio do software ImageJ. Observa-se que irinotecano aumenta a porcentagem de área marcada para COX-2 no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que LP11 IAA diminui essa imunomarcção. Os valores foram apresentados como média+ EPM da porcentagem de área marcada para COX-2 (por campo). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # p<0,05 vs grupo controle e * p<0,05 vs grupo CPT-11.

Fig. 30 - Efeito de LPII IAA na imunomarcção de NF-kB no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para NF-kB. Nota-se aumento da imunomarcção para NF-kB no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que LPII IAA diminui a imunomarcção (painel C) quando comparado ao grupo CPT-11. Controle negativo para imunohistoquímica (Painel D). Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm em aumento de 400x.

Fig.31 - LP11 IAA reduz a porcentagem de área imunomarcada para NF- kB no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50 μ m). A porcentagem da área imunopositivas para NF-kB foram quantificadas por meio do software ImageJ. Observa-se que irinotecano aumenta a porcentagem de área marcada para NF-kB no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que LP11 IAA diminui essa imunomarcção. Os valores foram apresentados como média+ EPM da porcentagem de área marcada para NF-kB (por campo). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo CPT-11.

5.7 Efeito da fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* nos níveis de GSH e MDA na mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos.

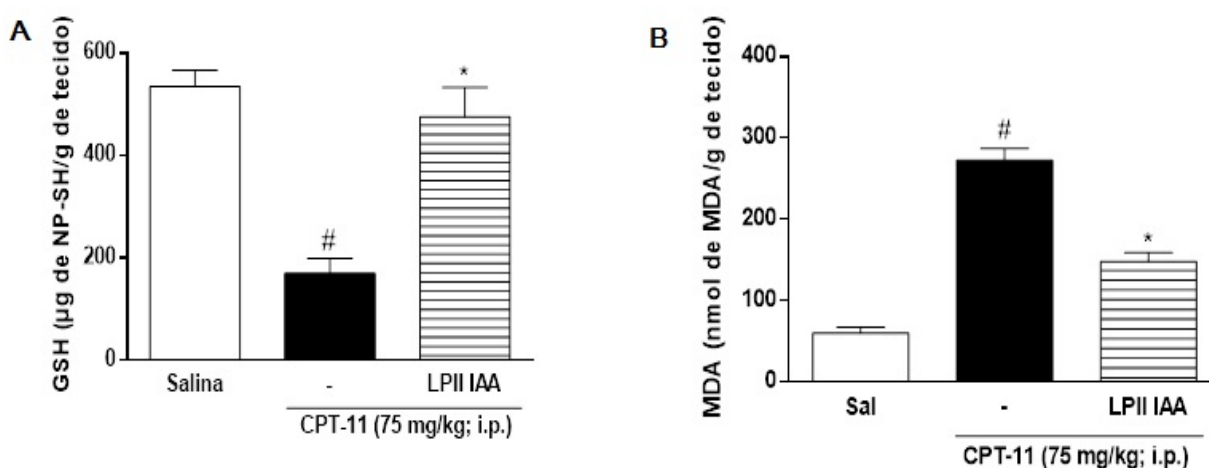
A glutationa sintetase (GSH) é um antioxidante fisiológico que é armazenado nas células e é consumido nos processos inflamatórios, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio, uma vez que sua função é de neutraliza-las.

Como apresentado na **figura 32 A**, observou-se ainda que CPT-11 reduziu (média=169,6±71,40) os níveis de GSH quando comparado ao grupo controle (média=534,3± 72,43). O tratamento com LPII IAA aumentou (média=475,5±128) os níveis desse antioxidante no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal.

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

De acordo com a **figura 32 B**, observou-se que CPT-11 aumentou (média=91,20±10,08) os níveis de MDA quando comparado ao grupo controle (média=73,70±18,27). Enquanto, LPII IAA foi capaz de reduzir (média=51,46±8,37) significativamente os níveis de MDA em comparação ao CPT-11.

Fig. 32 – Fração proteica LPII IAA de *Calotropis procera* aumenta os níveis de GSH e reduz os de MDA no duodeno de camundongos com mucosite intestinal induzida por CPT-11.



Os animais foram tratados com Salina (5 mL/kg, i.p. 1xdia/4dias), Irinotecano (75 mg/kg, i.p. 1xdia/4dias), e LPII IAA [5 mg/Kg, e.v.+ Irinotecano (75 mg/kg, i.p 1xdia/4dias)]. No sétimo dia de experimento, o duodeno foi coletado para dosagem dos níveis de GSH e MDA. Os resultados foram expressos como média±E.P.M dos valores da razão obtida. *p<0,05 quando comparado ao grupo CPT-11, #p<0,05 quando comparado ao grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a fração proteica do látex de *Calotropis procera* associada a iodoacetamida (LPII IAA) foi capaz de aumentar a sobrevida e reduzir a diarreia de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11. Além disso, pode-se sugerir que desempenhou atividade anti-inflamatória, uma vez que atenuou as alterações histológicas no duodeno, como também reduziu os níveis de neutrófilos, concentração de citocinas pró-inflamatórias e aumentou IL-10 (citocina anti-inflamatória); como também, apresentou atividade antioxidante ao aumentar a concentração de glutathiona e reduzir a de malonaldeído, apresentando assim, efeito protetor na mucosite intestinal. Contudo, nota-se que a fração sem inibidor de proteases cisteínicas (LPII) apesar de reduzir os níveis da mieloperoxidase, não reverteu à diarreia e sobrevida, sendo esses os principais parâmetros avaliados, o que poderia justificar esse achado é que a intensa atividade proteolítica potencializa o dano no tecido intestinal.

O modelo de indução da mucosite intestinal por irinotecano foi inicialmente proposto por Ikuno *et al* (1995) e adaptado por Melo *et al* (2008) demonstrou que camundongos tratados com CPT-11 na dose de 75mg/kg, administrado via intraperitoneal durante quatro dias consecutivos apresentaram: diarreia, alta mortalidade, perda de massa corpórea, leucopenia, perda acentuada do revestimento celular epitelial, encurtamento das vilosidades com redução da razão vilo/cripta, infiltrado de células polimorfonucleares, expressão de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-18, óxido nítrico, além da presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria. Wong (2013) também mostrou um aumento da translocação bacteriana para órgãos estéreis, com identificação bioquímica de bacilos gram-negativos no fígado e no linfonodo mesentérico.

O desenvolvimento da diarreia, manifestação mais comum associada ao uso de quimioterápicos, está relacionada à resposta inflamatória que provoca alterações gastrointestinais como aumento do trânsito intestinal e retardo do esvaziamento gástrico (BELARMINO-FILHO, 2010); alterações epiteliais que contribuem para uma menor capacidade absorptiva e alteração na secreção de sódio e potássio (KEEF *et al.*, 2007); além da composição da microbiota intestinal e a disbiose (MONTASSIER *et al.*, 2015; PEDROSO *et al.*, 2015).

Recentemente, avaliando o efeito de proteínas laticíferas sob mucosas, (Alencar *et al.* 2017) demonstrou que a fração de proteínas do látex de *Calotropis procera*, LP, administrada diariamente na dose de 5mg/Kg reduziu os danos inflamatórios e funcionais causados pela mucosite intestinal experimental induzida por CPT-11 em camundongos. Semelhante a esse estudo, Freitas e colaboradores (2012) observaram forte efeito anti-inflamatório de proteínas do látex (LP) da *Calotropis procera* sobre a inflamação induzida por 5-FU em modelo de mucosite oral uma vez que inibiu significativamente as alterações macroscópicas (como edema e formação de úlceras danosas) e histológicas (como infiltrado de células inflamatórias e perda da integridade do epitélio oral) induzidas por 5-FU. E posteriormente, mostrou que a fração proteica LP II IAA de *C. procera* preveniu a perda ponderal e a morte de hamsters submetidos ao mesmo modelo. Além disso, atenuou as alterações macroscópicas e microscópicas, o recrutamento de neutrófilos, estresse oxidativo e a inflamação, bem como diminuiu a degradação de fibras colágenas na mucosa jugal desses hamsters, resultados esses não encontrados na fração LP II, sozinha, sem inibidor de atividade proteolítica.

Entretanto, essa fração proteica rica em proteases cisteínicas (LP II) não interferiu no curso da mucosite intestinal, visto que os animais apresentaram mortalidade semelhante aos tratados apenas com CPT-11, além disso, tiveram diarreia severa, redução do comprimento intestinal, contudo, surpreendentemente, os níveis de MPO no duodeno estavam reduzidos, mostrando sua atividade anti-inflamatória. Esses resultados corroboram com o estudo de Freitas (2016) que utilizou a mesma fração proteica no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU, onde além do aumento da mortalidade, não preveniu a formação de lesões histológicas na mucosa oral. Estes resultados nos levaram a hipótese de que a atividade proteolítica das proteínas presentes na LP II possa estar interferindo de forma negativa no efeito desta fração na MI. Desta forma, o estudo foi prosseguido no sentido de comprovar a nossa hipótese, por isso, as abordagens experimentais foram realizadas somente com a LP II associada à iodoacetamida, um potente inibidor de atividade proteolítica, LP II IAA.

Demonstramos que LP II IAA na menor dose administrada (1 mg/kg) não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de diarreia e redução do comprimento intestinal, apesar de apresentar atividade anti-inflamatória ao reduzir os níveis de MPO no duodeno. Entretanto, as doses de 5 e 25 mg/kg reduziram estes

parâmetros avaliados, mostrando um resultado semelhante aos animais que foram tratados apenas com salina 0,9%. Assim, considerando que não houve diferença entre as doses de 5 e 25mg/kg, decidimos trabalhar com a menor dose.

Inicialmente, destacou-se no presente estudo que o irinotecano induz a perda de massa corpórea, conforme mostrado em outros estudos (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015; ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014). Contudo, LPII IAA não foi capaz de reverter essa alteração. Isso se deve a perda de massa corpórea induzida por esse quimioterápico ter origem multifatorial, dentre essas, náuseas, anorexia, diarreia e perda de integridade da barreira epitelial intestinal. Tal como, o tratamento com LP não foi capaz de reverter esse parâmetro no mesmo modelo estudado (ALENCAR *et al.*, 2017). Levando em consideração o alto catabolismo metabólico causado pelo CPT-11 e seus metabolitos tóxicos, isto poderia estar provocando essa alteração nos animais tratados com LPII IAA apesar da preservação tecidual e diminuição significativa da diarreia.

No modelo experimental aqui utilizado, CPT-11 também induziu aumento significativo de mortalidade. Esse achado previamente estudado por Gibson e colaboradores (2003) relatou mortalidade proporcional à dose administrada, em até 96 horas, quanto maior a dose, maior a mortalidade, chegando 100% com a dose de 200mg/kg. Na autópsia, observou-se peritonite e perfuração duodenal como causa *mortis*. No presente estudo, LPII IAA foi capaz de aumentar a sobrevida dos camundongos submetidos à mucosite intestinal. Corroborando com esses resultados LPII IAA aumentou a sobrevida de animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (Freitas, 2016). Bem como, LP aumentou a sobrevida de camundongos no modelo de sepse letal induzida por *Salmonella entérica* quando administrado por via intraperitoneal e previamente (24 antes) a infecção (LIMA-FILHO *et al.*, 2010), assim como quando administrado por via oral, preveniu de forma significativa a morte dos animais no modelo de sarcoma 180 (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Outros estudos demonstraram aumento da sobrevida no modelo de mucosite intestinal submetidos aos tratamentos com calvacrol e calvacryl, agonistas do receptor TRPA1 e ácido alfa lipoico (ALVARENGA *et al.*, 2016, 2017; COSTA, 2017).

No decorrer da presente investigação, observou-se que o irinotecano provocou severa leucopenia, e que LPII IAA não alterou esse perfil hematológico, o que reflete que seu efeito não interfere na ação do quimioterápico

Nesse estudo, investigamos também se LPII IAA seria capaz de melhorar a

diarreia, avaliada através dos escores de Kurita (2000). Os resultados demonstraram que CPT-11 induziu a diarreia grave, conforme mostrado por (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014). Enquanto que LPII IAA foi capaz de reduzir significativamente essa alteração. Corroborando aos achados do presente estudo, a fração proteica LP atenuou a diarreia no mesmo modelo estudado, semelhante ao ácido alfa-lipóico que também foi capaz de reduzir esse parâmetro (ALENCAR *et al.*, 2017; COSTA, 2017).

Outra alteração que está relacionada a diarreia é o aumento da contratilidade intestinal ocasionada por uma ação colinérgica induzida pelo irinotecano (GANDIA *et al.*, 1993; DODDS *et al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999; MELO, 2008). Comprovando o efeito antidiarreico de LPII IAA, foi mostrado que esta fração proteica reduz a contratilidade intestinal induzida por acetilcolina *ex vivo*. Corroborando com os achados de Alencar (2017) no modelo de MI.

Corroborando com o efeito mencionado acima, LPII IAA reverteu o encurtamento do intestino delgado induzido por CPT-11, levando em consideração que o irinotecano promove o encurtamento do músculo liso intestinal por promover hipercontratilidade desse tecido (TEIXEIRA, 2015; ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; COSTA, 2017).

A análise histopatológica do duodeno tratado com CPT-11 mostrou um tecido com lesão da mucosa intestinal que é caracterizado por mucosite grau 4, segundo o critério de classificação descrito por Woo *et al.* (2000). Somado a isso, ocorreu achatamento acentuado dos vilos, acompanhado de perda da arquitetura e necrose das criptas intestinais; vacuolização de células epiteliais intestinais e infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria, conforme já observado por estudos anteriores (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015; ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014). No entanto, ao tratar os animais com LPII IAA observou-se melhora dessas alterações histológicas induzidas por irinotecano no duodeno.

Para complementar a avaliação da amplitude dos danos teciduais foi realizada a morfometria intestinal (razão vilo/cripta), onde se verificou que o tratamento com CPT-11 induz a hiperplasia das criptas e reduz a altura dos vilos, o que revela o efeito desta droga sobre a capacidade absorptiva do intestino, refletindo o que já foi demonstrado por MELO *et al.*, 2008; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012. Contudo, o tratamento com LPII IAA aumentou a razão vilo/cripta, confirmando sua preservação

tecidual. Semelhante a esse achado, o tratamento com LP, ácido alfa-lipóico, fullerol, calvacrol e carvacryl também revertem as alterações histológicas causadas pelo CPT-11 (ALENCAR *et al.*, 2017; COSTA, 2017; ARIFA *et al.*, 2016; ALVARENGA *et al.*, 2016, 2017).

No intuito de avaliar a resposta inflamatória, avaliamos primeiramente a mieloperoxidase, uma ferramenta importante para identificar a presença de infiltrados de neutrófilos e para indicar um processo inflamatório como resultado da inflamação da mucosa intestinal. Diante disso, a redução da sua atividade em animais tratados com LP e LPII IAA indica diminuição do recrutamento de neutrófilos para o duodeno de animais submetidos a MI. De forma semelhante, LP e LPII IAA reduziram os níveis de MPO em modelo de mucosite intestinal e oral, respectivamente (ALENCAR *et al.*, 2017; FREITAS, 2016). Desta forma, o efeito de LPII IAA aqui demonstrado respalda-se com vários estudos que evidenciam efeito anti-inflamatório de LP em diferentes modelos animais (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2011, 2015; RAMOS *et al.*, 2009; FREITAS, 2014; Chaudhary *et al.*, 2015). Como também, o tratamento com ácido alfa-lipóico, fullerol, calvacrol tem atividade anti-inflamatória na MI induzida por CPT-11 (COSTA, 2017; ARIFA *et al.*, 2016; ALVARENGA *et al.*, 2016, 2017).

O processo inflamatório estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento que tem dentre suas funções estimular a migração de neutrófilos para o sítio da lesão, como também regulam e amplificam a resposta imune, estimulando a lesão tecidual. Logo, IL-1 β tem demonstrado estimular a migração de neutrófilos (OLIVEIRA *et al.*, 2008) através da ativação do fator de transcrição NF κ B, que ao ser ativado transloca-se para o núcleo, estimulando a transcrição de genes de diversas quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (LAWRENCE, 2009).

Assim, ao avaliar a expressão proteica de IL-1 β , IL-6 e KC (análoga a IL-8 humana), observou-se que LPII IAA previne o aumento da concentração das citocinas supracitadas, conseqüentemente reduzindo a resposta inflamatória na mucosite intestinal. Corroborando com esses resultados, Alencar e colaboradores (2017) e Freitas (2016) demonstraram que LP e LPII IAA na mesma dose utilizada no presente trabalho (5 mg/kg), foram capazes de diminuir a expressão de IL-1 β , no mesmo modelo em estudo e no modelo de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters, respectivamente. Como também, o tratamento com ácido alfa-lipóico e

fullerol reduziram IL-1 β ; e calvacrol reduziu IL-1 β e KC, demonstrando atividade anti-inflamatória semelhante (COSTA, 2017; ARIFA *et al.*, 2016; ALVARENGA *et al.* 2016).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória primordial e muito investigada na patogênese da doença inflamatória intestinal (DII), secretada por células CD4+, Th2, monócitos e macrófagos e outras células do sistema imunológico (SULTANI *et al.*, 2012). Sabe-se que IL-10 controla os processos inflamatórios ao suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, assim como apresentadores de antígeno, moléculas co-estimulatórias de monócitos/macrófagos, neutrófilos e células T. Estudos *in vitro* preliminares demonstraram que IL-10 suprime citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Clarke e colaboradores (1998) acreditam que IL-10 atenua a expressão do receptor de TNF e medeia os efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição do fator de transcrição NF- κ B, um mensageiro secundário fundamental para induzir a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Juntos, estes achados indicam IL-10 como um importante fator imunorregulador que contribui significativamente para redução da resposta inflamatória por downregulation da produção de citocinas pró-inflamatórias no local do dano no tecido (ASADULLAH *et al.*, 2003). De forma interessante, animais deficientes na produção da IL-10 e criados em condições convencionais desenvolveram espontaneamente colite crônica, enquanto os animais criados em condições assépticas não desenvolveram inflamação intestinal (SELLON *et al.*, 1998).

Por outro lado, na patogênese na mucosite temos resultados controversos, uma vez que não houve diferença significativa entre animais tratados com salina versus irinotecano. Como demonstrado por Fernandes (2017), não se observou diferença na produção de IL-10 intestinal entre o grupo que recebeu apenas irinotecano e o salina, apesar de haver uma tendência à redução nos animais com mucosite, esse resultado se repetiu no estudo de Belarmino Filho (2010), isso ocorreu devido à diferença da linhagem de animais, uma vez que, Fernandes utilizou camundongos isogênicos C57BL/6 e em nosso estudo, utilizamos *Swiss*. Entretanto, em nosso estudo LPII IAA foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10 e surpreendentemente os animais com mucosite tiveram maior expressão dessa citocina comparado ao salina, provavelmente por um mecanismo imune de defesa

contra a injúria. E, para confirmar o mecanismo, quando macrófagos foram desafiados com LPS e tratados com LPII IAA, também houve aumento de IL-10, demonstrando que essa fração proteica é capaz de estimular diretamente essa citocina.

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e o estresse oxidativo são os primeiros eventos do desenvolvimento da mucosite, afetando diretamente células e tecidos (SONIS *et al.*, 2004; MAEDA *et al.*, 2011). Células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e monócitos são capazes de produzir EROs (SONIS *et al.*, 2004). Contudo, acredita-se que seu desenvolvimento aconteça primeiramente pela ação dos quimioterápicos, e que o estresse oxidativo seja evidenciado em fases posteriores. A fim de evidenciar essa hipótese, Miyazono, Gao, Horie (2004) e Maeda *et al.* (2010) observaram que o aumento da formação de EROs acontece principalmente 24 horas após a indução da mucosite, enquanto que o aumento da peroxidação lipídica e do infiltrado de neutrófilos no tecido ocorrem somente 48 horas após a administração do quimioterápico.

Sabendo disso, devido a *Calotropis procera* ter atividade antioxidante, investigaram-se os níveis de GSH e MDA (KUMAR, 2011, 2014, 2015; CHAUDHARY, 2015; FREITAS, 2016; NASCIMENTO, 2016). Dessa forma, observou-se neste trabalho que LPII IAA aumentou os níveis de GSH e reduziu os de MDA na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Assim como no presente estudo, estudos anteriores já haviam mostrado que irinotecano reduzia consideravelmente os níveis de GSH (ALVAREGA *et al.*, 2016; ARIFA *et al.*, 2014). Achado semelhante também foi observado com as substâncias ácido alfa-lipóico, fullerol, calvacrol e carvacryl no mesmo modelo em estudo (COSTA, 2017; ARIFA *et al.*, 2016; ALVARENGA, *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados neste estudo mostram o efeito anti-inflamatório da fração proteica proteica do látex de *Calotropis procera* (LPII IAA) no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos, a qual atua na prevenção da formação de diarreia, redução do comprimento intestinal, aumento da sobrevida, atenuou os danos teciduais e morfométricos, reduziu os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8), aumentou da citocina anti-inflamatória (IL-10), e produziu efeito antioxidante por aumento da concentração de GSH e redução de MDA. Contudo, faz-se necessário maior aprofundamento do estudo para desvendar o mecanismo de ação pelo qual LPII atenua as alterações induzidas por

CPT-11.

Desta forma, fica sinalizado que o efeito das proteínas isoladas do látex de *C.procera* na mucosite intestinal por CPT-11 se deve em parte às suas proteases, entretanto, a atividade proteolítica destas proteínas parece estar modulando de forma negativa o seu efeito farmacológico.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que LP II IAA, fração da LP rica em proteases cisteínicas, modula a resposta inflamatória na mucosite intestinal induzida por CPT-11, por inibir as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais (diarreia, sobrevida), quando a atividade proteolítica desta fração foi inibida.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AJANI, J. A. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. **Oncologist**. v. 3, p. 49-58, 2005.
- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in: three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Plant. Med.**, v. 7, p. 1144-1149, 2004.
- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. Are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 559-564, 2006.
- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytother. Res.** v.31, p. 312–320, 2017.
- ALIMONTI, A. *et al.* New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer. Treat. Rev.**, v. 30, p. 555-562, 2004.
- ALMEIDA, S. M. V. *et al.* DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538–1556, 2017.
- ALVARENGA, E. M. *et al.* Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. **Chem Biol Interact.** v. 25, n. 260, p. 129-140, 2016.
- ALVARENGA, E. M. *et al.* Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **J Pharm Pharmacol.** v. 69, n. 12, p. 1773-1785, 2017.
- ALVES-FILHO J. C. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med.** v. 34, n. 2, p. 461-470, 2006.
- ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiol Biochem**, v.43, p.637–50, 2005.
- APOSTOLIDOU, E. *et al.* Mitoxantrone and prolonged infusion gemcitabine as salvage therapy in patients with acute myelogenous leukemia. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 4, p. 301-4, 2003.
- ARBUCKLE, R.; HUBER, S.; ZACKER, C. The consequences of diarrhea occurring during chemotherapy for colorectal cancer: a retrospective study. **Oncologist**. v.5, p.250–259, 2000.
- ARIFA, R. D. *et al.* Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. **Am J Pathol.** v. 184, n. 7, p. 2023-2034, 2014.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 Therapy Review of a new approach. **Pharmacological Review**, v. 55, n. 2, p. 241–269, 2003.

AZARKAN, M. *et al.* Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 790, p. 229-238, 2003.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Handbook of Proteolytic Enzymes New York: **Academic Press**; 1998.

BATKIN, S.; TAUSSIG, S. J.; SZEKEREZES, J. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. **J Cancer Res Clin.** 1988; 114(5): 507-508.

BELARMINO FILHO, J. N. **Modulação da resposta inflamatória com dexametasona reverte a dismotiliade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICKERMAN, A.W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. **Phytochemistry**, v. 65, p.43–58, 2004.

BLEIBERG, H.; CVITKOVIC, E. Characterisation and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: the European perspective. **Eur J Cancer.** v. 32A(Suppl 3):S18–s23, 1996.

BOEHMER, C. H.; JAEGER, W. Capecitabine in treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 1a, p. 439-43, 2002.

BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J. T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H.-P. Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinetics. **New York: Marcel Dekker.**, cap. 4, p. 235-61, 1999.

BOSSI, P.; LUCCHESI, M.; ANTONUZZO, A. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies measurement, duration and impact. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care.** n. 9, p. 2, n. 163–167, 2015.

CARNEIRO-FILHO, B. A. *et al.* Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Dig Dis Sci.** v. 49, n.1, p. 65-72, 2004.

CASSEL, S. L. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 105, p. 9035-9040, 2008.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 369, 2001.

CHAUDHARY, P. *et al.* Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 69-73, 2015.

CHESTER, J. D. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J ClinOncol.** v. 15, n. 21, p.1125-32, 2003.

CHOWBAY, B. *et al.* The modulation of irinotecan-induced diarrhoea and pharmacokinetics by three different classes of pharmacologic agents. **Oncol. Rep.**, v. 10, p. 745-751, 2003.

CHU, E. Drug development. IN: DEVITA JR., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles and practice of oncology, pancreatic cancer**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, v. 8, p. 195-204, 2005.

CLARKE, C. J. *et al.* IL-10 mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF-kappa β activity. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 5, p. 1719–1726, 1998.

COSTA, D. V. S. **O efeito do ácido alfa-lipóico na mucosite intestinal experimental por irinotecano**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CUNHA, F. Q. *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, p. 47-52, 1993.

CUNNINGHAM, D. *et al.* Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet**. v. 352, p. 1413–1418, 1998.

DE FIGUEIREDO, I. S. T. *et al.* Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 1, p. 1-8, 2014.

DINCA, A.; CHIEN, W.; CHIN, M. T. Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v.17, 2016.

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

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

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

DOMSALLA, A; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.** v. 74, n. 699-711, 2008.

DRANITSARIS, G.; MAROUN, J.; SHAH, A. Estimating the cost of illness in colorectal câncer patients who were hospitalized for severe chemotherapy- induced diarrhea. **Can.J.Gastroenterol.** v. 19, p. 83–87, 2005.

DUBEY, V. K., JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**. v. 62, n.7, p. 1057-1071, 2003.

EIN GEDI. **Flowers in Israel**. Disponível em: <[HTTP://WWW.FLOWERSINISRAEL.COM/CALOTROPISPROCERA_PAGE.HTM](http://www.flowersinIsrael.com/calotropisprocera_page.htm)>. Acesso em: 05 nov. 2017.

ENZINGER, P. C. *et al.* A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 2005.

FERNANDES, C. *et al.* Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis. **Eur J Pharm Sci**. v. 30, n. 115, p. 158-166, 2018.

FREITAS, A. P. *et al.* Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn Schmiedebergs Archives in Pharmacology**, 2012.

FREITAS, A. P. **Efeito de subfrações da proteína do látex da *Calotropis procera* na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

FREITAS, C. D. T. *et al.* Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, p. 1-7, 2011.

FREITAS, C. D. T. *et al.* Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 781-789, 2007.

FUCHS, C. S. *et al.* Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** v. 25, p. 807-814, 2003.

FUJII, H. *et al.* Intermittent, repetitive administrations of irinotecan reduces its side-effects. **Cancer Detect Prev.** v.26, n.3, p.210-2, 2002.

GALLEGOS-OLEA, R. S. *et al.* Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p. 263-265, 2002.

GANDIA, D. *et al.* CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients (letter). **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 196-197, 1993.

GIBSON, R. J. *et al.* Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 1095-100, 2003.

GIBSON, R. J. *et al.* The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 53-8, 2002.

GIBSON, R. J. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer.** v. 21, n. 1, p. 313-26, 2013.

GUABIRABA, R. *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol.** 2014.

GUICHARD, S. *et al.* CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. **Br J Cancer.** v. 80, p. 364-370, 1999.

GUICHARD, S. *et al.* CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. **Br J Cancer.** v. 80, p. 364-370, 1999.

HYE-SUNG KIMA. *et al.* Dendritic cell vaccine in addition to FOLFIRI regimen improve antitumor effects through the inhibition of immunosuppressive cells in murine colorectal cancer model. **Vaccine**, v. 28, p. 7787-7796, 2010.

HUSSEIN, H. T. *et al.* Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **J. Chem. Ecol.**, v. 20, p.135-140, 1994.

IKUNO, N. *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum

and cecum. **J Natl Cancer Inst.** v. 87, n.24, p. 1876-83, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

IRVIN, W. P. *et al.* A phase II study of irinotecan in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. **Cancer.** v.15, n. 82, p. 328-33, 1998.

KEEFE, D. M. *et al.* Risk and outcomes of chemotherapy-induced diarrhea (CID) among patients with colorectal cancer receiving multi-cycle chemotherapy. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 74, p. 675-680, 2014.

KEEFE, D. M.; SCHUBERT, M. M. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer.** v. 109, n.5, p. 820 – 31, 2007.

KIRTIKAR, K. R., BASU, B. D. **Indian Medicinal Plants.** LOLIT MOHAN BASU, ALLAHABAD, p.1606, 1935.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas.** SÃO PAULO: EDITORA BASF, 2.ED., p.978, 1999.

KOIZUMI, F. *et al.* Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res.** v. 66, n. 20, p. 10048-10056, 2006.

KONNO, K. *et al.* Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, n. 3, p. 370-378, 2004.

KRISHNA, S. G. *et al.* Incidence and risk factors for lower alimentary tract mucositis after 1529 courses of chemotherapy in a homogenous population of oncology patients: clinical and research implications. **Cancer**, v. 117, p. 648–655, 2011.

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

KURITA, A. *et al.* Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 46, n. 3, p. 211-20, 2000.

KWEEKEL, D.; GUCHELAAR, H. J.; GELDERBLOM, H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. **Cancer treatment reviews**, v. 3, n.7, p. 656-669, 2008.

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

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** p. 1-10, 2009.

LEITAO, R. F. *et al.* Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **Bmc. Gastroentreol.**, v. 16, p. 11-90, 2011.

LIMA, R. C. S. *et al.* Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy &**

Behavior., v. 23, p. 123–126, 2012.

LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**. v.129, p. 327–334, 2010.

LIMA-JÚNIOR, R. C. *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 69, p. 931–942, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R. C. *et al.* Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2335-2350, 2014.

LOGAN, R. M. *et al.* Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 62, n. 1, p. 33-41, 2008.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J Biol Chem**. v.7, n.45, p. 30433-7, 2008.

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

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

MAEDA, T. *et al.* Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 65, p. 1117–23, 2010.

MANTLE, D.; PREEDY, V. R. Adverse and beneficial functions of proteolytic enzymes in skeletal muscle. An overview. **Adverse Drug React Toxicol Rev**. v. 21, n. 31-49, 2002.

MAROUN, J. A. *et al.* Prevention and management of chemotherapy – induced diarrhea in patients with colorectal cancer: a consensus statement by the canadian working group on chemotherapy-induced diarrhea. **Curr. Oncol**. v. 14, p. 13–20, 2007.

MATHIJSEN, R. H. J. *et al.* Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 21, p. 1585-1592, 2004.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cell Mol Life Sci**. v. 58, p. 1234-1245, 2001.

MELO, M. L. *et al.* Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 61(5), p.775-84, 2008.

MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. **Scand J Gastroenterol**. v.39, p.1119–27, 2004.

MONTASSIER, E. *et al.* Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. **Aliment Pharmacol Ther**. v.42, n.5, p.515-28, 2015.

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* Latex. **Fitoterapia**, v.75, p. 480- 493, 2004.

MOURA, R. A. *et al.* Estudo dos elementos figurados do sangue. In: _____. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 32, p. 343-74, 1998.

MASHLAWI, M. K. H; ELSHEIKH, T. Evaluation of the biological activity of crude latex and ethanolic leaves extract of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) against the mosquito vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) **International Journal of Mosquito Research**, v. 4, n.1, p. (01-06), 2017.

NASCIMENTO, D. C. O. *et al.* Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytochemistry**, v. 23, n.7, p.745–753, 2016.

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

NUNES, M.O. **Efeito de uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR na cicatrização: Estudos pré-clínico e clínico piloto**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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

OLIVEIRA, J. S. *et al.* In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 382, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, S.H.P. *et al.* Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation**. v.31, n.1, 2008.

PEDROSO, S. H. *et al.* Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, v. 161, p.1950-1960, 2015.

PEREZ, E. A, *et al.* Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J Clin Oncol**. v.22, n.14, p.2849-5, 2004.

PEREZ, E. A. *et al.* Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J Clin Oncol**. v.22, n.14, p.2849-55, 2004.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R. J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical practice guidelines. **Ann Oncol**, v. 22, p. 78–84, 2011.

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

PISANO, C. *et al.* A phase II study of capecitabine in the treatment of ovarian cancer resistant or refractory to platinum therapy: a multicentre italian trial in ovarian cancer (mito-6) trial. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 64, p. 1021-1027, 2009.

RABBA, A. K. *et al.* In situ intestinal perfusion of irinotecan: application to P-gp mediated drug interaction and introduction of an improved HPLC assay. **Journal of Pharmacy &**

Pharmaceutical Sciences. v.14, n.2, p. 138-147, 2011.

RABBA, A. K. *et al.* In situ intestinal perfusion of irinotecan: application to P-gp mediated drug interaction and introduction of an improved HPLC assay. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 14(2), p. 138-147, 2011.

RALPH, M. T. **Propriedades anti-inflamatórias de proteases cisteínicas do látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. aplicadas ao controle de infecções por *Salmonella***. TESE (DOUTORADO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

RAMOS, M. V. *et al.* Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (ait.) R.Br. **Plant Sci.**, v. 173, p. 349-357, 2007.

RAMOS, M. V. *et al.* Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 125, p. 1-10, 2009.

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

RAMOS, M. V. *et al.* Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin-and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 385, p. 455-463, 2012.

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

RAMOS, M. V. *et al.* New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **Int J Biol Macromol.** v.58, n. 211-9, 2013.

RAWDKUEN, S. *et al.* The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food And Bioproducts Processing**. v. 89, pp.73-80, 2011.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 78, p. 881-893, 2016.

RIBRAG, V. *et al.* Phase II trial of irinotecan in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma**. v.44, n.9, p.1529-33, 2003.

RIVORY, L.P. Conversion of irinotecan to its active metabolite, 7-ethyl-10-hidroxicamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. **Biochem.Pharmacol.** v. 52, n. 7, p. 1103-11, 1996.

ROCHA-LIMA, C. M. *et al.* Cancer and Leukemia Group B. Phase II trial of irinotecan/gemcitabine as second-line therapy for relapsed and refractory small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 39902. **Ann Oncol.** 18 (2):331-7, 2007.

ROCHA-LIMA, C. M. *et al.* Irinotecan/gemcitabine combination chemotherapy in pancreatic cancer. **Oncology (Williston Park)**. v.15, n.3, p.46-51, 2001.

ROSATI, G. *et al.* A phase II study of irinotecan alternated with a weekly schedule of high-dose leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil infusion in patients with metastatic colorectal

cancer. **Oncology**, v. 62, n.3, p.209-15, 2002.

RUBENSTEIN, E.B. *et al.* Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, p. 2026-2046, 2004.

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

SALIBA, F. *et al.* Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 8, p. 2745-2751, 1998.

SALVESEN, G. S.; HEMPEL, A.; COLL N. S. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. **FEBS J.** v.283, n.14, p. 2577-98, 2015.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-832, 2010.

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

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

SELLON, R. K. *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun**, v.66, n.11, p. 5224-31, 1998.

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

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

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

SILVA, L. G. *et al.* Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30(5), p. 615–619, 1997.

PEDROSO, S. H. S. P. **Papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e gravidade de mucosite induzida por irinotecano em modelo murino**. TESE (DOUTORADO), Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

SINGH, A. N., SHUKLA, A. K., JAGANNADHAM, M. V., DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process in Biochemistry**, v. 45(3), p. 399-406, 2010.

SOARES, P. M. G. *et al.* Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, p. 46–49, 2012.

SOARES, P. M. G. *et al.* Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48, p.

80-85, 2011A.

SOARES, P. M.G. *et al.* Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquids in awake rats. **Arq Gastroenterol.** v.48, n.1, p.80-5. 2011.

SOARES, P. M. G. *et al.* Role of platelet activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 713-720, 2011B.

SOARES, P. M. G. **Mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil: papel de IL-1BETA, IL-4, PAF e avaliação das alterações da motilidade digestiva.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SOARES, P. M. *et al.* Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p.125-129, 2005.

SONAL, G. *et al.* Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recente developments. **Drug Deliv**, v.20(6), p. 237–246, 2013.

SONIS, S. T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 1995-2025, 2004.

STRINGER, A. M. *et al.* Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int. J. Exp. Path.**, v. 90, p. 489–499, 2009.

SULTANI, M. *et al.* Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. **Chemotherapy Research and Practice**, 2012.

TAKASUNA, K. *et al.* Inhibition of intestinal microflora glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 42, p. 280-286, 1998.

TAKASUNA, K. *et al.* Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3752-3757, 1996.

TAKASUNA, K. *et al.* Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11) induced delayed diarrhea. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 25, p. 1-10, 2006.

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

VAN-VLIET, M. J. *et al.* The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Plos One**, 2010.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinases laticíferas de *Calotropis procera*.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

WALD, M. *et al.* Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma. **Life Sci.** v. 63, p. 237-243, 1998.

WALL, M.E. *et al.* Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, n. 16, p. 3888-90, 1966.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea*. **Indian Medicinal Plants**, v.1, p. 341-345, 1994.

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. 2nd ed. **Edinburgh, E&S Livingtone**. 127p, 1962.

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

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One**, 2015.

WOO, P. C. *et al.* Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 527-532, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 09/01/2018.

XIANG, D. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist attenuates cyclophosphamide induced mucositis in a murine model. **CANCER CHEMOTHER. PHARMACOL.**, v. 67, p. 1445–1453, 2011.

XIE, R. *et al.* Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 72, n. 3, p. 265-75, 2002.

APÊNDICE A - MATERIAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Fármacos	Fabricante
Cloridrato de Irinotecano Evoterin®	Bergamo
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	
Xilazina 2% (Calmin®)	
Reagentes e materiais	Fabricante
Ácido acético glacial P.A.	Merck
Ácido Sulfúrico P.A.	Merck
Ácido Tiobarbitúrico	
Ácido perclórico	
Soro fisiológico 0,9%	Pharmace
Formaldeído 40%	Reagen
Hematoxilina	Reagen
Eosina	Merck
Solução de Turk;	
Solução tamponada com fosfato (PBS);	
Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)	Sigma
Fosfato de potássio monobásico KH ₂ PO ₄	Synth
Fosfato de potássio dibásico K ₂ HPO ₄	Synth
O-dianisidina	
EDTA	
Ácido Tricloroacético (TCA)	
Tris HCl 0,4M	
DTNB 0,01M	
L-Glutathione	

KCl 0,15M

Tetrametoxi-propano (TMP)

albumina sérica bovina (BSA)

Streptavidina (STV)

Substrato ABC (kit #DY999)

Stop solution (kit #DY994)

Anticorpo	Fabricante
Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-TNF- α (Sigma)	
Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-IL1- β	
Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-IL-6	
Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-IL-10	

Equipamentos	Fabricante
Agitador de tubos tipo Vortex cetomart® MV	
Amplificador – AD Instruments, ML845 Powerlab 4/25	
Aquecedor com temperatura controlada	
Balança analítica Ohaus AS2600;	
Câmara de contagem Neubauer;	
Centrífuga Eppendorf 5804R;	
ELISA ELX 800 – Biotek;	
Homogeneizador de tecidos Ultraturraz T8 e Dispergierstation T8.10 da Ika	
Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys	
Banho Maria	
Lâmina lisa para microscopia 26 X 76 mm	
Medidor de pH Hanna Instruments HI	

8519N

Microscópio Óptico binocular Nikon e
lente ocular micrométrica Leitz
Wetzlar

Seringas (B-D Plastipack)

Anexo 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO EFEITO DE PROTEASES CISTEÍNICAS ISOLADAS DE CALOTROPIS PROCERA NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS.", protocolo nº 55/2017, sob responsabilidade da Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 21 de setembro de 2017.

=Vigência do projeto	01/03/2017 a 01/08/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	296
Peso/Idade	8 semanas 25g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 22 de setembro de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1866982