



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

**LUANA DAVID DO CARMO**

**EFEITO PROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DA SEMENTE DE  
*Morinda citrifolia* L. NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA - CE**

**2019**

LUANA DAVID DO CARMO

EFEITO PROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DA SEMENTE DE  
*Morinda citrifolia* L. NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Doutor 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)

---

- D66e do Carmo, Luana David.  
Efeito protetor de uma proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* L. na mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongo / Luana David do Carmo. – 2019.  
109 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. *Morinda citrifolia* L.. 2. Proteínas vegetais. 3. Câncer. 4. Quimioterapia. 5. Efeito colateral. I. Título.

CDD 615.1

---

LUANA DAVID DO CARMO

EFEITO PROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DA SEMENTE DE  
*Morinda citrifolia* L. NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Duilio Reis da Rocha Filho  
Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)

---

Dr. Sérgio Faloni de Andrade  
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)

Dedico...

A Deus e a minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que vem me abençoando desde o dia em que passei na seleção do doutorado. Se não existisse uma força divina nos guiando e protegendo nesse mundo eu não estaria concluindo mais essa etapa na minha vida.

Aos meus pais que me educaram e me ensinaram a buscar ser sempre melhor. Aos meus sobrinhos amores da vida (Ariadne, Ariela e José Augusto) minha alegria hoje e sempre. E a toda minha família que sempre me apoiou, me deu suporte e me incentivou a conquistar cada vitória.

Aos meus amigos de faculdade (Tamiris, Juliano, Anália, Anamaria, Livia e Juliano) que sempre vibraram a cada conquista durante todos esses anos, o apoio psicológico de vocês sempre foi mais que importante!

À minha orientadora professora Nylane que me deu a oportunidade de entrar nessa vida de pesquisa a quase dez anos atras. Muito obrigada por ser essa orientadora que não se preocupa só com publicação, que trata seus alunos como filhos e que é nosso exemplo de educadora. Não existem palavras suficientes para agradecer todas as oportunidades e confiança depositadas em mim.

À minha parceira de experimentos Gisele Pinheiro que hoje se tornou também companheira de vida, não existem palavras que possam agradecer toda ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório Fernanda, Marília, Kayanny, Taiana, Liviane, Anderson, Rebeca, Brenda, Debora, Suzy, Patrícia e Manoel por toda ajuda nos experimentos durante esses anos, pelo apoio e pela disponibilidade. Obrigada Laboratório de Farmacologia e Bioquímica! Serei *team* LFB para sempre!

Às alunas do laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas, Dyely e Andrea, que isolaram a proteína e me deram todo o suporte que precisei.

À professora Sandra Maria, professora Karol Sabóia e ao técnico Carlos Roberto por aceitarem participar da minha banca de qualificação e pelas valiosas contribuições para melhorar esse trabalho.

Ao Professor Roberto César, Professor Hermógenes, Doutor Duilio Reis e Professor Sérgio Faloni por aceitarem participar da banca. Muito obrigada!

À todos os funcionários do departamento de fisiologia e farmacologia e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC que sempre se disponibilizaram a ajudar no que fosse preciso.

Aos animais que foram utilizados nos experimentos, minha gratidão!

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP agradeço o apoio financeiro desde o mestrado por dar condições para a realização da dissertação e agora da tese de doutorado.

E a todos que de alguma maneira participaram e foram importantes para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

“A felicidade que mais repercute em nós é a que foi alcançada pelo esforço, pelo empenho, que não nos dispensou da dor, do caminho árduo e da decepção. Felicidade sem esforço é desprovida de valor”.  
(Padre Fábio de Melo)

## **EFEITO PROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DA SEMENTE DE *Morinda citrifolia* L. NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral que pode acometer pacientes que fazem tratamento para câncer. Cerca de 50-60% dos pacientes submetidos à quimioterapia desenvolvem a MI em graus variados e o tratamento disponível é apenas paliativo. *Morinda citrifolia* L., conhecida popularmente como noni, é uma espécie nativa do sudeste da Ásia, encontrada também no Nordeste do Brasil, especialmente nos estados de Sergipe e Ceará, utilizada com finalidade medicinal para o tratamento de câncer, infecções, inflamação e dor. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que McLTP1, uma proteína transferidora de lipídeos, isolada das sementes de *M. citrifolia* (9,4 KDa) apresentou em camundongos atividade anti-inflamatória, gastroprotetora, antibacteriana e antinociceptiva. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito protetor de McLTP1 no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11). Para indução da MI camundongos swiss machos (25-30 g) foram divididos em 5 grupos: Grupo 1 recebeu salina (0,9%, i.p.) uma vez ao dia durante quatro dias; Grupo 2 recebeu irinotecano (75 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia durante quatro dias; Grupos 3, 4 e 5 foram tratados por 7 dias com McLTP1 nas doses de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 8 mg/kg e.v. respectivamente, 30 min antes do CPT-11 que foi administrado durante 4 dias. Durante os sete dias de tratamento foi avaliada a perda de peso, presença de diarreia por escores e a sobrevivência. No sétimo dia foi feita a coleta de sangue para contagem de leucócitos e em seguida a eutanásia para coleta do duodeno e avaliação dos parâmetros: comprimento do intestino delgado, contratilidade intestinal, alterações histopatológicas e morfométricas, níveis de MPO, GSH, MDA, NO e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, TGF- $\beta$  e IL-10) e a imunomarcação para COX-2, NF $\kappa$ B e iNOS. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste ANOVA/Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunns e  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Pesquisas com Animais da UFC - CEPA (93/15). CPT-11 causou perda de massa corpórea, diarreia, aumentou a mortalidade, induziu leucopenia, diminuiu o comprimento intestinal, aumentou a contratilidade intestinal, causou

achatamento das vilosidades, perda da arquitetura das criptas, presença de vacuolização, infiltrado de células inflamatórias e comprometimento da camada mucosa e muscular. Em relação aos parâmetros inflamatórios foi observado um aumento nos níveis de MPO, IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$ , além do aumento da imunomarcação para COX-2, NF $\kappa$ B e iNOS. Também foi observado aumento do MDA e diminuição do GSH. Comparativamente, o tratamento com McLTP1 8 mg/kg melhorou a diarreia, aumentou a sobrevivência, preveniu a redução do comprimento intestinal, diminuiu a hipercontratibilidade e o dano intestinal, atenuando as alterações histopatológicas provocadas por CPT-11. McLTP1 também foi capaz de diminuir os níveis de MPO, IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$ , diminuir a imunomarcação para COX-2, NF $\kappa$ B e iNOS, além de diminuir os níveis de MDA e aumentar o GSH. Portanto, McLTP1 demonstra atividade anti-inflamatória e antioxidante importantes que a tornam uma promissora opção terapêutica para prevenir e atenuar a gravidade da mucosite intestinal durante o tratamento quimioterápico com CPT-11.

**Palavras chaves:** *Morinda citrifolia* L. Proteínas vegetais. Câncer. Quimioterapia. Efeito colateral.

## **EFFECT OF A PROTEIN ISOLATED FROM THE SEED OF *Morinda citrifolia* L. IN THE INTESTINAL MUCOSITIS INDUCED BY IRINOTECAN IN MICE**

Intestinal mucositis (IM) is a side effect that can affect patients who are being treated for colorectal cancer (CRC). About 85% of patients undergoing chemotherapy develop IM in varying degrees and the available treatment is only palliative. *Morinda citrifolia* L., commonly known as noni, is a species native to Southeast Asia, also found in northeastern Brazil, especially in the states of Sergipe and Ceará, used medicinally for the treatment of cancer, infections, inflammation and pain. Our research group has demonstrated that McLTP1, a lipid transfer protein isolated from the seeds of *M. citrifolia*, presented antiinflammatory, gastroprotective, antibacterial and antinociceptive activity in mice. The objective of this study was to study the effect of McLTP1 on the intestinal mucositis model induced by irinotecan (CPT-11). For induction of IM male swiss mice (25-30 g) were divided into 5 groups: group 1 received saline (0.9%, i.p.) once daily for four days; Group 2 received irinotecan (75 mg/kg, i.p.) once daily for four days; Groups 3, 4 and 5 were treated for 7 days with McLTP1 at doses of 0.5 mg/kg, 2 mg/kg and 8 mg/kg e.v. respectively, 30 min before CPT-11 which was administered for 4 days. During the seven days the weight loss, presence of diarrhea by scores and the survival were evaluated. On the seventh day, blood was collected for leukocyte count and then euthanasia for duodenum collection and evaluation of the following parameters: small intestine length, intestinal contractility, histopathological and morphometric changes, MPO, GSH, MDA, NO, cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, TGF- $\beta$  and IL-10) and the immunohistochemistry for COX-2, NF $\kappa$ B and iNOS. Statistical analysis used ANOVA/Bonferroni or Kruskal Wallis/Dunns test and p

<0.05 was considered significant. This study was approved by the UFC - CEPA Animal Research Ethics Committee (93/15). CPT-11 caused loss of body mass, diarrhea, increased mortality, induced leucopenia, decreased intestinal length, increased intestinal contractility, caused villi flattening, loss of crypt architecture, presence of vacuolization, inflammatory cell infiltrate, and mucous and muscular layer. An increase in the levels of MPO, IL-1 $\beta$ , IL-6, KC and TGF- $\beta$  was observed in relation to inflammatory parameters, in addition to increased immunohistochemistry for COX-2, NF $\kappa$ B and iNOS. An increase in MDA and a decrease in GSH levels were also observed. Comparatively, treatment with McLTP1 8 mg/kg reduced diarrhea, increased survival, prevented intestinal length reduction, decreased hypercontractility and intestinal damage, attenuating the histopathological changes caused by CPT-11. McLTP1 was also able to decrease the levels of MPO, IL-1 $\beta$ , IL-6, KC and TGF- $\beta$ , decrease the immunostaining for COX-2, NF $\kappa$ B and iNOS, and decrease MDA levels and increase GSH. Therefore, McLTP1 demonstrates important anti-inflammatory and antioxidant activities that make it a promising therapeutic option to prevent and attenuate the severity of intestinal mucositis during the chemotherapy treatment with CPT-11.

**Key words:** *Morinda citrifolia* L. Vegetal protein. Cancer. Chemotherapy. Side effect.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	19
<b>Figura 2</b>	Estrutura do irinotecano	22
<b>Figura 3</b>	Metabolização do irinotecano	23
<b>Figura 4</b>	Desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11)	29
<b>Figura 5</b>	Aspectos gerais das partes de <i>Morinda citrifolia L.</i>	35
<b>Figura 6</b>	Análise eletroforética do isolamento da proteína da semente de <i>Morinda citrifolia L.</i> (McLTP1)	46
<b>Figura 7</b>	Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite	48
<b>Figura 8</b>	Figura esquemática do grau de diarreia apresentada em animais tratados com CPT-11	50
<b>Figura 9</b>	O tratamento com McLTP1 não altera o peso ponderal dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11	69
<b>Figura 10</b>	O tratamento com McLTP1 aumenta a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11	60
<b>Figura 11</b>	O tratamento com McLTP1 reduz a queda de leucócitos totais de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11	61
<b>Figura 12</b>	O tratamento com McLTP1 previne a redução do	62

comprimento intestinal de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano

- Figura 13** McLTP1 foi capaz de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos 64
- Figura 14** Efeito do tratamento com McLTP1 sobre a contratilidade duodenal in vitro de animais com mucosite induzida por CPT-11 65
- Figura 15** O tratamento com McLTP1 previne alterações histopatológicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 67
- Figura 16** O tratamento com McLTP1 previne as alterações sobre a altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidade/cripta em camundongos tratados com CPT-11 68
- Figura 17** O tratamento com McLTP1 diminui a atividade de MPO em animais com mucosite induzida por CPT-11 70
- Figura 18** Efeito do tratamento com McLTP1 nos níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, TGF- $\beta$  e IL-10) no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 71
- Figura 19** McLTP1 diminui a imunomarcação para COX-2 no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 73
- Figura 20** McLTP1 diminui a imunomarcação para NF $\kappa$ B no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 74
- Figura 21** McLTP1 diminui a imunomarcação para iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 75

- Figura 22** McLTP1 diminui a porcentagem de imunomarcção para COX-2, NFκB e iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 76
- Figura 23** Efeito do tratamento com McLTP1 sobre o estresse oxidativo (MDA, GSH e NO) no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11 77
- Figura 24** Esquema Hipotetico proposto para o efeito protetor de McLTP1 da mucosite intestinal induzida por irinotecano. 87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Proteínas terapêuticas aprovadas pelo CDER dos EUA entre 2011 e 2013	31
<b>Tabela 2</b>	McLTP1 reduz o grau de diarreia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	64
<b>Tabela 3</b>	McLTP1 foi capaz de prevenir lesões histopatológicas duodenais em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APC	7-etil-10-[4-N-(5-ácidoamino pentoico)-1-piperidino]- carboniloxicamptotecina)
CBER	Centro de Avaliação e Revisão de Biologia
CCR	Câncer colorretal
CDER	Centro de Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA
CE	Carboxilesterases
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CLP	Modelo de sepse com ligadura do ceco em camundongos
COX	Ciclooxigenase
CPT-11	Cloridrato de Irinotecano
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
e.v.	Via endovenosa
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutathiona reduzida
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
Hr	Hora
g	Gramas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
KC	Análogo da interleucina 8 humana
IL-10	Interleucina 10
IL-33	Interleucina 33
i.p.	Via intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer

LPTs	Proteínas transferidoras de lipídeos
kD	Kilodalton
kg	Quilograma
mg	Miligrama
µL	Microlitros
McLTP1	Proteína transferidora de lipídeos isolada da semente de <i>Morinda citrifolia</i>
ml	Mililitro
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de Diferenciação Mieloide 88
NO	Óxido Nítrico
NPC	7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)-carboniloxicamptotecina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
NRL	Receptores do tipo NOD
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
p	Nível de significância
PBS	Tampão Fosfato Salina
pg	Picograma
PGE2	Prostaglandina E2
rpm	Rotações por Minuto
SN-38	7-etil-10-hidroxiamptotencina
SN-38G	7-etil-10-hidroxiamptotencina glicuronídeo
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento beta
TGI	Trato gastrointestinal
TLR2	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 2
TLR4	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 4
TLR9	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 9
TLRs	Receptores do tipo toll-like
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará

UGT1A1 Polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase  
1

UMPO Unidade de Mieloperoxida

de

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
1.1	Câncer	18
1.1.1	Câncer Colorretal	18
1.1.2	Tratamento do câncer colorretal	20
1.2	Cloridrato de irinotecano (CPT-11) (farmacocinética, mecanismo de ação e efeitos colaterais)	21
1.3	Mucosite intestinal (definição, classificação e tratamento)	24
1.4	Mucosite intestinal induzida por irinotecano	27
1.5	Proteínas como ferramentas farmacológicas	30
1.6	<i>Morinda citrifolia L.</i>	34
1.7	Proteína transferidora de lipídeos da <i>Morinda citrifolia L.</i> (McLTP1)	39
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	43
3	<b>OBJETIVOS</b>	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
4.1	Extração e fracionamento das proteínas isoladas das sementes de <i>Morinda citrifolia L.</i> (McLTP1)	46
4.2	Animais experimentais	46
4.3	Indução da Mucosite Intestinal	47
4.4	Grupos experimentais e protocolos de tratamento	47
4.5	Parâmetros Avaliados	48
4.5.1	Curva Ponderal	48

4.5.2	Análise de sobrevida	48
4.5.3	Avaliação do perfil hematológico: Leucócitos totais	49
4.5.4	Comprimento intestinal	49
4.5.5	Avaliação da Diarreia	49
4.5.6	Análise histopatológica e morfométrica do intestino	50
4.5.7	Avaliação sobre a contratilidade intestinal in vitro	51
4.6	Avaliação do processo inflamatório	52
4.6.1	Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)	52
4.6.2	Quantificação de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, TGF- $\beta$ e IL-10 no intestino	53
4.6.3	Imunohistoquímica para iNOS, COX-2 e NF-Kb	54
4.7	Avaliação da participação do estresse oxidativo no efeito anti-inflamatório de McLTP1	55
4.7.1	Quantificação dos níveis de MDA (malonaldeído)	55
4.7.2	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)	56
4.7.3	Determinação dos níveis de nitrito (NO)	57
4.8	Análise estatística	58
5	<b>RESULTADOS</b>	59
5.1	McLTP1 não altera a curva ponderal de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	59
5.2	McLTP1 aumenta a sobrevida de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	60
5.3	McLTP1 previne leucopenia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	61
5.4	McLTP1 previne a redução do comprimento intestinal em	62

	animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	
5.5	McLTP1 reduz o grau diarreia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11	63
5.6	McLTP1 reduz o aumento da contratilidade duodenal induzida por CPT-11 ex vivo	65
5.7	McLTP1 reduz as alterações morfológicas duodenais induzidas por CPT-11	66
5.8	Efeito da McLTP1 sobre a resposta inflamatórias na MI induzida pelo CPT-11	69
5.8.1	McLTP1 reduz a atividade da mieloperoxidase	69
5.8.2	McLTP1 reduz os níveis de mediadores inflamatórios (citocinas e fator de crescimento)	70
5.8.3	McLTP1 reduz a imunomarcção de mediadores inflamatórios (COX-2, NFκB e iNOS)	72
5.9	McLTP1 modula o estresse oxidativo	77
6	<b>DISCUSSÃO</b>	78
7	<b>CONCLUSÃO</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS</b>	88
	<b>ANEXOS</b>	
		100

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Câncer**

Atualmente, o câncer é uma das doenças mais temidas pela população, sendo bastante relacionada a sofrimento, dor e mortalidade. Existem mais de 100 tipos de câncer e essa doença se apresenta como uma enfermidade multicausal crônica caracterizada pelo crescimento rápido, agressivo e descontrolado de células diferenciadas que podem invadir tecidos e órgãos próximos ou distantes. O câncer é o resultado da interação entre condições ambientais e endógenas e seus fatores de risco podem ser herdados ou encontrados no ambiente, por exemplo, tabagismo, obesidade, exposição a alguns tipos de vírus e bactérias, além do contato frequente com substâncias carcinogênicas (GARÓFOLO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005).

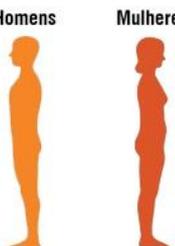
Segundo o INCA para o biênio 2018-2019, surgirão cerca de 600 mil casos novos de câncer em cada ano no Brasil. Essa estimativa mostra que os cânceres de próstata (68.220 casos novos), mama feminina (59.700 casos novos) e cólon e reto (36.360 casos novos) estarão entre os mais incidentes, mas também apresenta altas taxas de incidência para os cânceres de pulmão (31.270 casos novos), estômago (21.290 casos novos), colo do útero (16.370 casos novos), cavidade oral (14.700 casos novos), sistema nervoso central (11.320 casos novos), esôfago (10.970 casos novos) e leucemias (10.800 casos novos).

#### **1.1.1. Câncer colorretal**

O câncer colorretal é o segundo mais incidente em mulheres com uma estimativa de 18.980 casos novos em 2018 e o terceiro mais incidente nos homens com uma estimativa de 17.380 casos novos (FIGURA 1). O câncer colorretal abrange tumores que acometem algum segmento do intestino grosso. Pode ser tratável e curável se for detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. O início da maioria desses tumores ocorre a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede

interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenção para o aparecimento desse tipo de tumor seria a detecção e a remoção dos pólipos precocemente antes que se tornem malignos. No ano de 2013 o número de mortes causadas por esse tipo de câncer chegou a 15.415 casos, sendo 7.387 homens e 8.024 mulheres (INCA, 2018).

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

\* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Ministério da Saúde (2018).

Indivíduos com histórico familiar de câncer colorretal têm um risco significativamente elevado de desenvolver a doença quando comparados à pessoas que não possuem casos na família. Além disso, grande parte dos casos diagnosticados em pacientes jovens apresentam maior agressividade. No entanto, a agressividade da doença não depende apenas da idade do paciente, mas também do estágio de desenvolvimento, do local do tumor, das comorbidades já existentes e do tipo de tratamento. Para um melhor prognóstico o ideal é que seja feito um diagnóstico precoce que detecte o tumor no seu estágio inicial, antes que ocorram metastáses, aumentando as chances de cura do paciente (SIMMONDS, 2000; JOHNS, HOUSTON, 2001; POPAT, HUBNER, HOULSTON, 2005).

Aproximadamente 25% dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal já apresentam metástase e mesmo nos pacientes com diagnóstico precoce a incidência de metástase ocorre em torno de 40 a 50%. Pacientes com câncer colorretal metastático tem um prognóstico ruim com tempo médio de sobrevivência descrito de até 30 meses (CUTSEM et al., 2009).

### 1.1.2. Tratamento do câncer colorretal

De acordo com a Portaria Nº 958, de 26 de setembro de 2014, que aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Cólon e Reto, o tratamento padrão para o câncer de cólon localizado é feito através da remoção cirúrgica. No entanto, quando a doença encontra-se em um estágio mais avançado e com presença de metástase também não se faz a remoção cirúrgica apenas esquemas terapêuticos de quimioterápicos. O início do tratamento adjuvante deve ocorrer entre 4 e 6 semanas após à cirurgia, evidências mostrando que essa combinação traz ganhos em termos de sobrevida. Também pode ser realizada a quimioterapia antes da remoção cirúrgica associada à radioterapia em pacientes com câncer retal localizado e em casos selecionados também metastáticos. Para pacientes com câncer colorretal recidivado inoperável a quimioterapia paliativa pode ser indicada a critério médico.

Para o tratamento do câncer colorretal metastático umas das principais escolhas adotada é a quimioterapia antineoplásica. O primeiro antineoplásico utilizado para esse tratamento foi o 5-fluorouracila (5-FU), sendo utilizado por mais de 40 anos como tratamento padrão. Na década de 80 esse medicamento passou a ser utilizado em combinação com leucovorin, aumentando a sobrevida do paciente em até 14 meses (SALTZ *et al.*, 2001; TONON, SECOLI, CAPONERO, 2007).

Na década de 90 surgiu uma nova droga no mercado farmacêutico chamada irinotecano (Camptosar®), sendo indicada inicialmente como monoterapia para o tratamento do câncer colorretal não responsivo ao 5-FU ou em casos de recidivas. Após alguns anos o irinotecano passou a ser utilizado em associação com o 5-FU e leucovorin (FOLFIRI), melhorando a sobrevida dos pacientes quando comparado ao tratamento padrão da época. No mesmo período surgiu outra droga chamada oxaliplatina (Eloxatin®), derivado da platina, que passou a ser utilizada em associação com 5-FU e leucovorin (FOLFOX) ou em associação com 5-FU, leucovorin e irinotecano (FOLFOXIRI). Nos anos 2000 foi introduzida mais uma droga, capecitabina (Xeloda®), um pró

fármaco oral do 5-FU que apresentou vantagem em relação ao 5-FU, já que era utilizado por via oral e não necessitava de infusões contínuas. Essa droga também passou a ser utilizada em associação com a oxaliplatina (XELOX) (FAKIH, 2015; HIRSCH, ZAFAR, 2011; TONON, SECOLI, CAPONERO, 2007).

Além dos agentes citotóxicos como as fluorpirimidinas, irinotecano e oxaliplatina, também existem alternativas farmacológicas como anticorpos que agem contra alvos específicos e importantes para o desenvolvimento do câncer e podem ser associados a essas drogas já utilizadas, com o intuito de inibir o crescimento dos tumores e diminuir a resistência aos outros antineoplásicos, aumentando assim a sobrevida dos pacientes. Temos como exemplos desses novos fármacos utilizados contra o câncer colorretal: o bevacizumabe (Avastin®), anticorpo monoclonal contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); o cetuximabe (Erbix®), anticorpo monoclonal contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); panitumumabe (Vectibix®), anticorpo monoclonal totalmente humano contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); regorafenibe (Stivarga®), inibidor da tirosina quinase; ziv-aflibercepte (Zaltrap®), proteína de fusão recombinante anti-VEGF; ramucirumabe (Cyramza®), um anticorpo monoclonal humano contra o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (HAN VAN KRIEKEN *et al.*, 2017; LEE, SUN, 2016; FAKIH, 2015; FOUBERT, MATYSIAK-BUDNIK, TOUCHÉFEU, 2014; CUTSEM *et al.*, 2009; JONKER *et al.*, 2007).

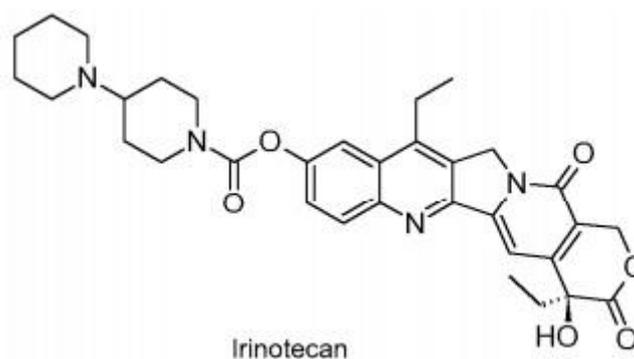
Diante de tantas alternativas terapêuticas inovadoras, o irinotecano ainda é um medicamento antitumoral importante para o tratamento do câncer colorretal metastático. Quando combinado com 5-fluorouracila, oxaliplatina e um fármaco com alvo molecular, pode aumentar a sobrevida do paciente em mais de 30 meses (FUJITA *et al.*, 2015).

## **1.2. Cloridrato de irinotecano (CPT-11) (farmacocinética, mecanismo de ação e efeitos colaterais)**

Irinotecano é um derivado semissintético da camptotecina encontrada na *Camptotheca acuminata*, uma planta nativa da China e Tibete que atua

como inibidor da topoisomerase I (Figura 2). A topoisomerase I é uma enzima com papel fundamental na estabilização de complexos clivados do DNA, mantendo a estrutura do DNA durante a transcrição gênica e duplicação do DNA. Quando o irinotecano inibe essa enzima ocorre a quebra irreparável da dupla fita de DNA e 8 paralisa o ciclo celular, que desencadeia a cascata apoptótica e resulta em morte celular (FUCHS, MITCHELL, HOFF, 2006; GOVINDARAJAN, 2002).

**Figura 2: Estrutura do irinotecano.**



Fonte: MARTINO *et al.*, 2017.

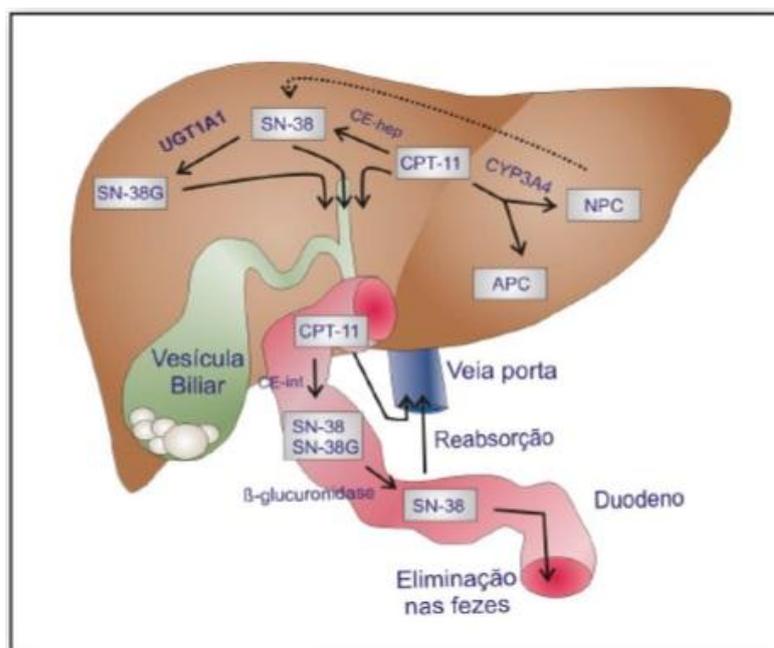
O irinotecano começou a ser comercializado em 1994 no Japão, sendo indicado inicialmente para o tratamento de câncer de pulmão, colo de útero e ovário. Em 1996 nos Estados Unidos foi aprovado para ser utilizado no tratamento de câncer colorretal metastático refratário ao 5-fluorouracila (5-FU), pouco tempo depois foi aprovado também para ser utilizado em combinação com 5-FU e leucovorin como tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático. Atualmente, a monoterapia com irinotecano é utilizada como tratamento de segunda ou terceira linha para o câncer colorretal metastático. Estudos de fase II no Japão, Europa e Estados Unidos já demonstraram que a monoterapia com irinotecano resultou em diminuição tumoral e proporcionou a estabilização da doença em até 60% dos pacientes. Além disso, outro estudo de fase III demonstrou aumento na sobrevida dos pacientes (CUNNINGHAM *et al.*, 2001).

O irinotecano é classificado como um pró-fármaco, sendo convertido em seu metabólito ativo SN-38 quando metabolizado por carboxilesterases

encontradas principalmente no soro, fígado e intestino delgado. O SN-38 atua inibindo a replicação do DNA nas células cancerígenas, levando à morte celular. Esse metabólito é 1000 vezes mais potente que a droga parental, sendo apontado como o responsável pela eficácia e toxicidade da droga. (YAMAMOTO *et al.*, 2008; VE'NAT-BOUVET, 2007; FUCHS, MITCHELL, HOFF, 2006).

O SN-38 é inativado por ação do polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1) e resulta no SN-38 glicuronídeo (SN-38G), o qual é eliminado principalmente através da bile. Acredita-se que glicuronidação do SN-38 pode ser protetora contra a toxicidade induzida por irinotecano que provoca principalmente diarreia e mielossupressão. Ao ser excretado no intestino através da bile, o SN-38G é convertido novamente em SN-38 pelas  $\beta$ -glucuronidases das bactérias encontradas no intestino, levando a uma maior exposição desse metabólito sobre as células epiteliais intestinais. A meia-vida média de eliminação do CPT-11 é cerca de 6 horas, enquanto a meia-vida média de eliminação do SN38 é cerca de 10 horas (Figura 3) (YAMAMOTO *et al.*, 2008; IYER *et al.*, 2002; MATHIJSEN *et al.*, 2001).

**Figura 3: Metabolização do irinotecano.**



Legenda: No fígado a enzima CYP3A4 atua sobre o irinotecano (CPT-11), gerando dois compostos inativos o APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e o NPC (7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)-carboniloxicamptotecina). O NPC é metabolizado pela enzima carboxilesterase (CE) no metabólito ativo e tóxico SN-38. O SN-38 é depurado no fígado por meio do polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando o metabólito não-tóxico SN-38 glicuronídeo (SN-38G), que não possui atividade biológica. O irinotecano, SN-38 e SN-38G são excretados na bile e chegam no intestino delgado, onde o irinotecano é clivado pela CE intestinal, formando novamente o SN-38. Devido aos microorganismos presentes no intestino, o SN-38G pode sofrer desconjugação por bactérias produtoras de  $\beta$ -glucuronidase, sendo convertido novamente em SN-38.

Fonte: Ribeiro, R.A. Concurso para provimento ao cargo de professor titular de Farmacologia Geral, 2011.

A exposição prolongada do SN-38 no intestino provoca danos na mucosa intestinal e favorece o aparecimento da toxicidade do irinotecano. No tratamento os pacientes podem receber vários ciclos de irinotecano na dose de 300-350 mg/m<sup>2</sup>, a cada 3 semanas essa dose pode ser escalonada e o número de ciclos aumentados de acordo com a resposta do paciente. Os efeitos colaterais mais frequentes relatados por pacientes tratados com esse quimioterápico são diarreia e náusea. Também pode ser observada nesses pacientes uma neutropenia grave. Esses efeitos tóxicos prejudicam a qualidade de vida do pacientes e se tornam fator limitante para a continuação do tratamento e podem levar à redução da dose ou até mesmo à interrupção da terapia, favorecendo o desenvolvimento do câncer (FUJITA *et al.*, 2015; YCHOU *et al.*, 2002; CUNNINGHAM *et al.*, 2001).

### **1.3. Mucosite intestinal (definição, classificação e tratamento)**

Mucosite intestinal (MI) é definida como a presença de lesões inflamatórias e/ou ulcerativas na mucosa do trato gastrointestinal. Pode ser causada por uma doença infecciosa, baixa imunidade ou por medicamentos como os quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer. Para avaliar o grau da MI há um número limitado de instrumentos disponíveis. Geralmente, a

avaliação da MI desenvolvida pelo paciente que recebeu o quimioterápico é classificada de maneira indireta através do grau de diarreia apresentado pelo paciente (PETERSON, BENSADOUN, ROILA, 2011).

A MI pode aparecer no início ou após o tratamento com quimioterápicos, sendo um dos efeitos colaterais mais prevalentes na terapia contra o câncer. Cerca de 50-60% dos pacientes submetidos à quimioterapia apresentam MI em graus variados, o grau depende da dose, esquema terapêutico escolhido, predisposição genética, entre outros. O aparecimento da MI nos pacientes é associado não só à diarreia, mas também à presença de dor, náusea, vômito, constipação, anorexia, desidratação, inchaço abdominal, ulcerações intestinais, infecções locais no intestino e sistêmicas agravadas pela imunossupressão causada pela quimioterapia (GERHARD *et al.*, 2017; MIRANDA, SOUZA, 2015).

A MI causada pela quimioterapia provoca danos na mucosa intestinal, resultando em inflamação, perda da arquitetura do epitélio intestinal e necrose, que acarretam um desequilíbrio entre a absorção e secreção no intestino, resultando na diarreia. A diarreia apresentada pelos pacientes após a quimioterapia pode causar distúrbios eletrolíticos, o paciente pode evoluir para um quadro de desnutrição, desidratação, chegando à necessidade de internação por comprometimento cardiovascular e possibilidade de óbito (STEIN, VOIGT, JORDAN, 2010).

O *National Cancer Institute* (NCI) (2017) publicou uma escala utilizada para avaliar e classificar o grau de diarreia apresentado pelos pacientes após a quimioterapia. Essa escala varia de 1 a 5, onde quanto maior o escore maior a intensidade da diarreia: Grau 1, número de evacuações menor que 4 vezes por dia; Grau 2, número de evacuações variando de quatro a seis vezes por dia, provável necessidade de hidratação; Grau 3, número de evacuações maior que sete vezes por dia, presença de incontinência, necessidade de hidratação e provável necessidade de internação; Grau 4, risco de vida, necessitando de internação hospitalar urgente; Grau 5, óbito.

Dentre os quimioterápicos que podem provocar diarreia grave está o irinotecano, 5-FU e capecitabina, muito utilizados para o tratamento do câncer colorretal. A presença da diarreia nos pacientes acarreta um aumento do custo do tratamento com os cuidados e redução da qualidade de vida, também se torna motivo para atrasar ou interromper a quimioterapia, levando a um impacto negativo na eficácia do tratamento (KNOW, 2015; KOSELKE, 2012).

A diarreia ocasionada pelo irinotecano pode ocorrer em duas fases: a precoce e a tardia. A precoce ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes e aparece em até 24 horas após a administração do quimioterápico, depende da dose e se manifesta através da ativação da via parassimpática que produz a síndrome colinérgica através da inibição da acetilcolinesterase pelo irinotecano. São observados efeitos colinérgicos tais como lacrimação, salivação, aumento da motilidade intestinal e dores abdominais, esses efeitos são controlados usando a atropina. Já a tardia, ocorre na maioria dos pacientes e aparece cerca de 6 dias após o início da quimioterapia, esse tipo de diarreia é de origem multifatorial, tais como, distúrbios na motilidade, alterações na absorção de fluidos e eletrólitos, disfunção motora intestinal e inflamação na mucosa que reveste o trato gastrointestinal. Para o controle desse tipo de diarreia é feito apenas o manejo clínico, utilizando medidas de suporte que apresentam eficácia limitada (RIBEIRO et al., 2016; STEIN, VOIGT, JORDAN, 2010).

O manejo clínico adequado para a diarreia tardia pode melhorar de maneira significativa a adesão dos pacientes ao tratamento. Pesquisas sobre possíveis ferramentas farmacológicas para esse efeito colateral da quimioterapia vem sendo investigadas nos últimos anos, mostrando grande interesse em proporcionar aos pacientes uma melhor qualidade de vida e continuação do tratamento (FUCHS, MITCHELL, HOFF, 2006).

Atualmente, o tratamento da diarreia causada pelo irinotecano é apenas sintomático. Para esse manejo terapêutico são usados medicamentos e algumas ferramentas não farmacológicas, por exemplo, a reidratação oral e ingestão de alimentos que induzam a constipação intestinal. São exemplos de fármacos utilizados: loperamida, octreótida, probióticos e antibióticos. A loperamida, derivado opiáceo, é a droga de escolha como antidiarreico,

atuando na diminuição do peristaltismo e no aumento da reabsorção de líquidos. Octreótide um análogo da somatostatina que regula o transporte de fluidos e eletrólitos no intestino, reduzindo as secreções intestinais. Probióticos são micro-organismos não-patogênicos que fornecem uma barreira física que protege a mucosa intestinal contra bactérias e carcinógenos, contudo é necessário cautela quando usados em imunodeprimidos, pois podem se tornar fonte de infecção para o paciente. Antibióticos são úteis na prevenção de infecções, já que o paciente apresenta neutropenia e um processo inflamatório intestinal que favorece a translocação bacteriana e a contaminação com patógenos oportunistas. Também existem outras alternativas como corticóides, no entanto mesmo diante dessas alternativas ainda não existe um tratamento totalmente eficaz para a diarreia grave provocada pela quimioterapia (GERHARD *et al.*, 2017; KOSELKE, 2012).

#### **1.4. Modelo experimental de mucosite intestinal induzida por irinotecano**

Diante da falta de um tratamento eficaz para a mucosite intestinal e seus sintomas, principalmente a diarreia, grupos de pesquisa vem desenvolvendo estudos em animais com o intuito de elucidar a fisiopatologia e os mecanismo pelos quais ocorre a mucosite intestinal induzida por irinotecano a fim de buscar ferramentas farmacológicas eficazes como tratamento desse efeito colateral, mas sem prejuízo no efeito da quimioterapia. Dentre esses grupos de pesquisa se destaca o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) que vem contribuindo de forma significativa com estudos direcionados aos efeitos colaterais provocados pela quimioterapia no tratamento do câncer. Como resultado desta linha de pesquisa o LAFICA tem estudado os mecanismos envolvidos nos modelos experimentais de mucosite intestinal (FERNANDES *et al.* 2018; ALENCAR *et al.* 2016; FREITAS, 2016; PEREIRA *et al.* 2016; WONG *et al.* 2015; LIMA-JUNIOR *et al.* 2014; LIMA-JUNIOR *et al.* 2012; MELO *et al.* 2008), mucosite oral (BARBOSA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.* 2008) esteato-hepatite (MARCOLINO *et al.* 2017; COSTA *et al.* 2014), cistite hemorrágica (DORNELAS-FILHO *et al.* 2018; LEITE *et al.* 2015; MACEDO *et*

*al.*, 2012) e neuropatia periférica (PEREIRA *et al.* 2018; AZEVEDO *et al.*, 2013) induzidos pelos quimioterápicos.

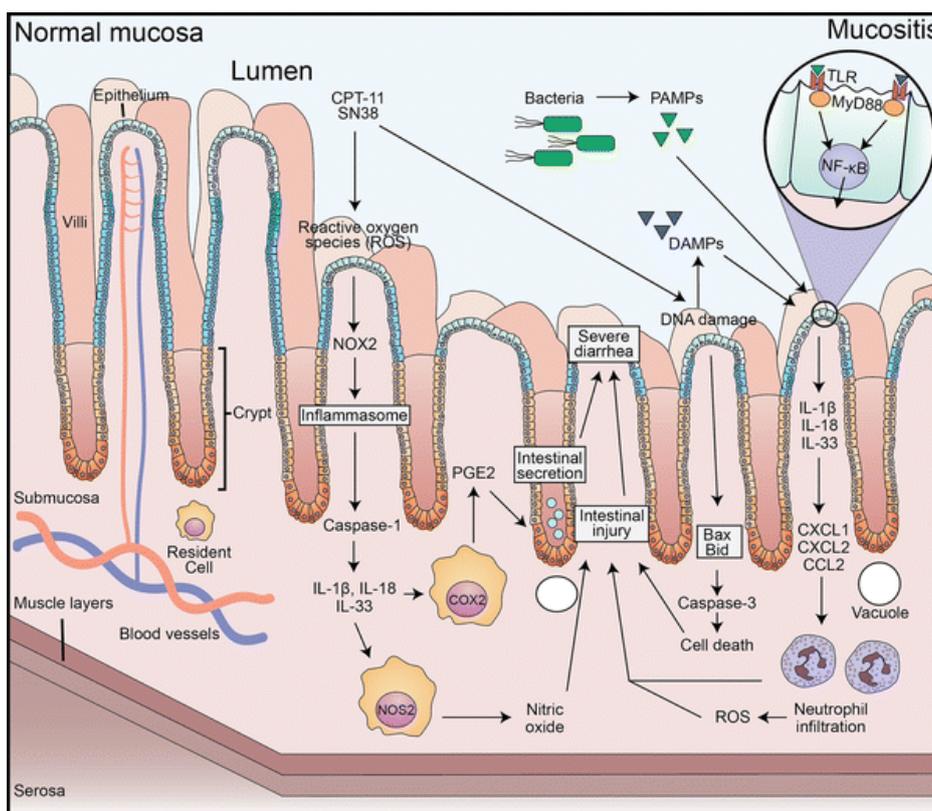
O primeiro trabalho com o modelo animal de mucosite intestinal adaptado e padronizado pelo LAFICA mostrou que o irinotecano (CPT-11) causou diarreia, alterações histopatológicas (infiltração de células inflamatórias, perda da arquitetura das criptas e encurtamento das vilosidades) e aumento da atividade da MPO, níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC no tecido intestinal. Enquanto o tratamento com pentoxifilina inibiu a diarreia tardia, reduziu o dano histopatológico, a atividade intestinal de MPO, o nível tecidual de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC e a imunomarcção para TNF- $\alpha$  de camundongos submetidos à mucosite intestinal experimental (MELO *et al.* 2008).

No trabalho de Trifan e colaboradores (2002) foi demonstrado que no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos ocorre o aumento da COX-2 e de prostaglandinas (PG) no intestino, além da presença de infiltrados inflamatórios e dano na mucosa intestinal. LIMA-JUNIOR e colaboradores (2012) mostraram a participação do óxido nítrico na mucosite intestinal. Na presença de um inibidor da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) ou a ausência do gene da iNOS reduziu a atividade de MPO, a hipercontratilidade do músculo liso, diarreia e o dano intestinal. LIMA-JUNIOR e colaboradores (2014) também demonstraram que a IL-18 e caspase 1 apresentam papel importante no desenvolvimento da mucosite, pois na presença de inibidor ou através da sua deleção gênica ocorre a prevenção da diarreia, do aumento da atividade de MPO e da imunomarcção para iNOS. Diante desses achados é possível também relacionar o desenvolvimento da inflamação na mucosite com a presença de espécies reativas de oxigênio que podem ativar caspase-1 que cliva a pró-IL-1 e pró-IL-18 em suas formas funcionais (ARIFA *et al.*, 2014).

Além disso, foi demonstrado que a IL-33, citocina inflamatória, tem papel importante no desenvolvimento da mucosite. A inibição da IL-33 ou o bloqueio do seu receptor melhora os parâmetros inflamatórios e o dano nas células intestinais (GUABIRABA *et al.*, 2014).

Adicionalmente, WONG e colaboradores (2015) investigaram o papel da proteína adaptadora MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88) que participa da via de sinalização dos receptores toll like 2 (TLR2) e toll like 9 (TLR9), os quais possuem capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Os resultados obtidos desse trabalho mostram que na ausência dos genes para TLR2 e MyD88 os animais apresentaram menor dano intestinal e diminuição da expressão de marcadores inflamatórios, como NF $\kappa$ B, IL-1, IL-18 e COX-2, no entanto com a deleção gênica para TLR9 ocorre um agravamento da mucosite com maior acometimento intestinal. Nesse trabalho também foi observada a presença de translocação bacteriana sistêmica e hepática nos animais tratados com irinotecano, sinalizando o envolvimento de PAMPs (FIGURA 4).

**Figura 4 - Desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.**



Fonte: Ribeiro *et al.*, 2016.

## 1.5. Proteínas com potencial farmacológico

Proteínas são moléculas compostas de longas cadeias de aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas. As proteínas desempenham importantes funções nas células e apresentam potenciais usos terapêuticos na prevenção e cura de várias doenças. A partir delas já foram desenvolvidos diversos produtos biológicos com diferentes indicações: para distúrbios metabólicos ou endócrinos, para estimular respostas imunes do corpo, para inibir o funcionamento de moléculas, vacinas e até mesmo usados para fins de diagnóstico (AKASH *et al.*, 2015; NAYAK 2010).

A natureza e a função de uma proteína são direcionadas pela sua sequência de aminoácidos que determina sua conformação tridimensional ou estrutura. As ligações internas (pontes dissulfeto e pontes de hidrogênio) entre os aminoácidos dão forma e formato para as proteínas e desempenham papéis críticos na biologia celular. Essas moléculas apresentam potenciais usos terapêuticos na prevenção e cura de doenças e desordens (THOMAS 2002).

As proteínas com potencial terapêutico apresentam diversas vantagens, são altamente específicas, complexas e não podem ser imitadas por compostos químicos simples. Apresentam baixa interferência com os processos biológicos normais ocasionando menos efeitos adversos e são frequentemente bem toleradas pelo organismo. Também podem proporcionar um tratamento eficaz de substituição para as doenças em que um gene está mutado ou inexistente (LEADER *et al.*, 2008).

A L-asparaginase é um exemplo de proteína com aplicação terapêutica. L-asparaginase é uma enzima encontrada em diferentes microrganismos, vegetais e alguns animais. É utilizada na indústria farmacêutica como alternativa para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como leucemia linfoblástica aguda e linfomas de Hodgkin. Atualmente, a produção dessa enzima baseia-se principalmente na produção biotecnológica, utilizando algumas bactérias como *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, a enzima obtida a partir de microrganismos procarióticos pode apresentar hipersensibilidade e inativação imunológica. A produção industrial de L-

asparaginase apresenta alguns desafios, como a busca por novos microrganismos capazes de produzi-los com menos efeitos adversos. Dentro desse contexto, microrganismos eucarióticos como fungos filamentosos e leveduras têm sido investigados para a produção dessas enzimas, devido à melhor compatibilidade com o sistema imunológico humano (CACHUMBA *et al.*, 2016; EL-NAGGA, EL-EWASY, EL-SHWEIHY, 2014).

Desde 2011, o Centro de Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (CDER) e o Centro de Avaliação e Revisão de Biologia (CBER) já aprovaram cerca de 62 proteínas terapêuticas recombinantes. Destas 62 proteínas terapêuticas, 48% eram anticorpos monoclonais, 19% eram fatores de coagulação e 11% eram enzimas, os 22% restantes incluem proteínas de fusão, hormônios, fatores de crescimento e proteínas plasmáticas. As proteínas com finalidade terapêutica aprovadas pela FDA/EUA possuem indicação para uma grande variedade de áreas terapêuticas: hematologia (29%), oncologia (26%), musculoesqueléticas (8%), endocrinologia (6%), imunologia (6%), cardiologia/doença vascular (5%), dermatologia (3%), doenças infecciosas (3%), oftalmologia (3%), doença pulmonar/respiratória (3%), doenças genéticas (2%), nefrologia (2%), gastroenterologia (2%) e reumatologia (2%) (TABELA 1) (LAGASSE *et al.*, 2017).

**Tabela 1 – Proteínas terapêuticas aprovadas pelo CDER/EUA entre 2011 e 2013.**

Proteínas terapêuticas aprovadas pelo CDER (2011-2013)			
Data da aprovação	Droga (Nome comercial)	Classe	Área terapêutica (indicação)
1. 9/3/11	Belimumab (Benlysta)	Anticorpo anti-fator de ativação células B	Imunologia (Lupus)
2. 25/3/11	Ipilimumab (Yervoy)	Anticorpo anti-CTLA-4	Oncologia (Melanoma)

3. 19/8/11	Belatacept (Nulojix)	Proteína de fusão CTLA-4	Imunologia (Rejeição de transplante renal)
4. 18/11/11	Brentuximab vedotin (Adcetris)	Anticorpo anti-CD30	Oncologia (Linfoma)
5. 18/11/11	Aflibercept (Eylea)	Proteína de fusão VEGGR	Oftalmologia (Degenaração macular)
6. 17/1/11	Asparaginase Erwinia Chrysanthemi (Erwinaze)	Enzima	Oncologia (Leucemia)
7. 17/1/2012	Glucarpidase (Voraxaze)	Enzima	Nefrologia (Falência renal)
8. 1/5/12	Taliglucerase alfa (Elelyso)	Enzima	Endocrinologia/ Gastroenterologia (Desordem genética)
9. 8/6/2012	Pertuzumab (Perjeta)	Anticorpo anti- receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2)	Ginecologia/ Oncologia (Câncer)
10. 3/8/12	Ziv-Aflibercept (Zaltrap)	Proteína de fusão VEGGR	Oncologia (Câncer colorretal)
11. 29/8/12	TBO-Filgastrim (Granix)	Fator de crescimento	Oncologia (Neutropenia)
12. 17/10/12	Ocriplasmin (Jetrea)	Enzima	Oftalmologia

13. 14/12/12	Raxibacumab (Raxibacumab)	Anticorpo anti- antraz	Doenças infecciosas (Antraz)
14. 22/2/13	Ado-trastuzumab em tansine (Kadcyla)	Anticorpo anti- receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2)	Ginecologia/ Oncologia (Câncer)
15. 18/7/13	Golimumab (Simponi)	Anticorpo anti-TNF $\alpha$	Reumatologia (Artrite reumatóide)
16. 1/10/13	Tocilizumab (Actemra)	Anticorpo anti- receptor IL-6	Reumatologia (Artrite reumatóide)

Fonte: LAGASSE *et al.*, 2017.

Proteínas com baixo peso molecular apresentam a possibilidade de serem produzidas quimicamente, no entanto as que possuem um grande número de aminoácidos precisam ser produzidas usando células ou organismos. Após a produção, as proteínas devem passar por um processo de purificação e para selecionar o método de purificação adequado deve ser levado em consideração o rendimento, integridade estrutural, pureza, imunogenicidade e funcionalidade da proteína que será purificada. As condições de armazenamento também são importantes, pois mudanças de temperatura ou pH podem levar a processos como desnaturação, agregação ou precipitação, causando a desestabilização da estrutura e afetando sua atividade (AKASH *et al.*, 2015).

Para o desenvolvimento de formulações contendo proteínas são necessários estudos de pré-formulação que incluem a caracterização físico-química, solubilidade, estabilidade, determinação do pH e seleção de excipientes farmacêuticos. Todos esses fatores devem ser considerados na formulação, a fim de prevenir ou minimizar a degradação física e química da

proteína. Para melhorar a estabilidade dessas formulações podem ser feitas modificações químicas e físicas, assim como a utilização de polímeros que mantenham sua integridade. As formulações farmacêuticas devem ser pensadas de modo a preservar as atividades biológicas, promover uma vida de prateleira aceitável e permitir um transporte eficaz e seguro (NAYAK 2010).

As vantagens dessa potencial opção terapêutica vêm motivando o aumento de estratégias para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas. No entanto, ainda existem muitos desafios como a produção em larga escala, o baixo rendimento e o processo de purificação. São necessários métodos que simplifiquem o processo de purificação, a fim de tornar viável a produção em quantidades industriais rentáveis para sua aplicação comercial. Várias tecnologias estão sendo usadas para aumentar a estabilidade, o rendimento da produção e a pureza dessas novas drogas proteicas (LAGASSE *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2015).

Dentre essas tecnologias estão ganhando destaque sistemas de produção para proteínas terapêuticas como lipossomas, microesferas e nanopartículas. Também vem ganhando destaque a tecnologia do DNA recombinante, que permite a produção e comercialização de diversas proteínas terapêuticas recombinantes, objetivando um menor custo de produção e possibilitando um valor de venda viável para participação no mercado do setor farmacêutico, permitindo a produção de biofármacos (SHARMA *et al.*, 2014; PISAL, KOSLOSKI, BALU-IYER, 2012).

Atualmente, novos estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar o processo de produção e estabelecer novas formas de síntese enzimática.

#### **1.6. *Morinda citrifolia* L.**

*Morinda citrifolia* L. é uma árvore ou arbusto que pode atingir cerca de 3 a 6 m de altura e que pertence à família Rubiaceae. A planta é conhecida popularmente por Noni, Nonu, Ba Ji Tian, Indian Mulberry, Canary wood e Cheese fruit. Apresenta folhas verdes, brilhantes e ovais chegando até 30 cm

de comprimento, suas flores são brancas e seu fruto tem forma ovoide podendo atingir até 12 cm de comprimento. O fruto imaturo é duro e tem uma cor verde brilhante, quando amadurece, se torna mole, suculento e sua cor passa para amarelo ou branco translúcido. O fruto maduro apresenta como característica um odor desagradável semelhante ao de ácido butírico e possui muitas sementes. Essas sementes são flutuantes devido à presença de uma cavidade de ar e podem germinar mesmo após longos períodos de deriva no mar, o que pode explicar sua ampla distribuição nas ilhas do Pacífico (POTTERAT, HAMBURGUER, 2007) (FIGURA 5).

**Figura 5 - Aspectos gerais das partes de *Morinda citrifolia* L.**



Legenda: Aspectos gerais da planta *Morinda citrifolia* L. (A), Fruto maduro (B), Semente do noni (C).

Fonte: BARROS, 2009.

*Morinda citrifolia* L. é nativa do Sudeste Asiático e da Austrália, sendo cultivada também na Polinésia, Índia, Caribe, América do Norte, Sul e Central. De acordo com o uso popular existem relatos da utilização do noni para prevenção e cura de algumas enfermidades como o câncer, infecções, inflamações, artrite, diabetes, asma, hipertensão, dores musculares, fadiga, dificuldades menstruais, dores de cabeça, úlceras gástricas, má digestão, aterosclerose, problemas vasculares e para estimular o sistema imunológico (SILVA *et al.*, 2012; CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

O noni é utilizado principalmente na forma de suco feito a partir do fruto, esse suco é considerado um potencial antioxidante, pois o fruto é rico em vitamina C. Geralmente os frutos aparecem cerca de nove meses após o plantio e são compostos basicamente de água, fibras alimentares, proteínas, minerais e vitaminas. No entanto, também é possível usar as folhas, flores, casca e raízes para fins medicinais. Dentre os compostos fitoquímicos já descobertos nessa planta, já foram identificados compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2002).

Na literatura é possível encontrar diversas pesquisas demonstrando o potencial farmacológico do noni em suas diferentes partes (AHAMD, DAUD, ISMAIL, 2016). Já foi demonstrado que o extrato etanólico das folhas do noni pela via oral promove efeito cicatrizante em ratos através da contração da ferida e diminuição do tempo de epitelização (NAYAK, SANDIFORD, MAXWELL, 2007). O extrato das folhas também demonstrou efeito benéfico contra a osteoporose, aumentando a formação e mineralização óssea (WATTANATHOM *et al.*, 2018).

A partir do fruto podem ser feitas preparações tais como o suco, além do consumo da própria fruta, Basar e colaboradores (2010) mostraram que um preparado dos frutos do noni quando administrado pelo via oral em ratos apresentou efeito analgésico e anti-inflamatório, reduzindo a destruição das articulações que ocorre na artrite.

O suco feito da fruta de Noni é a preparação mais utilizada pela população para o tratamento de diferentes enfermidades. Já foi demonstrado que o suco apresenta efeito antioxidante e anti-inflamatório, inibindo diretamente a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E2 (PGE2) (DUSSOSOY *et al.*, 2011). O consumo diário de suco do noni demonstrou grande potencial na regulação dos níveis elevados de açúcar no sangue e de outros parâmetros patológicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (ALGENSTAEDT, STUMPENHAGEN, WESTENDORF, 2018). O suco também apresentou atividade hipolipidemiante, levando uma diminuição do colesterol total, triglicerídeos e LDL em ratos com hiperlipidemia (SHOEB *et al.*, 2016).

Outro efeito relatado do suco está relacionado ao câncer de mama, em que o suco foi capaz de prevenir o estágio de iniciação da carcinogênese química, sugerindo seu papel na prevenção do câncer (WANG, SU, 2001). Estudos também relatam que um preparado à base do suco da fruta apresentou atividade anticancerígena e moduladora do sistema imunológico em camundongos, ajudando na diminuição de tumores quando associado a quimioterápicos como 5-fluorouracil, cisplatina e vincristina (TORRES *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2002).

Apesar de todos os resultados promissores com o noni citados anteriormente, também existem alguns relatos de toxicidade devido ao seu uso indiscriminado. Shalan, Mustapha e Mohamed (2017) mostraram que o consumo crônico do fruto de *Morinda citrifolia* em altas doses pode causar hepatotoxicidade, perda de peso e eventual mortalidade, no entanto o consumo crônico do extrato aquoso das folhas não produziu efeitos tóxicos observáveis.

Stadlbauer e colaboradores (2005) relataram dois casos de hepatotoxicidade relacionados ao suco do noni. No primeiro caso um homem de 29 anos com diagnóstico de hepatite tóxica prévia associada ao consumo de paracetamol desenvolveu insuficiência hepática subaguda após consumo de cerca de 1,5 litros de suco por 3 semanas, resultando na necessidade de transplante hepático. No segundo caso, uma mulher de 62 anos sem evidência de doença hepática prévia desenvolveu um quadro de hepatite aguda após consumo de 2 litros de suco por mais de 3 meses. Após esses dois relatos, acredita-se que os componentes hepatotóxicos mais prováveis da *Morinda citrifolia* seriam as antraquinonas (LI *et al.*, 2004).

Milloning, Stadlmann e Vogel (2005) também relataram o caso de um paciente de 45 anos que apresentou aumento nas transaminases hepáticas, sem evidência de nenhuma outra doença, apenas relatando o consumo do suco diariamente por três semanas. Após a recomendação de suspender a ingestão do suco os exames se normalizaram. Caso semelhante também ocorreu com uma jovem de 24 anos que tomou diariamente o suco durante quatro semanas e apresentou aumento das transaminases e bilirrubina com

suspeita de insuficiência hepática aguda. Com a interrupção da ingestão do suco as transaminases normalizaram em um mês (YUCE *et al.*, 2006).

Simulando o consumo crônico, West, Ju e Jensen (2009) mostraram que durante os testes de hepatotoxicidade o suco da fruta *in vitro* não diminuiu a viabilidade das células e no teste de toxicidade oral subcrônica *in vivo* o consumo da fruta não provocou alterações histopatológicas nem alterou os marcadores hepáticos em ratos.

Diante de tantas evidências que comprovam o potencial terapêutico do noni, tornam-se válidas pesquisas com essa planta no intuito de identificar as substâncias responsáveis pelos efeitos tóxicos e isolar os princípios ativos com potencial atividade farmacológica, mas que tenham o mínimo ou nenhum efeito tóxico. Diante dessa promissora ferramenta terapêutica, o Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas do nosso grupo de pesquisa passou a investigar proteínas com atividade farmacológica isoladas da *Morinda citrifolia L.*, chegando ao isolamento e purificação de uma proteína transferidora de lipídeos (McLTP1).

### **1.7. Proteína transferidora de lipídeos da *Morinda citrifolia L.* (McLTP1)**

As proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) são amplamente distribuídas no reino vegetal e estão presentes em abundância nas plantas. As LTPs estão envolvidas na sinalização contra patógenos como bactérias e fungos. LTPs são encontrados em diferentes vegetais como pêssego, maçã, tomate, cenoura, cevada, milho, trigo, arroz, brócolis, cebola e são moléculas bastante estáveis, possuem resistência ao calor e à proteólise (AZOFRA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015; ASERO *et al.*, 2000).

As LTPs são pequenas proteínas vegetais com massa molecular abaixo de 10 kDa e com ponto isoelétrico básico variando entre 8.5 e 12. LTPs são divididas em duas famílias de acordo com seu peso molecular, sendo a primeira família denominada LTPs tipo 1 com massa molecular de

aproximadamente 9 kDa e cerca de 90 aminoácidos, incluindo a grande maioria dessas proteínas. A segunda família é denominada LTPs tipo 2 formada por proteínas com massa molecular de aproximadamente 7 kDa e cerca de 70 aminoácidos, incluindo um número menor de representantes como cereais e tomate. Essas proteínas contêm oito resíduos de cisteína formadoras de pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura, composta de um feixe de quatro a cinco  $\alpha$ -hélices, que formam uma cavidade hidrofóbica com capacidade de facilitar a troca de lipídeos entre membranas, por exemplo ácidos graxos e fosfolipídeos (XU *et al.*, 2018; ASERO *et al.*, 2017; DEEKEN *et al.*, 2016; SALMINEN, BLOMQUIST, EDQVIST, 2016, KADER, 1996).

CAMPOS e colaboradores (2016) purificaram pela primeira vez uma proteína transferidora de lipídeos da *Morinda citrifolia* L. a partir de suas sementes designada *McLTP1*. Foram utilizadas quatro etapas de purificação, apresentando como resultado o rendimento de 72 mg de *McLTP1* para 100g de sementes noni. Após a purificação, *McLTP1* exibiu massa molecular em torno de 9.4 kDa e sua sequência N-terminal (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) revelou um elevado grau de identidade com outras proteínas transferidoras de lípidos vegetais já relatadas. Além disso, esta proteína mostrou-se resistente a altas temperaturas, digestão com pepsina, tripsina e quimotripsina. *McLTP1* administrado intraperitonealmente (1, 2, 4 e 8 mg/kg) e oralmente (8 mg/kg) causou uma inibição da resposta de contorção induzida pelo ácido acético em camundongos. Também apresentou termoestabilidade, mantendo 100% de sua atividade antinociceptiva após 30 min de incubação a 80°C. O pré-tratamento de camundongos com *McLTP1* (8 mg/kg, i.p. e v.o.) também diminuiu as fases neurogênica e inflamatória da nocicepção no teste da formalina. A naloxona (2 mg/kg, i.p.), antagonista de receptores opioides, antagonizou o efeito antinociceptivo do *McLTP1*, sugerindo que as propriedades analgésicas desta proteína ocorrem pela via opioide e mostrando o efeito de uma proteína pela via oral.

CAMPOS e colaboradores (2017) investigaram os possíveis mecanismos da atividade anti-inflamatória de *McLTP1* relatadas anteriormente.

Na dose 8mg/kg pela via oral ou intraperitoneal em camundongos, *McLTP1* inibiu significativamente a migração celular em modelos experimentais de peritonite induzida por carragenina e a formação de edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Além disso, o *McLTP1* diminuiu os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e promoveu um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10. O tratamento com *McLTP1* em camundongos pela v.o. e i.p. foi capaz de reduzir os marcadores de lesão pancreática e lesão pulmonar associados à pancreatite, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios relatados de *McLTP1* podem estar relacionados à modulação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Em outro trabalho de Campos (2018) já foi desenvolvida uma formulação líquida na forma de suspensão com concentração de 8 mg/kg, a qual foi patenteada e demonstrou também efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em camundongos pela via oral (dados não publicados).

Em outro trabalho mais recente com *McLTP1*, SOUSA *et al.*, (2018) demonstraram sua atividade antibacteriana *in vitro* e no modelo de sepse com ligadura do ceco em camundongos (CLP). Os resultados revelaram que *McLTP* (12,5-800  $\mu$ g/mL) reduziu o crescimento e a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Também foi observada uma interação sinérgica entre *McLTP1* e oxacilina *contra* essas bactérias. *McLTP1* não apresentou efeito inibitório significativo contra bactérias Gram-negativas. Nos experimentos *in vivo* a sepse foi letal em 83% dos animais, enquanto 100% dos animais tratados com *McLTP1* (8 mg/kg) pelas vias intraperitoneal ou oral permaneceram vivos e apresentaram melhora dos parâmetros como perda de massa corporal, febre, leucocitose e dano aos órgãos, além de diminuir os níveis de citocinas inflamatórias séricas induzidas pelo quadro de sepse.

Em relação à estabilidade e toxicidade de *McLTP1*, COSTA (2016) avaliou em diferentes condições de armazenamento sua ação antinociceptiva em camundongos, além de avaliar a sua toxicidade pré-clínica utilizando como parâmetros os *guidelines* sugeridos pela *OECD* (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). O armazenamento de *McLTP1* por 1, 3 e 6 meses

a -20, 4 e 25 °C, protegida da incidência de luz, não foi capaz de promover alterações em sua aparência, suspendibilidade, estrutura secundária e atividade antinociceptiva, apresentando efeito estatisticamente igual ao observado com a proteína não-armazenada. No armazenamento de *McLTP1* sem proteção da luz foram observadas alterações na cor, mudanças significativas na suspendibilidade e o teor de proteínas foi significativamente reduzido e conseqüentemente seu efeito farmacológico. *McLTP1* foi capaz de manter seu efeito mesmo após 12 horas de administração, sendo observada uma redução significativa do número de contorções abdominais e proteína disponível na circulação sistêmica dos animais tratados, comprovada através de imunodeteção.

Baseado nesses achados que demonstram grande potencial terapêutico de *McLTP1*, Campos (2018) desenvolveu uma formulação líquida utilizando essa proteína como princípio ativo que administrada pela via oral em camundongos demonstrou atividades analgésica e anti-inflamatória, resultando na patente de uma formulação líquida com indicação para inflamação e dor (dados não publicados).

Também foi avaliado o potencial alergênico de *McLTP1* em camundongos. LUTIF (2015) mostrou que *McLTP1* apresentou potencial efeito alergênico *in silico* e induziu a síntese de anticorpos IgG e IgG1 em camundongos imunizados pela via oral. Da mesma maneira que outras LTPs já descritas, anticorpos anti-*McLTP1* produzidos em coelho foram também capazes de reconhecer proteínas presentes em extratos de Rosaceae, Cucurbitaceae e na polpa do fruto de noni. Os resultados observados nesse trabalho permitiram a caracterização parcial de *McLTP1*, além de avaliar o seu potencial imunogênico após administração oral. No entanto, novos testes deverão ser conduzidos com intuito de avaliar a importância clínica desses dados.

Nos testes de toxicidade de *McLTP1* em dose única (doses de 8 e 80 mg/kg) e repetidas (dose de 8 mg/kg) durante 28 dias, não foram observadas alterações no ganho de peso, consumo de ração, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos. Através da análise histológica foi mostrado que

a arquitetura de diversos órgãos também foi preservada e não foram observadas alterações na viabilidade celular em cultura de células HepG2/C3a no teste de citotoxicidade. *McLTP1* também não apresentou atividade citotóxica contra células tumorais de cólon humano (HCT-116), leucemia humano (HL-60) e glioblastoma humano (SF-295) testadas (COSTA, 2016; LUTIF, 2015).

NOGUEIRA (2018) mostrou os efeitos gastroprotetor e hepatoprotetor de *McLTP1*. A proteína foi capaz de reduzir significativamente em todas as doses testadas (4, 8 e 16 mg/kg) as lesões gástricas induzidas por etanol após 1h, com valor máximo de inibição de 84% na dose de 8 mg/kg nos tratamentos profilático e terapêutico. O pré-tratamento dos animais com N $\omega$ -nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) (20 mg/kg, i.p.), inibidor da síntese de óxido nítrico, antes do tratamento com *McLTP1*, foi capaz de reverter parcialmente o efeito gastroprotetor de *McLTP1*, mostrando que este pode estar relacionado à ativação da via do óxido nítrico (NO). *McLTP1* também foi capaz de reduzir a secreção gástrica em modelo de ligadura pilórica e reduzir significativamente os níveis de malonaldeído (MDA) e de aumentar significativamente os níveis de glutathiona reduzida (GSH), mostrando que essa proteína é capaz de inibir o estresse oxidativo que precede o desenvolvimento das lesões experimentais induzidas por etanol. Nos ensaios de lesão hepática induzida por paracetamol, *McLTP1* (8mg/kg v.o.) foi capaz de reduzir significativamente as alterações histopatológicas, diminuindo os níveis de AST e ALT em amostras de soro dos camundongos. Da mesma forma como observado no modelo de úlcera induzida por etanol, o tratamento dos animais com *McLTP1* foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA e de aumentar os níveis de GSH no modelo de lesão hepática.

Diante desses resultados que mostram o potencial terapêutico de *McLTP1* e da necessidade de opções farmacológicas para prevenção da toxicidade gastrointestinal da quimioterapia, surgiu o interesse de investigar o efeito dessa proteína na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos colaterais que surgem durante e após a quimioterapia continuam preocupando médicos e pacientes, mesmo com tratamentos modernos que apresentam grande eficácia e maior sobrevida. Atualmente, as abordagens e tratamentos disponíveis para grande parte desses efeitos adversos são ineficazes ou aumentam o risco do paciente desenvolver outros efeitos indesejáveis, aumentando assim seu desconforto. A toxicidade gastrointestinal da quimioterapia para o tratamento do câncer colorretal apresenta grande importância, pois limita a continuidade do tratamento e a qualidade de vida do paciente (LEE, RYAN, DOHERTY, 2014).

A mucosite intestinal induzida pela quimioterapia é um processo complexo e não dispõe de um tratamento eficaz e seguro para sua prevenção ou tratamento. A mucosite intestinal pode provocar dor, perda de peso, má absorção, diarreia, anorexia, anemia e ulcerações, prejudicando a qualidade de vida do paciente que já se encontra debilitado pelo câncer. Portanto, são necessárias novas estratégias que melhorem a tolerabilidade à quimioterapia e reduzam os efeitos colaterais, permitindo a continuidade do tratamento e aumento na sobrevida do paciente (NURGALI, JAGOE, ABALO, 2018, SONIS, 2004).

Diante disso é de grande interesse o por novos princípios ativos que possam inibir ou atenuar o desenvolvimento da mucosite intestinal, permitindo que os pacientes possam completar o tratamento quimioterápico proposto, sem maiores prejuízos.

Proteínas já são conhecidas por terem grande potencial terapêutico contra várias doenças e síndromes e apresentam participação crescente na indústria farmacêutica. Dentre as várias proteínas terapêuticas aprovadas pelo FDA estão inclusos anticorpos, vacinas, enzimas, citocinas naturais e recombinantes, que podem ser usados para fins de diagnóstico, profilaxia, controle de doenças e/ou cura (AKASHI *et al.*, 2015).

*Morinda citrifolia L.* tem sido reconhecida como uma importante espécie vegetal para o tratamento de diversas patologias em todo o mundo. Já existem estudos que comprovam suas ações cicatrizante (NAYAK, SANDIFORD, MAXWELL, 2007), anti-inflamatória, analgésica (BASAR *et al.*, 2010), anticancerígena (WU *et al.*, 2015; BROWN, 2012), antioxidante, (DUSSOSOY *et al.*, 2011), hipoglicemiante (ALGENSTAEDT *et al.*, 2018) hipolipidemiante (SOEB *et al.*, 2016), dentre outras, mostrando o potencial farmacológico dessa planta.

McLTP1 é uma proteína isolada da *Morinda citrifolia L.* e apresenta atividade antinociceptiva (CAMPOS *et al.*, 2016), anti-inflamatória (CAMPOS *et al.*, 2017) e antibacteriana (SOUZA *et al.*, 2018). Mostra-se bastante promissora por ser detentora de atividades farmacológicas importantes sem causar toxicidade, mesmo em doses elevadas (COSTA, 2016). Além disso, diferente de outras proteínas, demonstrou seu efeito pela via oral sendo resistente ao pH gástrico, possibilitando o desenvolvimento de um biofármaco com administração oral.

Portanto diante desse contexto, McLTP1 se torna uma potencial opção farmacológica para ser estudada no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por CPT-11, atuando principalmente na inibição ou atenuação do processo inflamatório. Acreditamos que McLTP1 possa ser uma nova opção terapêutica para a toxicidade gastrointestinal decorrente da quimioterapia.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar o efeito de uma proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* (McLTP1) sobre as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais associadas à mucosite intestinal (MI) induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos.

#### 3.2. Específicos

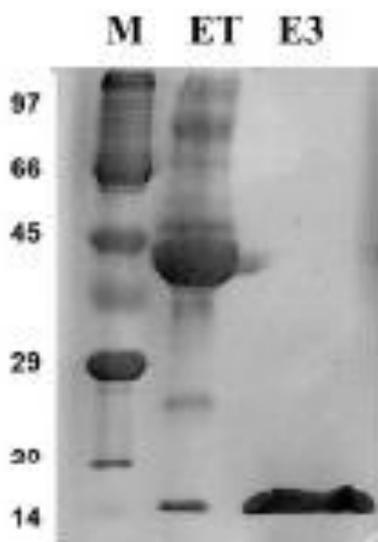
- Avaliar o efeito de McLTP1 sobre a sobrevivência, ganho ponderal e perfil hematológico dos animais com MI induzida por CPT-11;
- Investigar o efeito de McLTP1 sobre as alterações morfofuncionais, histológicas e funcionais no intestino de animais com MI induzida por CPT-11;
- Investigar o efeito de McLTP1 sobre a resposta inflamatória da MI induzida por CPT-11 através da avaliação do efeito de McLTP1 sobre: a atividade da mieloperoxidase intestinal, os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, KC, TGF- $\beta$  e IL-10 e sobre a expressão intestinal de COX-2, NF- $\kappa$ B, iNOS e TNF- $\alpha$  no intestino.
- Investigar o efeito de McLTP1 sobre o estresse oxidativo, através da determinação dos níveis de NO (óxido nítrico), MDA (malonaldeído) e da concentração de glutatona reduzida (GSH) no intestino.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento e purificação da proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* L. (McLTP1)

McLTP<sub>1</sub> foi isolada e purificada de acordo com a metodologia descrita por Campos *et al.* (2016) com as modificações introduzidas por Souza (2016) no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. O rendimento da proteína foi de aproximadamente 70 mg para 100g de semente e sua pureza foi confirmada pelo SDS-PAGE (FIGURA 6).

**Figura 6. Análise eletroforética do isolamento da proteína da semente de *Morinda citrifolia* L. (McLTP1)**



Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%; 20 µg). Raia 1: marcadores de massa molecular (kDa); Raia 2: Extrato total das sementes de *Morinda citrifolia*; Raia 3: McLTP1. Bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Fonte: CAMPOS, 2016.

### 4.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do

Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em caixas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Os experimentos foram conduzidos após aprovação da comissão de ética para animais de experimentação da Universidade Federal do Ceará (N° 93/15).

### 4.3. Indução da Mucosite Intestinal

O modelo experimental de mucosite intestinal utilizado foi descrito inicialmente por Ikuno e colaboradores (1995) e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), Universidade Federal do Ceará (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012).

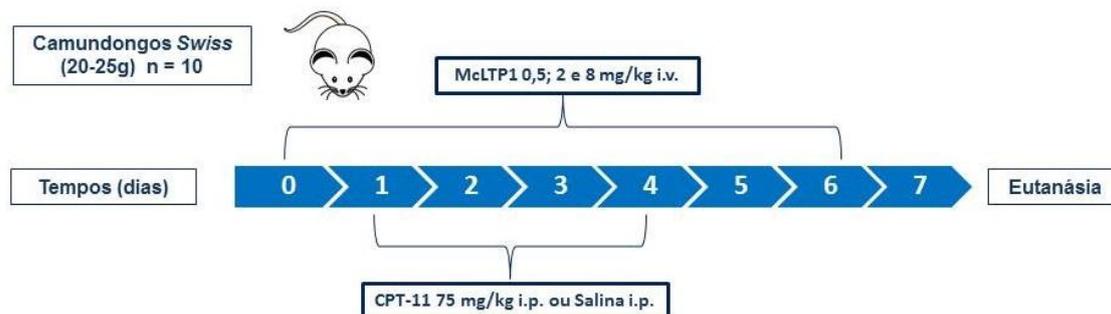
O modelo animal de mucosite intestinal adaptado e padronizado pelo LAFICA consiste em quatro administrações do irinotecano pela via intraperitoneal (i.p.) uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos em camundongos. Após essas quatro administrações os animais apresentam diarreia e aumento da mortalidade. No sétimo dia após a primeira administração do irinotecano os animais são eutanasiados e o intestino é coletado para determinação dos parâmetros relacionados ao desenvolvimento da mucosite intestinal. O sétimo dia foi escolhido porque nele ocorreu maior pico de diarreia, perda de peso e mortalidade (ALENCAR *et al.* 2017; WONG *et al.* 2015; MELO *et al.* 2008).

### 4.4. Grupos experimentais e protocolos de tratamento

Baseando-se nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa foram determinadas as doses e o tempo de tratamento com McLTP1 utilizados nesse estudo (ALENCAR *et al.* 2017; CAMPOS *et al.* 2017; CAMPOS *et al.* 2016). Os animais foram divididos em cinco grupos (n= 10/grupo). **Grupo I** : controle tratado com salina (5mL/Kg, i.p.); **Grupo II** : controle mucosite intestinal tratado com CPT-11 (75 mg/Kg, i.p., 1x dia por 4 dias); **Grupo III, IV e V**: mucosite tratado com McLTP1 nas doses de 0,5; 2 e 8 mg/Kg e.v. respectivamente. A

proteína foi diluída em salina nas três doses e administrada pelo plexo retro orbital dos camundongos. Os animais foram tratados com as três doses de McLTP1 24h antes da administração do CPT-11 (dia zero) e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de tratamento (Figura 7).

**Figura 7: Esquema de tratamento dos animais no modelo de mucosite.**



Fonte: autor

## 4.5. Parâmetros Avaliados

### 4.5.1. Curva Ponderal

Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados diariamente antes e após os tratamentos durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em percentual de perda ponderal em relação ao peso inicial.

### 4.5.2. Análise de sobrevivência

Com o objetivo de avaliar a taxa de sobrevivência em cada grupo experimental os animais foram observados durante 7 dias a partir do início do tratamento com CPT-11. Diariamente registrou-se a mortalidade dos animais em cada grupo experimental e os resultados foram expressos como o percentual de sobrevivência.

#### 4.5.3. Avaliação do perfil hematológico: Leucócitos totais

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

Utilizou-se 20 µL de sangue diluído em 380 µL do líquido de Turk para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Moura e colaboradores (1998). Os valores foram expressos em número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/ mL de sangue.

#### 4.5.4. Comprimento intestinal

No 7º dia os animais foram eutanasiados com excesso de anestésico, cetamina e xilazina, em seguida, foram colhidas as amostras dos intestinos. O comprimento do intestino delgado compreendeu a porção distal à incisão sobre o piloro até a válvula íleo-cecal. O órgão foi lavado e perfundido com solução fisiológica. O intestino delgado foi medido com régua milimetrada após lavagem e secagem com papel filtro para remoção do excesso de umidade.

#### 4.5.5. Avaliação da Diarreia

Para avaliarmos o grau de diarreia apresentada nos grupos experimentais a intensidade da mesma foi determinada no 7º dia experimental, anteriormente ao sacrifício dos animais, de acordo com os escores descritos por Kurita e colaboradores (2000) adaptado (CARVALHO, 2016) (**Figura 8**):

**Escore 0** = fezes com aspecto normal;

**Escore 1** = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas;

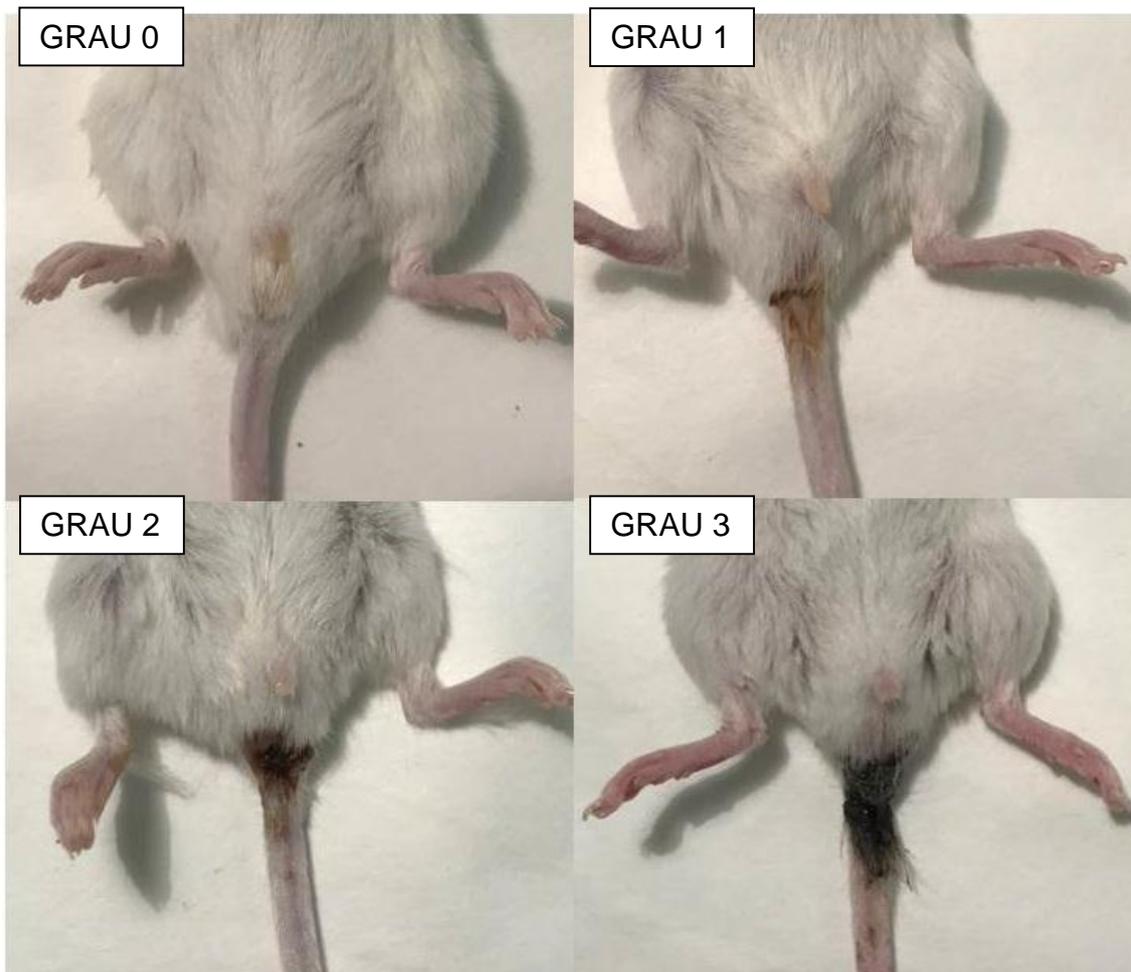
**Escore 2** = fezes úmidas com pouca sujidade perianal;

**Escore 3** = fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

**Escore 4** = óbito do animal.

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

**Figura 8 - Figura esquemática do grau de diarreia apresentada em animais tratados com irinotecano.**



Fonte: autor

À diarreia são atribuídos escores de acordo com a intensidade. Grau 0=fezes com aspecto normal; Grau 1=fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; Grau 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; Grau 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal; Grau 4=óbito do animal.

#### **4.5.6. Análise histopatológica e morfométrica do intestino**

Os segmentos do duodeno obtidos no sétimo dia foram fixados em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os segmentos intestinais foram retirados do formol e inseridos em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Na etapa seguinte, os segmentos intestinais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo para obter cortes histológicos de 5 µm de espessura, as lâminas contendo os cortes dos segmentos intestinais foram

adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilosidades e a profundidade de 10 criptas de cada lâmina. A altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais foram obtidas em  $\mu\text{m}$ . Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da mucosite intestinal induzida por CPT-11 por meio do sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer para os segmentos do intestino delgado (MACPHERSON & PFEIFFER, 1978).

Para avaliar as alterações histológicas do duodeno foi utilizado o sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer adaptado: 0= achados histológicos normais; 1= perda da arquitetura das criptas, baixo grau de infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 2= necrose das criptas, moderado infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa, edema na camada submucosa e camada muscular normal; 3= redução de células caliciformes, células vacuolizadas, necrose de criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e submucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos.

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

#### **4.5.7. Avaliação sobre a contratilidade intestinal *ex vivo***

A avaliação da contratilidade foi feita no laboratório de Eletrofisiologia no Departamento de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram sacrificados por excesso de anestésico e amostras de duodeno foram dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritiva de Tyrode modificada (composição: NaCl= 136 mM; KCl= 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  = 0,98

mM;  $\text{CaCl}_2 = 2 \text{ mM}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ mM}$ ;  $\text{NaHCO}_3 = 11,9 \text{ mM}$ ; glicose = 5,5 mM). A dose de McLTP1 utilizada a partir desse experimento foi aquela que melhor resposta apresentou nos modelos anteriormente descritos. Cada intestino foi limpo de seus tecidos adjacentes e em seguida foram amarrados com linha no sentido da musculatura longitudinal, suspensos em banho de órgão (20mL de solução de Tyrode, aquecida a  $37^\circ \text{ C}$ ,  $\text{pH}=7,4$  e oxigenada continuamente com mistura carbogênica 95%  $\text{O}_2/5\% \text{ CO}_2$ ) 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  $10^{-10}$ - $10^{-4}\text{M}$  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. 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.

#### **4.6. Avaliação do processo inflamatório**

##### **4.6.1. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)**

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino de camundongos após a indução da mucosite foi determinada de forma indireta pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado. Um fragmento do duodeno de aproximadamente 1 cm foi coletado de cada animal e incubado em 200 $\mu\text{L}$  de tampão gelado ( $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{NaPO}_4$

0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron) e o material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Realizou-se um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de solução de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm/15 min/4°C, o “*pellet*” foi ressuspensão em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizou-se novamente em triturador Pollytron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante obtido foram colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min a 37 °C. A seguir, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1x10<sup>5</sup> neutrófilos/50 µL no primeiro poço). Realizou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO et al, 2006).

#### **4.6.2. Quantificação de citocinas IL-1β, IL-6, KC, TGF-β e IL-10 no intestino**

As concentrações de IL-1β, IL-6, KC, TGF-β e IL-10 foram determinadas em amostras do duodeno retirados no 7º dia e estocadas em freezer -80°C até o momento do ensaio.

Para o ensaio, o tecido coletado foi homogeneizado em tampão PBS - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 – 7,4 e processados como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1995). A detecção de TNF-α, IL-1β, IL-6, KC e IL-10 foi determinada no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA *et al.*, 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-KC e anti-IL-10 murino (kit da R&D systems- Cat. Nº DY501 ou DY510, respectivamente). Os anticorpos foram retirados e as placas foram lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA), foram adicionados

290µL de BSA para o bloqueio das placas e estas foram incubadas por 1h à 4°C. Após o bloqueio as placas foram lavadas e 100µL das amostras foram adicionadas, a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubada por 2h a 4°C. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-KC, anti-TGF-β e anti-IL-10 diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação a 4°C por 2h, as placas foram lavadas e 100 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 20 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 100µL) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura ambiente por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e a densidade óptica medida a 450 nm no ELISA. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva obtida por uma diluição seriada. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante.

#### **4.6.3. Imuno-histoquímica para COX-2, NF-κB e iNOS**

Foram realizadas as imuno-histoquímicas para iNOS, COX-2 e NF-κB nas amostras dos duodenos que foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm 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 xilol por 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% (Abcam) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para anti-iNOS (Santa Cruz), anti-COX-2 (Santa Cruz) ou anti-NF-κB (Abcam) 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) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observaram-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imuno-histoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). Para quantificar a área imunomarcada para iNOS, COX-2 e NF-κB, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ da área imunomarcada} = \frac{\text{Área imunomarcada (pixels)}}{\text{Área total (pixels)}} \times 100$$

## **4.7. Avaliação do estresse oxidativo**

### **4.7.1. Quantificação dos níveis de MDA (malonaldeído)**

O teste quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo (DRAPER; HADLEY, 1990). 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 duodeno foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). Em seguida, 250 µL do homogenato foram levados ao banho de água a 37°C por 1 hora. Decorrido esse tempo, no intuito de interromper a peroxidação, adicionaram-se 400 µL de ácido perclórico 35% às amostras, que foram então centrifugadas (14000 rpm, 15 minutos, 4°C). Do sobrenadante obtido, 600 µL foram transferidos para um microtubo, ao qual se adicionaram 200 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Esta mistura foi levada ao banho de água a 95°C por 30 minutos. Após o resfriamento 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.

#### **4.7.2. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)**

A glutathiona reduzida 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 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-nitrobenzoico) (DTNB) com compostos de sulfidrílica, e conseqüente desenvolvimento de coloração amarela. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e glutathiona oxidada (GSSG). As amostras de duodeno foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) em Politron® com solução de EDTA 0,02 M. Logo após, adicionaram-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. Adicionaram-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  $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido.

#### 4.7.3. Determinação dos níveis de nitrito (NO)

A determinação de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) e nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ) foi obtida como indicador indireto da produção de óxido nítrico. O método baseia-se na reação do  $\text{NO}^{2-}$  com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que por sua vez reage com um composto aromático formando um azo-composto (reação de Griess) (GREEN et al., 1982), o qual absorve na região visível do espectro eletromagnético. O íon  $\text{NO}^{3-}$  é determinado como íon  $\text{NO}^{2-}$  após redução pela enzima nitrato redutase.

As amostras de duodeno foram pesadas e trituradas (POLITRON®) com auxílio de uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCl a 1,15%), após a obtenção dos homogenatos de cada amostra (10% de tecido) a centrifugação foi realizada para a obtenção do sobrenadante (1500g; 15 minutos). Para que todo o nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ) presente no sobrenadante se convertesse em nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ), as amostras obtidas foram plaqueadas (placa de 96 poços) em duplicata (80  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante) e incubadas por 12 horas com uma solução reagente (40 $\mu\text{L}$  da enzima nitrato redutase, substrato NADPH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em água destilada). Uma curva padrão de referência de nitrito também foi plaqueada, a partir de uma diluição contínua (1:2) de uma solução de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) de 200  $\mu\text{M}$ . Após a conversão de nitrato em nitrito, 80  $\mu\text{L}$  da solução de Griess (1% de sulfanilamida em 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /0,1% de NEED/água destilada/1:1:1:1) foram adicionadas em cada poço. A leitura da coloração púrpura final obtida pela reação foi feita na absorbância de 540 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}^{2-}$ , usando como referência a curva padrão de nitrito para a obtenção dos valores (CHEN et al., 2000).

#### 4.8. Análise estatística

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism®, versão 5.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis para dados paramétricos e não-paramétricos

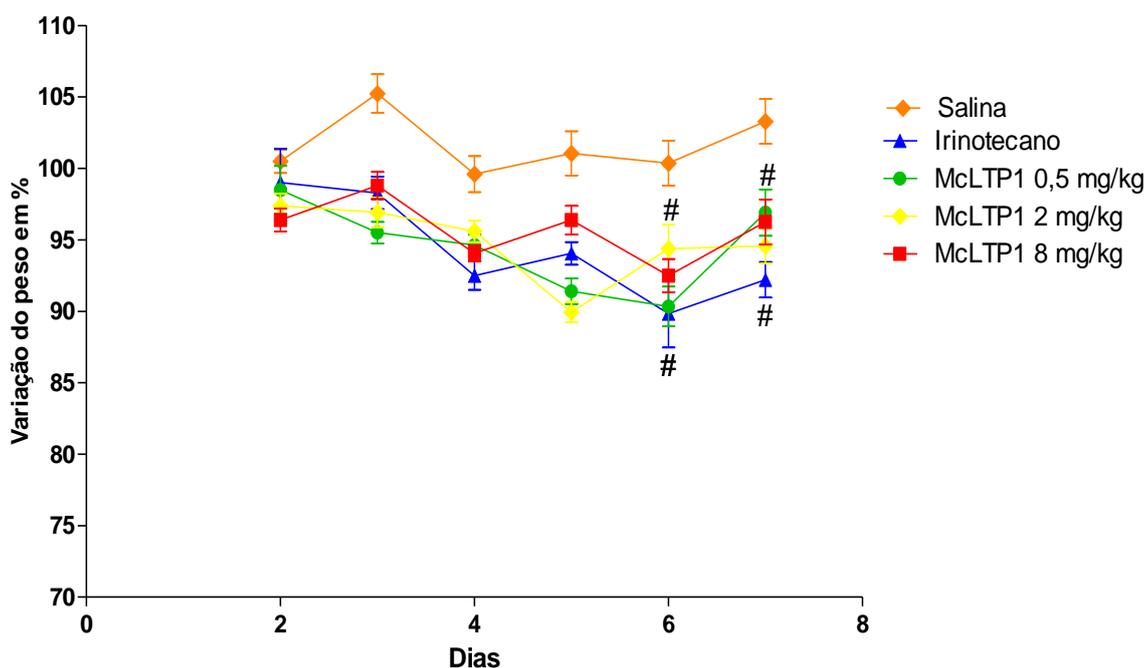
respectivamente. Quando utilizado ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas (teste de Bonferoni), baseando-se na continuidade das variáveis em análise e, quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn. Para análise da sobrevida foi utilizado o teste de Log-Rank. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 McLTP1 não altera a curva ponderal de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

A análise da variação da massa corpórea demonstrou que os animais do grupo que receberam apenas irinotecano (CPT-11), apresentaram uma perda ponderal durante e após a administração do CPT-11 sendo diferente do grupo Salina a partir do 6° dia. Nos grupos que receberam o tratamento com McLTP1 nas doses de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 8 mg/kg (i.v.) após a administração do CPT-11 também foi observado uma gradativa perda de massa corpórea e não foi observada diferença significativa em relação ao grupo CPT-11. Os grupos tratados com as três doses de McLTP1 foram diferentes apenas do grupo Salina a partir do 6° dia (**Figura 9**).

**Figura 9 – O tratamento com McLTP1 não altera a perda ponderal dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.**

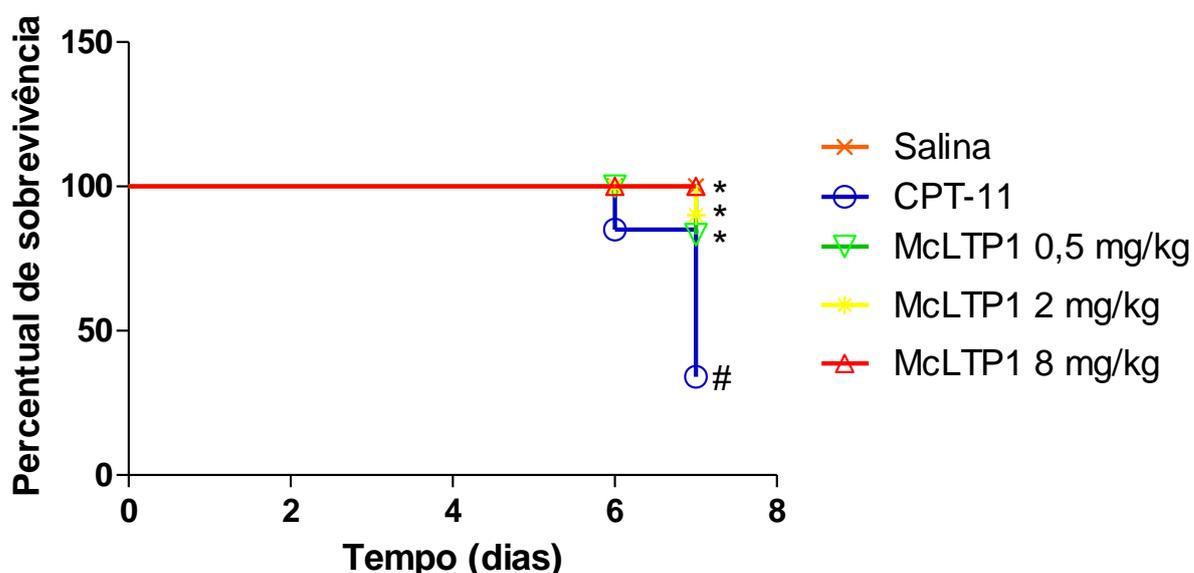


Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 (0,5; 2 e 8 mg/Kg) por sete dias consecutivos, dose única diária + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p e foram pesados diariamente por 7 dias (n=10). Valores representam o percentual da massa corpórea comparado ao inicial. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. (ANOVA, teste de Bonferroni).

## 5.2 McLTP1 aumenta a sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

No grupo de animais submetidos ao tratamento com irinotecano (CPT-11) foi observada uma diminuição na sobrevivência dos animais durante o período experimental da indução de MI, quando comparado ao grupo tratado apenas com salina (100% de sobrevivência). No grupo CPT-11, somente 34% dos animais sobreviveram até o final do protocolo (sétimo dia). Por outro lado, os animais com MI induzida pelo CPT-11, mas tratados com McLTP1, nas doses de 0,5; 2 e 8 mg/kg apresentaram percentuais de sobrevivência de 80%, 90% e 100% no sétimo dia, respectivamente, os quais foram significativamente superiores quando comparados ao grupo CPT-11 (**Figura 10**),

**Figura 10 – O tratamento com McLTP1 aumenta a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.**

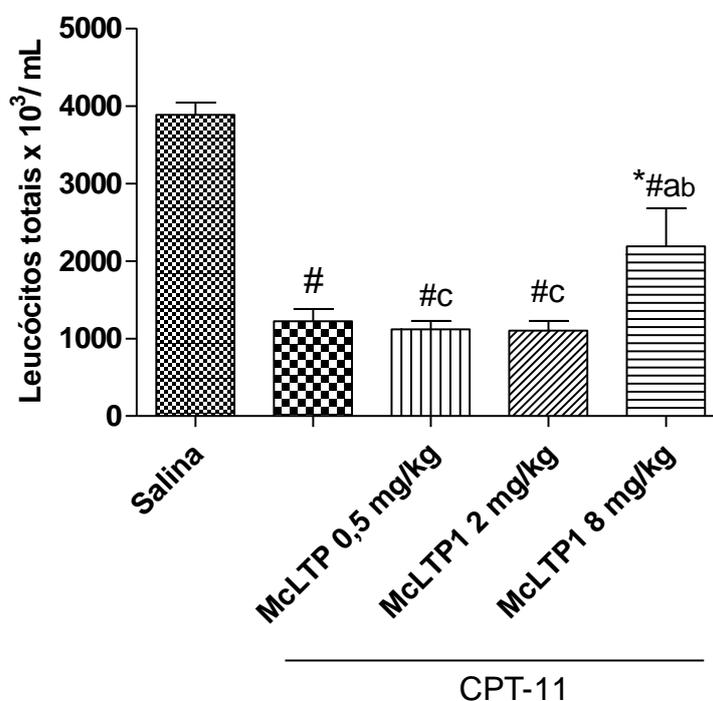


Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 (0,5; 2 e 8 mg/Kg) por sete dias consecutivos, dose única diária + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. sendo avaliados diariamente por 7 dias quanto a sobrevivência (n=10). Valores representam o percentual de animais vivos comparados ao primeiro dia. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11. Teste de Log-Rank.

### 5.3 McLTP1 previne leucopenia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

Como esperado, o tratamento dos animais com CPT-11 causou uma diminuição significativa de 68,5% no número de leucócitos totais quando comparados ao grupo que recebeu somente salina. O tratamento dos animais com McLTP1 nas doses de 0,5 e 2 mg/kg não foi capaz de alterar significativamente o número de leucócitos quando comparados ao grupo de animais que receberam apenas CPT-11. No entanto, os animais tratados com McLTP1 na dose de 8 mg/kg apresentaram diferença significativa no número de leucócitos com um aumento de 44,2% quando comparado ao grupo CPT-11 e quando comparado ao grupo salina uma redução de 56,3%. Também foi observada diferença entre os grupos tratados com McLTP1, a dose de 8 mg/kg aumentou o número de leucócitos em 48,9% quando comparado ao grupo McLTP1 0,5 mg/kg e aumentou em 49,7% quando comparado ao grupo McLTP1 2 mg/kg (Figura 11).

**Figura 11 – O tratamento com McLTP1 reduz a queda de leucócitos totais de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11.**



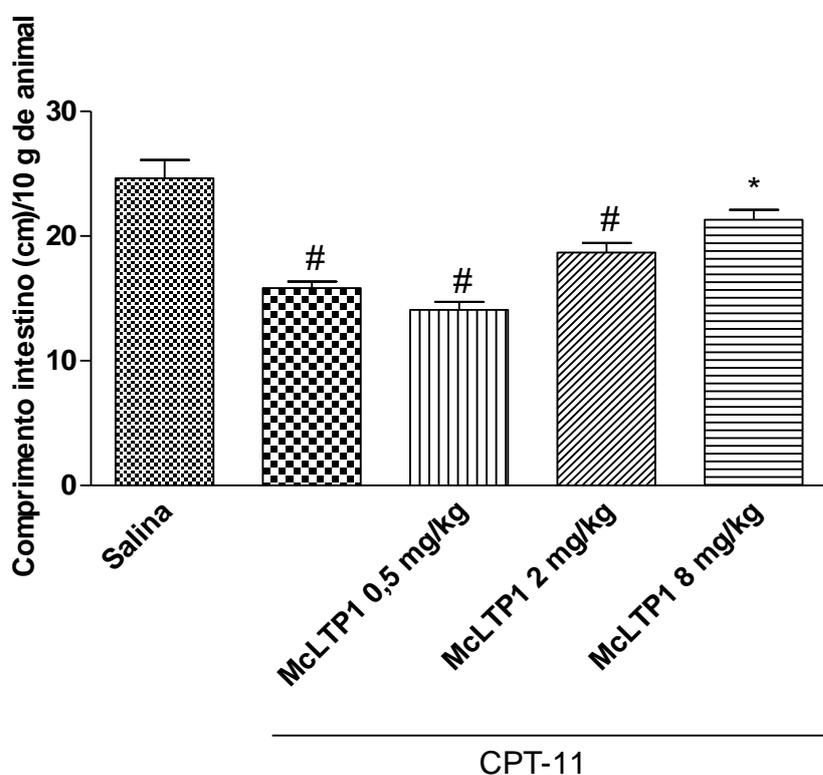
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg, e.v dose única um dia antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e

continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. (n=10). No sétimo dia, amostras de sangue foram coletadas para contagem de leucócitos totais ( $\times 10^3/\text{mL}$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p.; \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11; a ( $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 2 mg/kg); b ( $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 8 mg/kg) e c ( $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 8 mg/kg). (ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.4 McLTP1 previne a redução do comprimento intestinal em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11

O tratamento dos animais com o CPT-11 reduziu de forma significativa o comprimento do intestino delgado em 35,7% quando comparado ao grupo de animais tratados apenas com Salina. Somente o tratamento dos animais com McLTP1 na dose de 8 mg/kg preservou o comprimento intestinal apresentando aumento de 34,7% quando comparado ao grupo CPT-11. Não foi observada diferença significativa entre os animais tratados com McLTP1 na dose de 8 mg/kg e o grupo Salina (**Figura 12**).

**Figura 12 - O tratamento com McLTP1 previne a redução do comprimento intestinal de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

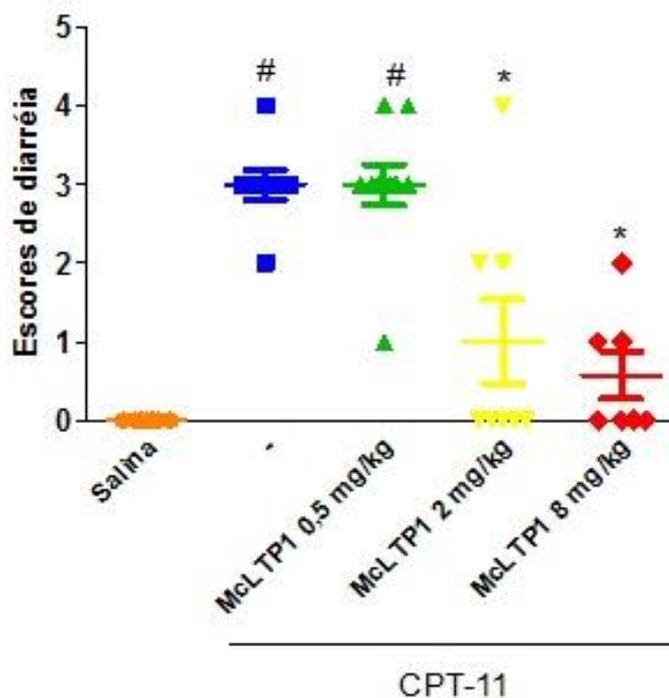


Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg, e.v dose única um dia antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, após a eutanásia as amostras dos intestinos foram retiradas e mensuradas em centímetros (n=10). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni).

### **5.5 McLTP1 reduz o grau de diarreia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11**

Durante a avaliação do grau de diarreia foi observado que o CPT-11 induziu aumento significativo na mediana, mínimo e máximo dos escores de diarreia de 3 (2-3) quando comparado ao grupo Salina 0 (0-0). Os animais tratados com McLTP1 nas doses de 2 e 8 mg/kg apresentaram diminuição significativa do grau de diarreia apresentada no sétimo dia, quando comparados ao grupo de animais que receberam apenas CPT-11, apresentando mediana, mínimo e máximo dos escores de diarreia iguais a 0 (0-2) e 0 (0-2), respectivamente. No entanto, os animais tratados com McLTP1 na dose de 0,5 mg/kg não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo que recebeu apenas CPT-11, apresentando mediana, mínimo e máximo dos escores de diarreia de 3 (1-3) (**Figura 13**). Considerando que o tratamento dos animais com McLTP1 na dose de 8mg/Kg promoveu efeitos significativos em todos parâmetros avaliados em comparação às outras doses, foi estabelecido que as demais abordagens avaliadas seriam realizadas em animais tratados somente com a dose de 8 mg/kg.

**Figura 13 – McLTP1 foi capaz de diminuir o grau de diarreia apresentada após administração de CPT-11 em camundongos.**



Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 (0,5; 2 e 8 mg/Kg) por sete dias consecutivos, dose única diária + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, antes do sacrifício dos animais, o grau de diarreia foi avaliado (n=10). Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

**Tabela 2 – McLTP1 reduz o grau de diarreia em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11**

Grupos	Mediana (min-max)
Salina	0 (0-0)
CPT-11 75 mg/kg	3 (1-3)#
McLTP1 0,5 mg/kg	3 (0-3)#bc
McLTP1 2 mg/kg	0 (0-2)*a
McLTP1 8 mg/kg	0 (0-1)*a

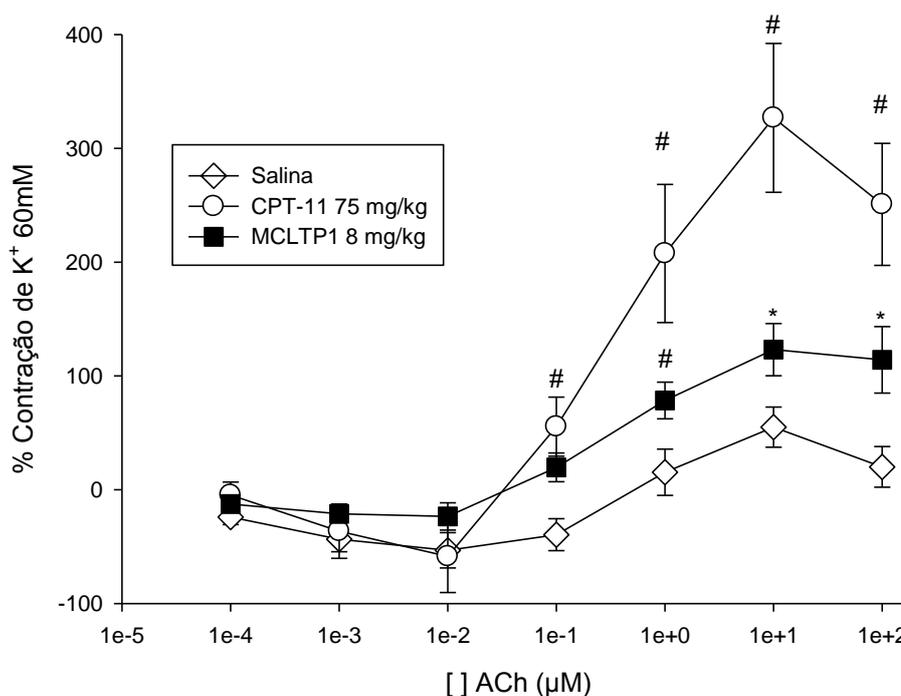
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 (0,5; 2 e 8 mg/Kg) por sete dias consecutivos, dose única diária + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia

durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, antes do sacrifício dos animais, o grau de diarreia foi avaliado (n=10). Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p., \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11; a (p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 2 mg/kg); b (p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 8 mg/kg) e c (p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com McLTP1 8 mg/kg) (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

### 5.6 McLTP1 reduz o aumento da contratilidade duodenal induzida por CPT-11 *ex vivo*

CPT-11 (75 mg/Kg/dia, i.p.) apresentou um aumento significativo da atividade contrátil do duodeno após estímulo com acetilcolina *ex vivo*, sendo essa resposta 410,9% maior que a contratilidade observada no duodeno de animais tratados apenas com salina. Nos animais tratados com McLTP1 (8 mg/Kg,) associado ao irinotecano, observou-se uma diminuição na atividade contrátil do tecido em resposta à acetilcolina quando comparados ao grupo que recebeu apenas CPT-11. Essa diminuição na resposta com a dose de 8 mg/kg, foi máxima de 56,2%. (Figura 14).

**Figura 14 – Efeito do tratamento com McLTP1 sobre a contratilidade duodenal *ex vivo* de animais com mucosite induzida por CPT-11.**



Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido para realização do ensaio de contratilidade *ex vivo*. Os resultados foram expressos como  $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$  # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni).

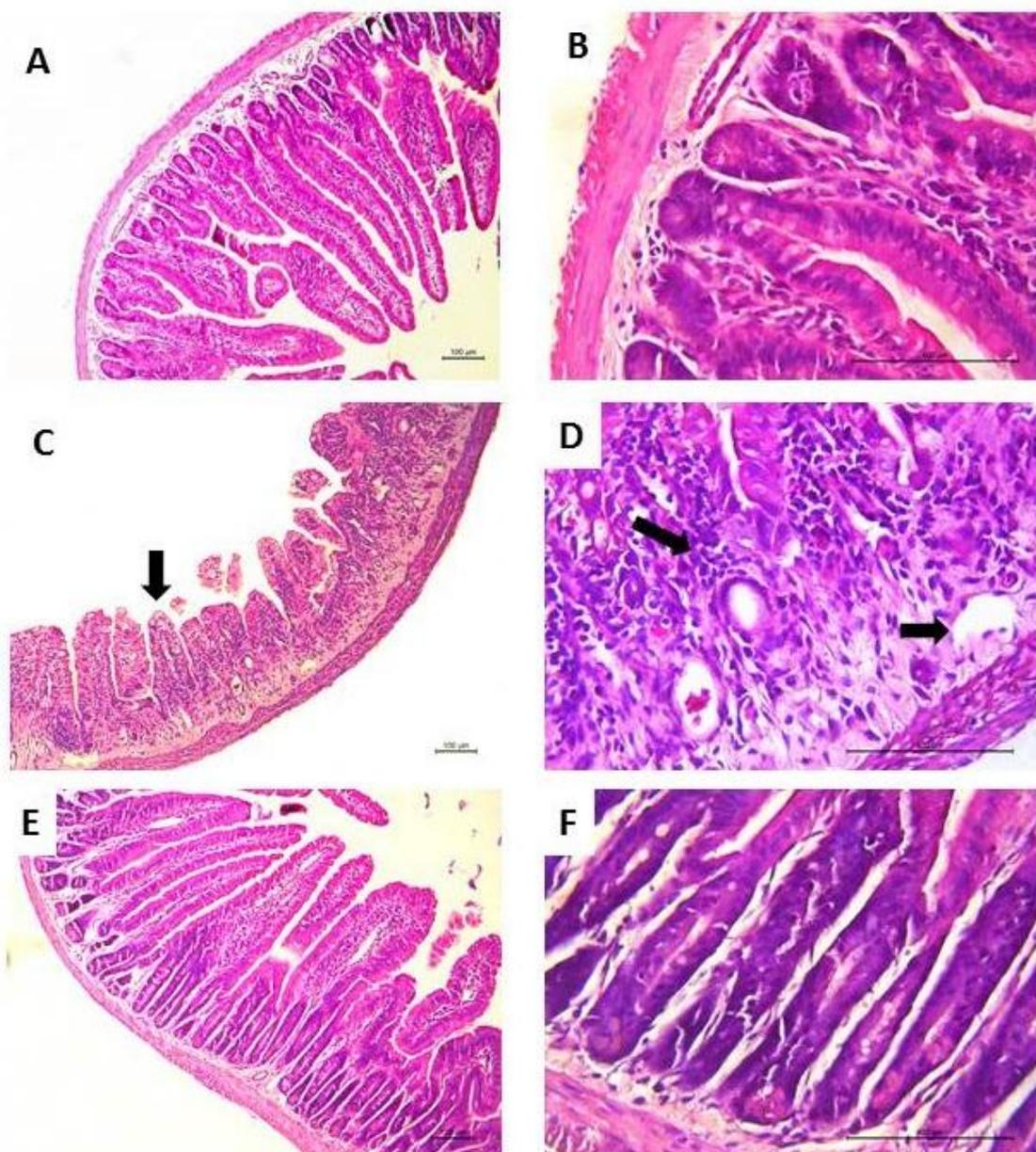
### **5.7 McLTP1 reduz as alterações morfológicas duodenais induzidas por CPT-11**

O tratamento dos animais com CPT-11 provocou um intenso processo inflamatório na mucosa do duodeno caracterizado pela presença de intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização, redução do tamanho das criptas e vilosidades intestinais, além do comprometimento da camada mucosa e muscular. O intestino delgado do grupo que recebeu apenas salina apresentou estrutura morfológica dentro dos parâmetros de normalidade, com preservação da integridade das vilosidades e criptas, epitélio e mucosa (**Figura 15C e D**). Observou-se escore histopatológico máximo no grupo CPT-11, sendo o escore em mediana e variação de 3 (1 – 3) no duodeno (**Tabela 2**).

McLTP1 administrada na dose de 8 mg/kg promoveu redução significativa nas alterações histológicas duodenais causadas por CPT-11 (**Figura 15E e F**). O grupo McLTP1 foi estatisticamente diferente do grupo CPT-11, apresentando escore menor com mediana e variação de 0 (0 – 2) no duodeno (**Tabela 2**).

Em relação à altura das vilosidades e a profundidade das criptas o grupo CPT-11 provocou uma diminuição de 60,3% e 35,8% respectivamente, quando comparado ao grupo salina. Já o grupo tratado com McLTP1 apresentou uma redução do dano intestinal em 48,4% na altura das vilosidades e 37,8% na profundidade das criptas quando comparado ao grupo CPT-11. Ao mensurar a razão vilosidade/cripta do duodeno, observou-se que irinotecano a diminuiu em ( $2,5 \pm 0,1$ ) quando comparado ao grupo salina ( $5,8 \pm 0,3$ ), enquanto McLTP1 na dose de 8 mg/kg aumentou a razão em ( $3,2 \pm 0,2$ ) quando comparado ao grupo CPT-11 (**Figura 16**).

**Figura 15 – O tratamento com McLTP1 previne alterações histopatógicas no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**



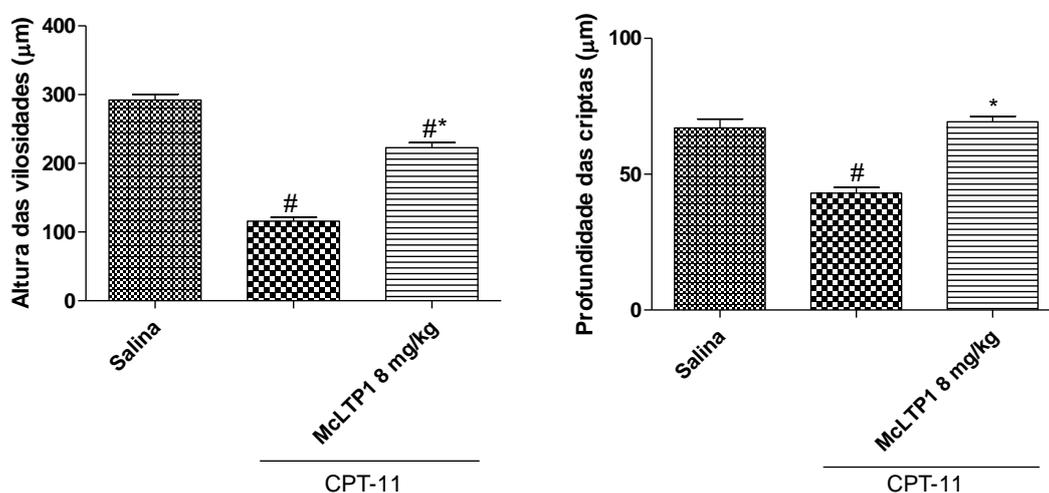
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia ou McLTP1 8 mg/Kg + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). No grupo tratado apenas com CPT-11 observa-se a presença de encurtamento das vilosidades (seta vertical), vacualização de células (seta horizontal) e intenso infiltrado inflamatório (seta inclinada). **Painel A e B:** Salina (100x e 400x); **Painel C e D:** CPT-11 (100x e 400x); **Painel E e F:** McLTP1 8 mg/kg+CPT-11(100x e 400x), respectivamente;

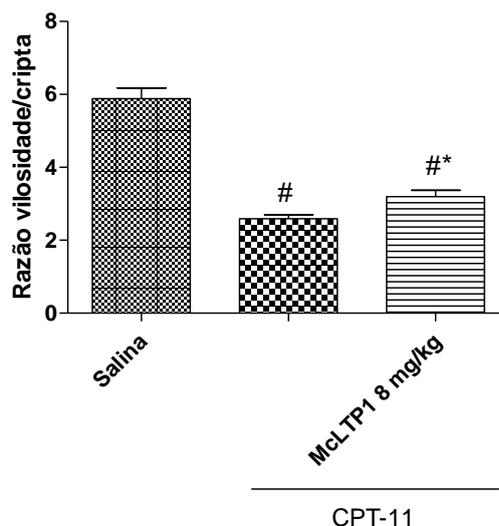
**Tabela 3 – McLTP1 foi capaz de prevenir lesões histopatológicas duodenais em animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11.**

Grupos	Mediana (min-max)
Salina	0 (0-0)
CPT-11 75 mg/kg	3 (1-3)#
McLTP1 8 mg/kg	0 (0-2)*

Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. Os resultados foram expressos como mediana dos valores de escores atribuídos. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (Kruskal-Wallis, teste de Dunn).

**Figura 16 – O tratamento com McLTP1 previne as alterações sobre a altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidade/cripta em camundongos tratados com CPT-11.**





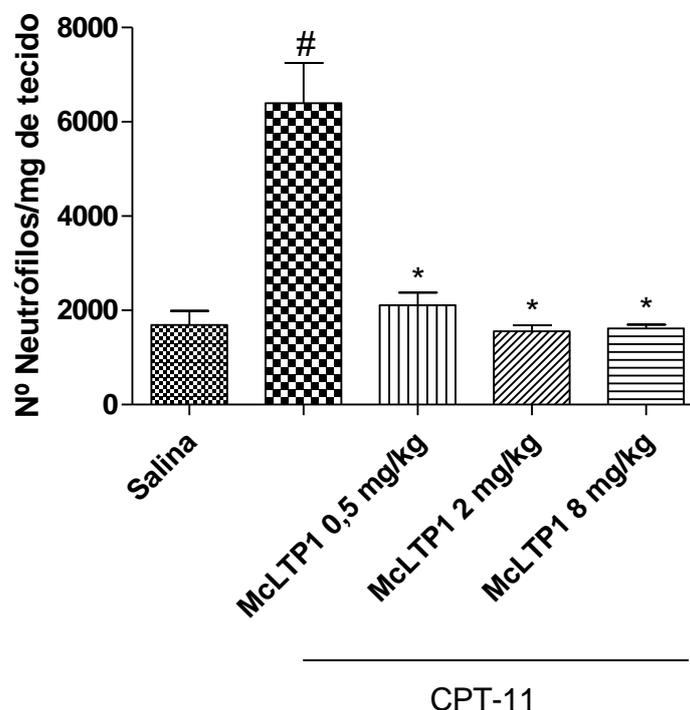
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica. Os resultados foram expressos como média±E.P.M dos valores da razão obtida. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11. (ANOVA, teste de Bonferroni).

## 5.8 Efeito da McLTP1 sobre a resposta inflamatória na MI induzida pelo CPT-11

### 5.8.1 McLTP1 reduz a atividade da mieloperoxidase

A figura 17 apresenta o perfil de infiltração de neutrófilos no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais, de forma indireta, através da atividade da MPO intestinal. Os resultados demonstram que nos animais que receberam somente CPT-11 ocorreu um aumento significativo do número de neutrófilos por miligrama de tecido ( $6398 \pm 849$ ) quando comparado ao grupo salina ( $1689 \pm 300$ ). Enquanto que o tratamento com McLTP1 nas doses de 0,5; 2 e 8 mg/kg diminui a atividade da MPO no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 em ( $2107 \pm 272$ ;  $1556 \pm 124$  e  $1618 \pm 79$ ).

**Figura 17 – O tratamento com McLTP1 diminui a atividade de MPO em animais com mucosite induzida por CPT-11.**

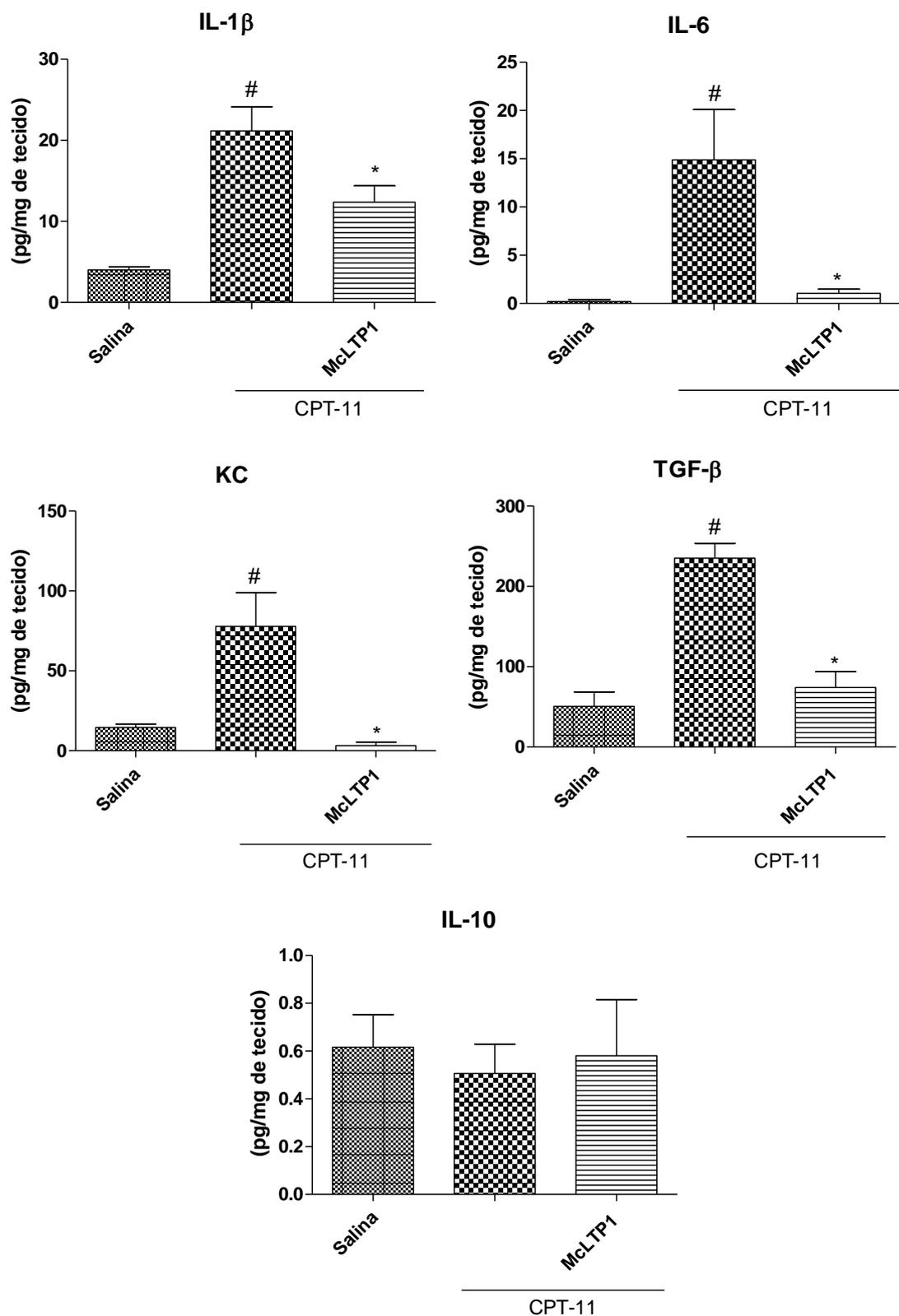


Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como média±E.P.M. . #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni).

### **5.8.2. McLTP1 reduz os níveis de mediadores inflamatórios (citocinas e fator de crescimento)**

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com CPT-11 aumentou significativamente os níveis de IL1- $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$  no duodeno em 425%, 6.900%, 432,9% e 370%, respectivamente, quando comparado ao grupo Salina. O tratamento dos animais com McLTP1 na dose de 8 mg/kg reduziu de forma significativa os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL1- $\beta$ , IL-6, KC) em 42%, 92,9%, 95,9%, respectivamente e do factor de crescimento TGF- $\beta$  em 68,5%, quando comparados ao grupo que recebeu apenas CPT-11. Entretanto, não observamos diferença nos níveis de IL-10 entre os grupos (Figura 18).

Figura 18 –McLTP1 diminui os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$  no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.



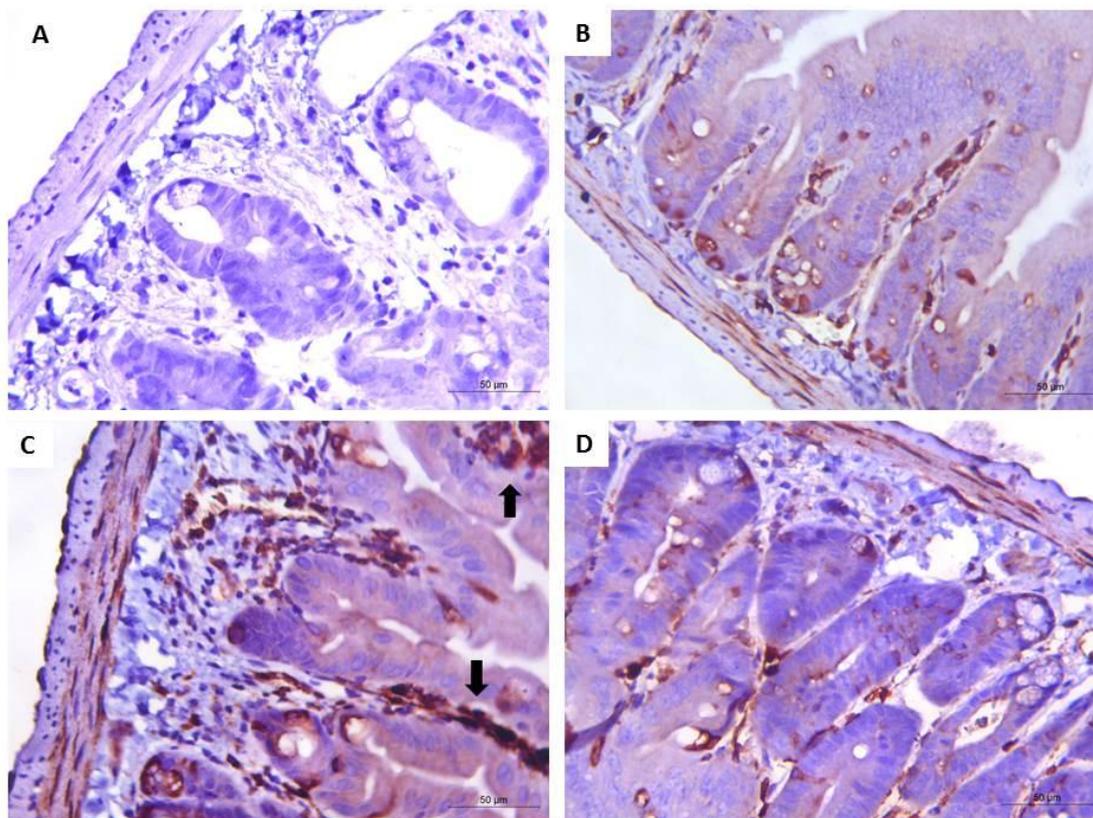
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1<sup>a</sup> injeção de irinotecano, dia

zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido para realização do ensaio de citocinas (n=10). Os resultados foram expressos como  $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$  # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni).

### **5.8.3. McLTP1 reduz a imunomarcção de mediadores inflamatórios (COX-2, NFkB e iNOS)**

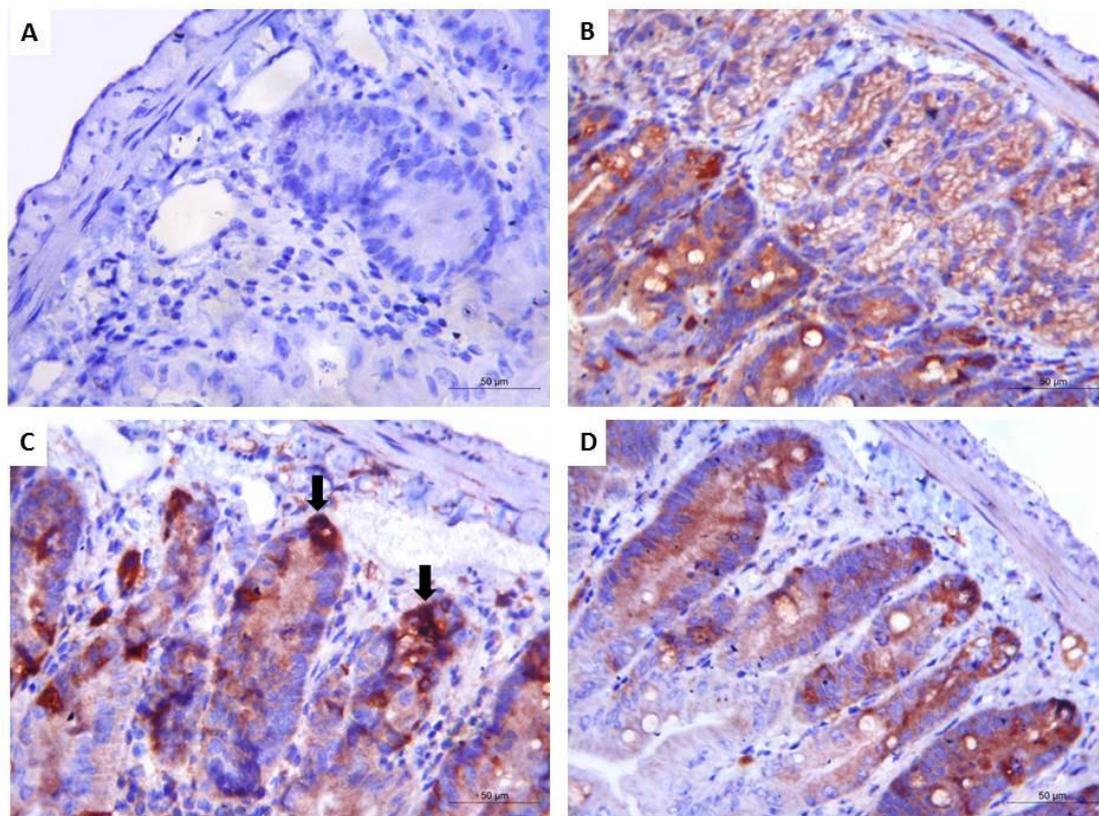
Os resultados obtidos mostram que o tratamento com CPT-11 aumentou significativamente a imunomarcção de COX-2, NFkB e iNOS no duodeno em 51,4%, 33,8% e 61%, respectivamente, quando comparado ao grupo Salina. O tratamento dos animais com McLTP1 na dose de 8 mg/kg reduziu de forma significativa a imunomarcção de COX-2, NFkB e iNOS em 61,7%, 51,6% e 44,2%, respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu apenas CPT-11 (Figura 19, 20, 21 e 22).

**Figura 19 –McLTP1 diminui a imunomarcção para COX-2 no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.**



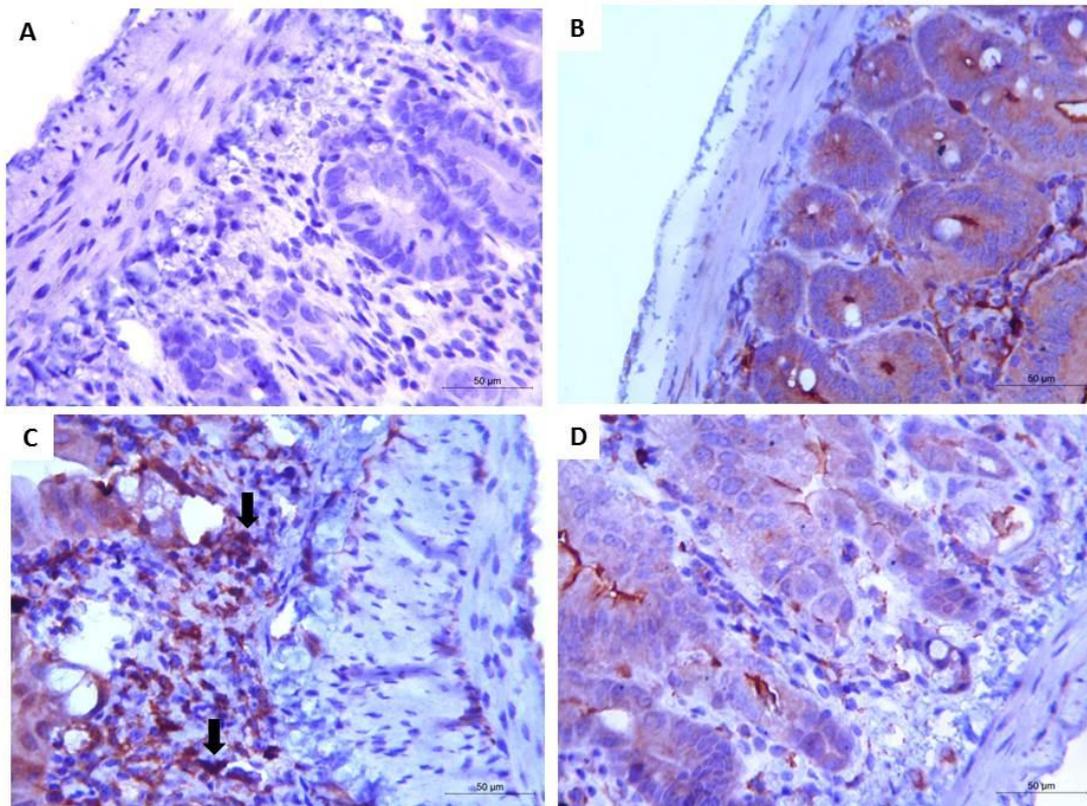
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a realização da imuno-histoquímica (400x). No grupo tratado apenas com CPT-11 observa-se o aumento da imunomarcção (setas pretas). **Painel A:** Controle negativo (400x); **Painel B:** Salina (400x); **Painel C:** CPT-11(400x); **Painel D:** McLTP1 8 mg/kg+CPT-11(400x), respectivamente;

**Figura 20 –McLTP1 diminui a imunomarcação para NFκB no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.**



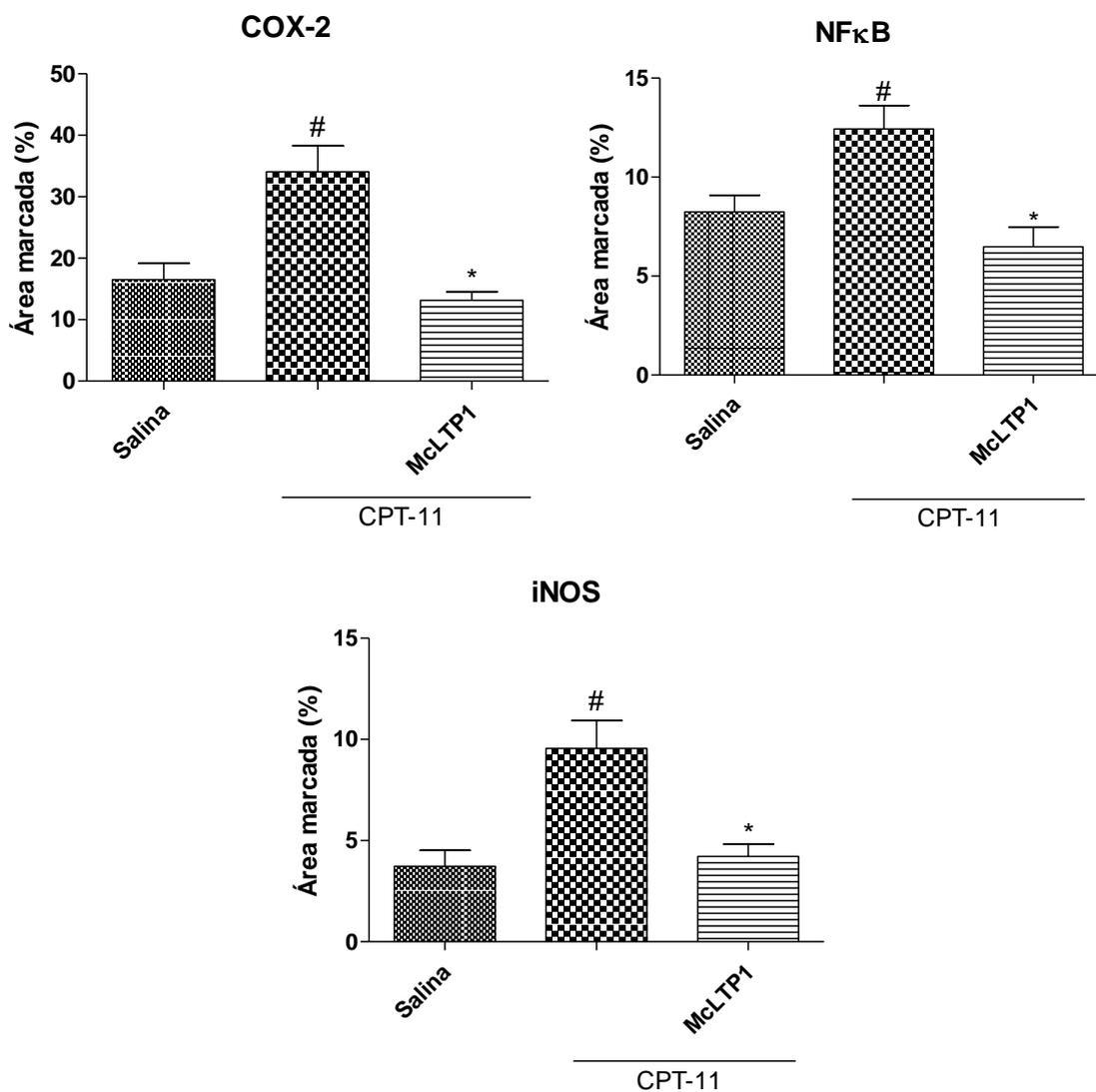
Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a realização da imuno-histoquímica (400x). No grupo tratado apenas com CPT-11 observa-se o aumento da imunomarcação (setas pretas). **Painel A:** Controle negativo (400x); **Painel B:** Salina (400x); **Painel C:** CPT-11(400x); **Painel D:** McLTP1 8 mg/kg+CPT-11(400x), respectivamente;

**Figura 21 –McLTP1 diminui a imunomarcção para iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.**



Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a realização da imuno-histoquímica (400x). No grupo tratado apenas com CPT-11 observa-se o aumento da imunomarcção (setas pretas). **Painel A:** Controle negativo (400x); **Painel B:** Salina (400x); **Painel C:** CPT-11(400x); **Painel D:** McLTP1 8 mg/kg+CPT-11(400x), respectivamente;

**Figura 22 –McLTP1 diminui a porcentagem de imunomarcção para COX-2, NFκB e iNOS no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.**

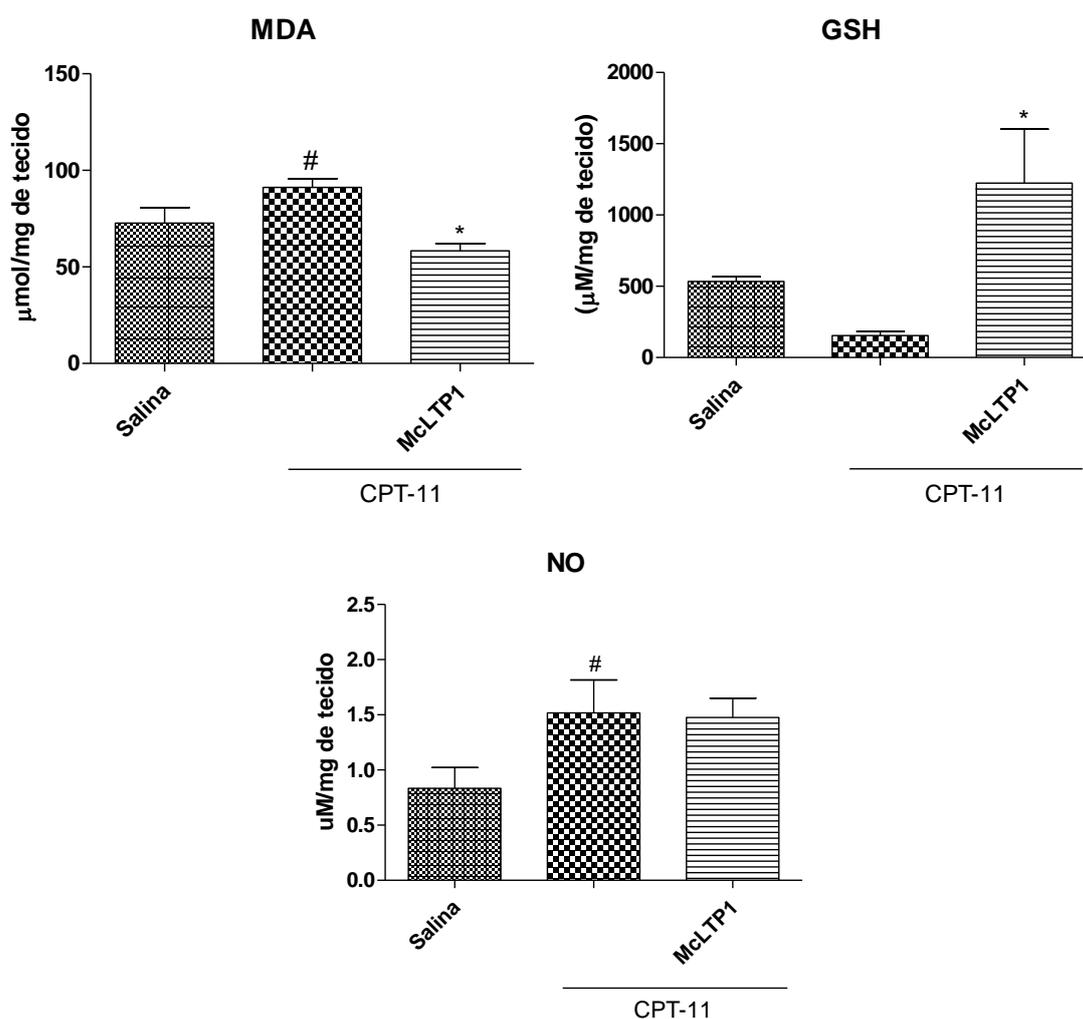


Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido e processado para a realização da imunohistoquímica (400x). Os resultados foram expressos como média±E.P.M. #p<0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \*p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.8.4. McLTP1 modula o estresse oxidativo na mucosite intestinal induzida por CPT-11

A partir da análise dos dados que avaliaram o estresse oxidativo observamos que o grupo CPT-11 aumentou significativamente os níveis de MDA no duodeno em 26,4% e diminuiu os níveis de GSH em 71,3% quando comparado ao grupo Salina. Já os animais tratados com McLTP1 na dose de 8 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de MDA em 36,2% e aumento do GSH em 700% quando comparado ao grupo que recebeu apenas CPT-11. Em relação ao óxido nítrico (NO) a dose de 8 mg/kg não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo CPT-11 (**Figura 23**).

**Figura 23 – Efeito do tratamento com McLTP1 sobre o estresse oxidativo (MDA, GSH e NO) no duodeno de animais com mucosite induzida por CPT-11.**



Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o duodeno foi removido para realização dos ensaios (n=10). Os resultados foram expressos como  $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$  # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. e \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com CPT-11 (ANOVA, teste de Bonferroni)

## 6. DISCUSSÃO

O modelo experimental de mucosite intestinal foi proposto inicialmente por Araki e colaboradores (1993), os quais demonstraram que a administração intraperitoneal de CPT-11 na dose de 50 mg/kg por 5 dias consecutivos em camundongos atímicos causava diarreia grave e colite hemorrágica no sétimo dia. Anos mais tarde, Ikuno e colaboradores (1995) mostraram que a administração intraperitoneal de irinotecano na dose de 100 mg/kg por 4 dias consecutivos em camundongos induzia apoptose e alterações nas mucosas intestinais responsáveis pela má absorção de água e eletrólitos e hipersecreção de mucina como possíveis causas da diarreia.

Diante desses trabalhos e do impacto negativo da mucosite intestinal na quimioterapia, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), buscou padronizar um modelo que mimetizasse o desenvolvimento da mucosite intestinal em camundongos tal qual ocorre na clínica e buscar a elucidação do seu mecanismo. Desta forma Melo e colaboradores (2008) padronizaram o modelo de MI em camundongos utilizando a dose de 75 mg/kg de irinotecano por quatro dias consecutivos pela via intraperitoneal.

O primeiro trabalho do nosso grupo de pesquisa acerca do tratamento da mucosite intestinal experimental induzida por CPT-11 em camundongos, demonstrou o efeito de uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (LP) na dose de 5mg/kg. CPT-11 foi administrado uma vez por dia durante 4 dias na dose de 75 mg/kg e LP foi administrado uma vez por dia um dia antes da primeira dose de CPT-11 como prevenção da mucosite intestinal e durante os seis dias seguintes uma vez por dia antes do quimioterápico. A fração proteica melhorou a diarreia, aumentou a sobrevivência, diminuiu os parâmetros inflamatórios e reduziu os danos histopatológicos (ALENCAR *et al.*, 2017).

A partir desse estudo, surgiu o interesse em buscar outras possíveis opções farmacológicas eficazes para o tratamento da mucosite intestinal. Baseando-se nesse estudo e no trabalho de CAMPOS e colaboradores (2016) e (2017) foi feito o desenho experimental e sugerido o esquema de tratamento com McLTP1, sendo escolhidas três doses de McLTP1, 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 8 mg/kg, pela via endovenosa para o modelo experimental proposto.

Nossos resultados demonstraram que os camundongos com MI induzida pelo CPT-11 que receberam o tratamento com a proteína transferidora de lipídeos de *Morinda citrifolia* L. (McLTP1) na dose 8mg/kg pela via endovenosa apresentaram maior sobrevida, melhora da leucopenia e diarreia, diminuição da contratilidade intestinal, melhora nas alterações morfométricas, menor infiltrado inflamatório, preservação da arquitetura das vilosidades e criptas, diminuição dos mediadores inflamatórios (MPO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$ ), diminuição da imunomarcagem para COX-2, NF $\kappa$ B, e iNOS e melhora do estresse oxidativo, diminuindo MDA e aumentando GSH. Concordando com os achados de COSTA (2016), também não observamos toxicidade após o tratamento com a proteína na dose de 8 mg/kg durante 7 dias pela via endovenosa. Os parâmetros bioquímicos (TGO, TGP e ureia) não foram alterados após o tratamento com a proteína e o quimioterápico (ANEXOS).

Corroborando com ALENCAR e colaboradores (2017) também observamos neste trabalho que a administração intraperitoneal de CPT-11 na dose de 75 mg/kg durante 4 dias consecutivos em camundongos SWISS provoca o desenvolvimento da mucosite intestinal com manifestações clínicas como perda de massa corpórea e diarreia, além do aumento da mortalidade. Contudo, o tratamento com McLTP1 na dose de 0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 8 mg/kg não reverteu a perda de massa corpórea provocada por CPT-11, mas aumentou a sobrevida em 80%, 90% e 100% respectivamente. Apenas os grupos tratados com a dose de 2 mg/kg e 8 mg/kg apresentaram melhora da diarreia significativa quando comparados ao CPT-11. A partir desses resultados a dose de 8 mg/kg foi escolhida entre as doses testadas por apresentar melhora em todos os parâmetros avaliados e diferença estatística quando comparada ao grupo que recebeu apenas CPT-11.

O irinotecano pode causar dois tipos de diarreia: precoce que ocorre horas após a sua administração e a diarreia tardia que ocorre mais de 24 horas

após a administração. A diarreia precoce se apresenta através de sintomas de excesso colinérgico, enquanto a diarreia tardia pode ocorrer pelo dano direto na mucosa pelo metabólito SN38 que provoca aumento da apoptose, hipoplasia das criptas, atrofia das vilosidades, diminuição de células calciformes e aumento na secreção de muco que prejudica a absorção de água e eletrólitos, favorecendo a diarreia (STEIN, VOIGT, JORDAN, 2010, STRINGER *et al.*, 2009; GIBSON *et al.*, 2003).

Neste trabalho não foi observada a diarreia aguda, apenas a diarreia tardia que apareceu dias após a primeira administração de CPT-11 nos animais, chegando ao maior escore de avaliação que resulta na morte do animal. Concordando com esse resultado, também foi observado dano no trato gastrointestinal com redução na altura das vilosidades, na profundidade das criptas e na razão vilosidade/cripta, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e comprometimento da camada mucosa e muscular.

Cechinel-Zanchett e colaboradores (2018) mostraram que uma fração rica em flavonoides extraída das folhas de *Bauhinia forficata* (FRF-BF) na dose de 100 mg/kg pela via oral atenuou os parâmetros ligados ao desenvolvimento da mucosite intestinal, melhorando a diarreia e as lesões histológicas provocadas pelo modelo experimental de mucosite intestinal induzida por CPT-11 sem afetar a perda de peso.

Sousa e colaboradores (2017) mostraram que a administração do suco da fruta de *Morinda citrifolia* L. diluído na proporção de 1:10 durante nove dias consecutivos em camundongos C57BL/6 com colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) apresentou um papel importante na inibição da inflamação durante o desenvolvimento da colite experimental, mas não influenciou na perda de peso dos animais. Também foi observado que a arquitetura intestinal dos camundongos tratados com o suco diluído foi preservada e que ocorreu uma redução no infiltrado inflamatório provocados pelo DSS.

Melo e colaboradores (2008) relatam que a presença da diarreia observada no sétimo dia experimental pode estar relacionada ao dano intestinal com a perda da arquitetura das criptas, encurtamento das vilosidades e presença do infiltrado de células provocado por CPT-11, resultando em má absorção, aumento de secreção de muco e aumento do peristaltismo.

Corroborando com a literatura nossos resultados mostraram que McLTP1 na dose 8 mg/kg melhora a diarreia, chegando a apresentar escore zero. Em concordância com esse resultado, McLTP atenuou o dano intestinal causado por CPT-11, apresentando redução no infiltrado inflamatório, melhora no comprimento dos vilosidades, na profundidade das criptas e na razão vilosidade/cripta, preservando a arquitetura da mucosa intestinal, que pode justificar a melhora da diarreia.

Outra alteração que pode justificar a presença da diarreia seria o aumento da contratilidade intestinal. Lima-Junior e colaboradores (2012) mostraram que amostras de intestino de animais que receberam CPT-11 apresentaram aumento na contratilidade intestinal induzida por acetilcolina.

Alencar e colaboradores (2017) demonstraram que LP diminui a hipercontratilidade intestinal induzida por CPT-11. Cechinel-Zanchett *et al.*, (2018) também observaram que o tratamento com uma fração rica em flavonóides reduz a motilidade intestinal nos animais que receberam CPT-11.

Pu e colaboradores (2004) mostraram que administração oral do suco de *Morinda citrifolia* (noni) foi capaz de inibir significativamente o esvaziamento gástrico. Já o trânsito intestinal, o peso corporal, a ingestão de alimentos, o consumo de água, o volume de urina e o peso das fezes não foram alterados pela administração aguda ou crônica de noni.

Neste trabalho também foi observado que os animais que receberam apenas CPT-11 apresentaram um aumento da contratilidade intestinal, enquanto nos animais que receberam o tratamento com McLTP1 essa resposta contrátil foi diminuída. Nossos resultados demonstram que a diminuição da contratilidade intestinal pode justificar a melhora da diarreia.

Em adição, também observamos em nossos resultados que o comprimento intestinal foi encurtado pelo CPT-11, concordando com outros trabalhos que também demonstraram esse encurtamento intestinal (ARIFA *et al.*, 2016; ARIFA *et al.*, 2014). No entanto, quando os animais são tratados com McLTP1 o comprimento intestinal se manteve semelhante ao de animais saudáveis, podendo relacionar esse dado como consequência da ação de McLTP1 na redução da hipercontratilidade do músculo liso intestinal.

Outro efeito tóxico de CPT-11 bastante relatado nos trabalhos é a leucopenia (ALENCAR *et al.*, 2017; WONG *et al.*, 2015; GUABIRABA *et al.*,

2014). Alvarenga e colaboradores (2016) também mostraram que a administração de CPT-11 causa leucopenia e que administração de cavacrol, um agonista do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), aumenta o número de leucócitos no sangue dos animais. Da mesma maneira observamos uma intensa leucopenia nos animais que receberam CPT-11 e o aumento dos leucócitos no sangue quando esses animais foram tratados com McLTP1, demonstrando a melhora no efeito citotóxico do quimioterápico.

Em contrapartida à leucopenia no sangue dos animais observada nesse modelo experimental, outros trabalhos já demonstraram que na mucosite intestinal induzida por CPT-11 ocorre um aumento no infiltrado de células inflamatórias no intestino (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2008).

Wong e colaboradores (2015) observaram que além do aumento do infiltrado de neutrófilos no intestino, a administração do CPT-11 também ocasionou o crescimento de bactérias no sangue e o aumento da translocação bacteriana. A soma desses resultados com a leucopenia aumentam o risco de uma septicemia e são semelhantes aos parâmetros observados no modelo de sepse com ligadura do ceco (CLP), relacionando-os a um prognóstico ruim. Kruse e colaboradores (2016) já mostraram que pacientes com quadro de sepse e presença de neutropenia no sangue apresentam maior índice de mortalidade.

Campos e colaboradores (2017) já demonstraram que o tratamento com McLTP1 diminui a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos grânulos de neutrófilos, no modelo de pancreatite induzida por ceruleína. Sousa e colaboradores (2018) mostraram que no modelo de sepse (CLP) o tratamento com McLTP1 na dose de 8 mg/kg melhorou todos os parâmetros avaliados e manteve 100% dos animais vivos.

Nesse trabalho também observamos que McLTP1 diminuiu a atividade de MPO no intestino dos animais que receberam CPT-11, mostrando que a diminuição do infiltrado de neutrófilos no intestino e a melhora da leucopenia induzem a um bom prognóstico, sugerindo melhora na sobrevivência.

O mecanismo da mucosite intestinal é complexo e ainda não foi totalmente elucidado. A literatura mostra que a mucosite tem início com a exposição a agentes citotóxicos, como o metabólito SN38, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resultam no estresse

oxidativo e danificam o DNA das células levando-as à morte, desencadeando uma cascata de vias inflamatórias. Nessa cascata ocorre a ativação do fator NF- $\kappa$ B que induz a expressão de citocinas inflamatórias, TNF  $-\alpha$ , IL -1 $\beta$  e IL-6, as quais conduzem a lesões teciduais e apoptose. NF- $\kappa$ B também induz a expressão gênica de moléculas de adesão e COX-2. A presença de inúmeros mediadores pró-inflamatórios amplifica todo o processo inflamatório e prolonga a lesão tecidual, afetando a submucosa e o epitélio basal. São observadas ulcerações e alterações atróficas da mucosa com lesão tecidual e morte de células-tronco, apresentando prejuízo em sua função (SHI *et al.*, 2016; LEE, RYAN, DOHERTY, 2014).

Neste trabalho também avaliamos a presença de estresse oxidativo através das dosagens de óxido nítrico (NO), malonaldeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH). Foi mostrado que os animais que receberam apenas CPT-11 apresentaram uma diminuição da GSH, parâmetro antioxidante, e aumento de NO e MDA, indicando a presença de estresse oxidativo.

O extrato metanólico da raiz e os extrato de acetato de etila da folha, fruto e raiz de *Morinda citrifolia* L. apresentam atividade antioxidante significativa (ZIN, ABDUL-HAMID, OSMAN, 2002). O suco feito da fruta de *Morinda citrifolia* L. também apresentam efeito antioxidante e anti-inflamatório, inibindo diretamente a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E2 (PGE2) (DUSSOSOY *et al.*, 2011).

NOGUEIRA (2018) mostrou que McLTP1 foi capaz de reduzir significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol e que esse efeito gastroprotetor pode estar relacionado à ativação da via do NO. McLTP1 também foi capaz de reduzir os níveis de MDA e de aumentar os níveis de GSH significativamente, mostrando que essa proteína é capaz de inibir o estresse oxidativo que precede o desenvolvimento das lesões experimentais induzidas por etanol. Da mesma maneira foi observado no modelo de lesão hepática que o tratamento dos animais com McLTP1 foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA e de aumentar os níveis de GSH.

Corroborando a literatura, observamos que os animais tratados com McLTP1 apresentaram um aumento de GSH e uma diminuição de MDA significativos, os níveis de NO que foram determinados de maneira indireta pela reação de Griess não foram alterados, mas a imunomarcagem da iNOS

aumentada no grupo CPT-11 foi diminuída no grupo tratado com McLTP1. Dessa forma podemos relacionar a atividade antioxidante de McLTP1 como efeito protetor atenuando o estresse oxidativo que precede o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) provenientes do estresse oxidativo após a administração de CPT-11 podem promover a ativação de complexos citoplasmáticos multiproteicos chamados inflamassomas. Esses inflamassomas são compostos por uma das várias proteínas do receptor tipo *NOD* (NLRs), que funcionam como sensores de moléculas associadas a danos endógenos ou exógenos e levam à ativação da caspase-1 e subsequente clivagem de citocinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas maduras importantes para o desenvolvimento da mucosite intestinal. No modelo de mucosite intestinal os animais *knockout* para caspase-1 e para IL-18 apresentaram uma atenuação da mucosite intestinal, prevenindo a diarreia, diminuindo a atividade da MPO e a imunomarcagem para iNOS (ARIFA *et al.*, 2014; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2014).

Como consequência do estresse oxidativo observamos danos celulares que desencadeiam uma série de eventos biológicos, como a ativação de fatores de transcrição, dentre eles o NF $\kappa$ B, que aumenta a expressão de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (KNOW, 2016).

No modelo de mucosite intestinal induzida por CPT-11 ocorre o aumento na atividade de MPO e aumento da imunomarcagem de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC no intestino dos animais. O aumento da expressão dessas citocinas pró-inflamatórias ocasiona o aumento do infiltrado inflamatório, amplifica a resposta imune e provoca alterações histológicas na mucosa gastrintestinal que resulta nas lesões do TGI, ressaltando que o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC são importantes mediadores desse processo (LOGAN *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2008).

Wong e colaboradores (2015) mostraram que CPT-11 reduz a sobrevivência dos animais, induz diarreia grave, aumenta a expressão de MyD88, IL-1 $\beta$ , IL-18, COX-2 e NF $\kappa$ B, contribui para o estabelecimento de translocação bacteriana e bacteremia. Sugerindo que a estimulação da via TLR/MyD88 e ativação de NF $\kappa$ B com consequente produção de citocinas e outros

mediadores inflamatórios estão relacionadas ao desenvolvimento da mucosite. Também foi evidenciada a participação dos receptores *Toll-like* do tipo 2 (TLR2) e da proteína adaptadora MyD88 na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, mostrando que animais *knockout* para TLR2 ou MyD88, não apresentaram alterações na perda ponderal, diarreia, alterações morfométricas e histopatológicas observadas nos animais com mucosite intestinal.

Os TLRs e NLRs apresentam semelhanças na sua estrutura e seus componentes. Ambos possuem um domínio TIR e usam a via MyD88, podendo sinalizar uma cooperação entre as vias dos TLRs e os inflamassomas que são ativados no desenvolvimento da MI (WONG *et al.*, 2015).

Na literatura já foi demonstrado que o suco da fruta de *Morinda citrifolia* L. promove uma diminuição na atividade da mieloperoxidase e nos níveis das principais citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no intestino de animais com doença inflamatória intestinal. Além disso, o suco diluído também reduz a produção de óxido nítrico e IL-17 no intestino dos animais (SOUSA *et al.*, 2017).

McLTP1 também é capaz de diminuir os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de promover um aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10, relacionando seu efeito anti-inflamatório com a modulação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo de edema de pata induzido por carragenina (CAMPOS *et al.*, 2017).

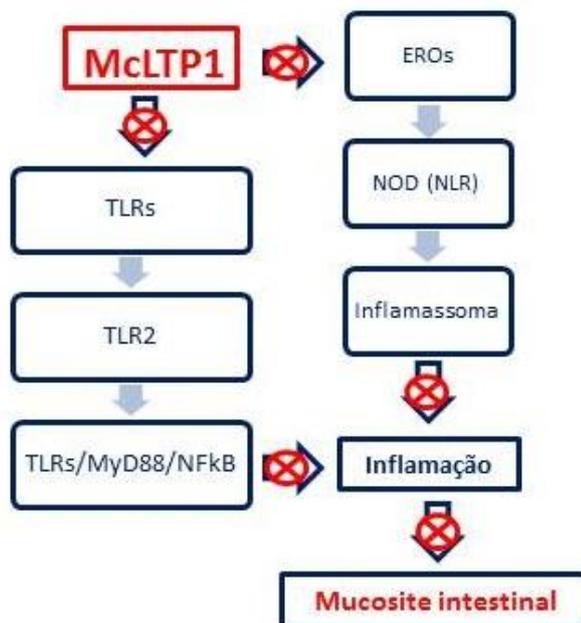
Os resultados desse trabalho corroboram com a literatura mostrando que a administração de CPT-11 aumenta os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$ , além da imunomarcagem para COX-2, NF $\kappa$ B e iNOS. Enquanto o tratamento com McLTP1 foi capaz de diminuir os níveis e a imunomarcagem desses mediadores inflamatórios, relacionando esse efeito à melhora da mucosite intestinal nos animais.

Também investigamos o envolvimento de TGF- $\beta$  nesse modelo, pois na presença de IL-1 $\beta$  e IL-6 o TGF- $\beta$  apresenta um perfil pró-inflamatório (SANJABI *et al.*, 2009). No grupo tratado com CPT-11 observamos um aumento de TGF- $\beta$  no duodeno, enquanto o tratamento com McLTP1 foi capaz de diminuir os níveis desse fator de crescimento no duodeno.

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, não foi obtida diminuição significativa entre os três grupos (salina, CPT-11 e McLTP1), o que concorda com o estudo de Fernandes (2017), que também não observou diferença na produção de IL-10 intestinal entre o grupo que recebeu apenas irinotecano e o que recebeu apenas solução fisiológica 0,9%.

Em resumo, nossos resultados mostram que McLTP1 demonstra ação antioxidante e anti-inflamatória, protegendo o epitélio intestinal contra os danos provocados pelo CPT-11 e seu metabólito ativo SN38, provavelmente inibindo o estresse oxidativo que diminui a ativação de inflamassomas via receptores do tipo NLR e consequente ativação de citocinas inflamatórias. Além disso, sugerimos que McLTP1 também pode estar inibindo a via TLRs/MyD88/NFκB, provavelmente via receptor *Toll like* tipo 2, já que observamos uma redução de NFκB e das citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com McLTP1 (Figura 24). Essa diminuição nos níveis das citocinas resulta em uma menor produção de mediadores inflamatórios, diminuindo assim o recrutamento de neutrófilos no intestino e consequente atenuação do processo inflamatório causado pela mucosite intestinal. Como consequência desse efeito observamos uma melhora na diarreia e no dano intestinal dos animais. No entanto são necessárias maiores investigações sobre McLTP1 tais como o sequenciamento completo da proteína, determinação da sua estrutura tridimensional, presença de toxicidade e/ou alergenicidade, ausência de interferência no efeito do quimioterápico e elucidação do seu mecanismo de ação responsável pelo efeito protetor na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

**Figura 24 - Esquema Hipotetico proposto para o efeito protetor de McLTP1 da mucosite intestinal induzida por irinotecano.**



Fonte: autor

## 7. CONCLUSÃO

Foi concluído que McLTP1 apresentou efeito protetor na mucosite intestinal induzida por CPT-11, aumentando a sobrevida dos animais, melhorando a leucopenia e a diarreia, diminuindo os mediadores e citocinas inflamatórias, além de diminuir o marcador de estresse oxidativo e aumentar o antioxidante, resultando na melhora das alterações morfofuncionais e histológicas. Esses resultados mostram o potencial farmacológico de McLTP1 tornando-o forte candidato para o desenvolvimento de uma terapia eficaz para a toxicidade gastrointestinal da quimioterapia.

## 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.

AHMAD, A. N.; DAUD, Z. A. M.; ISMAIL, A. Therapeutic effect of *Morinda citrifolia* L. **Current Opinion in Food Science**, n. 8, p. 62–67, 2016.

AKASH, M. S. H. *et al.* Development of therapeutic proteins: advances and challenges. **Turkish Journal Of Biology**, Faisalabad, v. 39, n. 1, p.343-358, 2015.

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.

ALGENSTAEDT, P. *et al.* The Effect of *Morinda citrifolia* L. Fruit Juice on the Blood Sugar Level and Other Serum Parameters in Patients with Diabetes Type 2. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

ALMEIDA, V. L. de *et al.* câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, Minas Gerais, v. 28, n. 1, p.118-129, set. 2004.

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.

ANDREYEV, J. *et al.* Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy. **Lancet Oncol**, London, v. 15, n. 1, p.447-460, 2014.

ARAKI, E. *et al.* Relationship between development of diarrhea and the concentration of SN-38, an active metabolite of CPT-11, in the intestine and the blood plasma of athymic mice following intraperitoneal administration of CPT-11. **Jpn J Cancer Res.**, v. 84, n. 6, p. 697-702, 1993.

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

ARIFA, R. D. *et al.* Inflammasome Activation Is Reactive Oxygen Species Dependent and Mediates Irinotecan-Induced Mucositis through IL-1 $\beta$  and IL-18 in Mice. **The American Journal Of Pathology**, v. 184, n. 7, p.2023-2034, 2014.

ASERO, R. *et al.* The clinical relevance of lipid transfer protein. **Clinical & Experimental Allergy**, Milano, v. 48, n. 1, p.6-12, 2017.

ASERO, R. *et al.* Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion. **International Archives Of Allergy And Immunology**, Milan, v. 122, n. 1, p.20-32, 2000.

AZEVEDO, M. *et al.* The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, p. 53, 2013.

AZOFRA, J. *et al.* Lipid Transfer Protein Syndrome in a Non-Mediterranean Area. **International Archives Of Allergy And Immunology**, Navarra, v. 169, n. 3, p.181-188, 2016.

BARBOSA, S. C. M. *et al.* Amifostine reduces inflammation and protects against 5-fluorouracil induced oral mucositis and hyposalivation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (on line), v. x, p. 1, 2018.

BARROS, S. P. N. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA POLPA E PRODUTOS DE NONI (*Morinda citrifolia* L.)**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BASAR, S. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. **Phytotherapy Research**, Hamburg, v. 24, n. 1, p.38-42, 2010.

BOKEMEYER, C. *et al.* Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, Hamburgo, v. 27, n. 5, p.663-671, 2009.

BRASIL. Informe Técnico nº 25, de maio de 2007. **Esclarecimentos Sobre As Avaliações de Segurança Realizadas De produtos Contendo *Morinda citrifolia*, Também Conhecida Como Noni.**. Brasília, DF, 2007. p. 1-5.

BROWN, A. C. Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit: A Review. **Phytother. Res.**, 2012.

CACHUMBA *et al.* Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 77-85, 2014.

CAMPOS, D. C. O. *et al.* First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Fortaleza, v. 86, p.71-79, 2016.

CAMPOS, D. C. O. *et al.* *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Fortaleza, v. 103, n. 1, p.1121-1129, 2017.

CAMPOS, D. C. O. **ISOLAMENTO DE UM PRINCÍPIO ATIVO DE NATUREZA PROTEICA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* L. COM POTENCIAL PARA ALÍVIO DA INFLAMAÇÃO E DA DOR.** 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

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.

CARVALHO, L. L. **INIBIÇÃO DO mTOR AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO.** 2016. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C. *et al.* Flavonoid-rich fraction of *Bauhinia forficata* Link leaves prevents the intestinal toxic effects of irinotecan chemotherapy in IEC-6 cells and in mice. **Phytotherapy Research.**, v. 2018, p. 1–17, 2018.

CHAN-BLANCO, Y. *et al.* The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal Of Food Composition And Analysis**, Limon, v. 19, n. 6-7, p.645-654, 2006.

COSTA, A. S. **AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia* L.), COMO ETAPAS PRELIMINARES PARA SEU USO TERAPÊUTICO EM HUMANOS.** 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

COSTA, M. L. V. *et al.* Chemotherapy-associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, p. 711-720, 2014.

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.* Optimizing the Use of Irinotecan in Colorectal Cancer. **The Oncologist**, London, v. 6, n. 4, p.17-23, 2001.

DEEKEN, R. *et al.* The Nonspecific Lipid Transfer Protein AtLtpI-4 Is Involved in Suberin Formation of *Arabidopsis thaliana* Crown Galls. **Plant Physiology**, Halle, v. 172, n. 3, p.1911-1927, 2016.

DORNELAS-FILHO, A. F. *et al.* Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY**, v. 62, p. 96-108, 2018.

DOUILLARD, J. *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **The Lancet**, França, v. 355, n. 1, p.1041-1047, 2000.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In: [s.l: s.n.]. p. 421–431, 1990.

DUSSOSSOY, E. *et al.* Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 108–115, 2011.

EL-NAGGA, N. E.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, p. 182-199, 2014.

FAKIH G, M. Metastatic Colorectal Cancer: Current State and Future Directions. **Journal of Clinical Oncology**, Duarte, v.33. n.16, p.1809-1824, 2015.

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.

FOUBERT, F. *et al.* Options for metastatic colorectal cancer beyond the second line of treatment. **Digestive and Liver Disease**, Nantes, v. 46. n. 2, p.105-112, 2014.

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

FUCHS, C; MITCHELL, Edith P.; HOFF, Paulo M.. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. **Cancer Treatment Reviews**, Boston, v. 32, n. 7, p.491-503, 2006.

FUJITA, K. *et al.* Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, Tokyo, v. 43, n. 21, p.12234-12248, 2015.

GARÓFOLO, A. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.491-505, 2004.

GIBSON, R. J. *et al.* Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, p. 1095–1100, 2003.

GERHARD, D. *et al.* Probiotic therapy reduces inflammation and improves intestinal morphology in rats with induced oral mucositis. **Brazilian Oral Research**, Presidente Prudente, v. 31, n. 71, p.1-11, 2017.

GOVINDARAJAN, R. Irinotecan/thalidomide in metastatic colorectal cancer. **Oncology**, v. 16, p. 23–26, 2002.

GRAMONT, A. de *et al.* Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, Paris, v. 18, n. 16, p.2938-2947, 2000.

GREEN L.C., *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131–138, 1982.

GUABIRABA, R. *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunology**, Minas Gerais, v. 7, n. 5, p.1079-1093, 2014.

HURWITZ, H. *et al.* Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **The New England Journal Of Medicine**, Waltham, v. 350, n. 23, p.2335-2342, 2004.

JOHNS, L. E.; HOULSTON, R. S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 96, n. 10, p.2992-3003, out. 2001.

JONKE, D. J. *et al.* Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. **The New England Journal Of Medicine**, Ottawa, v. 20, n. 357, p.2040-2048, 2007.

KADER, J. C. Lipid-transfer protein in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, n. 47 p. 627-654, 1996.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion In Oncology**, Adelaide, v. 19, n. 1, p.323-327, 2007.

KOSELKE, *et al.* Chemotherapy-Induced Diarrhea. **Journal of Hematology Oncology Pharmacy**, v. 2, n. 4, p.143-151, 2012.

KNOW, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 2016, n. 9, p. 2007–2016, 2016.

KRUSE, J. M. *et al.* Neutropenic Sepsis in the ICU: Outcome Predictors in a Two-Phase Model and Microbiology Findings. **Critical Care Research and Practice**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

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.

LAGASSÉ, D. *et al.* Recent advances in (therapeutic protein) drug development. **F1000 Research**, Silver Spring, v. 113, n. 6, p.1-17, Feb. 2017.

LEE, C. S.; RYAN, E. J.; DOHERTY, G. A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 14, p. 3751-3761, 2014.

LEITE, C. A.V.G. *et al.* Target Inhibition of IL-1 Receptor Prevents Ilofosamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **The Journal of Urology**, v. 194, p. 1777-1786, 2015

Li F. K. *et al.* Aggravation of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced hepatitis and acute renal failure by slimming drug containing anthraquinones. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p. 1916–1917, 2004.

LIMA JÚNIOR, R. C. P. *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, Fortaleza, v. 69, n. 4, p.931-942, 2011.

LIMA JÚNIOR, R. C. P. *et al.* Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal Of Pharmacology**, Fortaleza, v. 171, n. 9, p.2335-2350, 2014.

LIU, F. *et al.* Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. **Journal Of Experimental Botany**, Wuhan, v. 66, n. 19, p.5663-5681, 2015.

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.

LOGAN, R. M. *et al.* The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 5, p.448-460, 15 May 2007.

LOWRY, O. H. *et al.* The folin by oliver. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUTIF, C. C. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ALERGÊNICA DE UMA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE LIPÍDEOS ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* L. (RUBIACEAE)**. 2015. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MA, J. K. C.; DRAKE, Pascal M. W.; CHRISTOU, Paul. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 10, p.794-805, 2003.

MACEDO, F. Y. B. *et al.* Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation**, v. 35, p. 297-307, 2012.

MACPHERSON, B.R., PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 7, n. 2, p.135–50. 1978.

MARCOLINO, E. *et al.* Dual effect of silymarin on experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by irinotecan. **TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY**, v. 327, p. 71-79, 2017.

MATHIJSSSEN *et al.* Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 2182–2194, 2001.

MELO, M. L. P. *et al.* Role of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, Fortaleza, v. 61, n. 5, p.775-784, 2008.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Nonipreparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**, Innsbruck, v. 17, n. 1, p.445-447, 2005.

MIRANDA, M. P.; SOUZA, D. S. Glutamina na Prevenção e Tratamento da Mucosite em Pacientes Adultos Oncológicos: uma Revisão Sistemática da Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p.277-285, 2015.

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.

NAYAK, A. K. Advances in therapeutic protein production and delivery. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Orissa, v. 2, n. 2, p.1-5, 2010.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the Wound Healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, Trinidad, v. 6, n. 3, p.351-356, 2009.

NOGUEIRA, F. C. **EFEITOS GASTRO- E HEPATOPROTETORES DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) EM CAMUNDONGOS**. 2018. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

NURGALI, K.; JAGOE, T.; ABALO, R. Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 245, p. 1-3, 2018.

PEREIRA, A. F. *et al.* Neurotoxic effect of oxaliplatin: Comparison with its oxalate-free analogue cis-[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)] (LLC-1402) in mice. **TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY**, v. 340, p. 77-84, 2018.

PEREIRA, V. B. M. *et al.* A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, p. 323-32, 2016.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R. J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals Of Oncology**, Farmington, v. 22, n. 6, p.78-84, 2011.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, Skopje, v. 6, n. 11, p.1-5, 2012.

PISAL, D. S.; KOSLOSKI, M. P.; BALU-IYER, S. V. Delivery of Therapeutic Proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 6, 2010.

POPAT, S.; HUBNER, R.; HOULSTON, R. S. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. **Journal Of Clinical Oncology**, Sutton, v. 23, n.3, p.609-618, 2005.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit - Phytochemistry, Pharmacology, Safety. **Planta Medica**, Basel, v. 73, n. 3, p.191-199, 2007.

PU, H. *et al.* Effects of Juice from *Morinda citrifolia* (Noni) on Gastric Emptying in Male Rats. **Chinese Journal of Physiology**, v. 47, n. 4, p. 169-174, 2004.

R. HIRSCH, B. *et al.* Capecitabine in the management of colorectal cancer. **Cancer Management and Research**, Durhan, v.3, p.79-89, 2011.

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

RIBEIRO, R. A *et al.* Mucosite oral: Patogênese e manuseio clínico. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 15, p. 18-24, 2008.

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.

SALMINEN, T. A.; BLOMQUIST, K.; EDQVIST, J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. **Planta**, Turku, v. 244, n. 5, p.971-997, 2016.

SALTZ, L. *et al.* Irinotecan Plus Fluorouracil/Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer: A New Survival Standard. **The Oncologist: Promising New Drugs and Combinations**, New York, v. 6, n. 1, p.81-91, 2001.

SANJABI, S. *et al.* Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 9, n. 4, p. 447–453, 2009.

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

SHALAN, N. A. A. M.; MUSTAPHA, N. M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, Serdang, v. 83, n. 1, p.46-53, 2017.

SHARMA, A. R. *et al.* Next Generation Delivery System for Proteins and Genes of Therapeutic Purpose: Why and How? **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

SHELTON, B. K. Introduction to colorectal cancer. **Seminars In Oncology Nursing**, Baltimore, v. 18, n. 2, p.2-12, 2002.

SHI, C. *et al.* Steamed root of *Rehmannia glutinosa* Libosch (Plantaginaceae) alleviates methotrexate-induced intestinal mucositis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 143–150, 2016.

SHITARA, K. *et al.* Prognostic Factors for Metastatic Colorectal Cancer Patients Undergoing Irinotecan-Based Second-Line Chemotherapy. **Gastrointestinal Cancer Research**, Aichi, v. 4, n. 5-6, p.168-172, 2010.

SHOEB, A. *et al.* Effect of *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit Juice on High Fat Diet Induced Dyslipidemia in Rats. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, Karnataka, v. 10, n. 4, p.6-10, 2016.

SILVA, L. R. *et al.* Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Fortaleza, v. 17, n. 1, p.93-100, 2012.

SIMMONDS P.C. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Colorectal Cancer Collaborative*, v. 321, p. 531–535, 2000.

SOUSA, B. C. *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit Juice Reduces Inflammatory Cytokines Expression and Contributes to the Maintenance of Intestinal Mucosal Integrity in DSS Experimental Colitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

SOUZA, A. A. *et al.* Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**, Fortaleza, v. 149, n. 1, p.9-17, 2018.

SOUZA, A. A. **McLTP1 (*Morinda citrifolia* LIPID TRANSFER PROTEIN 1): EFEITO ANTIMICROBIANO INVITRO E ATIVIDADE PROTETORA SOBRE A SEPSE INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**. 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

STADLBAUER, V. *et al.* Hepatotoxicity of NONI juice: Report of two cases. **World Journal Of Gastroenterology**, Graz, v. 11, n. 30, p.4758-4760, 2005.

STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Therapeutic Advances In Medical Oncology**, Halle, v. 2, n. 1, p.51-63, 2010.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN J. M.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan-induced mucositis is associated with changes in intestinal mucins. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, Adelaide, v. 64, n. 1, p.123-132, 2008.

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

THOMAS, B. R.; VAN DEYNZE, A.; BRADFORD, K. J. Production of Therapeutic Proteins in Plants. **Agricultural Biotechnology**, Oakland, v. 1, n. 1, p.1-12, 2002.

TOL, J.; PUNT, C. J. A. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: A review. **Clinical Therapeutics**, Nijmegen, v. 32, n. 3, p.437-453, 2010.

TONON, L. M. *et al.* Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, v.53. n. 2, p.173-182, 2007.

TORRES, M. A. O. *et al.* One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. **Phytotherapy Research**, São Luís, v. 31, n. 7, p.971-979, 2017.

TRIFAN, O. C.; DURHAM, W. F.; SALAZAR, V. S, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Research**, v. 62, p. 5778-5784, 2002.

U.S. Department of Health and Human Services. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE), version 5.0, 27 Novembro2017, National Institutes of Health, National Cancer Institute. [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_8.5x11.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf). Acesso em 3 jan. 2019.

VAN CUTSEM, E. *et al.* Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. **The New England Journal Of Medicine**, Leuven, v. 14, n. 360, p.1408-1417, 2009.

VAN KRIEKEN, J. H. *et al.* Panitumumab use in metastatic colorectal cancer and patterns of RAS testing: results from a Europe-wide physician survey and medical records review. **Bmc Cancer**, Nijmegen, v. 17, n. 1, p.1-9, 2017.

VÉNAT-BOUVER, L. *et al.* Irinotecan-based chemotherapy in a metastatic colorectal cancer patient under haemodialysis for chronic renal dysfunction: two cases considered. **Anti-Cancer Drugs**, Limoges, v.18, p.977-980, 2007.

WANG, M. *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, Rockford, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.

WANG, M.; SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Ann N y Acad Sci**, Rockford, v. 952, n. 1, p.161-168, 2001.

WEST, B. J.; SU, C. X.; JENSEN, C. J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit. **The Journal Of Toxicological Sciences**, American Fork, v. 34, n. 5, p.581-585, 2009.

WONG, D. V. T. *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1-21, 2015.

WU, Y. *et al.* The Role of Endophytic Fungi in the Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

XU, Y. *et al.* NtLTP4, a lipid transfer protein that enhances salt and drought stresses tolerance in *Nicotiana tabacum*. **Scientific Reports**, Tai'an, v. 8, n. 1, p.8873-8887, 2018.

YAMAMOTO, M. *et al.* Metabolism of irinotecan and its active metabolite SN-38 by intestinal microflora in rats. **Oncology Reports**, Tokyo, v. 20, n. 1, p.727-730, 2008.

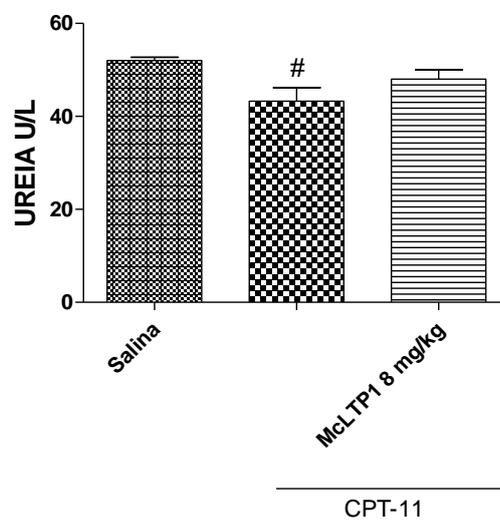
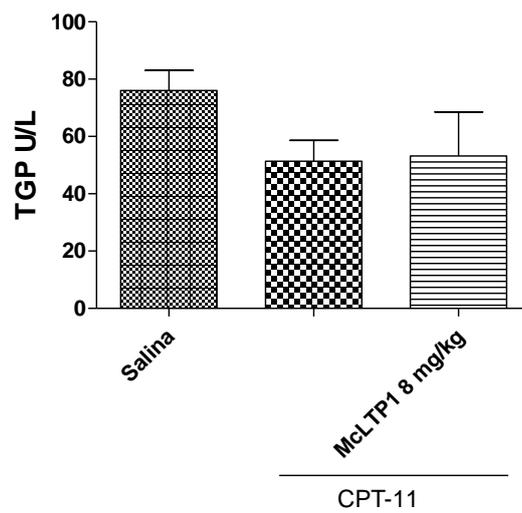
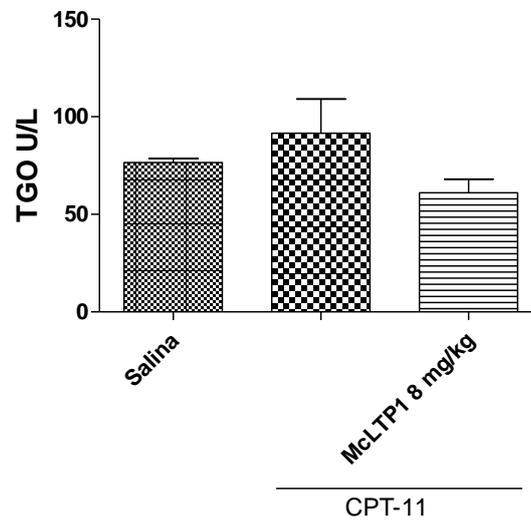
YAO, J. *et al.* Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. **International Journal Of Molecular Sciences**, Broken Arrow, v. 16, n. 12, p.28549-28565, 2015.

YCHOU *et al.* High-dose, single-agent irinotecan as first-line therapy in the treatment of metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 50, p. 383–391, 2002.

YÜCE, B. *et al.* Hepatitis Induced by Noni Juice from *Morinda citrifolia*: A Rare Cause of Hepatotoxicity or the Tip of the Iceberg?. **Digestion**, Munich, v. 73, n. 2-3, p.167-170, 2006.

## ANEXOS

## Parâmetros bioquímicos



Os animais receberam salina 5 mL/kg, i.p., CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias ou McLTP1 8 mg/Kg por sete dias consecutivos, dose única diária antes da 1ª injeção de irinotecano, dia zero e continuado por seis dias consecutivos, dose única diária, totalizando sete dias de administração + CPT-11 i.p. 75 mg/kg/dia durante 4 dias, i.p. No sétimo dia, o sangue periférico foi coletado para realização das dosagens bioquímicas (n=10). Os resultados foram expressos como  $\text{media} \pm \text{E.P.M.}$  # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado somente com salina i.p. (ANOVA, teste de Bonferroni)

## Drogas e reagentes

- Cloridrato de Irinotecano (CPT-11, Trebyxan®, ampolas 5 mL, 100mg/mL, Bergamo);
  - Ácido acético glacial P.A. (Merck);
  - Ácido Sulfúrico P.A. (Merck);
  - Soro fisiológico 0,9% (Salina),
  - Formaldeído 40% (Reagen);
  - Éter etílico (Merck)
  - Hematoxilina (Reagen);
  - Eosina (Merck);
  - Xilol (Reagen);
  - Solução salina 0,9 % (estéril e apirogênica) (Pharmace);
  - Solução de Turk;
  - Solução tamponada com fosfato (PBS);
  - Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma);
  - Envision Flex (Dako) (ref: K8006) diluente para anticorpo;
  - Violeta de Genciana (Reagen);
  - Fosfato de potássio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth);
  - Fosfato de potássio dibásico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Synth);
  - Envision Flex PBR (reagente de bloqueio de peroxidase) (ref: K8010/K8012/K8024);
  - Envision Flex tampão de lavagem (Wash Buffer) (ref. S3006);
  - Envision Flex tampão de substrato/DAB (ref K3468);
  - Envision Flex – Hematoxilina (ref: K8018);
- ANTICORPOS
- Anticorpo primário policlonal de cabra Anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). (ref: SC-1447);
  - Anticorpo primário policlonal de coelho anti-NFκB (Abcam) (ref: ab194926);

- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-iNOS (Abcam) (ref: ab15323);
- Anticorpo secundário anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (ref: SC-2020).

### **Equipamentos e materiais**

- Agitador de tubos tipo Vortex cetomart® MV;
- Amplificador – AD Instruments, ML845 Powerlab 4/25;
- Aquecedor com temperatura controlada;
- Balança analítica Ohaus AS2600;
- Balança analítica Marte AI200;
- Bequers;
- Câmera de contagem Neubauer;
- Centrífuga Eppendorf 5804R;
- ELISA ELX 800 – Biotek;
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys;
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergiestation T8.10 da Ika Labortechnik;
- Lâmina lisa para microscopia 26 X 76 mm;
- Lamínula 24X32 mm;
- Material cirúrgico;
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N;
- Microscópio Óptico binocular Nikon e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10X;
- Microscópio leica acoplado a computador;
- Pipeta Pasteur, Eppendorfs;
- Seringas (BD Plastipack);



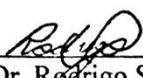
Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO EFEITO MECANIMOS DE AÇÃO DE UMA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE *HIMANTHUS DRASTICUS* NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS", protocolo nº93/2015, 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 11.794, de nº8 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 02 de março de 2016.

Vigência do projeto	31/02/2015 a 30/01/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	500
Peso/Idade	25g 8-semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 02 de março de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sipe: 1520734