



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

TROXERRUTINA PREVINE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA
CICLOOXIGENASE-2

FORTALEZA

2019

JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

TROXERRUTINA PREVINE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA
CICLOOXIGENASE-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.

FORTALEZA

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)

M643t Miranda, João Antônio Leal de.
Troxerrutina previne alterações morfológicas na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil : papel da via ciclooxigenase-2 / João Antônio Leal de Miranda. – 2019.
108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.

1. Antineoplásico. 2. Inflamação. 3. Flavonoide. 4. Intestino. I. Título.

CDD 611

JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

TROXERRUTINA PREVINE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA
CICLOOXIGENASE-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.

Aprovada em: 06/05/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima
Universidade Federal do Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico,

À Deus, grandioso em bondade, e em toda as suas maneiras de guiar seu rebanho. Aos meus pais, **Antônio Ferreira** e **Maria Aleluia**, não somente pelo fato de terem me dado à vida, mas por serem meus pilares, meus dois braços, pela confiança em mim depositada, pela força e incentivo que sempre pude contar, em qualquer momento da minha vida, inclusive nesta etapa percorrida até o dia de hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e força para alcançar este sonho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira, pelos anos de orientação, ensinamentos, dedicação, acolhimento, compreensão, e pelas palavras de incentivo em muitos momentos difíceis, muitíssimo obrigado.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima, Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao meu amigo Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha, pela disponibilidade de participar da banca examinadora qualificação e defesa de doutorado, bem como pela parcerias realizadas, orientações e prontidão em colaborar em várias etapas da pesquisa.

À Dra. Maria Francilene Souza Silva, pela amizade sincera, pela ajuda nos momento mais difíceis de minha estadia em Fortaleza, onde se fez presente, e se faz, além das dicas, sugestões e parcerias realizadas.

Aos colegas de Pós-graduação Lázaro Fideles, Kethyma Fonseca e Lucianny Lima, pelo apoio e amizade no decorrer desta jornada.

Ao meu IC e amigo Paulo Vitor pela ajuda inestimável em todos os momentos da pesquisa, meu muitíssimo obrigado pela disponibilidade em colaborar e somar forças nesses inúmeros finais de semana em laboratório, onde chuva e sol não abalaram sua determinação.

Aos corpo técnico e responsável pelo Laboratório NEMPI, em especial ao Adalberto Junior pela prontidão, disponibilidade e excelência em seus serviços, à Josy pela paciência e disponibilidade em ajudar nas mais variadas etapas da pesquisa, e Flávia pela atenção e ajuda demandada por mim.

Aos demais alunos de iniciação científica do NEMPI e grupo de pesquisa, em especial a Barbara, Letícia, Brenda e Neto.

À Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, pela valiosa colaboração e disponibilização da droga objeto de estudo.

Às amigas de Fortaleza e de pesquisa, Claudia e Cássia, por me ajudarem por demais em vários momentos que não tinha a quem recorrer, vocês foram fundamentais para que eu lograsse êxito.

Aos meus colegas de trabalho da UFPI Bom Jesus, HVU e CPCE, pela torcida e compreensão em muitas das minhas ausências, em especial ao meu amigo Márcio Eduardo.

À toda minha família pela torcida, orações, apoio em todos os momentos desta jornada, em especial meus pais Antônio e Aleluia e meus irmãos Paula e Gabriel.

RESUMO

Mucosite intestinal é uma complicação comumente associada ao 5-fluorouracil (5-FU), um agente quimioterápico bastante utilizado no tratamento do câncer em todo o mundo. Para a troxerrutina (TRX), um flavonóide semissintético oriundo da rutina, a qual é extraída da *Dimorphandra gardneriana*, várias atividades farmacológicas tem sido descritas, como antioxidante e anti-inflamatória. No presente estudo, objetivou avaliar o efeito do TRX na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU em camundongos Swiss. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos: Salina, 5-FU, TRX (50, 100 e 150 mg/kg), Celecoxibe (CLX), CLX + TRX 100 mg/kg. O peso dos camundongos foi avaliado diariamente. Após o protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram coletados para avaliação histopatológica e morfométrica, leucograma, níveis de glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e Mieloperoxidase (MPO), contagem de mastócitos e células caliciformes, imunohistoquímica para ciclooxigenase 2 (COX-2). Ensaio *in silico* de docagem molecular dos complexos formados entre TRX e as enzimas COX, TNF- α e NF- κ B foi realizado. Os resultados mostram que o composto 5-FU induziu intensa perda de peso, redução na altura das vilosidades, perda de arquitetura das criptas, edema, infiltrado inflamatório, bem como o aumento de MPO e MDA e diminuição de GSH, e indução de mastocitose e depleção das células caliciformes. O TRX 100 mg/kg preveniu alterações histopatológicas induzidas pelo 5-FU, diminuiu níveis de MDA e MPO, aumentou a concentração de GSH, preveniu a mastocitose intestinal e preveniu a depleção de células caliciformes. Através da modulação da via da COX-2, pode-se evidenciar, por meio da avaliação morfométrica e histopatológica e imunohistoquímica para COX-2, que o TRX possivelmente atue pela via da COX-2, interagindo com esta via para desencadear seu efeito protetor na mucosite intestinal. Os achados neste trabalho sugerem que TRX (100 mg/kg) previne as alterações morfológicas induzida pelo 5-FU, possivelmente atuando pela via da COX-2.

Palavras-chave: Antineoplásico. Inflamação. Flavonoide. Intestino.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is a common complication associated to 5-Fluorouracil (5-FU) treatment, a chemotherapeutic agent widely used for cancer treatment. Troxerrutin (TRX) a semisynthetic flavonoid from the rutin, which is extracted from the *Dimorphandra Gardneriana*, which has various pharmacological activities described as antioxidant and anti-inflammatory. The aim of the present study was to evaluate the effect of TRX on intestinal mucositis induced by 5-FU in Swiss mice. The animals were randomly divided in groups: Saline, 5-FU, TRX (50, 100 and 150 mg/kg), Celecoxib (CLX), CLX + TRX 100 mg/kg. The mice weight was evaluated daily for each group. At the end of the experimental protocol, the animals were euthanized and segments of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) were collected for histopathological and morphometric evaluation; leukogram, reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO), mast cell and goblet counts, and cyclooxygenase 2 (COX-2) by immunohistochemistry. *In silico* molecular docking assays of the complexes formed between TRX and the COX, TNF- α and NF- κ B enzymes were performed. The results indicate that 5-FU induced intense weight loss, reduced villi height, causing loss of crypt architecture, edema, inflammatory infiltrate as well as increased MPO and MDA and decreased GSH, and induction of mastocytosis and depletion of goblet cells. The use of TRX 100 mg/kg prevented histopathological changes induced by 5-FU, showing a decrease of MDA and MPO levels, increased GSH concentration, prevented intestinal mastocytosis and prevented depletion of goblet cells. Through modulation of the COX-2 pathway, can be evidenced by morphometric and histopathological and immunohistochemical evaluation for COX-2 that TRX 100 mg/kg possibly acts interacting with COX-2 pathways to trigger its protective effect on intestinal mucositis. The findings in this study suggest that TRX (100 mg/kg) prevented the morphological changes induced by 5-FU, possibly related to COX-2 pathways.

Keywords: Antineoplastic. Inflammation. Flavonoid. Intestine.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 01 | Características da neoplasia..... | 16 |
| Figura 02 | Estrutura de Bases Nitrogenadas Pirimidinas | 18 |
| Figura 03 | Mecanismo de Ação do 5-FU..... | 19 |
| Figura 04 | Organização geral das camadas intestinais e composição celular..... | 21 |
| Figura 05 | Fisiopatologia da Mucosite em cinco fases..... | 25 |
| Figura 06 | Síntese de Eicosanoides pela via Ciclooxigenase..... | 29 |
| Figura 07 | Diferenças estruturas das ciclooxigenases..... | 30 |
| Figura 08 | Estrutura básica de um flavonoide..... | 32 |
| Figura 09 | Estrutura química da Troxerrutina..... | 33 |
| Figura 10 | Espectro de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da Trioxietilrutina..... | 37 |
| Figura 11 | Esquema de indução e tratamento da mucosite intestinal..... | 39 |
| Figura 12 | Fluxograma do delineamento experimental..... | 41 |
| Figura 13 | Efeito do TRX na perda ponderal induzida por 5-FU..... | 49 |
| Figura 14 | Efeito do TRX na alterações morfométricas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 52 |
| Figura 15 | Efeito do TRX nas alterações histopatológicas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 53 |
| Figura 16 | Efeito de TRX na contagem de leucócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 54 |
| Figura 17 | Efeito de TRX no estresse oxidativo induzidos por 5-FU na mucosite intestinal..... | 55 |
| Figura 18 | Efeito de TRX na atividade da mieloperoxidase (MPO) em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 56 |
| Figura 19 | Efeito de TRX na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 58 |
| Figura 20 | Efeito de TRX na contagem de células calciformes no segmento duodenal de | |

| | |
|---|----|
| camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 59 |
| Figura 21 Docagem molecular da TRX com as enzimas ciclooxigenases 1 e 2..... | 63 |
| Figura 22 Docagem molecular da TRX com citocinas pró-inflamatórias TNF- α e NF- κ B..... | 64 |
| Figura 23 Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento da COX-2 no efeito protetor da TRX sobre as alterações morfológicas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 66 |
| Figura 24 Imunohistoquímica para COX-2..... | 68 |
| Figura 25 Modelo hipotético da ação farmacológica de TRX na mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 01 | Drogas utilizadas no protocolo experimental de mucosite intestinal por 5-FU..... | 38 |
| Tabela 02 | Sistema de escore de mucosite intestinal..... | 42 |
| Tabela 03 | Escores histopatológicos em camundongos tratados com TRX na mucosite intestinal induzida por 5-FU..... | 50 |
| Tabela 04 | Parâmetros de afinidade da docagem molecular de TRX com alvos proteicos pró-inflamatórios..... | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU – Fluoruracil
CAT - Catalase
CLX - Celecoxibe
COX - Ciclooxygenase
GI - Gastrintestinais
GMPc - Guanilato Monofosfato cíclico
GPx- Glutathiona Peroxidase
GSH - Glutathiona reduzida
IGF-I - Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL - Interleucina
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
L-NAME - N(G)-nitro-L-arginina éster metílico
MDA - Malondialdéido
MPO- Mieloperoxidase
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NO - Óxido nítrico
PAS - Ácido periódico Schiff
PG - Prostaglandinas
RMN - Ressonância magnética nuclear
ERN- Espécies reativa de nitrogênio
ERO- Espécies reativa de oxigênio
SOD - Superóxido dismutase
TBARS - Ácido tiobarbitúrico
TNF- α - Fator de necrose tumoral
TRX - Troxerrutina

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | Câncer e Terapêutica | 16 |
| 2.2 | 5-Fluorouracil (5-FU) | 17 |
| 2.3 | Intestino Delgado | 20 |
| 2.4 | Mucosite Intestinal | 22 |
| 2.4.1 | <i>Síntese de Eicosanóides: Via Ciclooxigenase</i> | 28 |
| 2.5 | Produtos naturais na Proteção Gastrintestinal | 31 |
| 2.5.1 | <i>Troxerrutina</i> | 33 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 35 |
| 4 | OBJETIVOS | 36 |
| 4.1 | Objetivo Geral | 36 |
| 4.2 | Objetivos Específicos | 36 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 5.1 | Obtenção de troxerrutina | 37 |
| 5.2 | Drogas e reagentes | 38 |
| 5.3 | Animais | 38 |
| 5.4 | Considerações Éticas | 39 |
| 5.5 | Protocolo de Indução e tratamento da mucosite intestinal | 39 |
| 5.6 | Determinação da dose efetiva da Troxerrutina no tratamento da mucosite. | 39 |
| 5.6.1 | <i>Parâmetros Avaliados</i> | 41 |
| 5.6.1.1 | <i>Análise ponderal</i> | 41 |
| 5.6.1.2 | <i>Análise histopatológica e morfométrica</i> | 41 |
| 5.6.1.3 | <i>Contagem de leucócitos</i> | 43 |
| 5.6.1.4 | <i>Contagem de células da mucosa gástrica: Caliciformes e Mastócitos</i> | 43 |
| 5.7 | Avaliação da ciclooxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e seu envolvimento no efeito protetor da TRX | 43 |
| 5.7.1 | <i>Parâmetros Avaliados</i> | 45 |
| 5.7.1.1 | <i>Docagem Molecular e determinação de sítios-alvo de ligação da troxerrutina.</i> | 45 |
| 5.7.1.2 | <i>Análise histopatológica e morfométrica</i> | 45 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| 5.7.1.3 | <i>Imunohistoquímica para COX-2</i> | 46 |
| 5.7.1.4 | <i>Mensuração dos níveis de GSH e MDA</i> | 47 |
| 5.7.1.5 | <i>Ensaio de mieloperoxidase (MPO)</i> | 47 |
| 5.8 | Análises Estatísticas | 48 |
| 6 | RESULTADOS | 49 |
| 6.1 | Efeito da TRX na perda ponderal induzida por 5-FU | 49 |
| 6.2 | Efeito da TRX nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU | 50 |
| 6.3 | Efeito de TRX na contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU | 54 |
| 6.4 | Efeito de TRX no dano oxidativo induzido por 5-FU na mucosite intestinal | 55 |
| 6.5 | Efeito de TRX na atividade da mieloperoxidase (MPO) em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU | 56 |
| 6.6 | Efeito de TRX contagem de mastócitos e células caliciformes em segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU | 57 |
| 6.7 | Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos | 60 |
| 6.7.1 | <i>Docagem molecular</i> | 60 |
| 6.7.2 | <i>Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina sobre as alterações morfológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU</i> | 65 |
| 6.7.3 | <i>Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina sobre a imunomarcação para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU</i> | 67 |
| 7 | DISCUSSÃO | 69 |
| 8 | CONCLUSÃO | 81 |
| | REFERÊNCIAS | 82 |
| | APÊNDICE A – LISTA DE REAGENTES | 99 |
| | ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA | 100 |
| | ANEXO B – ARTIGOS E RESUMOS PUBLICADOS | 101 |
| | ANEXO C - CADASTRO DOS PESQUISADORES NO SISGEN | 106 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada por apresentar autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular, potencial ilimitado de replicação, desenvolvimento de angiogênese sustentada e, capacidade de invadir e metastatizar, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo. Trata-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade em desenvolvimento, capaz de atingir todas as faixas etárias, indistintamente. Com prevalência crescente no Brasil, no ano de 2018 o câncer acometeu mais de meio milhão de pessoas, figurando como um sério problema de saúde pública (MELO; PINTO-FILHO, 2009; FERREIRA et al., 2012; KUMAR et al., 2013; INCA, 2018).

Dentre os agentes quimioterápicos disponíveis na terapêutica do câncer, o 5-fluorouracil (5-FU), um antimetabólito análogo de uracila, é considerado o agente quimioterápico mais utilizado no mundo (WILHELM et al., 2016). Onde apesar de sua efetividade no tratamento de vários tipos de câncer e tumores sólidos, efeitos colaterais como náuseas, vômitos, mielossupressão e mucosite tem sido relatados (KAWASHIMA et al., 2015a; KAWASHIMA et al., 2015b; KOBUCHI et al., 2016).

Mucosite intestinal, grande percalço no manejo da terapia oncológica, é uma síndrome caracterizada pela ulceração e inflamação da mucosa intestinal devido a complicações na terapia do câncer com o uso de quimioterápicos. A incidência da mucosite em pacientes submetidos à quimioterapia padrão é de aproximadamente 40%, podendo acometer em até 100% dos pacientes submetidos a doses elevadas de quimioterapia (PEREIRA, 2013; MERCADANTE et al., 2015; KIM et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015a).

Devido à falta de ferramentas terapêuticas eficazes para o tratamento da mucosite intestinal, novas alternativas terapêuticas que podem reduzir os efeitos colaterais do 5-FU, sem prejudicar o tratamento do câncer, tem sido fonte de investigação. Neste aspecto, os produtos naturais se destacam devido a boa compatibilidade com a natureza humana e menos efeitos colaterais (AHMAD et al., 2014; BAHMANI et al., 2014).

Os flavonoides, isolados pela primeira vez na década de 1930, são uma família grande e diversificada de compostos que ocorrem naturalmente em uma variedade de plantas. Formulações à base de flavonoides, como a troxerrutina, tem demonstrado eficácia na cicatrização de úlceras venosas (SCALLON et al., 2013). Para este flavonoide trihidroxietilado da rutina, outras propriedades biológicas têm sido reportadas como antioxidante, anti-inflamatória (SHAN et al., 2018), antiapoptótica (GEETHA et al., 2017;

BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017), antiedematogênico (NGEOW et al., 2008; MURI et al., 2010) e potente agente terapêutico para dor neuropática (GUI et al., 2015).

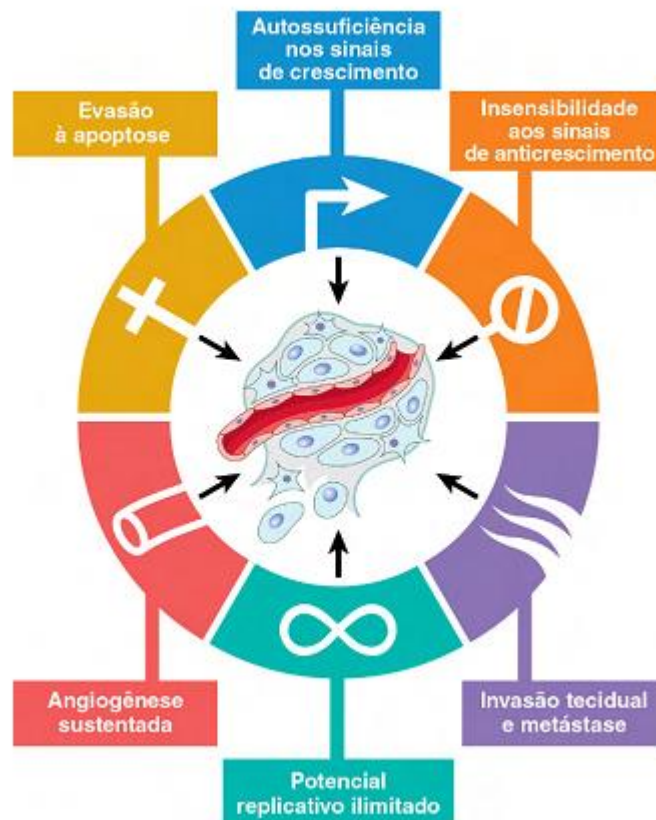
Com base na contextualização do problema, e nas buscas de novas alternativas terapêuticas para a mucosite intestinal, o presente estudo, objetiva avaliar efeito protetor da troxerrutina em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, bem como a modulação da Troxerrutina (TRX) na via da Ciclooxigenase 2 (COX-2).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer e Terapêutica

O câncer caracteriza-se por seis sinais cardeais, autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular, potencial ilimitado de replicação, desenvolvimento de angiogênese sustentada, capacidade de invadir e metastatizar, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (Figura 01) (KUMAR et al; 2013; FERREIRA et al., 2012).

Figura 01. Características da neoplasia.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al; 2013

Com o nome genérico de câncer atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças, este grave é considerado uma condição crônico-degenerativa grave e trata-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos e, em desenvolvimento, o que deixa as doenças neoplásicas malignas num cenário preocupante de saúde pública (KUMAR et al; 2013; ALVES et al. 2017; BENITES et al., 2017).

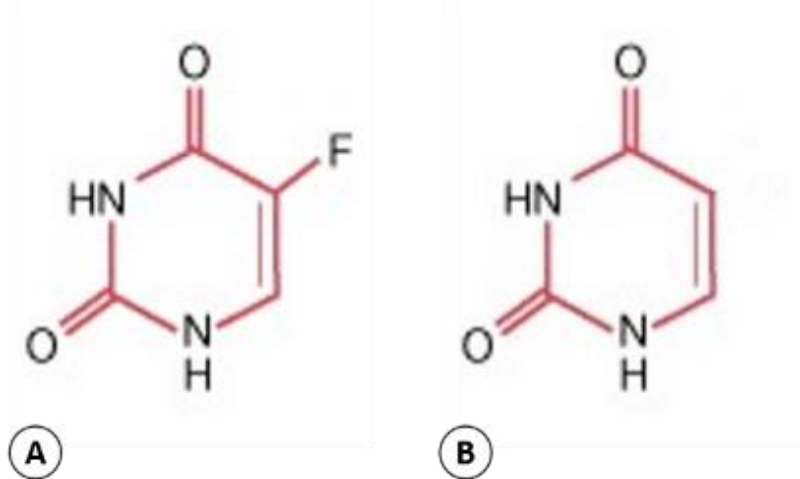
Para o ano de 2018, foram diagnosticados mais de meio milhão de pessoas com algum tipo de neoplasia no Brasil, e estima-se que em 2030, 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo, que muito se deve ao crescimento e envelhecimento populacional (ALVES et al. 2017). À medida que a incidência de câncer na população mundial cresce, o tratamento antineoplásico e a busca de melhoria da qualidade de vida do paciente em tratamento também se encontram em grande expansão. Cabe destaque a quimioterapia, que figura com uma das principais ferramentas que se tem à disposição na terapêutica do câncer (HUANG et al., 2013).

2.2 5-Fluorouracil (5-FU)

Drogas antimetabólicas desempenham suas funções através da inibição da biossíntese de processos essenciais, ou pela sua incorporação a macromoléculas, tais como DNA e RNA, inibindo a sua função normal (LONGLEY et al., 2003), ou seja, são drogas que interferem nos processos metabólicos normais dentro das células. Descobertos por Farber, em 1948, os antimetabólitos tem sido utilizados há pelo menos 50 anos no tratamento do câncer (KAYE, 1998).

A fluoropirimidina, 5-fluorouracil (5-FU), um fármaco antimetabólito análogo de nucleosídeo, tem sido utilizado há várias décadas na terapia antineoplásica e, é considerado o agente quimioterápico mais utilizado no mundo (WILHELM et al., 2016). O 5-FU é um composto orgânico aromático heterocíclico com uma estrutura semelhante à das moléculas de pirimidina de DNA e RNA (ZHANG et al., 2008); trata-se de um análogo de uracila com um átomo de flúor na posição 5 (Figura 02), em vez de hidrogênio (KUMAR et al., 2010). Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere com o metabolismo de nucleotídeo e pode ser incorporada no RNA e DNA (THOMAS et al., 2015), levando a morte celular e citotoxicidade (ZHANG et al., 2008; UDOFOT et al., 2015).

Figura 02. Estrutura de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.



Fonte: Adaptado de PIZZORNO et al., 2003. A: 5-Flourouracil; B: Uracila.

Comumente o 5-FU é administrado por injeção intravenosa (THOMAS et al., 2015), entretanto, a depender do câncer, o 5-FU pode ser administrado por outras vias, como oral (PANGENI et al., 2016) e tópica (RAJINIKANTH; CHELLIAN, 2016). Além da possibilidade de novas formulações com sistema de liberação controlada e continuada do 5-FU no tecido alvo (MINHAS et al., 2016; UDOFOT et al., 2015; WENANDE et al., 2016), bem como da combinação do 5-FU com outros agentes antineoplásicos, por meio de administração concomitante das drogas, melhorando o efeito da quimioterapia contra as células cancerígenas, e reduzindo a toxicidade nas células normais (KOBUCHI et al., 2014; GAO et al., 2016; ITO et al., 2016; SUZUKI et al., 2016).

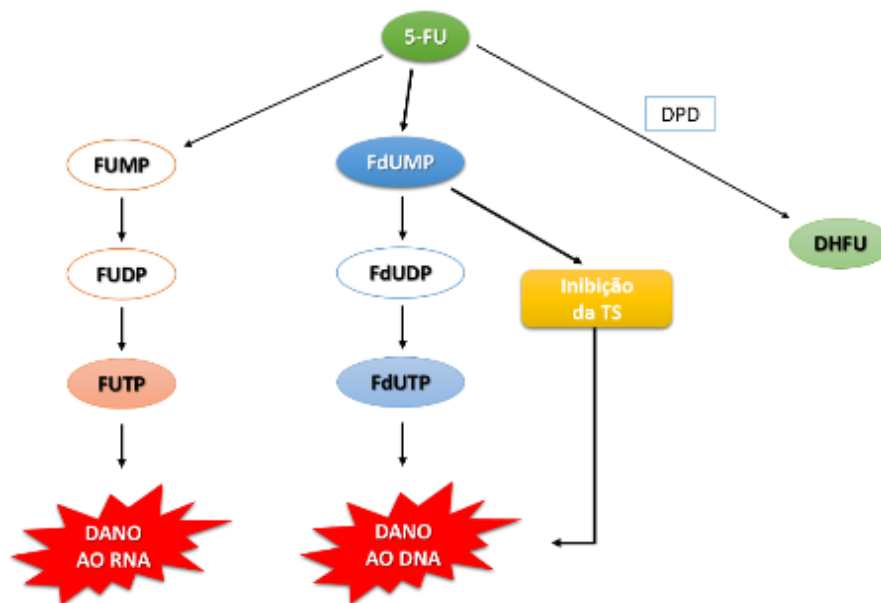
O 5-FU pode ser administrado na forma direta ou na forma de pró-droga, como exemplo a Capecitabina (N4-pentiloxicarbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina), uma solução administrada oralmente de fluoropirimidina carbamato 5-FU. A pró-droga é convertida em 5-FU através de uma cascata enzimática envolvendo três enzimas chaves, entre elas a timidina fosforilase (TP), culminando ao final, na liberação de 5-FU (FOCACCETTI et al., 2015; DERISSEN et al., 2016).

Intracelularmente, o 5-FU é convertido em vários metabolitos ativos: o Trifosfato fluorouridina (FUTP), que é incorporada no RNA em vez de trifosfato de uridina (UTP); o Trifosfato fluorodesoxiuridina (FdUTP), que é incorporado no DNA em vez de desoxitimidina-trifosfato (dTTP); e o monofosfato fluorodesoxiuridina (FdUMP), que forma um complexo estável com a timidilato sintase (TS), inibindo a produção de monofosfato de desoxitimidina (dTMP) (KUMAR et al., 2010). A dTMP é essencial para a replicação e reparação do DNA, e sua depleção, por conseguinte, causa citotoxicidade. Estes metabolitos

ativos perturbam a síntese de RNA, bem como a inibição e ação da TS, tal inibição é considerado principal mecanismo de ação do 5-FU (PETERS et al., 2002; NOORDHUIS et al., 2004; HOSKINS; BUTLER, 2007). Com isso, a FUTP provoca alterações no processamento e função do RNA, já a FdUTP e a FdUMP causam danos ao DNA (LONGLEY et al., 2003; MIURA et al., 2010).

O limiar de concentração e atividade do 5-FU é avaliado pela velocidade de catabolismo da dihidropirimidina desidrogenase (DPD) no fígado, que é responsável pela conversão do 5-FU (80% do total) em dihidrofluorouracil (DHFU), um metabolito inativo (Figura 03) (THORN et al., 2011). Aproximadamente 15-20% é eliminado na urina e apenas uma pequena fração, estimada em apenas 3% da dose original de 5-FU, permanece disponível para exercer sua ação antitumoral, mediando efeitos citotóxicos em células tumorais e tecidos normais (MIURA et al., 2010; FOCACCETTI et al., 2015).

Figura 03. Mecanismo de Ação do 5-FU.



FUMP: Monofosfato fluorouridina; FUDP: Difosfato fluorouridina; FUTP: Trifosfato fluorouridina; FdUMP: monofosfato fluorodesoxiuridina; FdUDP: difosfato fluorodesoxiuridina; FdUTP: trifosfato fluorodesoxiuridina; TS: timidilato sintase; DPD: dihidropirimidina desidrogenase, DHFU: dihidrofluorouracil.

A pirimidina fluorada, 5-fluorouracil (5-FU), é o fármaco de quimioterapia mais utilizados na prática clínica oncológica, onde desde a sua introdução, o 5-FU tem sido amplamente utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer e tumores sólidos, incluindo câncer gastrointestinal, ginecológico, câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal avançado, próstata, pâncreas, pele e queratose actínica (AK) e carcinoma

(BAYDAR et al., 2005; MIURA et al., 2010; CHANG et al., 2012; ELBELTAGY et al., 2012b; RAJINIKANTH; CHELLIAN, 2016; WENANDE et al., 2016; LIU et al., 2016).

O mecanismo de citotoxicidade de 5-FU se dá através da inibição competitiva de timidilato sintetase e consequentemente deficiência de timidina, resultando na inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (ELBELTAGY et al., 2012a). Além disso, a incorporação no ácido ribonucleico (RNA) interfere com o processamento e função do RNA e, tem sido associada com toxicidade (MCCARTHY et al., 1998).

Vários são os efeitos adversos no tratamento quimioterápico com o 5-FU, devido sua toxicidade, destacam-se neurotoxicidade, através da redução da neurogênese e consequentemente problemas cognitivos (ELBELTAGY et al., 2012b), cardiotoxicidade, culminando em isquemia, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatia (FOCACCETTI et al., 2015), hepatotoxicidade, mielosupressão (KUMAR et al., 2010; KOBUCHI et al., 2016), perda de cabelo, fadiga (MINHAS et al., 2016), reações cutâneas que incluem eritema, bolhas, prurido, necrose, erosão e exacerbação da rosácea (HADDOCK; COHEN, 2016), além de distúrbios gastrointestinais como lesão da mucosa intestinal (KAWASHIMA et al., 2015a; KAWASHIMA et al., 2015b).

O 5-FU pode levar a mucosite intestinal, atrofia das vilosidades da cripta, e necrose como um resultado de danos no tecido da mucosa, devido à intensa infiltração de células inflamatórias, liberação de citocinas pró-inflamatórias e edema (ARAÚJO et al., 2015a). A mucosite intestinal, induzida pelo 5-FU, é uma das principais complicações que ocorre em entre 50- 80% dos pacientes submetidos à quimioterapia com este antimetabólito e resulta em ulceração, sangramento, inchaço abdominal, bem como vômitos, diarreia e desidratação (CHANG et al., 2012; KIM et al., 2015).

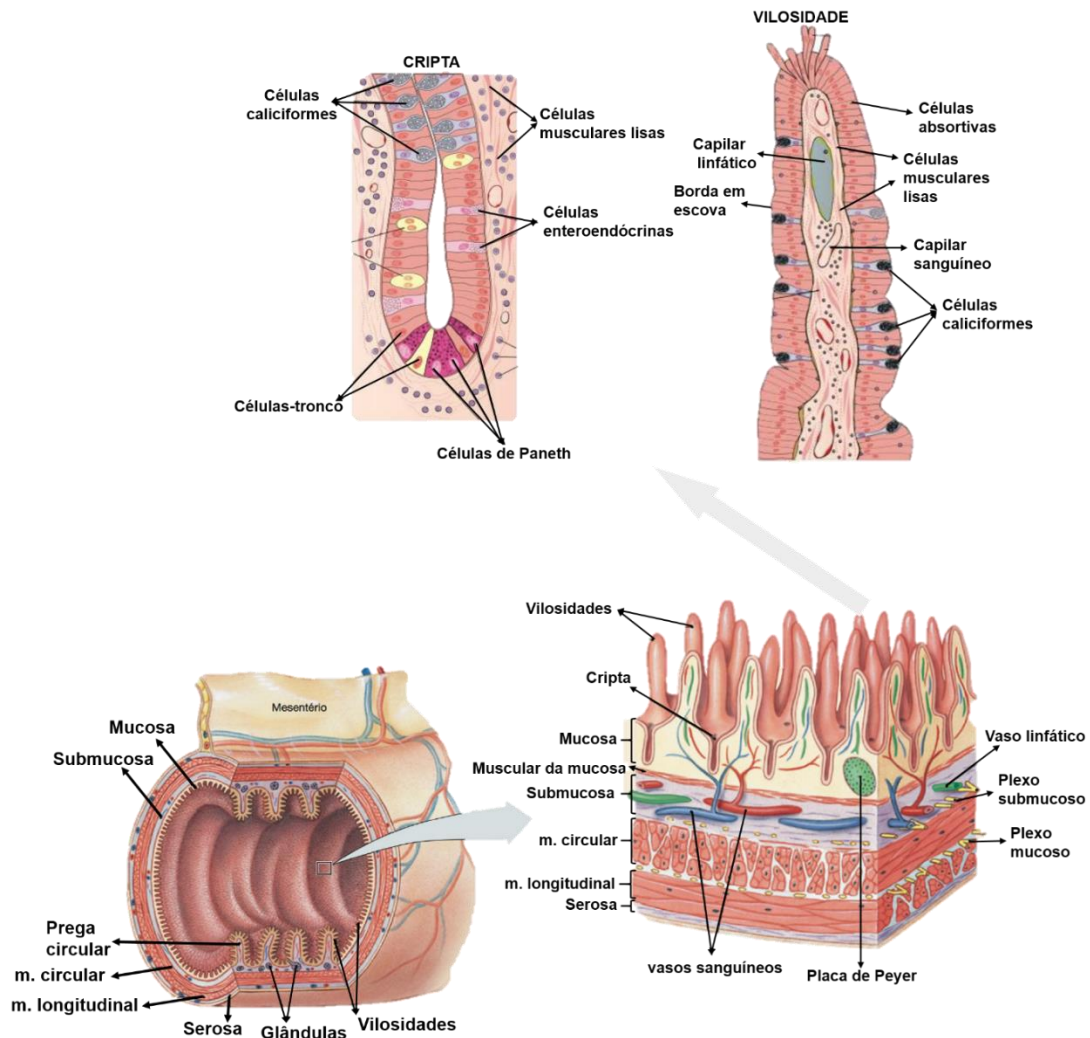
2.3 Intestino Delgado

O intestino delgado é sítio terminal de digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina. Compreendendo a porção mais longa do trato gastrointestinal, com 35 centímetros em camundongos e cerca de 7 metros em humanos, sua extensão encontra-se dividida em segmentos denominados duodeno, jejuno e íleo (TREUTING; VALASEK, 2012).

O intestino delgado apresenta as típicas quatro túnicas estruturais em sua parede: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 04). A mucosa apresenta as principais características histológicas relacionadas aos eventos de absorção, como a presença de

vilosidades (vilos), que são projeções alongadas formadas pelo epitélio e lâmina própria, com cerca de 0,5 a 1,5 mm de comprimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 04. Organização geral das camadas intestinais e composição celular.



Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

O epitélio de revestimento dos vilos é do tipo cilíndrico simples, formado principalmente por células absorptivas (enterócitos), que são células colunares altas com projeções voltadas para o lúmen (microvilosidade) no ápice da célula, criando a borda em escova e, células caliciformes produtoras de muco, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento intestinal. Em continuidade com os vilos apresenta-se as criptas, que por sua vez contêm algumas células absorptivas, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth, tipicamente piramidais que se localizam na porção basal das criptas e possuem grandes grânulos secretores de lisozima e defensina, detentoras de atividade antibacteriana e, células-tronco, também localizadas no terço basal da cripta e entre as células

de Paneth. A cripta tem formato tubular e representa o compartimento proliferativo do intestino (DUNCAN; GRANT, 2003; AIRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; BARRETT, 2015; ARAÚJO; BARROS, 2015; NASCIUTTI et al., 2016).

A submucosa é tipicamente formada por tecido conjuntivo frouxo, apresentando os tipos celulares clássicos deste tecido (fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, entre outros). Na submucosa também são encontrados pequenos gânglios do sistema nervoso autônomo, os quais constituem o plexo submucoso ou plexo de Meissner, que é responsável pelo controle das funções das estruturas da mucosa do intestino delgado (NASCIUTTI et al., 2016).

A muscular do intestino delgado apresenta duas camadas de fibras musculares lisas em diferentes orientações. Uma camada circular interna composta por fibras musculares lisas dispostas em trajeto circunferencial, sendo responsável pelo estreitamento e alargamento do tubo intestinal, enquanto a camada longitudinal externa apresenta fibras musculares lisas em disposição paralela ao longo eixo do tubo intestinal, sendo responsável pelo alongamento e encurtamento do intestino delgado. Estes movimentos constituem o peristaltismo do tubo intestinal, controlado essencialmente por pequenos gânglios do sistema nervoso autônomo, disseminados entre ambas camadas musculares; tais gânglios formam o plexo mioentérico ou plexo de Auerbach. Externamente à muscular, o intestino delgado é recoberto pelo peritônio visceral, que constitui a serosa do intestino delgado, formado por um delicado tecido conjuntivo frouxo recoberto por um epitélio simples pavimentoso, o mesotélio (BERNE; LEVY, 2009; SILVERTHORN, 2010).

O epitélio intestinal como um todo é auto-renovante, com capacidade de renovação que varia de 3 a 7 dias. Esse padrão de proliferação celular apresenta efeito paradoxal, ao passo que pode prevenir o acúmulo de mutações genéticas no compartimento epitelial produzidas por toxinas luminiais, também pode deixar a mucosa extremamente vulnerável a fontes de irritação, traumatismos ou lesão celular, como a causada pelos efeitos citotóxicos do tratamento do câncer (DUNCAN; GRANT, 2003; PINHO et al., 2010).

2.4. Mucosite Intestinal

O intestino é o principal local onde o sistema imunológico se encontra com um grupo diverso de antígenos presentes nos alimentos e nos micróbios intestinais (TURNER, 2010), e o epitélio intestinal como um todo é auto-renovante, com capacidade de renovação que varia de 3 a 7 dias. Esse padrão de proliferação celular apresenta efeito paradoxal, ao passo que

pode prevenir o acúmulo de mutações genéticas no compartimento epitelial produzidas por toxinas luminais, também pode deixar a mucosa extremamente vulnerável a fontes de irritação, traumatismos ou lesão celular, como a causada pelos efeitos citotóxicos do tratamento do câncer (DUNCAN; GRANT, 2003; PINHO et al., 2010). O resultado deste processo de lesão à mucosa intestinal recebe o nome de mucosite.

A mucosite desponta como mais comum das complicações relacionadas ao tratamento com quimioterápicos (PINHO et al., 2010) e, é definida como inflamatória e/ou lesões ulcerativas do trato oral e/ou gastrointestinal (PETERSON et al., 2011); podendo afetar todas as superfícies cobertas de membrana mucosa da boca até o reto (HARRIS et al., 2006). Quando a lesão epitelial é restrita a cavidade oral, a mesma é definida como mucosite oral; no caso de injúria tecidual de envolve o intestino denomina-se de mucosite intestinal, e para o termo mucosite alimentar a lesão tecidual deve envolver o trato orodigestivo (KEEFE et al., 2007; PEREIRA, 2013).

Com uma patogênese complexa, sabe-se que a mucosite intestinal surge a partir de lesões de células basais no trato gastrointestinal devido à quimioterapia e/ou radioterapia, o que resulta em danos na mucosa, reação inflamatória intensa, e consequente ulceração (MERCADANTE et al., 2015). Apesar da escassez de estudos epidemiológicos prospectivos em torno da mucosite intestinal, pesquisas demonstram que susceptibilidade dos pacientes à lesão da mucosa e incluem múltiplos fatores associados ao paciente e ao tratamento (ANTHONY et al., 2006), dessa forma tem-se ciência que o aumento da incidência dessa desordem não está relacionado somente com os tipos de fármacos utilizados, mas também com o número de ciclos de quimioterapia, dose, cronograma, sequenciamento de drogas, idade, gênero e estado nutricional do paciente (D'HONDT et al., 2006; KEEFE, 2007).

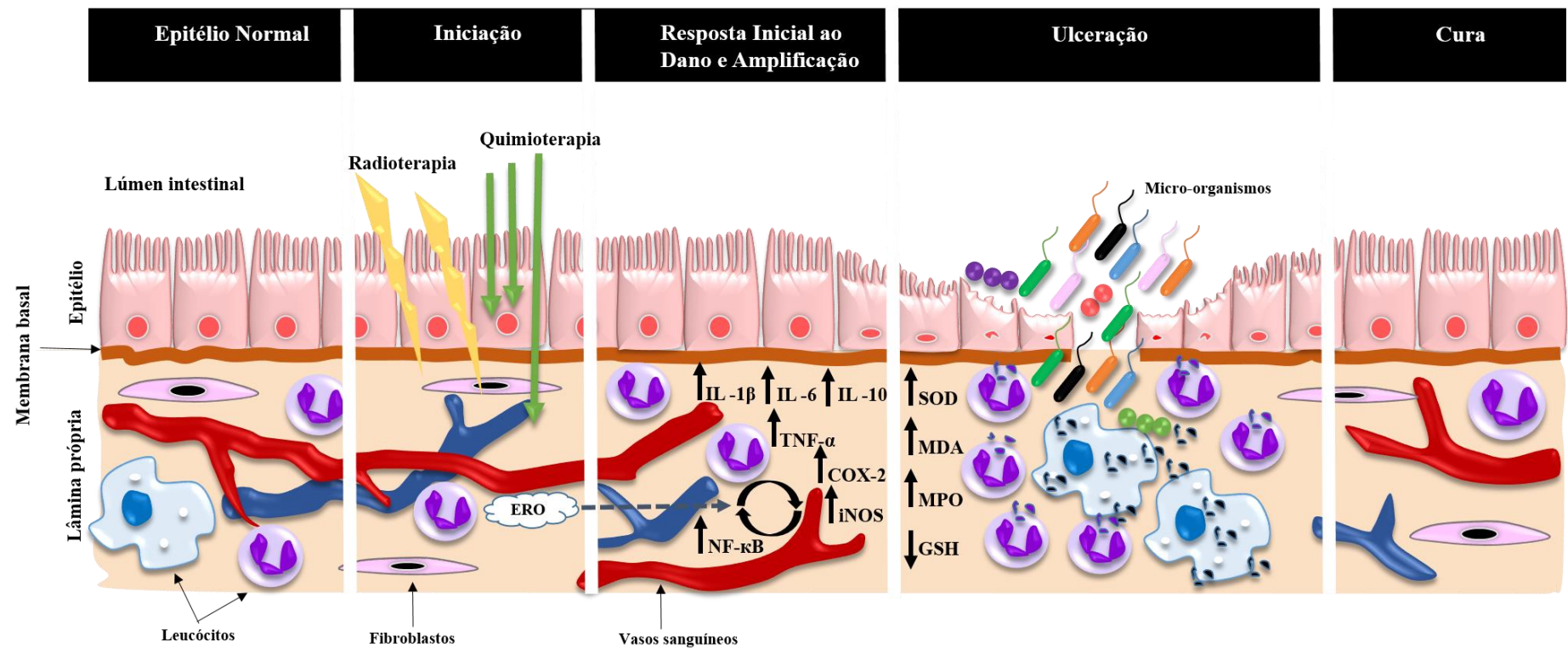
Para os pacientes tratados com quimioterapia, a mucosite é geralmente um evento agudo, e sua forma grave pode ocorrer a qualquer momento entre a segunda e sexta semana do tratamento (MEIROVITZ et al., 2010). Mucosites não resolvidas ou não tratada pode levar a infecções secundárias, bacteremia e sepse (CHEN et al., 2016), bem como comprometimento do estado nutricional, e outras complicações que podem aumentar a morbidade, e impactar portanto, diretamente, na sobrevivência e na qualidade de vida do paciente (AL-ASMARI et al., 2015).

A sintomatologia é dividida em duas categorias: dor e inflamação. Os sintomas de dor incluem inapetência e eventual anorexia, enquanto da inflamação incluem diarreia, vômito, e

redução na absorção de nutrientes (HARRIS et al., 2006; REINKE et al., 2015; ARAÚJO; BARROS, 2015; ZUO et al., 2015; KISSOW, 2015). A fisiopatologia destes sintomas é de grande complexidade e variabilidade ao longo do curso da doença e múltiplos mecanismos podem sobrepor-se (MERCADANTE et al., 2015).

A exata fisiopatologia da mucosite não está totalmente elucidada. Estudos recentes indicaram que os mecanismos fundamentais envolvidos na patogênese da mucosite são muito mais complexos do que somente danos direto ao epitélio, sugere-se que tal condição representa uma interação sequencial de eventos e passos que incluem geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas pró-inflamatórias, mediadores de apoptose, acarretando, em última instância, danos e ruptura da barreira epitelial. De acordo com evidências, a patogênese da mucosite segue modelo de cinco estágios básicos: Iniciação, Resposta Inicial ao dano, Amplificação, Ulceração e, Cura; contudo, não é obrigatório a presença de todas as fases para o estabelecimento da doença (Figura 05) (PETERSON, 2005; D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; GUABIRABA et al., 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; VASCONCELOS et al., 2016; CHEN et al., 2016).

Figura 05. Fisiopatologia da Mucosite em cinco fases.



Fonte: Adaptado de SONIS, 2004. ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; COX-2: Ciclooxigenase-2; NF- κ B: fator nuclear da família kappa-B; TNF- α : factor de necrose tumoral- α ; IL-1 β : Interleucina 1 beta; IL-6: Interleucina 6; IL-10: Interleucina 10; SOD: Superóxido Dismutase; MDA: Malondialdeído; MPO: Mieloperoxidase; GSH: Glutathiona reduzida.

O primeiro estágio da mucosite denomina-se Iniciação e, caracteriza-se pelo dano celular da mucosa e submucosa induzida pela quimioterapia e/ou radioterapia. Lesão das células epiteliais da mucosa e vasos sanguíneos da submucosa é resultado de eventos como inibição da síntese de DNA e agressão ao DNA através da inibição da topoisomerase e síntese de timidilato, bem como alterações no RNA, que por sua vez leva a formação de ERO e elevação do estresse oxidativo, culminando na diminuição da renovação celular. Além da morte celular e perda de integridade epitelial, ocorre também a ativação da resposta imune inata nesta primeira etapa da mucosite (TRUCCI et al., 2009; SONIS, 2009; ÁVILA, 2013; BASTOS, 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; KIM et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016). Apesar do dano tecidual, contudo, apenas uma pequena proporção de células morre rapidamente (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS, 2004). Este insulto inicial desencadeia uma cascata de eventos a serem desenvolvidos na segunda fase da mucosite (D'HONDT et al., 2006).

O estágio Resposta Inicial ao dano, também conhecido como sinalização ou fase de regulação positiva e geração de sinais mensageiros, compreende a segunda fase da cascata de eventos na mucosite, onde múltiplos eventos ocorrem simultaneamente, e a referida etapa inicia a partir do estímulo gerado na primeira fase, com a lesão tecidual propriamente dita e produção das ERO. A presença de ERO promove a regulação positiva de fatores de crescimento, fatores de transcrição, como o fator nuclear da família kappa-B (NF- κ B), p53, moléculas de adesão, genes que codificam citocinas pro-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α , interleucinas-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) e regulação de proteínas envolvidas na apoptose, como a Bcl-2 "*B-cell lymphoma protein 2*" que vai ser inibida e, a ativação da esfingomielinase ácida que desempenha papel importante na transdução de sinal de morte celular apoptótica. A produção dessas citocinas e enzimas que darão início às lesões teciduais e à morte celular por apoptose (SONIS et al., 2004; HARRIS, 2006; D'HONDT et al., 2006; CESCATO, 2010; ÁVILA, 2013; BASTOS, 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; KIM et al., 2015).

Na sinalização, sabe-se que radio e/ou quimioterapia podem ativar diretamente o NF- κ B, um fator de transcrição pró-inflamatório chave gênese do processo inflamatório, e indiretamente, ele pode ser ativado por ERO, onde os segundos mensageiros transmitem sinais de receptores na superfície celular para o ambiente celular interno, levando a regulação positiva. De maneira orquestrada e subsequente, a ativação do NF- κ B promove a expressão de vários genes associados com vias inflamatórias, como consequência, as principais citocinas

pró-inflamatórias (exemplo, TNF- α , IL-1 β , e IL-6), e a via da ceramida são ativadas. Macrófagos são ativados subsequentemente, levando as metaloproteinases de matriz (MMP) a causarem então degradação celular e extracelular diretamente, ou conduzindo a uma maior produção de TNF- α , gerando uma retroalimentação positiva do dano tecidual e morte celular por apoptose (LALLA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; TRUCCI et al., 2009). Nesta fase ocorre também a regulação positiva da expressão gênica para expressão de moléculas de adesão e subsequente ativação da via Ciclooxygenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase (iNOs) e Superóxido Dismutase (SOD) o que resulta em angiogênese e influxo da inflamação (SONIS et al., 2004; SONIS, 2009). É importante salientar que tais eventos ocorrem a nível molecular, e por esse motivo, o dano celular e tecidual representado é observado antes que o paciente seja sintomático e antes que haja qualquer manifestação clínica de lesão tecidual (SONIS, 2009; VASCONCELOS et al., 2016).

Na amplificação ocorre a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β , produzida principalmente por macrófagos, causando lesão de mucosas células, e também ativação das vias moleculares que amplificam a injúria no epitélio, endotélio e fibroblastos. A produção dessas proteínas tem dois efeitos, um direcionado para causar lesão à célula-alvo e o outro dirigido a sinalização e à amplificação do processo. O TNF- α , por exemplo, além de ser um mediador eficaz lesão celular e tecidual, atua numa série de sinalização e amplificação de sinais, através da ativação de feedback positivo por meio do NF- κ B para amplificar a sua resposta. O epitélio então, começa a perder integridade, o que é exacerbado na próxima fase, conhecida como ulceração (SONIS et al., 2004; D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; SONIS, 2009; TRUCCI et al., 2009; ÁVILA, 2013; BASTOS, 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; KIM et al., 2015).

Ulceração, estágio na qual a integridade do epitélio é destruída, compreende a fase mais associada, consistentemente, com a mucosite. A lesão e morte das células-tronco epiteliais basais resultante das fases anteriores acarretam em alterações atróficas que culminam na verdade deterioração e à discriminação da mucosa. A úlcera serve como um foco para a colonização bacteriana, e na presença de granulocitopenia, bactérias inteiras podem invadir vasos da submucosa para causar bacteremia ou sepse (SONIS, 2004; GUABIRABA et al., 2014; KIM et al., 2015).

O estágio final da patobiologia da mucosite é o processo de cicatrização e cura. Nesta fase, os sintomas começam a diminuir, e é caracterizada pela proliferação epitelial, bem como

diferenciação celular e do tecido, restaurando a integridade do epitélio. Infelizmente, em sua maioria, mesmo após a reposição completa do epitélio, a estrutura da submucosa reconstituída difere do seu estado de antes da realização do tratamento quimio-radioterápico. O processo de restauração da integridade epitelial ocorre de maneira concomitante com o retorno da contagem de glóbulos brancos aos valores normais (PETERSON, 2005; D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; ÁVILA, 2013; MONEIM et al., 2017).

Dentre os medicamentos citotóxicos mais frequentemente associada à mucosite incluem bleomicina, citarabina, doxorrubicina, etoposido, 5-fluorouracil, ifosfamida, mercaptopurina, metotrexato, paclitaxel, vinblastina, vincristina, e vinorelbina (HARRIS et al., 2006).

A mucosite é um agravo clínico grave, e apesar da importância clínica, não existe tratamento tido “padrão” e eficaz no mercado (BASTOS, 2014). Atualmente tem-se a disposição tratamento apenas sintomático da mucosite, e dependerá do seu grau de gravidade, objetivando tão somente o alívio dos sintomas, como dor e diarreia, por exemplo (ARAÚJO; BARROS, 2015; KISSOW, 2015).

Agentes terapêuticos em busca de tratamento efetivo da mucosite estão em alta demanda e recebem atenção crescente. Estudos recentes concentraram-se na utilização de bioativos, fatores de crescimento (exemplo a palifermina), hormônios ou interleucinas para modificar o metabolismo epitelial e reduzir a susceptibilidade do trato à mucosite (DUNCAN; GRANT, 2003; KEEFE, 2007; SANTOS et al., 2009; ARAUJO; BARROS, 2015; CHEN et al., 2016).

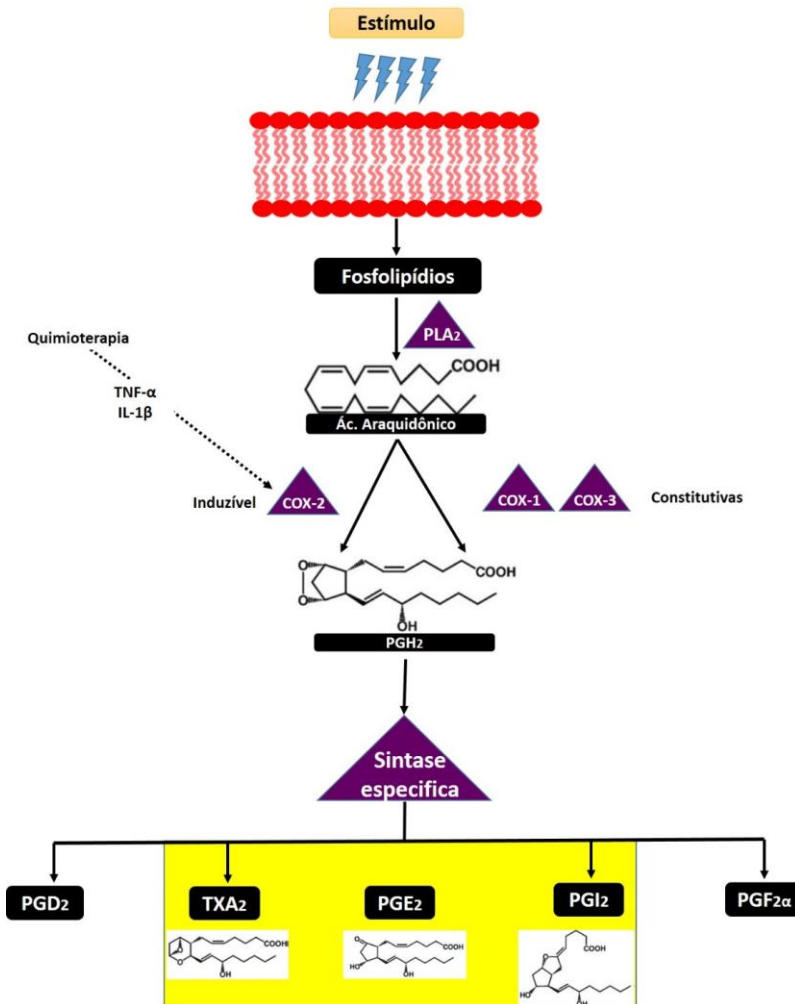
2.4.1 Síntese de Eicosanóides: Via Ciclooxygenase

A lesão celular associada à inflamação é uma resposta proeminente no dano da mucosa (oral e intestinal) durante a terapia antineoplásica por quimioterápicos, sendo a via da ciclooxygenase (COX), uma importante via envolvida na medição inflamatória (LALLA et al., 2010; MENEZES-GARCIA et al., 2018).

A via da ciclooxygenase é responsável pela síntese dos eicosanóides com estruturas de anéis (prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina) a partir da liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidios da bicamada lipídica das membranas celulares (Figura 06). Em resposta a vários estímulos, como as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), fator de

crescimento epidérmico (EGF), fator de ativação (PAF), hormônios (endotelina) e lipopolissacarídeos (LPS), o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado de 20 carbonos, é liberado da membrana e metabolizado em vários lipídios bioativos.

Figura 06. Síntese de Eicosanoides pela via Ciclooxygenase.



Fonte: Adaptado de LALLA et al., 2009; MINGHETTI et al., 2009; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; FURST et al., 2014; GANDHI et al., 2017.

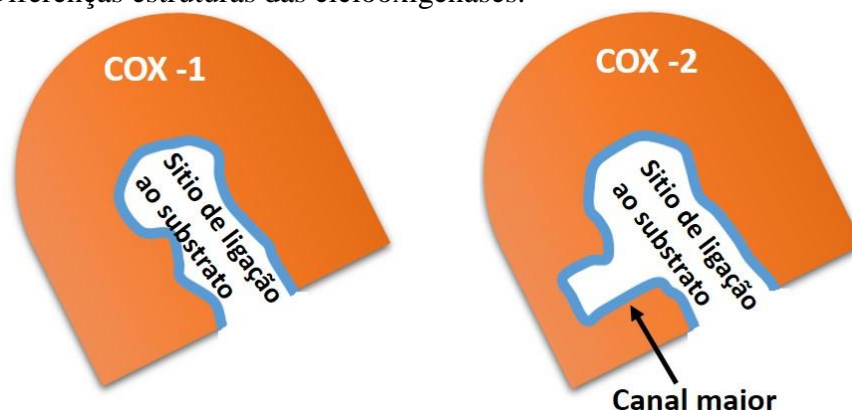
A conversão dos fosfolípidios à moléculas bioativas envolve três etapas principais. A primeira compreende a conversão dos fosfolípidios de membrana em ácido araquidônico através da ação da fosfolipase A2 (PLA2). A segunda etapa envolve a adição de duas moléculas de oxigênio para o ácido araquidônico formando a prostaglandina G2 (PGG2), um intermediário instável. E finalmente a PGG2 difunde-se ao sítio ativo onde a peroxidação leva à redução da instabilidade da PGG2 à prostaglandina H2 estável (PGH2) (GANDHI et al., 2017). Essas duas últimas etapas, que compreende, respectivamente, bis-dioxigenação e redução são catalisadas em dois distintos sítios ativos da COX (ROUZER; MARNETT, 2009; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; GANDHI et al., 2017). PGH2 produzido pelas COX, é

substrato comum para uma série de isomerase específica e enzimas sintase que produzem os cinco tipos de prostanoídes, respectivamente 4 prostaglandinas (PGs) e 1 tromboxanos: PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂ e TXA₂ (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; PENG et al., 2017).

Conhecida como Prostaglandina H sintase (PGH), a COX é uma glicoproteína de membrana, consistindo de um homodímero com um grupo heme associado envolvido em ambas as atividades enzimáticas. Estudos com COX remetem às décadas de 70 e 80, tendem seu ápice na década de 90 com a busca de inibidores específicos para COX-2. Até o momento, as isoformas COX-1, COX-2 e mais recentemente COX-3, foram elucidadas, e de acordo com suas expressão e atuação enzimática, são designadas como constitutivas ou induzível (FURST et al., 2014).

Codificadas por genes distintos localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente, a COX-1 e COX-2 apresenta homologia de 60% em relação sua sequência de aminoácidos (MINGHETTI et al., 2004); ambas enzimas contêm três oligossacarídeos ricos em manose, um dos quais facilita dobramento de proteínas. Um quarto oligossacarídeo, presente apenas em COX-2 regula sua degradação. Dessa forma, enquanto os sítios funcionais são conservados entre as ciclooxygenases, algumas substituições cruciais causam variações conformacionais na bolsa do sítio ativo das 2 isoenzimas, o que poderia explicar as diferentes sensibilidades COX-1 e COX-2 para inibidores específicos. Uma diferença importante entre as duas isoformas é a inserção de 18 aminoácidos próximo do terminal C da COX-2, que não está presente na COX-1, o que torna a COX-2 maior e mais flexível que a COX-1, conferindo a COX-2 maior capacidade de oxigenar uma série de ácidos graxos poliinsaturados livres que são pobres substratos para COX-1 (Figura 07) (MINGHETTI, 2004; ROUZER; MARNETT, 2009; CLARK et al., 2013).

Figura 07. Diferenças estruturas das ciclooxygenases.



Fonte: Adaptado de CLARK et al., 2013.

Conceitualmente, tem-se determinado que a COX-1, é expressa constitutivamente sendo responsável pela produção de PGs com funções homeostáticas como proteção contra úlceras gástricas, controle de fluxo sanguíneo renal (PGE₂) e agregação plaquetária (TXA₂); e COX-2, a enzima induzível, é rapidamente expressa e em grande quantidade nos macrófagos e polimorfonucleares, sendo responsável pela produção de PGs envolvido na inflamação (COON et al., 2007; NARASIMHA et al., 2009; GANDHI et al., 2017). No entanto, em cérebro, testículos e células da mácula densa do rim, ambos COX- 1 e COX-2 são expressos sob condições fisiológicas. A COX-3 trata-se de uma variante da COX-1, produzidas pela expressão do gene COX-1, e também com caráter constitutivo, predominante no cérebro e coração (MINGHETTI et al., 2004).

2.5 Produtos naturais na Proteção Gastrintestinal

Com séculos de experiência acumulada, os seres humanos tem usado plantas para fins de tratamento até o desenvolvimento da medicina moderna. Estima-se que 70-80% da população humana, principalmente em países em desenvolvimento, depende de plantas medicinais para cuidados (DOGAN; UGULU, 2013; ROKAYA et al., 2014).

Uma diversidade de ervas, plantas medicinais e especiarias têm sido usadas para o tratamento e controle de várias doenças, como diarreia, refluxo, gastroenterite, úlcera gástrica, constipação, inchaço e outros distúrbios do trato gastrointestinal. Além de resultados promissores sobre os efeitos das plantas para o tratamento de uma diversidade de doenças, o que muito se deve a boa compatibilidade com a natureza humana e tem menos efeitos colaterais (AHMAD et al., 2014; BAHMANI et al., 2014).

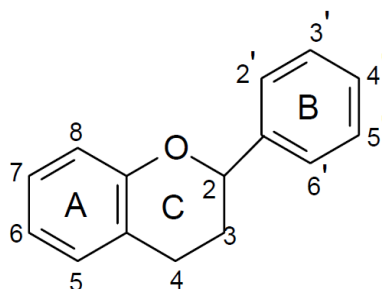
Neste contexto, um grande número de plantas medicinais e seus metabólitos secundários com potencial gastroprotetor tem sido relatados, podendo este efeito estar ligado a diferentes mecanismos de ação (AHMAD et al., 2014). Muitas das propriedades medicinais das plantas são atribuídas principalmente à presença de flavonoides e grande parte dos produtos farmacêuticos que são desenvolvidos a partir dos produtos naturais, são oriundos de flavonóides, que emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos, apresentando atividades antitumorais, imunoestimulante e anti-inflamatória (ROKAYA et al., 2014).

Flavonoides representam uma classe altamente diversificada de metabólitos secundários, com mais de 9.000 compostos individuais conhecidos até o momento, muitos

deles com potencial efeito benéfico sobre a saúde humana, devido às suas elevadas atividades farmacológicas (RUIZ-CRUZ et al., 2017). Para estas substâncias, já tem-se relatos de várias atividades biológicas, que incluem antialérgico, antiplaquetário, antiestrogênico, antidiabéticos, anticancerígeno, antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e antioxidantes, além de baixa ou inexistente toxicidade. Os flavonoides também foram relatados para atuar no trato gastrointestinal, tendo antiespasmódico, anti-secretório, antidiarreico e propriedades antiúlcera (MOTA et al., 2009; ROKAYA et al., 2014). Acredita-se que muitas dessas propriedades esteja aliada com sua capacidade de modular enzimas celulares, de tal forma que também são conhecidos por serem inibidores potentes para várias enzimas, como a xantina oxidase (XO), ciclooxigenase (COX), lipoxigenase e fosfoinositídeo 3-quinase (PANCHE et al., 2016).

De maneira geral, todos os flavonoides são compostos por um núcleo flavan, que consiste em 15 átomos de carbono dispostos em três anéis fenólicos (C6 – C3 – C6) referidos como anéis A, B e C (Figura 08). Suas funções dependem de sua classe estrutural, grau de hidroxilação e conjugação e grau de polimerização. Tendo em conta a natureza química da molécula e as variações na estrutura em torno do anel de oxigênio heterocíclico, os flavonoides são divididos em 14 grupos diferentes. Sete desses grupos: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanóis (catequinas), flavanolóis e antocianinas, são particularmente bem conhecidos e relatados na literatura (MOTA et al., 2009; RUIZ-CRUZ et al., 2017).

Figura 08. Estrutura básica de um flavonoide.



Fonte: MOTA et al., 2009.

Em trabalhos de revisão, há relatos de ao menos 95 flavonoides relacionados em estudos de atividade gastroprotetora, onde estes compostos protegem a mucosa gastrointestinal de lesões produzidas por vários modelos experimentais de úlcera e contra diferentes agentes necróticos. Vários mecanismos de ação pode estar envolvida nesse efeito protetor. Flavonoides, já foram indicados como detentores de atividade antissecretora, atuando

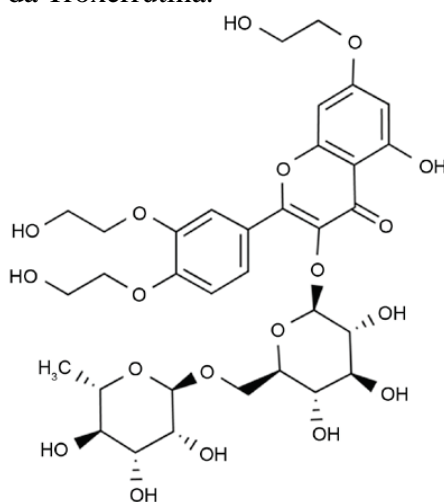
na liberação de histamina e bomba de prótons (como é o caso da quercetina), citoprotetoras por meio do aumento do fluxo sanguíneo mucoso, estimulação da síntese de mucos e aumentar os níveis de PGs (como exemplo as chalconas) (MOTA et al., 2009).

Contudo, o mais importante mecanismo de ação responsável pela atividade antiulcerogênica dos flavonoides deve se a suas propriedades antioxidantes (observado em garcinol, rutina e quercetina). Trabalho indicam que devido à alta reatividade do grupo hidroxila, os flavonoides (Fl-OH) são capazes de eliminar radicais livres, quelar íons metálicos (ferro e cobre), inibir enzimas oxidantes, elevar antioxidantes proteicos e não proteicos e reduzir a peroxidação lipídica (AHMAD et al., 2014; HIGUCHI, 2014).

2.5.1 Troxerrutina

Troxerrutina (TRX), um bioflavonóide derivado da rutina, cabe destaque no meio farmacológico, por ser um fitoquímico com grande abordagem terapêutica. A troxerrutina (reconhecida também como vitamina P4) e 3',4',7'-Tris[O-(2-hidroxietil)] rutina, consiste em mistura de mono, di, tri e tetrahidroxietil-rutosídeos, sendo que 80% de sua composição é trihidroxietilado da rutina (MURI et al., 2010; AZARFARIN et al., 2018) (Figura 9). A obtenção por sua vez do flavonóide rutina, dar-se principalmente da extração de *Dimorphandra gardneriana*, *Sophora japonica* (pagode japonês) e *Aesculum hippocastanum* (castanha silvestre ou castanha das Índias) e *Ruta graveolens* L., e também encontrada em chá, café, cereais e diferentes tipos de frutas e vegetais (CAVALCANTE et al., 2007; BABRI et al., 2012; PANAT et al., 2016; WANG et al., 2017; BAYANDOR et al., 2018; BIANCHI et al., 2018).

Figura 09. Estrutura química da Troxerrutina.



Fonte: Azarfarin et al., 2018.

Apesar de normalmente ser lembrado no tratamento de varizes e hemorroidas (GUI et al., 2015), vastos são os relatos das atividades biológicas da Troxerrutina (TRX), como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias (SHAN et al., 2018), antiapoptóticas (GEETHA et al., 2017; BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017), ansiolíticas e antidepressivas (AZARFARIN et al., 2018; BAYANDOR et al., 2018), antitrombótica, antifibrinolítica, antiedematogênico (NGEOW et al., 2008; MURI et al., 2010); eficaz também na melhoria da função capilar na insuficiência venosa crônica e fragilidade capilar (VANSCHIEDT et al., 2002), neuroprotetor na doença de Alzheimer (BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; FARAJDOKHT et al., 2017), hepatoprotetor, nefroprotetor (FAN et al., 2009; SHAN et al., 2017; DEHNAMAKI et al., 2018), anti-mutagênico (SUBASTRI et al., 2017b) e cardioprotetor na prevenção do desconforto, lesões e reperfusões miocárdicas (MOKHTARI et al., 2015; SHU et al., 2017; NAJAFI et al., 2018).

A troxerrutina também sido relatada devido seu efeito homeostático em distúrbios metabólicos sistêmicos como hiperlipidemia e hiperglicemia (ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2017; YANG et al., 2019) e suas complicações, como cardiopatia e retinopatia (YU et al., 2017). Melhoria na aprendizagem, memória, desempenho cognitivo e diminuição da fadiga (LU et al., 2013; WANG et al., 2017; ZAMANIAN et al., 2017; DIBA et al., 2018) também tem sido relatado após administração desse flavonóide.

Na terapêutica do câncer, a troxerrutina tem sido relatada devido sua eficácia na radioproteção em câncer de próstata e timo (LIM et al., 2015; PANAT et al., 2016; XU et al., 2017b), quimioprevenção na carcinogênese do cólon, quimioterápico no carcinoma hepatocelular (THOMAS et al., 2016; SUBASTRI et al., 2017) e adjuvante com 5-Fluorouracil no câncer gástrico (XU et al., 2017). A troxerrutina é também uma potente agente terapêutico para dor neuropática (GUI et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal desponta como um dos principais agravos relacionados ao tratamento do quimioterápico com o 5-FU, e é caracterizada pelo processo inflamatório e/ou ulcerativo no gastrointestinal, resultado do dano celular e tecidual promovido pelo quimioterápico através da geração de estresse oxidativo (PETERSON et al., 2011).

Com elevada incidência entre os pacientes em tratamento com câncer, a mucosite além de gerar desconforto e dor, afeta consideravelmente a qualidade de vida do paciente. Para este agravo, apesar de avanços e busca de medicamentos para prevenção e cura, ainda não se tem à disposição no mercado medicamento efetivo para tratamento da mucosite.

Neste contexto, produtos naturais e semissintéticos como flavonoides, tem papel de destaque, devido as diversas propriedades farmacológicas já relatadas, bem como a baixa toxicidade vista em muitos deles.

Nesta perspectiva, a troxerrutina, um flavonoide semissintético derivado da rutina destaca-se pelas atividade antioxidantes, anti-inflamatória, analgésica, antiapoptótica, antiedematogênica, neuroprotetora, hepatoprotetora, nefroprotetora já relatadas na literatura (NGEOW et al., 2008; FAN et al, 2009; MURI et al., 2010; GUI et al., 2015; GEETHA et al., 2017; SHAN et al., 2017; BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; FARAJDOKHT et al., 2017; DEHNAMAKI et al., 2018; SHAN et al., 2018). Contudo, até o momento, não se tem estudos avaliando o efeito da troxerrutina na mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Dessa forma, o presente trabalho além de propor avaliar o efeito da troxerrutina nas alterações morfológicas na mucosite intestinal promovida pelo 5-Fluorouracil em camundongos, procura também investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação da troxerrutina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da troxerrutina na prevenção das alterações morfológicas na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

4.2. Objetivos específicos

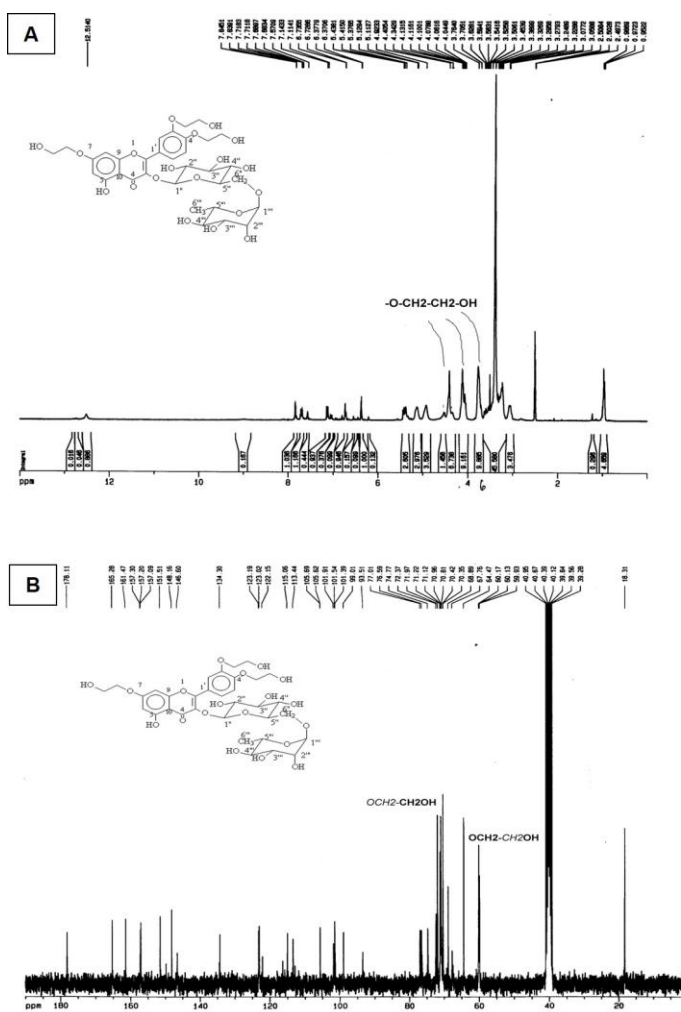
- Avaliar o efeito da troxerrutina sobre a perda ponderal de camundongos no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- Identificar os efeitos da troxerrutina sobre as alterações histopatológicas e morfométricas em vilosidades e criptas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal.
- Analisar o efeito da troxerrutina sobre a contagem de leucócitos totais sanguíneos após a indução da mucosite intestinal por 5-FU.
- Estudar o efeito da troxerrutina no estresse oxidativo induzidos por 5-FU na mucosite intestinal, através da mensuração dos níveis de MDA e GSH.
- Determinar o efeito da troxerrutina na inflamação induzidos por 5-FU em modelo experimental de mucosite intestinal por meio da mensuração dos níveis de MPO.
- Mensurar o efeito da troxerrutina na contagem de mastócitos teciduais induzidos por 5-FU na mucosite intestinal.
- Avaliar o efeito protetor da troxerrutina na mucosa intestinal por meio da mensuração da contagem de células caliciformes em modelo experimental de mucosite intestinal.
- Investigar o envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina na mucosite intestinal, por meio análise histopatológica e morfométricas dos vilos e criptas, imunohistoquímica para COX-2 e docagem molecular.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção de troxerrutina

A troxerrutina trata-se de um pó cristalino amarelo, obtido da reação da rutina, um flavonoide extraído da *Dimorphandra gardneriana*, com óxido de etileno em solução aquosa (JACQUES, 1961; COURBAT, 1970). A partir da reação da rutina com o óxido de etileno, a suspensão formada dissolveu-se gradualmente, originando os derivados mono, di, tri e tetra O-(β-hidroxietil). Contudo, através do controle do pH e das condições da reação, dirigiu-se a reação para produção de um rendimento de 90% de produtos β-hidroxetilado tendo com o principal constituinte os derivados tri-O-(β-hidroxalados), ou seja, o trihidroxietilado da rutina, dados estes confirmados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e comparada com os dados de RMN da literatura (COURBAT, 1966), conforme apresentado na figura 10.

Figura 10. Espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C da Trioxietilrutina.



A: Espectro de RMN ^1H ; **B:** RMN ^{13}C da Trioxietilrutina.

O processo de obtenção da Troxerrutina descrito acima foi realizado no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela parceira e colaboração com a Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro. Dessa forma, por envolver um produto semisintético obtido da rutina que é extraída da *Dimorphandra gardneriana*, realizou-se cadastro dos pesquisadores envolvidos no projeto em questão, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), conforme em anexo C.

5.2 Drogas e reagentes

As drogas e reagentes utilizados na investigação laboratorial, encontram-se listados na tabela abaixo.

Tabela 01. Drogas utilizadas no protocolo experimental de mucosite intestinal por 5-FU.

| Drogas | Concentração | Procedência |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| 5-FU (FauldFluor) | 450 mg/kg | Libbs®, Brasil |
| Celecoxibe (Celebra) | 7,5 mg/kg | Pfizer®, Brasil |

Todas as drogas e reagentes foram preparados imediatamente antes de usar. Os outros reagentes eram de grau analítico comprados de empresas comerciais padrão.

5.3 Animais

No protocolo experimental, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com massa corpórea entre 25 a 30g, que foram randomicamente distribuídos em grupos de n=6, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) – Fortaleza, Ceará.

Os camundongos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha, trocadas duas vezes por semana. Durante todo o experimento, os animais estavam em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ num ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão.

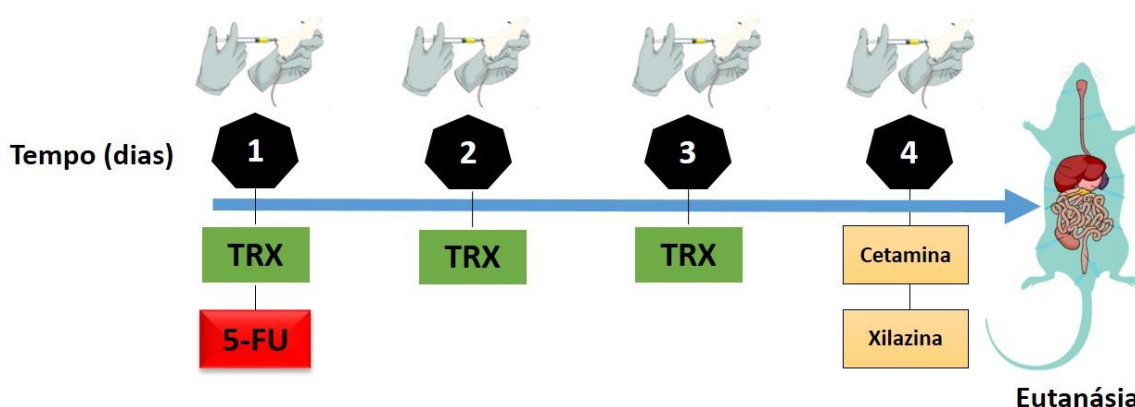
5.4 Considerações éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC) sob número 2413051018.

5.5 Protocolo de Indução e tratamento da mucosite intestinal

O modelo experimental de mucosite intestinal em camundongos *Swiss* foi induzido pela método adaptado de Carneiro-Filho et al. (2004), representado na figura 11. No primeiro do protocolo experimental o 5-FU (450 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal (i.p) em dose única, assim como o tratamento com a Troxerrutina (TRX) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg via oral, 1h antes da administração do antineoplásico. No segundo e terceiro dia do protocolo, seguiu o tratamento com TRX (50, 100, 150 mg/kg, via oral), uma vez ao dia. As doses de TRX foram estabelecidas em conformidade com resultados estabelecidos em estudos anteriores (THOMAS et al., 2016; GEETHA et al., 2017; BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; SHAN et al., 2018; DEHNAMAKI et al., 2018). No quarto dia do protocolo experimental, após avaliação da massa corpórea e coleta sanguínea pelo plexo orbital, os animais foram eutanasiados com quetamina (270 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e as amostras intestinais foram coletadas.

Figura 11. Esquema de indução e tratamento da mucosite intestinal.



5.6 Determinação da dose efetiva da Troxerrutina no tratamento da mucosite

Para a determinação da melhor dose de Troxerrutina (TRX) no tratamento da mucosite intestinal, os camundongos foram alocados em três grupos de tratamento com a TRX (50, 100

e 150 mg/kg), além de dois grupos controles (Negativo e Positivo), com 6 animais por grupo, como pode-se observar nos seguintes grupos experimentais:

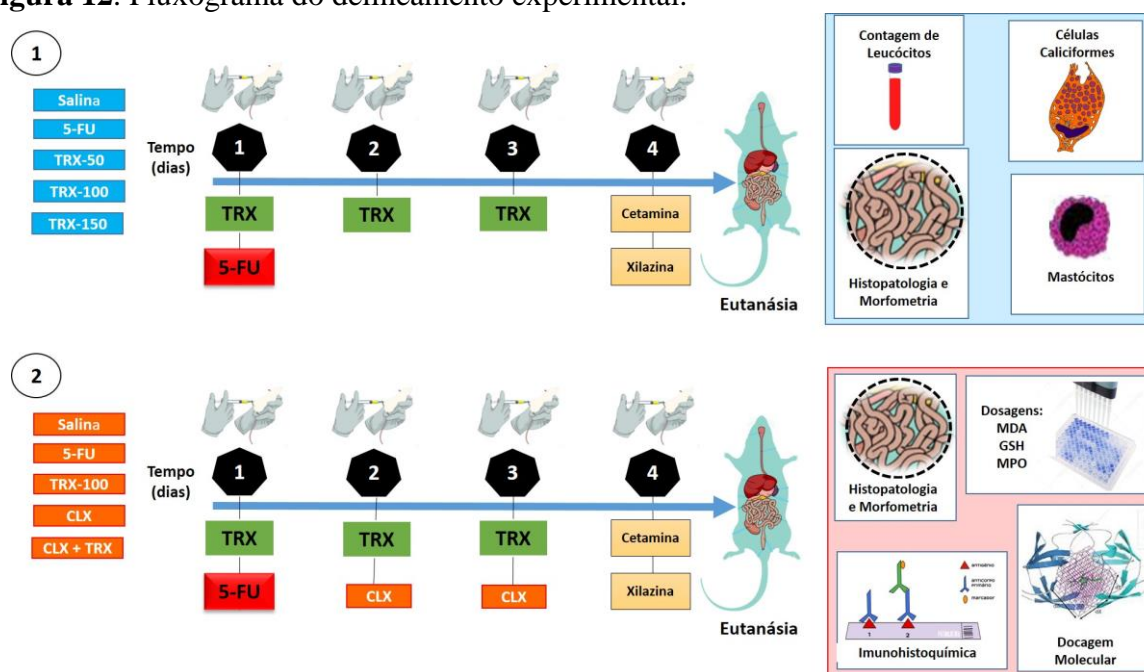
- **Grupo Salina** (Controle Negativo): os animais deste grupo foram tratados apenas com soro fisiológico (NaCl a 0,9%), por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), para mimetizar a condição de estresse submetido aos demais grupos.
- **Grupo 5-FU** (Controle positivo): Os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e soro fisiológico por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas soro fisiológico por via oral.
- **Grupo TRX 50**: Os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Troxerrutina (50 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas a Troxerrutina (50 mg/kg) por via oral.
- **Grupo TRX 100**: Os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Troxerrutina (100 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas a Troxerrutina (100 mg/kg) por via oral.
- **Grupo TRX 150**: os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Troxerrutina (150 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas a Troxerrutina (150 mg/kg) por via oral.

O peso corporal dos camundongos, avaliado no decorrer dos quatro dias do protocolo experimental, a contagem de leucócitos e a análise histológica e morfométrica, foram utilizados para confirmação do modelo experimental de mucosite induzida por 5-FU e determinação da efetiva dose do TRX capaz de proteger a mucosa intestinal do efeito lesivo por 5-FU.

5.6.1 Parâmetros Avaliados

Com a análise dos parâmetros (análise ponderal, histopatológica, morfométrica e contagem de leucócitos) foi então determinada a dose efetiva da Troxerrutina no tratamento da mucosite intestinal e o segmento intestinal com melhor resposta ao tratamento com a TRX. Partindo da melhor dose de TRX (100 mg/kg), deu-se continuidade a avaliação dos demais parâmetros referente a primeira etapa de investigação (contagem de mastócitos e células caliciformes), bem como a modulação da via COX-2, nas etapas seguintes. O fluxograma do delineamento experimental encontra-se representado na figura 12.

Figura 12. Fluxograma do delineamento experimental.



5.6.1.1 Análise ponderal

Durante todo o período experimental, o peso dos camundongos foi aferido em balança antes da administração de quaisquer dos compostos (Salina 0,9%, 5-FU e TRX), de modo a se acompanhar o processo de perda de massa corpórea induzida pelo 5-FU, bem como avaliar a suposta ação protetora dos tratamentos da TRX sobre o processo de perda de massa.

5.6.1.2 Análise histopatológica e morfométrica

Para a análise Histopatológica e Morfométrica, após a eutanásia dos animais por combinação de anestésicos foram obtidas amostras de tecido dos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Considerou-se como duodeno, o segmento que corresponde à porção anterior a 3 cm do ligamento de Treitz; jejuno, a porção anterior a 10 cm do

ligamento de Treitz; e íleo, a porção anterior a 6 cm da válvula íleo-cecal (CARNEIRO-FILHO et al., 2004). Tais amostras, após fixação por 24h em formol a 10% e conservação em álcool a 70%, foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos em micrótomo, de modo a se obter as lâminas a serem avaliadas, coradas com H&E (HemotoxilinaEosina).

Na análise histopatológica foi realizado um estudo-cego e randomizado, por um histopatologista experiente, de forma a avaliar a severidade da mucosite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura tecidual, com enfoque nos vilos e criptas, e ocorrência de infiltrados celulares (em especial a infiltração neutrofílica), típicos de processo inflamatório. Os níveis de intensidade da mucosite foram, então, definidos por um sistema de escores com variação de 0 (ausência de lesão) a 3 lesão intensa na camada mucosa e muscular conforme proposto por Macpherson; Pfeiffer (1978), e representado na tabela 02.

Tabela 02. Sistema de escore de mucosite intestinal.

| Escores | Achados histológicos | |
|---------|---|---|
| | Mucosa | Muscular |
| 0 | Normal (ausência de lesão) | Normal (ausência de lesão) |
| 1 | Vilos encurtados, perda de arquitetura das criptas, infiltrado inflamatório, vacuolização e edema | Normal |
| 2 | Vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema | Normal |
| 3 | Vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema | Edema, vacuolização e infiltrado inflamatório |

Fonte: Adaptado de Macpherson e Pfeiffer (1978).

Para as análises morfométricas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA®), foram medidas a altura dos vilos (topo à junção vilo-cripta) e profundidade das criptas intestinais para a correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos e criptas foi calculada utilizando-se o software *ImageJ*®, por meio da aferição da altura de 10 vilosidades e a 10 profundidade das criptas intestinais, ambas em μm , sendo a análise feita por campo, totalizando 6 campos. A conversão das medidas obtidas, dos vilos e das criptas, em pixels foram convertidas em micrometro (μm), por meio da razão $200 \mu\text{m} = 4.710.096$ pixels.

5.6.1.3 Contagem de leucócitos

A contagem de leucócitos foi realizado previamente à eutanásia, os animais foram anestesiados com combinação de anestésicos (xilazina 10 mg/kg e cetamina 70 mg/kg), no qual foram obtidas amostras de sangue periférico da artéria ocular, seguido de diluição líquido de Turk a uma proporção de 20 μ L de sangue para 380 μ L de solução. Após isso, foi realizada a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer (MOURA et al, 1998), com resultados expressos na forma de número total de leucócitos por/mm³ de sangue.

5.6.1.4 Contagem de células da mucosa gástrica: Caliciformes e Mastócitos

Para possibilitar a identificação e quantificação de mastócitos e células secretoras de muco (caliciformes), os blocos de parafina com amostras do segmento duodenal, correspondente aos grupo Salina, TRX 100 e 5-FU, foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany et al. (2008) e ácido periódico Schiff (PAS) (SANO et al., 2017). As colorações foram realizadas após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70% em seguidas as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, lavadas e secas. Para o PAS, as lâminas foram incubadas nos corantes, ácido periódico, reagente de Schiff e hematoxilina de Carazzi por período de 1, 10 e 10 minutos, respectivamente, seguido de lavagens sucessivas em água destilada, conforme recomendações do fabricante *EasyPath*[®]. Após a secagem as lâminas clareadas com uma série de xilol foram montadas. Para a contagem de mastócitos e células caliciformes presentes nas lâminas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), realizou-se a captura das imagens digitais, para contagem posterior de no mínimo 10 campos, com auxílio de software *ImageJ*[®]. Os resultados representam a média de 10 campos de cada grupo.

5.7 Avaliação da ciclooxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e seu envolvimento no efeito protetor da TRX

De posse da dose efetiva de TRX no tratamento da mucosite intestinal, realizou-se docagem molecular e determinação dos sítios-alvos da TRX com enzima COX-1 e 2, TNF- α e NF-kB, e seguindo o protocolo experimental de indução da mucosite intestinal conforme descrito anteriormente, realizou-se uma segunda investigação (efeito da COX-2 na mucosite intestinal e seu envolvimento protetor da TRX). Para isso camundongos foram alocados em três grupos de tratamento, que correspondem respectivamente, TRX (100 mg/kg, via oral),

Celecoxibe (CLX, 7,5 mg/kg, i.p) e TRX (100 mg/kg, via oral) mais CLX (7,5 mg/kg, i.p), além de dois grupos controles (Negativo e Positivo), com 6 animais por grupo, como pode-se observar nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Salina** (Controle Negativo): os animais deste grupo foram tratados apenas com soro fisiológico (NaCl a 0,9%), por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), para mimetizar a condição de estresse submetido aos demais grupos.
- **Grupo 5-FU** (Controle positivo): Os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e soro fisiológico por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas soro fisiológico por via oral.
- **Grupo TRX 100**: Os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Troxerrutina (100 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas a Troxerrutina (100 mg/kg) por via oral.
- **Grupo CLX**: Os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).
- **Grupo CLX + TRX**: Os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, Troxerrutina (100 mg/kg de peso do animal) por via oral e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas Troxerrutina (100 mg/kg) por via oral e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).

Pretendeu-se com a administração da Celecoxibe, um bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), avaliar como o bloqueio da síntese de prostanóides, atuaria na fisiopatologia da mucosite e como sua interação com a TRX influenciaria no efeito protetor da mesma no tratamento da mucosite intestinal.

Posterior ao protocolo de indução da mucosite intestinal foi realizado a eutanásia e retiradas das amostras do segmento duodenal, para avaliação da mucosite, efeito do

bloqueador da COX-2, bem como sua interação com a TRX, através das análises histopatológicas e morfométricas pelo método de coloração H&E, Imunohistoquímica para detecção de COX-2.

5.7.1 Parâmetros Avaliados

5.7.1.1 Docagem Molecular e determinação de sítios-alvo de ligação da troxerrutina

As estruturas 3D de todos os possíveis alvos da enzima cicloxigenase (COX-1 e 2), NF-kB, e TNF- α , foram obtidas no banco de dados de proteínas (PDB) (*Protein Data Bank*, 2017). Os cálculos de docagem molecular foram realizados com o programa *Autodock 4.2*[®] (GOODSELL et al., 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS et al., 2008). As proteínas e ligantes foram preparados para docagem molecular utilizando o programa com *Autodock Tools (ADT)*, versão 1.5.6. O receptor foi considerado rígido enquanto que cada ligante foi considerado flexível. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global e pseudo-Solis e Wets com busca local foram os métodos utilizados na docagem molecular, onde para cada simulação foram realizada 100 corridas independentes (RAMOS et al., 2012). O resto dos parâmetros de docagem foi definido com os valores padrão. As análises da docagem molecular foram concentradas nos clusters de menor energia, e a conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise mais detalhada.

5.7.1.2 Análise histopatológica e morfométrica

Para a análise Histopatológica e Morfométrica, após a eutanásia dos animais por combinação de anestésicos foram obtidas amostras de tecido dos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Considerou-se como duodeno, o segmento que corresponde à porção anterior a 3 cm do ligamento de Treitz; jejuno, a porção anterior a 10 cm do ligamento de Treitz; e íleo, a porção anterior a 6 cm da válvula íleo-cecal (CARNEIRO-FILHO et al., 2004). Tais amostras, após fixação por 24h em formol a 10% e conservação em álcool a 70%, foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos em micrótomo, de modo a se obter as lâminas a serem avaliadas, coradas com H&E (HemotoxilinaEosina).

Para as análises morfométricas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA[®]), foram medidas a altura dos vilos (topo à junção vilo-cripta) e profundidade das criptas intestinais para a correlação com a capacidade absorptiva (razão

altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos e criptas foi calculada utilizando-se o software *ImageJ*[®], por meio da aferição da altura de 10 vilosidades e a 10 profundidade das criptas intestinais, ambas em μm , sendo a análise feita por campo, totalizando 6 campos. A conversão das medidas obtidas, dos vilos e das criptas, em pixels foram convertidas em micrometro (μm), por meio da razão $200 \mu\text{m} = 4.710.096$ pixels.

5.7.1.3 *Imunohistoquímica para COX-2*

A imunohistoquímica para COX-2 foi realizada de acordo com o método estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Para a realização da imunohistoquímica realizou-se cortes histológicos dos segmento intestinal duodeno a partir dos cassetes obtidos no experimento de modulação da via da COX. Os cortes (com espessura de 4 μm) foram colocados em lâminas recobertas com poli-Llisina, apropriadas para a realização da imunohistoquímica.

Os cortes foram desparafinizados com inserção em estufa (60°C) e três ciclos de imersão em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em álcool com concentrações decrescente (absoluto, 90, 80 e 70%). Os cortes histológicos foram então lavados com água destilada por 10 minutos e realizados a recuperação antigênica em tampão citrato (DAKO, pH 7,0), por 20 minutos em Banho-Maria (95°C). Em seguida, aos cortes foram lavados com solução tamponada de fosfato-salino (PBS) por 5 minutos em temperatura ambiente. Dando continuidade ao protocolo, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% por 30 minutos. Os cortes foram então, incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário goat anti-COX-2 (SantaCruz[®]), e por 60 minutos em câmara úmida com o anticorpo rabbit anti-IL-1 β (SantaCruz[®]) diluídos em 1:1000 e 1:100, respectivamente, em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem em 3 ciclos com PBS, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho (GBI Labs[®]), diluído 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado com PBS, os cortes serão incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se a revelação por meio da coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido, o DAB (DAKO[®], uma gota de DAB para um μL de diluente), seguida por contra-coloração com hematoxilina (DAKO[®]) por 10 minutos. O DAB é um cromógeno que reage com a a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Por fim, realizou-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas com entelan. Controle

negativo foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%. Os procedimentos aqui mencionados foram realizados de maneira automatizada com a Autostainer Plus (DAKO®).

Para a quantificação da imunomarcação por COX-2 presentes nas lâminas, imagens da imunohistoquímica foram capturadas com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA). Em seguida, a partir das imagens com imunomarcação com COX-2, realizou-se a quantificação através da mensuração da % de área imunomarcada com o auxílio do *Adobe Photoshop*® versão 10.0.

5.7.1.4 Mensuração dos níveis de GSH e MDA

Amostras do segmento duodenal, correspondente aos animais do grupo Salina, TRX 100 mg/kg e 5-FU, foram homogeneizados em EDTA gelado ou KCl (1: 9, v/p) para dar uma suspensão de homogenato a 10%, para os teste de GSH e MDA, respectivamente. De acordo com método descrito por Sedlak; Lindsay (1968), com pequenas modificações, para o ensaio de GSH, alíquotas (400 µl) de tecido homogenatos foram misturados com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (50%, p/v), em tubos de vidro e centrifugados a 3000 rpm, por 15 min. Os sobrenadantes (400 µl) foram misturados com 800 µl de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,01 M) foi adicionado. A absorvância de GSH foi lida a 405 nm e expressa em µg de GSH/mg de tecido. Por outro lado, a peroxidação lipídica foi determinada pela avaliação do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) medidas como MDA (OHKAWA, 1979). Os homogenatos foram incubados a 37°C por 1h, e adicionado a 400 µL de ácido perclórico a 35%. A mistura foi centrifugada (5000 rpm, 10 min a 4°C) e 400 µl ácido tiobarbitúrico a 0,6% foram adicionados aos sobrenadantes, seguido da incubação a 95-100°C durante 1h. Após arrefecimento, a absorvância de MDA foi lida a 532 nm e a sua concentração foi expressa como nmol/mg de tecido.

5.7.1.5 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da MPO, utilizando amostras do segmento duodenal, correspondente aos animais do grupo Salina, TRX 100 e 5-FU, foi determinada pela técnica descrita por Bradley et al. (1982). Resumidamente, os segmentos do duodeno (50-100 mg) foram homogeneizados em 1 ml de tampão de potássio contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), depois centrifugados (4000 rpm, 7min, 4°C). A atividade de

MPO foi analisada medindo a absorvência a 450 nm utilizando di-hidrocloreto de di-isocianato e 1% de peróxido de hidrogênio no sedimento ressuspenso. Os resultados foram registrados como unidades MPO por mg de tecido.

5.8 Análises Estatísticas

Os resultados com distribuição paramétrica foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e, para os dados não-paramétricos como os escores histológicos foram expressos pela mediana. Foram analisados a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk.

Os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey como post hoc teste através do programa GraphPad Prism versão 5.0. Os dados obtidos a partir da análise histológica foram analisados por estatística não-paramétrica utilizando teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (comparações múltiplas). Para todas as análises foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

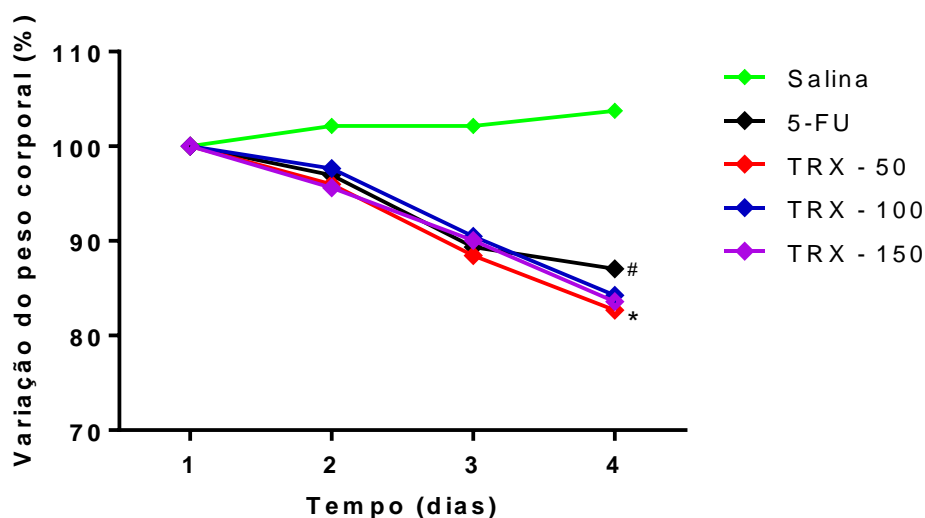
6 RESULTADOS

6.1 Efeito da TRX na perda ponderal induzida por 5-FU.

A perda de peso no decorrer da quimioterapia é um dos efeitos adversos comuns no tratamento com o 5-FU. Experimentalmente, camundongos submetidos ao modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU também a apresentam, sendo um importante indicador de reprodutibilidade do modelo.

Conforme apresentado a figura 13, a partir do segundo dia, todos os camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU apresentaram perda de peso progressiva, que foi significativa em comparação ao grupo salina ($p < 0,05$). Todavia, o TRX em nenhuma das doses de pré-tratamento com TRX preveniram a perda de peso induzida pelo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 13. Efeito do TRX na perda ponderal induzida por 5-FU.



Varição do peso corporal em camundongos submetidos à mucosite intestinal (5-FU, 450 mg/kg, i.p, dose única) e pré-tratados com Troxerrutina (TRX, 50, 100 e 150 mg/kg por 3 dias). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da percentagem de avaliação de peso do peso inicial, de um mínimo de 6 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de seguimento do teste Bonferroni, onde o # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina e, * $p < 0,05$ comparado com o grupo 5-FU.

6.2 Efeito da TRX nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Conforme apresentado na tabela 03, a administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciado pela redução da altura das vilosidades, necrose das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal e intenso infiltrado de células inflamatórias, que resultaram em aumento significativo dos escores microscópicos em comparação ao grupo salina ($p < 0,05$) nos três segmentos intestinais. O pré-tratamento com TRX (100mg/kg) promoveu diminuição significativa dos escores histopatológicos quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$), sendo possível evidenciar reversão da diminuição da altura das vilosidades e de vacuolização, bem como atenuação das necroses das criptas e infiltração de células inflamatórias na mucosa intestinal no segmento duodeno e jejuno. TRX (nas doses 50 e 150 mg/kg) não apresentou diminuição significativa ($p > 0,05$) dos escores histopatológicos promovidos pelo 5-FU, nos três segmentos intestinais.

Tabela 03. Escores histopatológicos em camundongos tratados com TRX na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

| Segmentos | Grupos Experimentais | | | | |
|-----------|----------------------|----------------------|-------------|----------------------|-----------|
| | Salina | 5-FU | TRX (mg/kg) | | |
| | | | 50 | 100 | 150 |
| Duodeno | 0 (0-1) | 3 (2-3) ^a | 2 (1-3) | 1 (1-2) ^b | 3 (1-3) |
| Jejuno | 0 (0-1) | 3 (1-3) ^a | 2 (1-3) | 1 (1-3) ^b | 2 (1-3) |
| Íleo | 0 (0-0) | 3 (1-3) ^a | 3 (1-3) | 1,5 (1-3) | 2,5 (1-3) |

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Os valores foram expressos como mediana, onde **a** $p < 0,05$ vs salina e **b** $p < 0,05$ vs 5-FU.

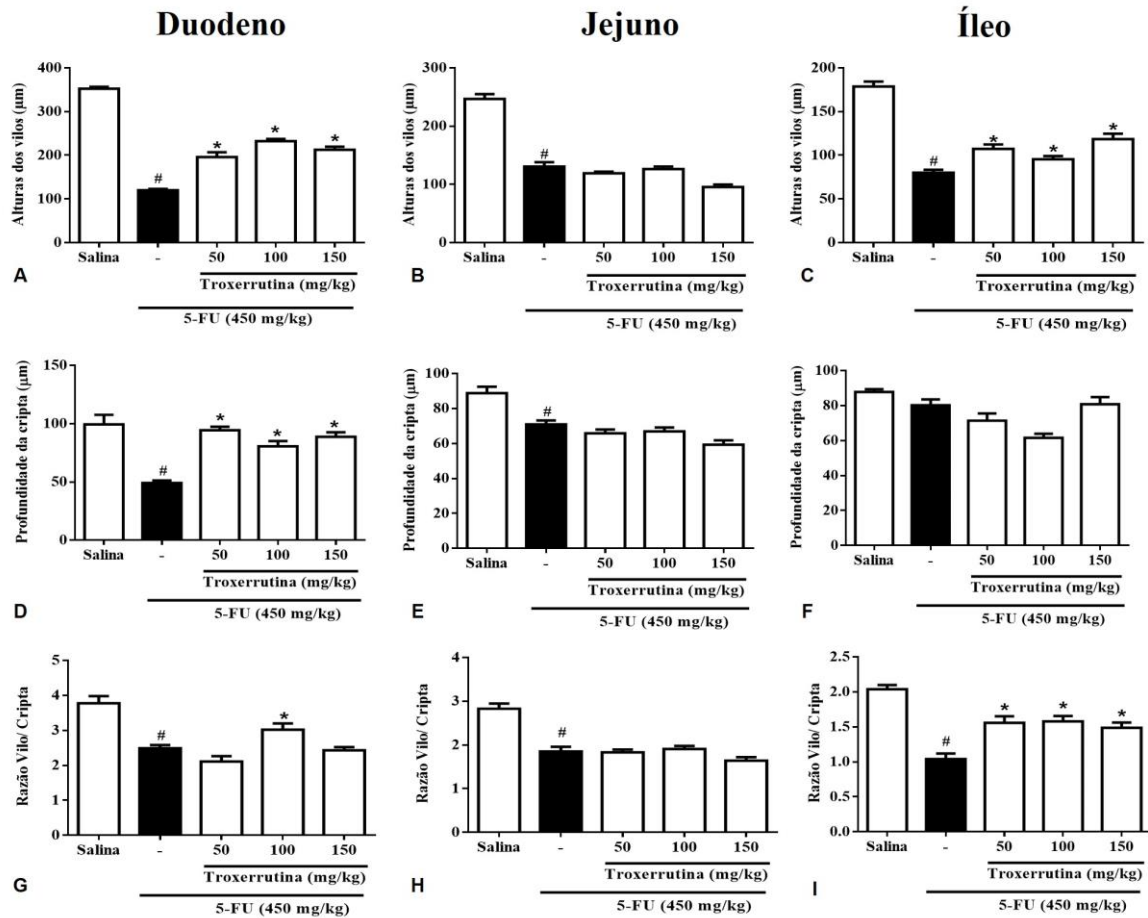
Ao mensurar a altura das vilosidades nos três segmentos intestinais (Figura 14), pode-se observar que o 5-FU promoveu encurtamento significativo das vilosidades no duodeno ($120,30 \pm 2,90$, $p < 0,05$), jejuno ($130,50 \pm 7,73$, $p < 0,05$) e íleo ($80,04 \pm 3,45$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo salina nos segmentos correspondentes, duodeno ($352,70 \pm 4,25$), jejuno ($246,70 \pm 8,13$) e íleo ($178,7 \pm 5,72$). Nos segmentos duodeno e íleo, o pré-tratamento com TRX nas três doses testadas apresentaram reversão significativa do encurtamento dos vilos promovidos pelo 5-FU ($p < 0,05$), podendo evidenciar que TRX 50 ($195,80 \pm 11,12$), 100 ($232,70 \pm 4,74$) e 150 mg/kg ($212,4 \pm 7,21$) no duodeno, assim como TRX 50 ($107,30 \pm 5,09$), 100 ($95,38 \pm 3,70$) e 150 mg/kg ($118,60 \pm 6,22$) no íleo apresentaram vilosidades com alturas significativamente maiores que os animais que receberam apenas o 5-FU. No jejuno, contudo, nenhuma das doses de TRX foi capaz de prevenir o encurtamento dos vilos promovidos pelo 5-FU de forma significativa.

Ao avaliar a profundidade das criptas nos três segmentos intestinais (Figura 14), evidenciou-se que o 5-FU ($49,23 \pm 2,01$, $p < 0,05$) promoveu no segmento duodenal diminuição significativa da profundidade das criptas, quando comparado ao grupo salina ($99,30 \pm 8,29$, $p < 0,05$), e TRX 50 ($94,36 \pm 2,97$, $p < 0,05$), 100 ($80,53 \pm 4,57$, $p < 0,05$) e 150mg/kg ($88,75 \pm 3,79$, $p < 0,05$) preveniram a diminuição da profundidade das criptas quando comparado com o grupo lesivo 5-FU. No jejuno, também foi evidenciado a diminuição significativa da profundidade das criptas promovida pelo 5-FU ($71,00 \pm 2,20$, $p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina ($88,79 \pm 3,66$, $p < 0,05$), contudo nenhuma das doses testadas de TRX reverteu a diminuição da profundidade das criptas promovida pelo 5-FU. No íleo não evidenciou-se diferença significativa ($p < 0,05$) da profundidade das criptas entre o grupo lesivo 5-FU e o grupo salina, assim como entre as doses testadas de TRX com o grupo 5-FU.

Na análise da relação vilosidade/cripta nos três segmentos intestinais (Figura 14), pode-se evidenciar que no duodeno, a razão vilosidade/cripta apresentou diminuição significativa entre o grupo 5-FU ($2,48 \pm 0,09$, $p < 0,05$) e salina ($3,77 \pm 0,20$, $p < 0,05$) e apenas a dose 100 mg/kg ($3,02 \pm 0,17$, $p < 0,05$) apresentou aumento significativo da razão vilosidade/cripta quando comparado com o grupo lesivo 5-FU. No íleo também pode-se evidenciar que o 5-FU ($1,04 \pm 0,07$, $p < 0,05$) promoveu diminuição significativa da razão vilosidade/cripta quando comparado com o grupo salina ($2,03 \pm 0,06$, $p < 0,05$), e os grupos TRX 50 ($1,55 \pm 0,09$, $p < 0,05$), 100 ($1,57 \pm 0,07$, $p < 0,05$) e 150 mg/kg ($1,48 \pm 0,07$, $p < 0,05$) promoveram aumento da razão vilosidade/cripta quando comparado ao grupo 5-FU. No segmento jejuno, apesar do 5-FU ($1,85 \pm 0,10$, $p < 0,05$) promover aumento da razão vilosidade/cripta quando comparado ao grupo salina ($2,82 \pm 0,11$, $p < 0,05$), em nenhuma das doses testadas de TRX teve capacidade de reverter a diminuição da razão vilosidade/cripta promovida pelo 5-FU ($p > 0,05$).

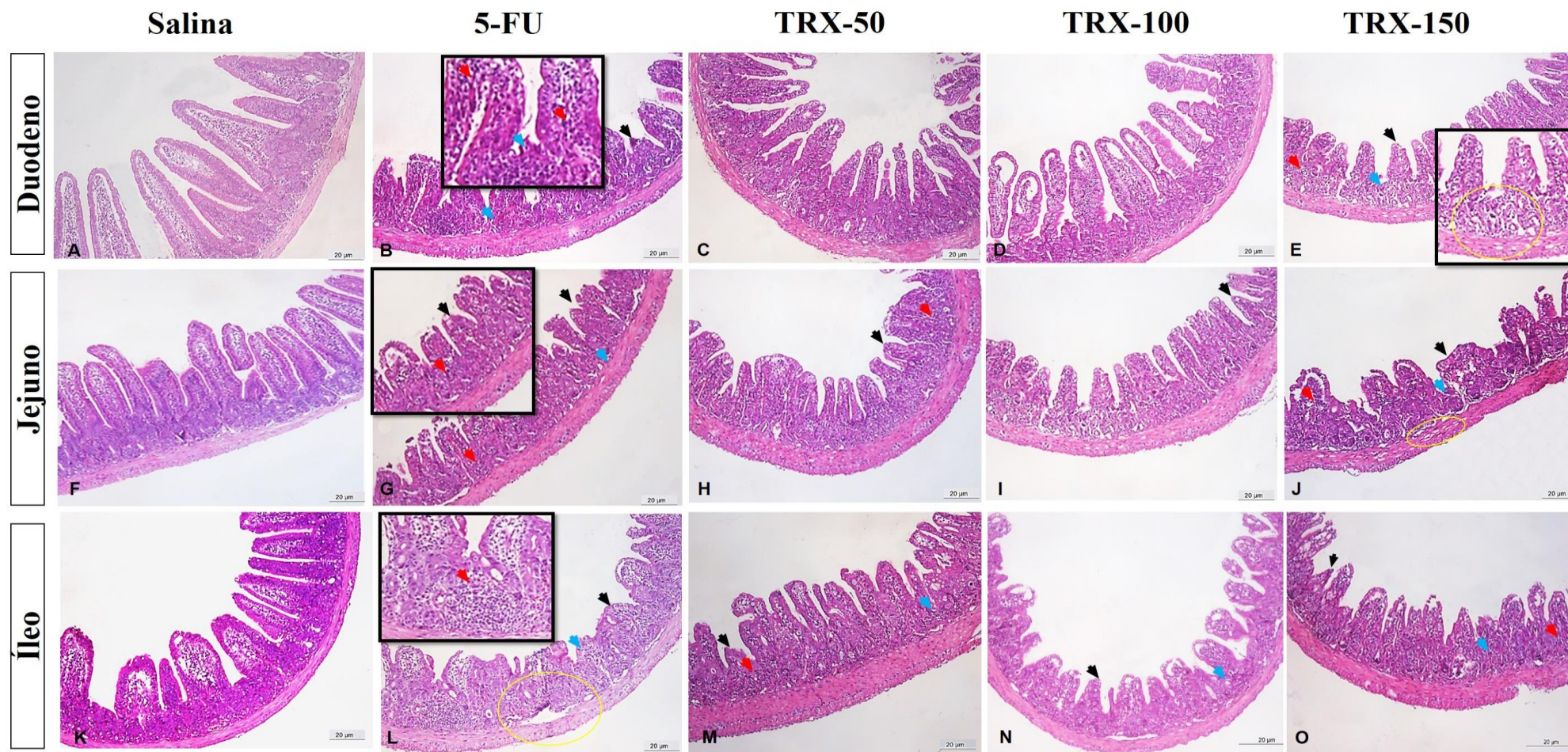
Nas fotomicrografias apresentadas na figura 15, pode-se evidenciar, que o 5-FU promoveu diminuição da altura das vilosidades, necrose e perda de arquitetura das criptas intestinais, induziu aumento do infiltrado inflamatório, quando comparado com os animais do grupo salina. Também pode-se evidenciar que TRX preveniu as alterações histológicas promovidas pelo 5-FU, sendo bem evidenciado seu efeito protetor no segmento duodenal e pela dose de TRX de 100 mg/kg.

Figura 14. Efeito do TRX na alterações morfológicas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Análise morfológica em camundongos submetidos à mucosite intestinal (5-FU, 450 mg/kg, i.p, dose única) e pré-tratados com Troxerrutina (TRX, 50, 100 e 150 mg/kg por 3 dias), seguida pela avaliação dos três segmentos intestinais (Duodeno, Jejuno e Íleo). **A, B e C:** Altura dos vilos dos segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. **D, E e F:** Profundidade das criptas dos segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. **G, H e I:** Razão vilosidade/cripta dos segmentos duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Os valores foram expressos como média ± E.P.M em µm. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs salina e * $p < 0,05$ vs 5-FU.

Figura 15. Efeito do TRX nas alterações histopatológicas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

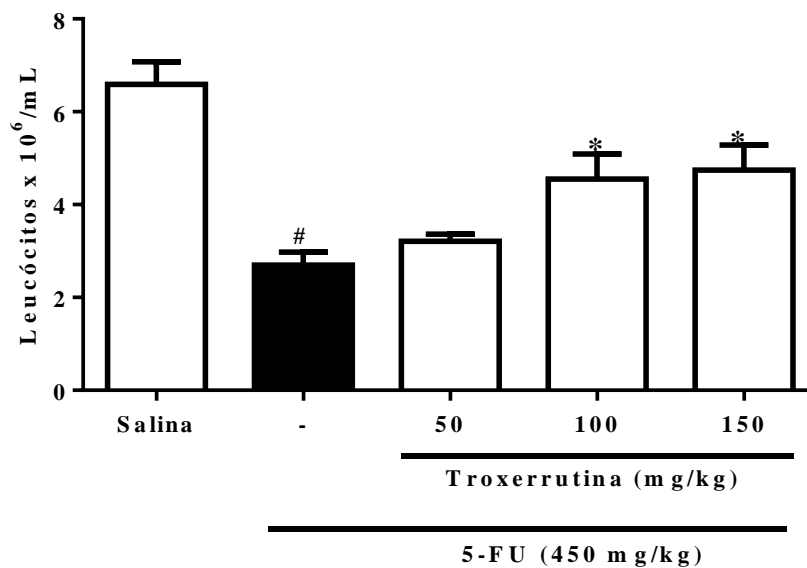


Horizontalmente, o duodeno é representado em **A, B, C, D** e **E**: correspondendo ao grupo salina, 5-FU, TRX 50, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. No Jejuno **F, G, H, I** e **J**: Salina, 5-FU, TRX 50, 100 e 150. E Íleo está representado em **K, L, M, N, O**: Salina, 5-FU, TRX 50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente. **Setas pretas**: Vilos encurtados; **setas vermelhas**: infiltrado inflamatório, **setas azuis**: perda de arquitetura de cripta, e **círculo amarelo**: edema. Em todos os segmentos, o 5-FU apresentou vilos encurtados, perda de arquitetura das criptas, intenso infiltrado inflamatório. As alterações histológicas é perceptivelmente diminuída ao pré-tratamento com TRX 100 mg/kg, em destaque no segmento duodenal.

6.3 Efeito de TRX na contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Conforme demonstrado na figura 16, o 5-FU (2.69 ± 0.27 , $p < 0,05$) promoveu diminuição significativa da contagem de leucócitos totais em comparação ao grupo salina (6.58 ± 0.48 , $p < 0,05$). TRX nas doses de 100 (4.55 ± 0.53 , $p < 0,05$) e 150 mg/kg (4.74 ± 0.54 , $p < 0,05$) preveniram de maneira significativa da leucopenia promovida pelo 5-FU.

Figura 16. Efeito de TRX na contagem de leucócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU.



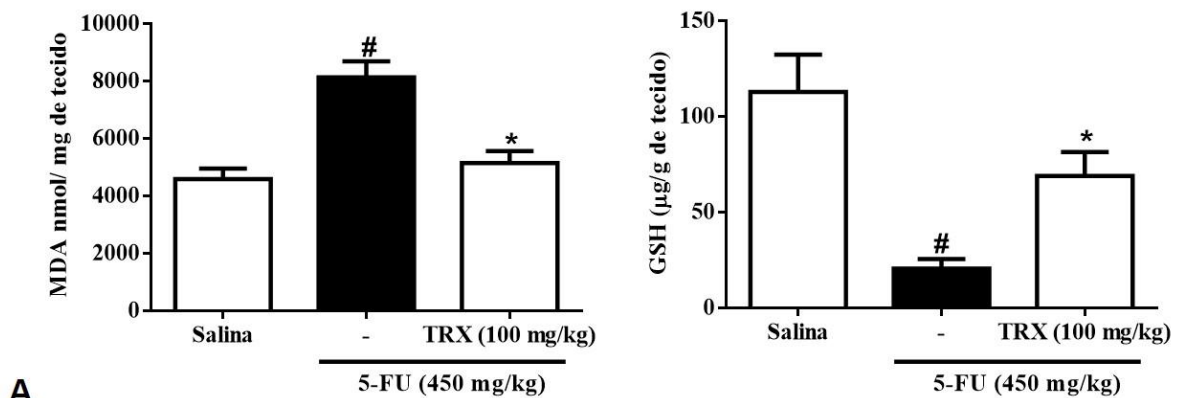
O sangue do plexo orbital foi coletado para contagem de leucócitos plasmáticos, como parâmetro para avaliar a mielossupressão na mucosite intestinal. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de leucócitos por mm^3 . Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.4 Efeito de TRX no dano oxidativo induzido por 5-FU na mucosite intestinal

Para investigar o efeito do pré-tratamento com TRX sobre o dano oxidativo induzido por 5-FU no duodeno, os níveis de MDA e GSH (produtos finais do estresse oxidativo) foram avaliados. Conforme representação da figura 17A, evidenciamos que 5-FU ($8127 \pm 561,5$, $p < 0,05$) eleva os níveis de MDA no duodeno em comparação com o grupo de solução salina ($4587 \pm 367,5$, $p < 0,05$). O pré-tratamento com TRX 100 mg/kg ($5149 \pm 415,4$, $p < 0,05$) reduziu os níveis de MDA em comparação ao grupo 5-FU, reduzindo, assim, o estresse oxidativo induzido por 5-FU.

Na figura 17B, pode-se observar que o 5-FU ($20,48 \pm 4,89$, $p < 0,05$) promoveu diminuição significativa dos níveis de GSH em comparação com o grupo salina ($112,8 \pm 19,45$, $p < 0,05$). E TRX 100 mg/kg ($68,94 \pm 12,46$, $p < 0,05$) preveniu a diminuição dos níveis de GSH induzido pelo 5-FU.

Figura 17. Efeito de TRX no estresse oxidativo induzidos por 5-FU na mucosite intestinal.

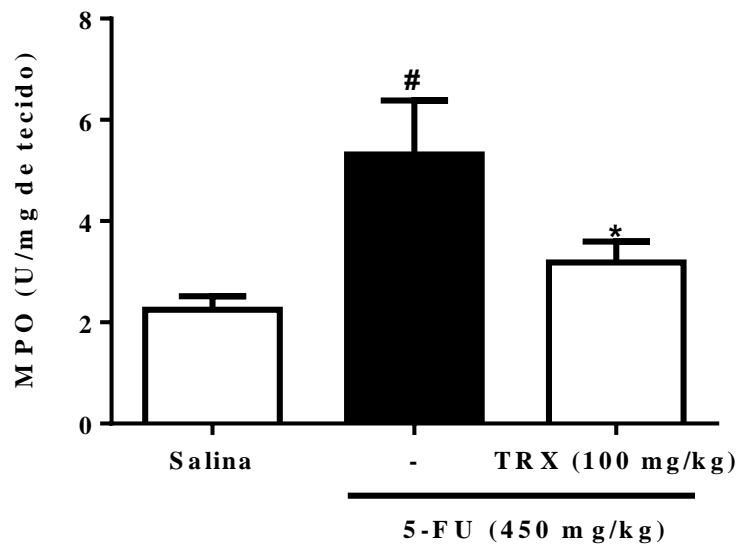


Análise do dano oxidativo pela mensuração do níveis de MDA (A) e GSH (B) no segmento intestinal duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal (5-FU, 450 mg/kg, i.p, dose única) e pré-tratados com Troxerrutina (TRX 100 mg/kg por 3 dias). Os valores foram apresentados como média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.5 Efeito de TRX na atividade da mieloperoxidase (MPO) em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

De acordo com a figura 18, o 5-FU ($5,31 \pm 1,06$, $p < 0,05$) promoveu aumento significativo dos níveis de MPO por mg de tecido do segmento duodenal em comparação com o grupo salina ($2,24 \pm 0,26$, $p < 0,05$). TRX 100 mg/kg ($3,18 \pm 0,41$, $p < 0,05$) diminuiu significativamente os níveis de MPO em comparação ao grupo 5-FU e, por conseguinte, diminuição do infiltrado de neutrófilos.

Figura 18. Efeito de TRX na atividade da mieloperoxidase (MPO) em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



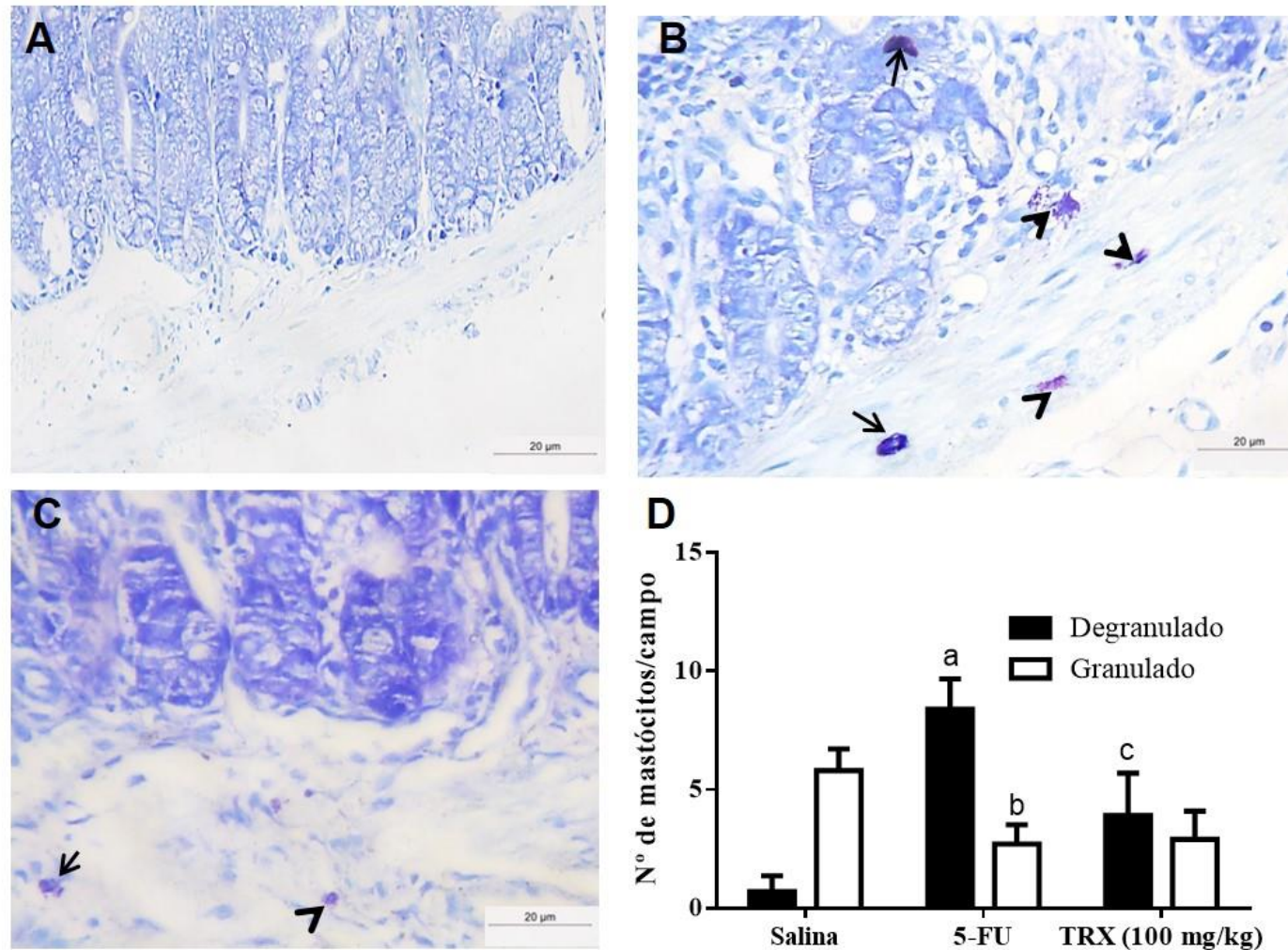
O segmento duodenal foi coletado para mensurar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador bioquímico de infiltração granulocítica. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da atividade de MPO expressos em Unidade (U) de MPO/mg de tecido. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.6 Efeito de TRX na contagem de mastócitos e células caliciformes em segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com TRX na mastocitose induzida pelo 5-FU, realizou-se a contagem de mastócitos do segmento duodenal de camundongos, conforme apresentado na figura 19. O 5-FU promoveu o aumento do número de mastócitos degranulados ($8,40 \pm 0,52$, $p < 0,05$) e diminuição de mastócitos granulados ($2,70 \pm 0,47$, $p < 0,05$) em comparação com o número de mastócitos degranulados ($0,70 \pm 0,25$, $p < 0,05$) e granulados ($5,80 \pm 0,47$, $p < 0,05$) do grupo salina. O pré-tratamento com TRX 100 mg/kg preveniram a mastocitose e sua degranulação promovida pelo 5-FU, evidenciado pela diminuição de mastócitos degranulados ($3,90 \pm 0,52$, $p < 0,05$) e aumento de mastócitos granulados ($2,90 \pm 0,47$, $p < 0,05$) em comparação com o grupo 5-FU.

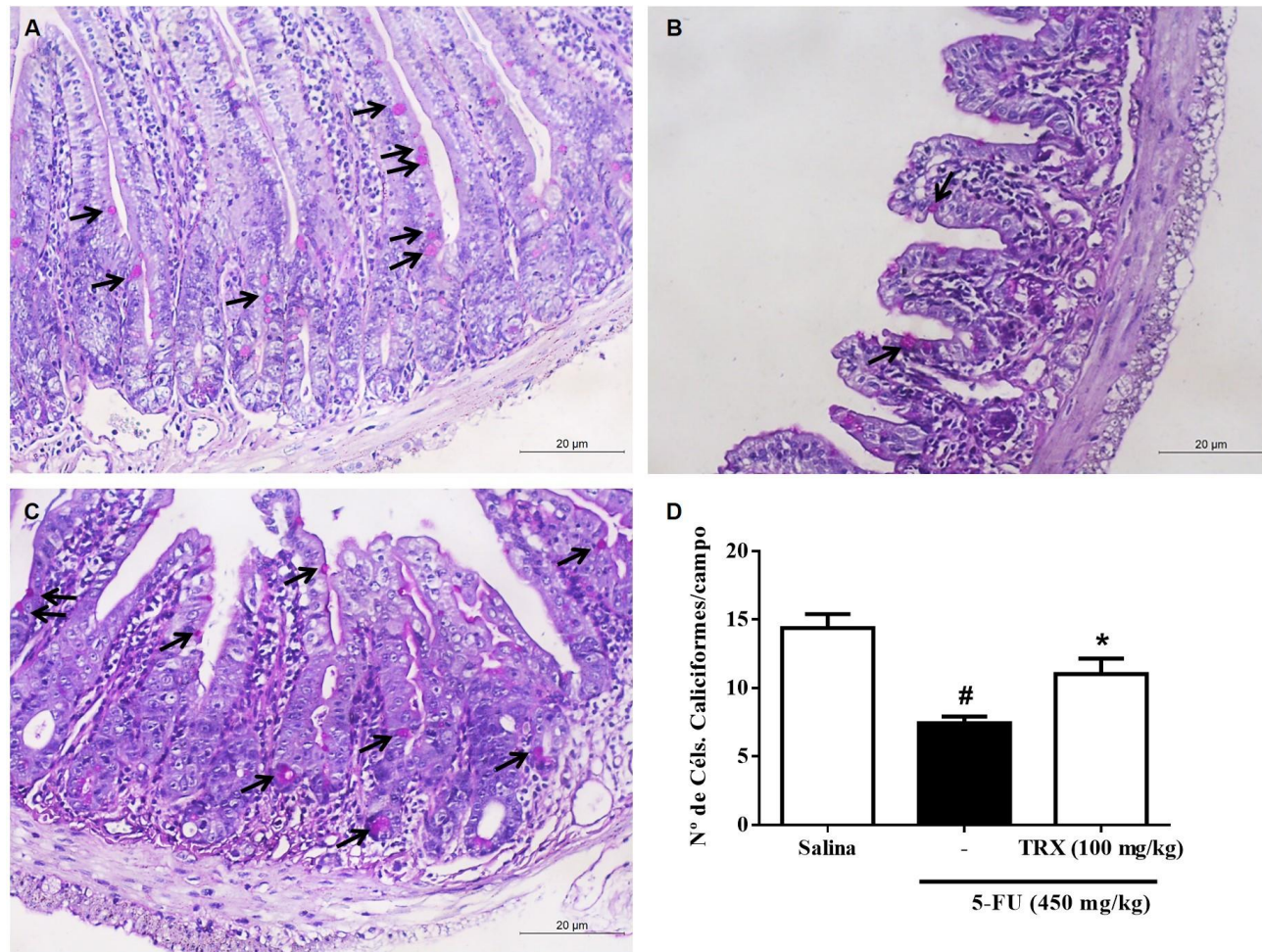
Na análise das células caliciformes no segmento duodenal, representado na figura 20, evidenciou que o 5-FU ($7,42 \pm 0,48$, $p < 0,05$) promoveu diminuição de células caliciformes na mucosa intestinal em comparação com o grupo salina ($14,38 \pm 1,01$, $p < 0,05$). Com o pré-tratamento com TRX 100 mg/kg ($11,00 \pm 1,15$, $p < 0,05$) observou preservação do número de células caliciformes em comparação ao grupo 5-FU.

Figura 19. Efeito de TRX na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Contagem de mastócitos no segmento duodenal a partir da coloração em Azul de Toluidina, onde **A**, **B** e **C** correspondem respectivamente aos grupos Salina, 5-FU e TRX 100 mg/kg. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de mastócitos por campo. Para a análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde **a** $p < 0,05$ vs grupo salina (degranulado), **b** $p < 0,05$ vs grupo salina e **c** $p < 0,05$ vs grupo 5-FU (degranulado).

Figura 20. Efeito de TRX na contagem de células caliciformes no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Contagem de células caliciformes no segmento duodenal, a partir da coloração em Ácido Perioódico Schiff (PAS), onde A, B e C correspondem respectivamente aos grupos Salina, 5-FU e TRX 100 mg/kg. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de células caliciformes por campo. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.7 Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos

6.7.1 Docagem molecular

Para investigar se os efeitos do TRX na redução da lesão intestinal induzida por 5-FU, do estresse oxidativo e da inflamação são mediados pela via da ciclooxigenase-2 (COX-2), realizou-se docagem molecular para desvendar possíveis interações da TRX com as enzimas COX-1 e 2, e mediadores inflamatórios TNF- α , NF-k β , e com isso compreender o efeito protetor da TRX na mucosite intestinal e possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Os resultados referente a docagem molecular da TRX com os alvos proteicos são apresentados na tabela 04, e as interações TRX-ligantes podem ser visualizados figura 21 e 22.

Na docagem molecular do complexo TRX/COX-1 obteve energia de ligação de ligação -5,63 Kcal mol⁻¹ e constante de inibição de 74,43 μ M, demonstrando atividade bioativa da troxerrutina na enzima de ciclooxigenase-1 (COX-1), onde a taxa da constante de inibição é elevada mesmo possuindo baixa afinidade molecular entre o receptor e o ligante. A interação no sítio ativo da COX-1 resultou em cinco pontes de hidrogênio nos resíduos Asn382, Glu454, Thr212, Trp387 e Tyr385 (Tabela 04). As pontes de hidrogênio formadas pelos aminoácidos Asn382 e Thr212, são as ligações mais intensas do complexo possuindo uma distância de 2,85Å e 2,60Å, respectivamente, onde a ponte se estende até o resíduo Thr212, como ilustrado na figura 21C e D.

A docagem molecular do complexo TRX/COX-2 teve energia de ligação de -6.31 Kcal mol⁻¹ e constante de inibição de 23,64 nM, demonstrando uma interação biológica da Troxerrutina na enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), onde a taxa de inibição é elevada e a interação entre as moléculas são intensas, com a formação de cinco pontes de hidrogênio nos resíduos Ser530, Arg120, Lys83, Tyr115, Tyr355 (Figura 21A e B), onde elas são importantes para a interação molecular do complexo. As pontes de hidrogênio formada pelos aminoácidos Arg120 e Tyr355, são as ligações mais intensas do complexo e agem diretamente entre as bordas do sítio ativo. A atividade inibitória ocorre nas bases do sítio ativo da COX-2, e nos pontos de ligações hidrofóbicas, nos aminoácidos Phe518, Val349, Ala527, Leu531, Val523, Pro86, Ser119, Glu524, Val89, Pro84, Trp100, Ile112, Leu93, Phe357, Leu359, Val116 e Leu352 (Tabela 04).

O complexo proteína/ligante formado entre TRX/TNF- α apresentou energia de ligação de -3,51 Kcal mol⁻¹, e constante de inibição de 2,68 mM, demonstrando que interação

biológica da Troxerrutina na citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Para este complexo, evidenciou-se intensa interação entre as moléculas, com formação de cinco pontes de hidrogênio nos resíduos Asp140, Gln67, Glu107, Glu110, Thr105 (Figura 22A e B).

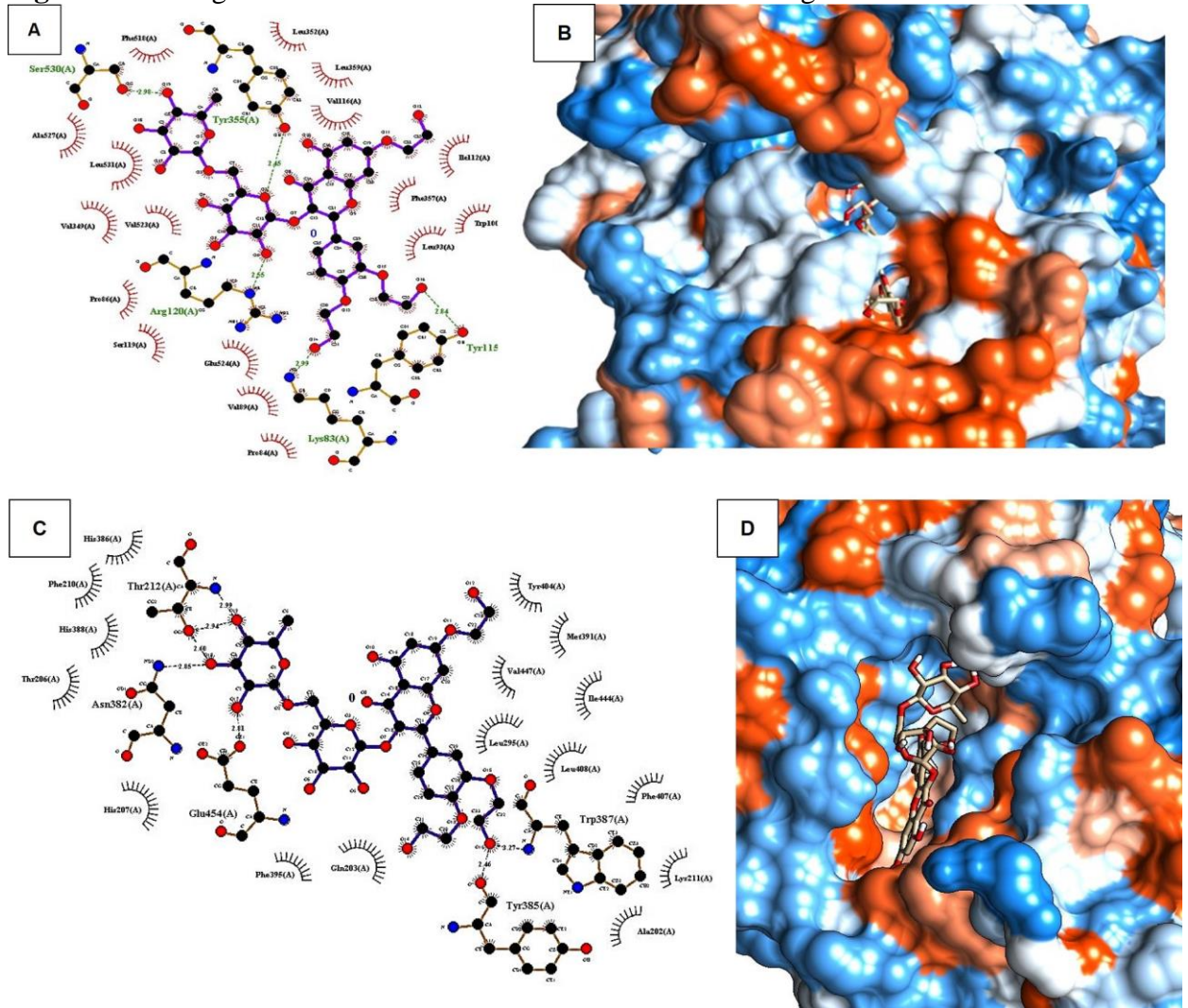
Os parâmetros de afinidade para o complexo TRX/NF-kB, evidenciaram energia de ligação $-3,93 \text{ kcal mol}^{-1}$, e constante de inibição de 1,31 mM, demonstrando interação biológica da Troxerrutina no fator nuclear kappa B (NF-kB), embora apresente taxa de inibição moderada a fraca. Para este complexo, evidenciou-se intensa interação entre as moléculas, com formação de cinco pontes de hidrogênio nos resíduos Arg30, Asp277, Gln271, Glu49, Ser281 (Figura 22C e D).

Tabela 04. Parâmetros de afinidade da docagem molecular de TRX com alvos proteicos pró-inflamatórios.

| Complexo (proteína- ligante) | ΔG_{bind}^a (kcal mol⁻¹) | Ki^b (μM) | Corridas de encaixe Independen- tes | Conforma- ções no Primeiro Cluster | Aminoácidos que Interagem por Pontes de Hidrogênio | Aminoácidos que Fazem Interações Hidrofóbicas |
|---|---|---|--|---|---|--|
| TRX/COX-2 | -6,31 | 23,64 μ M | 100 | 10 | Ser530, Arg120, Lys83, Tyr115, Tyr355 | Phe518, Val349, Ala527, Leu531, Val523, Pro86, Ser119, Glu524, Val89, Pro84, Trp100, Ile112, Leu93, Phe357, Leu359, Val116, Leu352 |
| TRX/COX-1 | -5,63 | 74,43 μ M | 100 | 4 | Asn382, Glu454, Thr212, Trp387, Tyr385 | Ala202, Gln203, His207, His386, His388, Ile444, Leu295, Leu408, Lys211, Met391, Phe210, Phe395, Phe407, Thr206, Tyr404, Val447 |
| TRX/TNF-α | -3,51 | 2,68 mM | 100 | 2 | Asp140, Gln67, Glu107, Glu110, Thr105 | Ala111, Cys69, Gly66, Gly68, Pro106, Pro70, Ser71 |
| TRX/NF-kB | -3,93 | 1,31 mM | 100 | 1 | Arg30, Asp277, Gln271, Glu49, Ser281 | Arg278, Glu119, Glu279, Leu280, Lys28, Pro283, Thr229 |

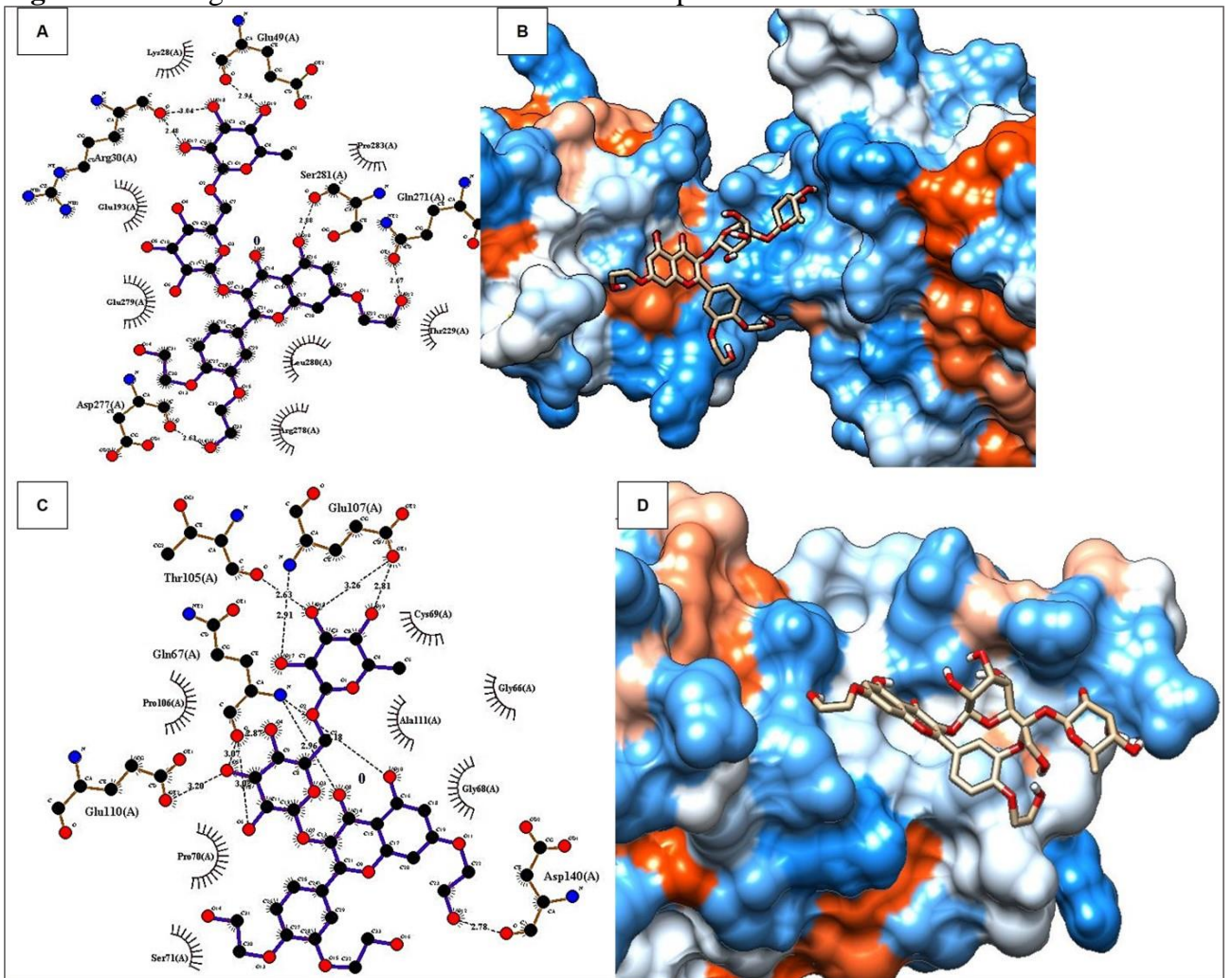
a: Ligação de energia na melhor conformação; b: Constante de inibição da melhor conformação; TRX: Troxerrutina; COX-1: Ciclooxigenase 1; COX-2: Ciclooxigenase 2; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; NF-kB: fator nuclear kappa b.

Figura 21. Docagem molecular da TRX com as enzimas ciclooxigenases 1 e 2.



A e C: Diagrama Ligplot 2D que mostra detalhes das pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas nos complexos TRX/COX-2 e TRX/COX-1, respectivamente. **B e D:** Estrutura global dos complexos TRX/COX-2 e TRX/COX-1, respectivamente.

Figura 22. Docagem molecular da TRX com citocinas pró-inflamatórias TNF- α e NF-kB.



A e C: Diagrama Ligplot 2D que mostra detalhes das pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas nos complexos TRX/ TNF- α e TRX/ NF-kB, respectivamente. **B e D:** Estrutura global dos complexos TRX/ TNF- α e TRX/ NF-kB, respectivamente.

6.7.2 Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina sobre as alterações morfológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU

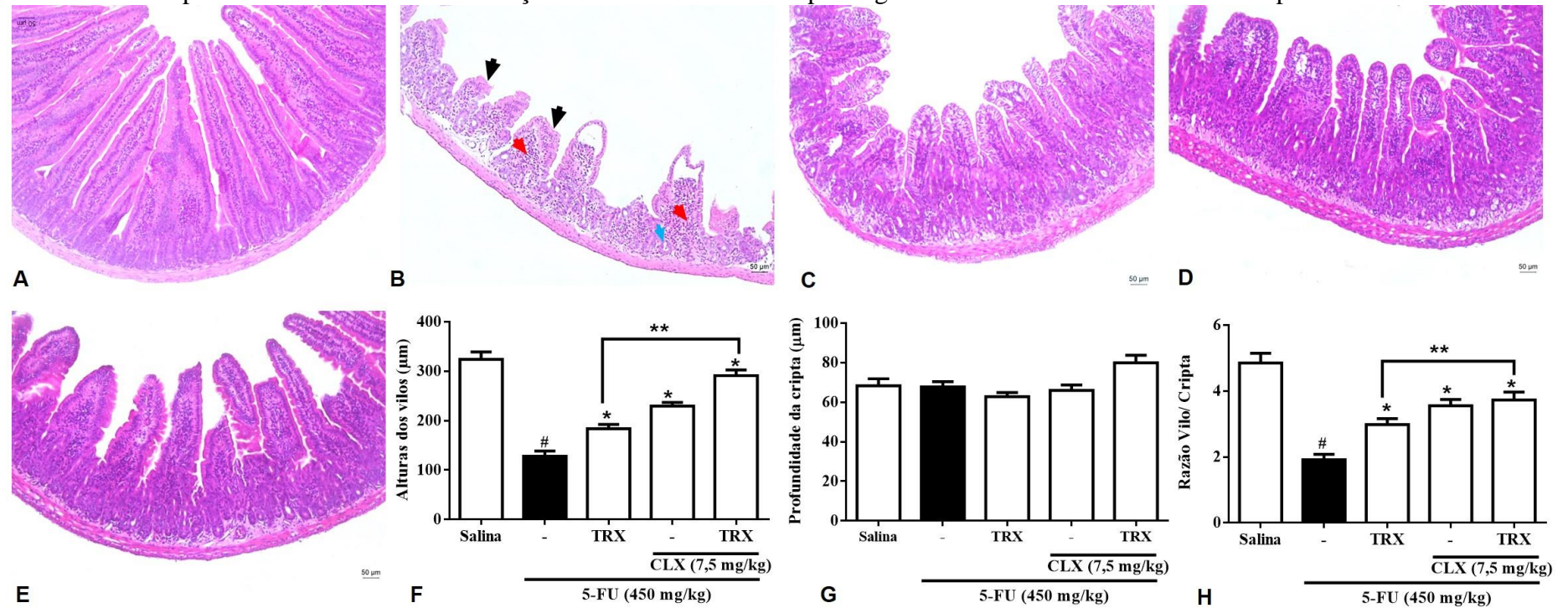
Ao mensurar a altura das vilosidades no segmento do duodeno, conforme a figura 23F, observou-se que 5-FU promoveu a redução ($128,20 \pm 10,76$, $p < 0,05$) de maneira significativa da altura das vilosidades quando comparado ao grupo salina ($324,20 \pm 15,04$, $p < 0,05$). Ao passo que TRX 100mg/kg ($183,90 \pm 8,62$, $p < 0,05$) preveniu a diminuição da altura das vilosidades quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. O tratamento com o bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), o Celecoxibe (CLX, $229,40 \pm 7,5$, $p < 0,05$), também preveniu o encurtamento das vilosidades de forma significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. Evidenciou-se também que o tratamento da TRX 100 em associação com Celecoxibe ($291,00 \pm 11,97$, $p < 0,05$) foi capaz de prevenir efetivamente o encurtamento das vilosidades quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. Observou-se o grupo que tratados com a associação de TRX 100 mg/kg e CLX apresentou melhor reversão na diminuição da altura das vilosidades que os grupos tratados somente com TRX 100 ou CLX ($p < 0,05$).

Na mensuração das criptas no duodeno, apresentada na figura 23G, não observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo lesivo 5-FU ($67,68 \pm 2,69$) para o grupo salina ($68,29 \pm 3,55$), assim como também não foi observado diferença significativa nos demais grupos de tratamento com TRX 100 mg/kg e/ou CLX quando comparado com o grupo 5-FU.

Ao avaliar a relação vilosidade/cripta no segmento do duodeno, conforme a figura 23H, observou-se que grupo 5-FU promoveu redução da relação vilosidade/cripta ($1,91 \pm 0,16$, $p < 0,05$) de maneira significativa quando comparado ao grupo salina ($4,85 \pm 0,29$, $p < 0,05$). Os grupos tratados com TRX 100mg/kg ($2,98 \pm 0,18$, $p < 0,05$), Celecoxibe (CLX, $3,55 \pm 0,1$, $p < 0,05$), TRX 100 e CLX ($3,73 \pm 0,23$, $p < 0,05$) apresentaram aumento da relação vilosidade/cripta significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. Evidenciou-se também que o grupo tratado com a combinação de TRX 100mg/kg e CLX apresentou maior relação vilosidade/cripta que o grupo tratado apenas com o TRX ($p < 0,05$).

Em análise das fotomicrografias apresentadas na figura 23A a E, pode-se evidenciar que 5-FU promoveu diminuição das alturas dos vilos, além de perda de arquitetura dos vilos e criptas, edema, e aumento do infiltrado inflamatório, quando comparado com o grupo salina. Também pode-se observar que os grupos de tratamento com TRX 100mg/kg e/ou CLX apresentaram diminuição do dano histopatológico promovido pelo 5-FU.

Figura 23. Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento da COX-2 no efeito protetor da TRX sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

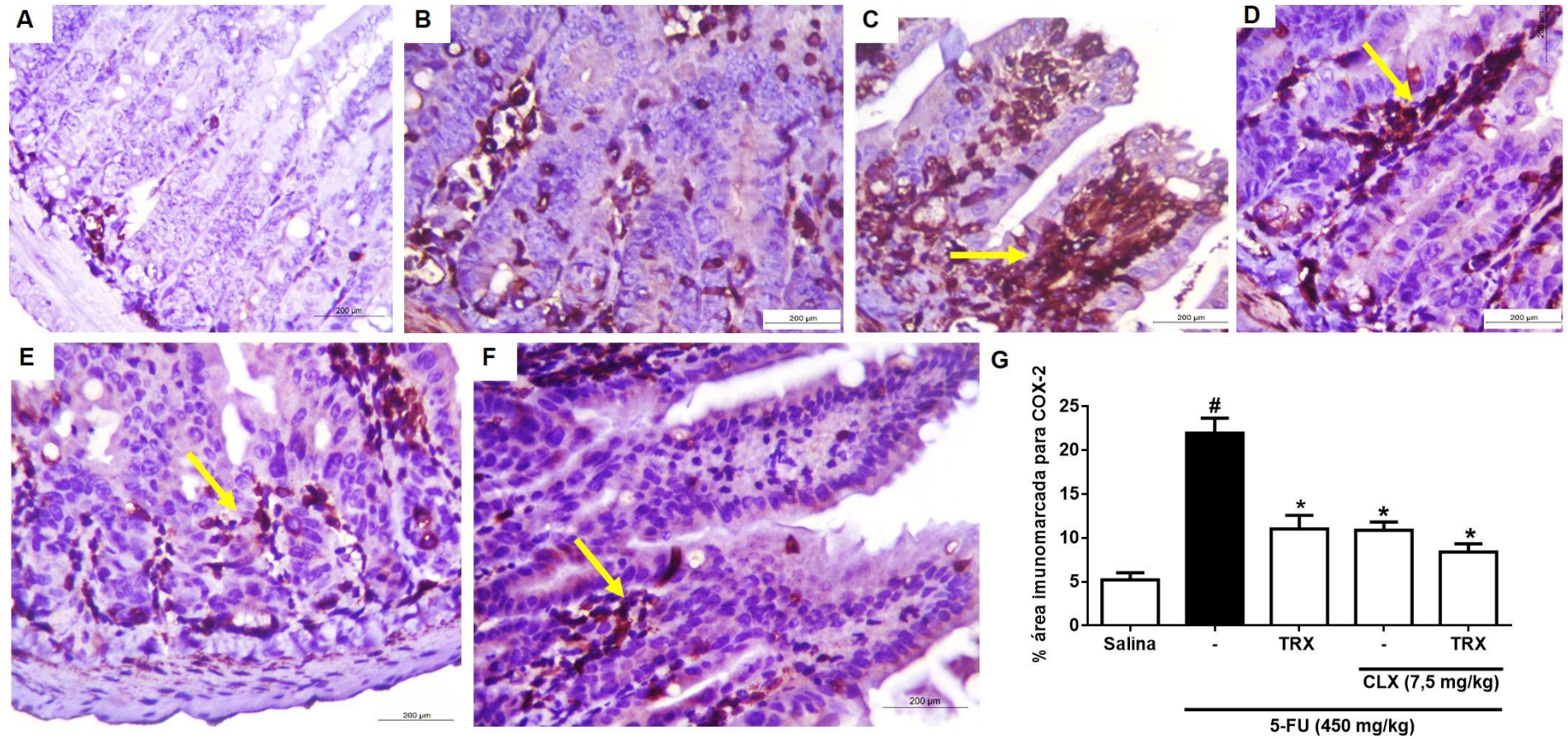


Segmentos do duodeno foram removidos e processados para coloração pelo método de H&E para análise morfométrica e histopatológica. **A:** Salina; **B:** 5-FU; **C:** TRX 100 mg/kg; **D:** CLX; **E:** TRX 100 mg/kg e CLX; **F:**Altura dos vilos; **G:** Profundidade das criptas; **H:** Razão Vilo/Cripta. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. Para análise estatística, ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey foi usado, onde #p <0,05 vs grupo salina, *p <0,05 vs grupo 5-FU, **p <0,05 vs grupo TRX.

6.7.3 Avaliação do envolvimento da cicloxigenase 2 (COX-2) no efeito protetor da troxerrutina sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU

Ao investigar os efeitos do TRX 100 mg/kg (na presença ou ausência de CLX) na expressão de COX-2 durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU através de análise imunohistoquímica, evidenciou-se que o 5-FU ($21,95 \pm 1,70$) promoveu imunomarcção intensa de COX-2 (Figura 24C) na mucosa duodenal em comparação com o grupo salina ($5,20 \pm 0,81$, $p < 0,05$) (Figura 24B; G). Como mostrado na Figura 24D, o pré-tratamento com TRX 100 mg/kg ($11,01 \pm 1,56$, $p < 0,05$) diminuiu a imunocoloração para COX-2, comparado ao grupo 5-FU (Figura 24C; G). Similarmente, CLX ($10,93 \pm 1,56$, $p < 0,05$) (Figura 24E) ou a combinação de CLX e TRX 100 mg/kg ($8,34 \pm 0,92$, $p < 0,05$) (Figura 24F; G) diminuiu a expressão de COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU em comparação com o Grupo 5-FU (Figura 24; G).

Figura 24. Imunohistoquímica para COX-2.



A: Controle negativo; **B:** Salina; **C:** 5-FU; **D:** TRX 100 mg/kg; **E:** CLX; **F:** TRX 100 mg/kg +CLX; **G:** percentual de área imunomarcada para COX-2. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. Para análise estatística, ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey foi usado, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a Troxerrutina (TRX) foi capaz de proteger a mucosa intestinal das alterações induzidas por 5-FU que perfazem o quadro da mucosite intestinal, como leucopenia, dano oxidativo, recrutamento neutrofílico, mastocitose, depleção de células caliciformes e alterações histológicas e morfométricas do intestino.

Para alcançar esses resultados, utilizou-se o modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU adaptado de Carneiro-Filho et al. (2004) e também descrito por Soares et al. (2008). Para este modelo, a administração única de 450 mg/kg de 5-FU em camundongos, é capaz de mimetizar alterações dos parâmetros inflamatórios e morfofuncionais que são observados na clínica, agora na mucosite experimental.

Em nossos achados, pode-se evidenciar que houve a instalação da mucosite intestinal pela administração do 5-FU, evidenciado por alterações funcionais e inflamatórias, como perda de peso progressiva, leucopenia, alterações histopatológicas e morfométricas, aumento do dano oxidativo (com depleção de GSH e aumento de MDA), infiltrado neutrofílico (aumento de MPO), aumento de mastócitos teciduais e diminuição das células califormes.

A perda de peso progressiva trata-se de um achado funcional característico da mucosite intestinal provocado pelo tratamento quimioterápico com 5-FU, e culmina da diminuição da ingestão de alimentos e capacidade absorptiva (LIU et al., 2013).

No presente estudo, a análise ponderal evidenciou que o 5-FU promoveu diminuição da massa corporal dos camundongos, contudo a troxerrutina não foi capaz de reverter esta alteração funcional no decorrer dos 4 dias de protocolo experimental.

Flavonoides, tem demonstrado eficácia na mucosite intestinal e na reversão da perda de peso. Chen et al. (2017) e Liu et al. (2013) demonstrou que pré-tratamento com extratos de materiais vegetais de *Ficus virens* e *Chimonanthus nitens* var. *salicifolius*, respectivamente, por sua vez, ricos em flavonoides, possuem capacidade de reverter a perda ponderal, lesão histológica, estresse oxidativo e processo inflamatório da mucosa intestinal promovida pelo 5-FU.

Cechinel-Zanchett et al. (2019) ao avaliar efeito de extratos de folhas de *Bauhinia forficata* rico em flavonoides, em concentrações semelhantes ao presente estudo, também evidenciou que a fração do seu extrato não teve capacidade de evitar a perda de peso devido o tratamento quimioterápico, apesar de ser eficaz na reversão das alterações histológicas, o estresse oxidativo e processo inflamatório instalado na mucosite intestinal de experimental de

14 dias. Cheah et al. (2009) ao indicar que extratos de sementes de uvas ricos em flavonoides teriam efeito protetor da mucosite intestinal através da diminuição do dano histológico e infiltrado inflamatório, mas não observou prevenção da perda peso progressiva promovida pelo 5-FU. Gerhard et al. (2017) e Araújo et al. (2015b) ao avaliar o efeito de quimioterápicos na perda de peso, também não observaram em seus estudos, capacidade de prevenir perda de peso em suas investigações de mucosite intestinal. Nobre (2017) ao avaliar efeito de um fármaco antirreumático em modelo agudo de mucosite intestinal, evidenciou que o fármaco não atenuava a perda ponderal progressiva promovida pelo quimioterápico irinotecano.

A administração aguda de 5-FU afeta o peso corpóreo dos animais, o que possivelmente, se deve à ativação de respostas inflamatórias seguidas por disfunção gastrointestinal (SONG et al., 2013). Dentre os fatores que podem desencadear a perda de massa corpórea, a literatura tem demonstrado que muito se deve à perda de integridade da barreira epitelial intestinal, diminuição da capacidade absorptiva de alimentos devido às alterações nas vilosidades intestinais e alteração na secreção de eletrólitos (KEEFE, 2007; SOARES et al., 2013; COSTA, 2017; LIMA, 2018).

Dessa forma, outro parâmetro estudado foi as alterações histopatológicas e morfométricas da mucosa intestinal. No presente estudo, confirmou-se o que já se tem bastante descrito na literatura, o 5-FU promove diminuição e vacuolização das vilosidades intestinais, necrose das criptas, infiltração de células inflamatórias, edema, perda da arquitetura celular, diminuição da relação vilo/cripta (SOARES et al., 2008; SOARES et al., 2013; GENEROSO et al., 2015; GALDINO et al., 2018; COSTA et al., 2019; MIRANDA et al., 2019). E o pré-tratamento com TRX 100 mg/kg reverteu os efeitos deletérios promovidos pelo 5-FU na mucosa intestinal, sobretudo no segmento duodenal, onde pode-se evidenciar prevenção do encurtamento dos vilos, manutenção da arquitetura das criptas, diminuição de edema, vacuolização de células epiteliais intestinais, e infiltrado inflamatório, além do aumento da relação vilo/cripta, manutenção da integridade da camada muscular.

Trabalhos envolvendo flavonoides e produtos naturais, também tem evidenciado o efeito protetor destes compostos na restauração da integridade da mucosa intestinal. Kalita et al. (2016) determinou que a combinações de flavonoides rutina e podofilotoxina atenua o alterações histológicas (integridade dos vilos e aumento da razão vilo/cripta) durante dano intestinal. Topal et al. (2018) sugeriu que o flavonoide rutina (o substrato para síntese de troxerrutina) na dose de 100 mg/kg é eficaz na proteção da mucosa do jejuno de ratos com mucosite intestinal induzida por quimioterápico cisplatina, sendo este flavonoide capaz, além

de diminuir o estresse oxidativo e processo inflamatório, reverter as alterações intestinais nos vilos e criptas. Ambos os dados corroboram e reafirmam os resultados obtidos no presente estudo.

É durante a fase de ulceração, a fase mais associada com a mucosite, que a integridade epitelial é destruída, onde alterações atróficas são perceptíveis e enquadram o quadro de lesão do epitélio intestinal característico da mucosite (SONIS, 2004; GUABIRABA et al., 2014; KIM et al., 2015). Ao prevenir e/ou atenuar grande parte das alterações na mucosa intestinal promovidas pelo quimioterápico, TRX encabeça os processos fisiológicos para o curso da restauração da integridade epitelial, cicatrização e cura da mucosite, pois ao evitar a exacerbação da fase ulcerativa, evita além da deterioração do tecido, um foco de bacteremia e sepse, que por sua vez, são fundamentais para piora do prognóstico da mucosite.

Concomitante à restauração da integridade epitelial, o retorno da contagem de glóbulos brancos aos valores basais são de grande valia para o processo de tratamento e cura da mucosite, visto que a mielossupressão (e conseqüentemente a leucopenia) é um achado importante e, figura entre os principais efeitos adversos no tratamento quimioterápico com o 5-FU (KUMAR et al., 2010; KOBUCHI et al., 2016).

No presente estudo, evidenciou-se que o 5-FU (450 mg/kg) provocou a diminuição do número de leucócitos totais. TRX nas doses de 100 e 150 mg/kg foram capazes de atenuar a leucopenia (diminuição do número de leucócitos). Soares et al. (2008) e Soares et al. (2013) ao estabelecer o protocolo de indução de mucosite intestinal, por doses agudas de 5-FU (150 e 450 mg/kg, respectivamente), evidenciou para essas duas concentrações o quadro de leucopenia, instalados nos animais avaliados com mucosite; o que corrobora com os resultados obtido no presente estudo.

Quimioterápicos antimetabólitos, como o 5-FU, atuam sobre a divisão celular provocando redução na atividade regenerativa de vários tecidos, dentre eles, o hematopoiético, culminando em declínio correspondente na síntese e diferenciação celular (NASCIMENTO JUNIOR, 2014). Dessa forma, ao reverter a leucopenia, e auxiliar na manutenção da integridade do epitélio intestinal, o TRX, evita complicações na fisiopatologia da mucosite (como infecções bacteriana generalizada), visto que auxilia na integridade da barreira epitelial e manutenção dos níveis de basais leucócitos para defesa deste microambiente contra microorganismos ou processos inflamatórios.

Neutrófilos constitui a primeira linha de defesa celular do sistema imunológico, contudo, o acúmulo e superativação dos neutrófilos exacerba o processo inflamatório e, acarreta efeitos lesivos ao tecido, que muito se deve, a liberação de mediadores tóxicos,

derivados dos grânulos citoplasmáticos primários de neutrófilos, como a mieloperoxidase (MPO) (MONTESEIRÍN et al., 2001; LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; JOHNSON et al., 2011; RYMASZEWSKI et al., 2014). Dessa forma, ao avaliar os níveis de MPO, pode-se avaliar, indiretamente, a magnitude do infiltrado neutrofílico na lâmina própria intestinal. No presente estudo, evidenciou-se aumento dos níveis de MPO promovidos pelo 5-FU e reversão deste aumento de MPO pela TRX (100 mg/kg) no segmento duodenal.

Em Cechinel-Zanchett et al. (2019) frações do extratos de folhas de *Bauhinia forficata* rico em flavonoides na concentração de 100 mg/kg também apresentaram capacidade de diminuir os níveis de MPO nos segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano. E Cheah et al. (2009) ao avaliar extratos de sementes de uvas ricos em flavonoides determinou que estes extrato teria capacidade de diminuir os níveis de MPO em jejunos de ratos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Muitos mecanismos têm se proposto para explicar a ação anti-inflamatória dos flavonóides, dentre elas, a capacidade de inibir a degranulação de neutrófilos, a ação inibitória sobre enzimas geradoras de eicosanoides e na produção de mediadores (citocinas) pró-inflamatórios, além da sua atuação na secreção e agregação plaquetária. Por fim, estudos tem indicado que os flavonoides podem modular as células imunes envolvidas na inflamação, como células *natural killer*, linfócitos, macrófagos e mastócitos (AGRAWAL et al. 2011; SANGEETHA et al., 2016; HAYAT et al. 2017). Sabendo que a MPO trata-se de uma enzima hemo-peroxidase altamente catiônica, liberada a partir da ativação de neutrófilos, e detém capacidade de estimular liberação de EROs e citocinas pró-inflamatórias e recrutar leucócitos adicionais para a região da inflamação (KINDZELSKII et al., 2006; LACY, 2006; RYMASZEWSKI et al., 2014). Acredita-se que o efeito anti-inflamatório de TRX se deve a diminuição do MPO, e, conseqüentemente, atenuação da infiltração neutrofilica, promovida pelo efeito quimiotático da MPO na mucosa intestinal, bem como diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibição de eicosanoides via ciclooxigenase 2.

Mastócitos, por sua vez, desempenham um papel crítico na regulação da imunidade inata ou adquirida, em resposta à infecções bacterianas e parasitárias, bem como modulação da inflamação (WALLACE, 2005; RAMSAY et al., 2010). Diante disso, ao realizar a contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos, observamos que o 5-FU promoveu aumento significativo do número de mastócitos degranulado e granulado quando comparado ao grupo controle negativo. Também foi observado que o pré-tratamento com TRX diminuiu o número de mastócitos teciduais, tanto degranulado quanto granulado, promovido pelo 5-FU.

Barbosa (2019) ao avaliar o efeito do alcaloide episopiloturina na mucosite induzida por 5-FU, observou que o pré-tratamento com o alcaloide nos animais submetidos a mucosite por 5-FU, os camundongos apresentaram diminuição da mastocitose (aumento do número de mastócitos) quando comparado com o grupo que recebeu apenas 5-FU. Al-Asmari et al. (2016) ao investigar o efeito da taurina sobre a infiltração de mastócitos na mucosite intestinal, e determinou que a mastocitose foi significativamente maior no grupo tratado com 5-FU, ao passo que a taurina atenuou o aumento de mastócitos. Já para a troxerrutina, Thomas et al. (2018) indicou que TRX (nas doses de 50, 100 e 200mg/kg) revertem a mastocitose em tecido hepático de ratos com carcinoma hepatocelular (HCC).

Mastócitos são células provenientes de células progenitoras hematopoiéticas mielóides pluripotentes da medula óssea, de onde circulam no fluxo sanguíneo e migram para os tecidos periféricos, como epitélio das mucosas. Em condições fisiológicas, os mastócitos compreendem cerca de 5% das células mononucleares da lâmina própria do trato gastrointestinal e contribuem para a homeostase intestinal. Contudo, são considerados críticos na patogênese de processos inflamatórios como a mucosite, devido sua superexpressão e, consequentemente amplificação da resposta inflamatória, que se deve da liberação seletiva de mediadores (WALLACE, 2005; RAMSAY et al., 2010; DE WINTER et al., 2012; THEOHARIDES et al, 2012; AMIN, 2012; PILLAI et al., 2015).

Ramsay et al. (2010) e Nogueira et al. (2017) sugerem que ativação de mastócitos contribui consideravelmente para a fisiopatologia da mucosite, uma vez que promovem mudanças arquitetônicas, como a alargamento das vilosidades e mudanças no tamanho da cripta no intestino delgado. Segundo Kheirollahi et al. (2018) dentre os vários mecanismos passíveis de flavonoides como a TRX atuarem na reversão do dano tecidual evidenciado em processos inflamatórios, seria na prevenção da degranulação de neutrófilos e mastócitos, corroborando os dados obtidos presente estudo.

Além do dano intestinal evidenciado no processo inflamatório, quimioterápicos também podem comprometer a camada de proteção da mucosa pela diminuição de mucina. Este evento expõem o epitélio (já danificado) à agentes nocivos presentes no lúmen intestinal, além de deixá-lo susceptível à degradação bacteriana (GIBSON et al., 2008). Ao avaliar o número de células caliciformes (células produtoras de muco) no segmento duodenal de camundongos, evidenciou-se que o 5-FU diminuiu a quantidade de células caliciformes, e que TRX (100 mg/kg) reverte a depleção de células caliciformes induzidas pelo 5-FU.

Gawish et al. (2013) ao induzir mucosite intestinal com administração aguda de 5-FU (150 mg/kg) em ratos, observou que as células caliciformes foram significativamente reduzidas, tanto nas vilosidades quanto nas criptas. Ciobanu et al. (2016) ao avaliar o efeito da do antibiótico oral Rifaximina (200 mg/kg) na mucosite intestinal com 5-FU (500mg/kg) em ratos, determinou que o número e distribuição das células caliciformes foram significativamente reduzidas pelo 5-FU, principalmente no duodeno e jejuno, e Rifaximina reverteu a depleção de células caliciformes, sendo encontradas uniformemente distribuídas no epitélio intestinal. Fijlstra et al. (2011) e Vardi et al. (2008) observou que o MTX causou esgotamento de células caliciformes e um tímido acúmulo no topo das vilosidades e, nos grupos sem tratamento com MTX (controle negativo), as células caliciformes estão distribuídas uniformemente ao longo do eixo cripta-vilosidade, para este último pesquisador, evidenciou também que o beta caroteno atenua a diminuição de células caliciformes causada pelo quimioterápico MTX. Sasu et al. (2015) indicou que o tratamento com quimioterápico epirrubicina em ratos, induz dano à barreira intestinal principalmente pela diminuição das células caliciformes, contudo, ao tratar com 100 mg/kg de silimarina, um composto bioativo que se trata de uma mistura padronizada de flavonolignas, restaurou para níveis basais número de células caliciformes no intestino.

Células caliciformes são responsáveis por revestir epitélio intestinal com uma camada protetora de muco. Além disso, a secreção de muco, pelas células caliciformes, é mais alta perto da abertura da cripta, que cria uma barreira física ao lúmen intestinal. Portanto, o fluxo contínuo de fluido da cripta efetivamente isola o microambiente na cripta de patógenos e o processo digestivo (GEHART; CLEVERS, 2018).

Acredita-se que o 5-FU afeta a barreira proteção mucosa por meio da diminuição da secreção de muco que se dá por duas maneiras distintas. A primeira corresponde a liberação rápida de muco pelas células caliciformes causando o esgotamento de muco por essas células, que se deve à regulação positiva de neurotransmissores entéricos que atuam nas células caliciformes. E a segunda maneira seria destruição celular das criptas e vilos e a morte prematura das células progenitoras e com isso perda de capacidade de renovação de todas as linhagens celulares, incluindo as células caliciformes (GAWISH et al., 2013; GEHART; CLEVERS, 2018).

Quando instalado, processos inflamatórios, como a mucosite intestinal, propicia um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes denominado estresse oxidativo. E é

caracterizado pela superprodução espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os radicais livres, e constante ação dos mesmo sobre o organismo, além da ineficiente neutralização de sua ação, que culminam em danos estruturais e/ou funcionais (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008).

Neste contexto, ao avaliar os níveis de MDA, um produto final da peroxidação lipídica, evidenciou-se que o 5-FU elevou os níveis de MDA no duodeno de camundongos, e que o TRX na dose de 100 mg/kg foi capaz de reverter o aumento dos níveis de MDA e com isso diminuir o estresse oxidativo provocado instaurado pelo quimioterápico na mucosite intestinal. Este dado evidencia a capacidade de supressão de dano celular e tecidual da TRX na mucosite intestinal ao atuar como antioxidante, ou seja, combatendo o estresse oxidativo causado por aldeídos e derivados, frutos da degradação dos lipídeos de membrana na peroxidação lipídica.

Gautman et al. (2016) ao avaliar os níveis de MDA no intestino de ratos com mucosite induzido por quimioterápicos, e tratados com flavonoide rutina na dose de 100 mg/kg, observou a diminuição dos níveis de MDA, assim como em nosso trabalho. Gulgun et al. (2010) ao avaliar o efeito de flavonoide Proantocianidina na dose de 100 mg/kg na mucosite intestinal em ratos induzido pelo quimioterápico antimetabólito metotrexato (MTX), determinou que o flavonoide em estudo reverteu o aumento dos níveis de MDA promovidos pelo 5-FU, chegando a valores próximos ao grupo controle negativo. Em modelos experimentais de estresse oxidativo com ratos diabéticos, Badalzadeh et al. (2015) evidenciou que a TRX na dose de 150 mg/kg reduziu a peroxidação lipídica (através da diminuição dos níveis de MDA) no tecido aórtico de ratos diabéticos. Dehnamaki et al. (2018) ao avaliar o efeito protetor da troxerrutina no dano renal promovido pelo quimioterápico cisplatina, determinou que TRX (nas doses de 75 e 150 mg/kg) diminui os níveis de MDA no tecido renal. E Fan et al (2009) também evidenciou efeito nefroprotector da TRX (150 mg/kg) através da diminuição dos níveis de MDA.

O MDA é considerado segundo mensageiro tóxico devido sua capacidade de induzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e ativação de várias vias de sinalização, incluindo NF- κ B, um fator de transcrição fundamental na gênese do processo inflamatório, incluindo a mucosite (RAGHAVAN et al., 2012; AL-ASMARI et al., 2016). Desta maneira, não somente diminuindo o estresse oxidativo, possivelmente TRX atue diminuindo a exacerbação da inflamação estabelecida na mucosite.

A síntese de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/Ns) no organismo propiciada pelos quimioterápicos na terapêutica do câncer é necessário para desencadear a apoptose das células malignas. Contudo, discrepância entre a síntese EROs e ERNs e sistemas de antioxidantes, culminam no distúrbio que conhecemos como estresse oxidativo, e

representa um relevante problema na homeostase corpórea. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos endógenos, destaca-se a Glutathiona reduzida (GSH) (BHATTACHARYYA et al., 2014; ALDEMIR et al., 2015; KART et al., 2016).

Ao mensurar os níveis de GSH em duodeno de camundongos com mucosite intestinal, evidenciou-se no presente estudo que TRX aumentou o poder antioxidante por meio da prevenção do consumo de GSH em animais que receberam a TRX (100 mg/kg), quando comparado com os animais que receberam apenas 5-FU. A atividade antioxidante é frequentemente relatada em estudos envolvendo flavonoides em modelos experimentais de mucosite por quimioterápicos (GULGUN et al., 2010; GAUTMAM et al., 2016; TOPAL et al., 2018; CECHINEL-ZANCHETT et al., 2019).

Para a troxerrutina, vários estudos tem relatado o efeito antioxidante deste flavonoide, em diversos tipos de modelos experimentais de lesão e inflamação tecidual, com doses semelhantes e distintas de TRX (das doses que foram utilizadas em nosso estudo). No tecido renal, Shan et al. (2017) e Dehnamaki et al. (2018) evidenciaram que TRX aumenta os níveis de Glutathiona Peroxidase (GPX), GSH e SOD nas doses 75, 100 e 150 mg/kg. No tecido hepático, Zhang et al. (2014) e Thomas et al. (2016; 2018) determinaram que TRX, em doses que variaram de 50 a 200 mg/kg, era eficaz na preservação dos níveis dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos GSH, CAT e SOD. No tecido aórtico, Badalzadeh et al. (2015) observou que a dose de 150 mg/kg de TRX apresentava maior eficácia na preservação dos níveis de GPX e SOD. Geetha et al. (2016 e 2017) obteve resultados significativamente aumentados também da dose de 150 mg/kg de TRX ao avaliar nos níveis de GSH, GPX, SOD e CAT em tecido cardíaco. E Vinothkumar et al. (2014) ao avaliar o efeito de TRX (50 mg/kg) na mensuração dos níveis de GSH, GPX, SOD e CAT em tecido intestinal.

Flavonoides são também chamados de sequestradores de radicais livres, e exibem atividade antioxidante por meio da inibição de oxidases, varredura e captação de radicais livres e doação de íons de hidrogênio. Sua alta reatividade com substituintes hidroxila que participam da reação e quelação com íons metálicos também são fundamentais na eliminação de radicais livres. A ampla gama de efeitos terapêuticos dos flavonóides pode ser atribuída às suas propriedades antioxidantes (SANGEETHA et al., 2016; HAYAT et al., 2017).

Os flavonoides são corriqueiramente relatados pelos efeitos benéficos no tratamento de desordens do trato digestivo. Muitas pesquisas tem revelado que os flavonoides têm ação gastroprotetora pela inibição de AMPc, ciclooxigenase e fosforilação de proteínas (SANGEETHA et al., 2016).

No presente estudo realizou-se docagem molecular para investigar a interação de TRX com as enzimas ciclooxigenase 1 e 2, NF-kB e TNF- α , seguido de avaliação histopatológica do efeito de TRX na mucosite intestinal via COX. A docagem molecular, revelou que TRX liga-se estavelmente com os sítios alvos de COX-2, COX-1, TNF- α e NF-kB (apresentando ordem decrescente de interação, respectivamente). Observou-se intensa interação entre os complexos formados de TRX/COX-1 e TRX/COX-2, contudo observou-se no complexo TRX/COX-2 maior interação e com mais afinidade. Apesar das ciclooxigenases serem enzimas com similaridade em cerca de 60% de suas estruturas, a COX-2 apresenta variações conformacionais na bolsa do sítio ativo, que podem influenciar nas diferenças de sensibilidades e afinidade entre COX-1 e COX-2 para ligantes como o TRX. Dessa forma, a COX-2 apresenta canal de sitio de ligação ao substrato maior e mais flexível, o que possivelmente justifica a maior afinidade de TRX com a COX-2 que para COX-1 (MINGHETTI, 2004; ROUZER; MARNETT, 2009; CLARK et al., 2013).

Os resultados *in silico* vistos na docagem molecular corrobora com os resultados experimentalmente *in vivo* ao realizar a análises histológicas e morfométricas e imunohistoquímica para COX-2. Além de evidenciar alterações histológicas promovidas pelo 5-FU (como diminuição e vacuolização das vilosidades intestinais, necrose das criptas, infiltração de células inflamatórias, edema, perda da arquitetura celular, diminuição da relação vilo/cripta) e reversão desses efeitos deletérios promovidos pelo 5-FU na mucosa intestinal, pela TRX (100 mg/kg), pode-se observar que o celecoxibe (CLX), um bloqueador da COX-2 reverte o encurtamento dos vilos e promove aumento da razão vilo/cripta. No presente estudo, pode-se determinar que o pré-tratamento com TRX e CLX, apresentou melhor reversão nas alterações morfométricas que os pré-tratamento isolados de TRX (100 mg/kg) ou CLX.

Na fisiopatologia da mucosite intestinal, o dano direto ao DNA por agentes quimioterápicos como 5-FU, irinotecano e MTX e radiação estimulam a geração de EROs, que por sua vez, desencadeia a ativação de fatores de transcrição em resposta ao dano inicial, como o fator nuclear kB (NF-kB). Crucial na gênese da inflamação, o NF-kB, estimula a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α e da enzima COX-2. A COX-2 por sua vez desempenha papel fundamental na inflamação através da liberação de ácido araquidônico, e por conseguinte biossíntese de eicosanoides, como exemplo prostaglandinas envolvidas em vários respostas imunológicas e inflamatórias. Diante disso, vários estudos tem demonstrado o efeito lesivo de agentes radio-quimioterápicos através da hiper-expressão de COX-2, IL-1 β , TNF- α e NF-kB em modelos de mucosite intestinal

(YEOH et al., 2007; AGRAWAL et al., 2011; WONG et al., 2015; KALITA et al., 2016; ALENCAR et al., 2017; RANGEL et al., 2019). Cabendo destaque para Liu et al. (2013) que evidenciou que o 5-FU causa elevação de IL-1 β , TNF- α , e já o extrato aquoso de *Chimonanthus nitens* var. *salicifolius* apresenta efeito anti-inflamatório promovendo diminuição da expressão desta citocinas pró-inflamatórias, e Gautam et al. (2016) evidenciou que a rutina através da inibição da COX-2 pode refrear a reação inflamatória promovida pelo MTX.

A afinidade de TRX por estudos *in silico* por docagem molecular já foi avaliada e pode-se determinar que este flavonoide tem grande afinidade de ligação com importantes proteínas envolvidas na apoptose celular, como Bcl-2 e caspase-3 (THOMAS et al., 2018). Aliado a esses estudos, estudos de docagem molecular avaliando interações entre metabolitos secundários de plantas como alcaloides imidazólicos, curcuminoides e flavonoides com proteínas pró-inflamatórias e receptores essenciais na carcinogênese e, evidenciaram forte interações entre a alcaloides com a *Peroxisome proliferator-activated receptor* gama (PARP γ) causando bloqueio da indução do processo carcinogênico, bem como também foi evidenciado que curcuminoides ao interagir com NF- κ B, promovendo diminuição do processo inflamatório, assim como o flavonoide também apresenta capacidade de interagir com NF- κ B, I κ K-NEMO, promovendo efeito anti-inflamatório ao bloquear os efeitos promovidos por este fator de transcrição nuclear (PADHYE et al., 2009; SILVA, 2011; KADIOGLU et al., 2015).

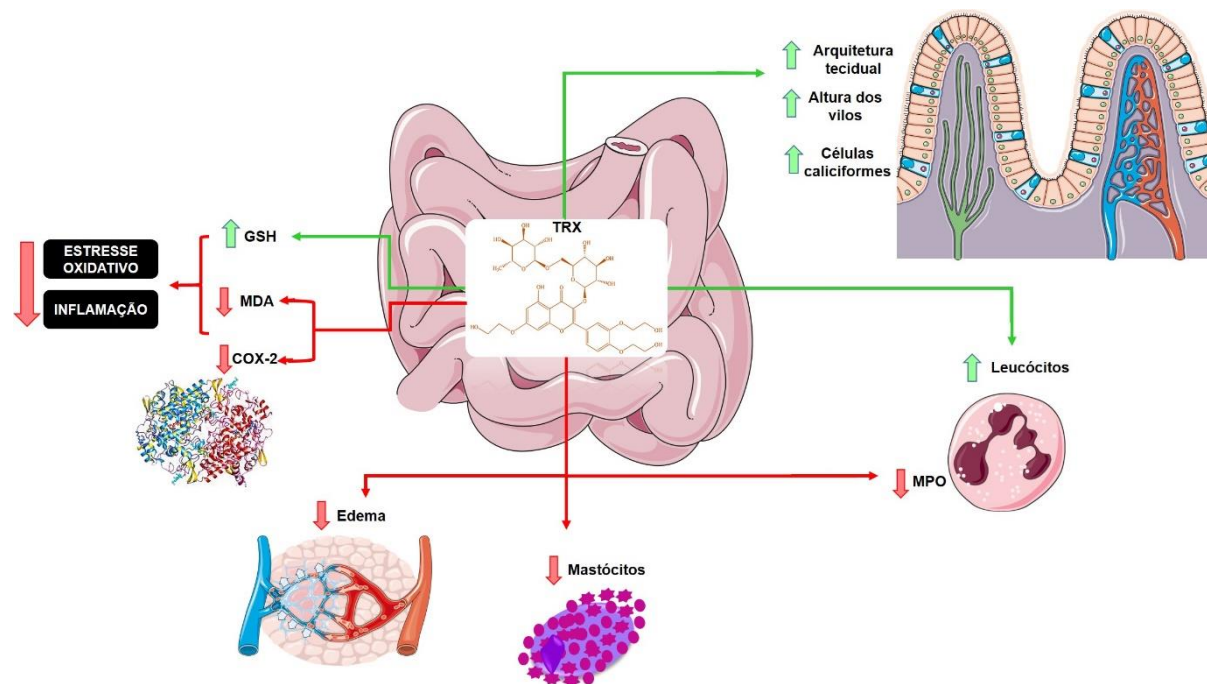
Wang et al. (2017) ao realizar a análise transcriptômica demonstrou que a troxerrutina interfere na expressão de quinze genes, dentre eles três genes com atividade inflamatória e imune (Npy, Fcnb, H2-k1, Pnp2) e dois oxidantes (Hbq1a, Rp-13) foram reprimidos.

Embora a mucosite intestinal não conduza frequentemente à morte, a sintomatologia associada a este grave é por muitos, relatada como desconfortável e dolorosa, prejudicando a ingestão de alimentos e/ou líquidos, culminando em desidratação e desnutrição que podem levar a aumento das internações hospitalares e afetam consideravelmente à qualidade de vida do paciente. Apesar disso, um fármaco eficaz na prevenção e tratamento da mucosite induzida por quimioterápicos não se tem disponível atualmente na prática clínica. Pesquisas envolvendo métodos eficazes para intervir na fisiopatologia da mucosite tem sido realizadas, cabendo destaque para fatores de crescimento, como fator de crescimento de queratinócitos e epidermal, suplementos vitamínicos, glutamina, folato, lipídios (*Lyprinol*) probióticos e

terapias complementares baseadas em plantas, como extrato de alho, extrato de semente de uva e diversos flavonoides (TOLLEY, 2006; KUCHAY, 2016).

Terapias complementares baseadas em plantas e seus derivados, tem sido vista com entusiasmo no meio científico devido resultados promissores na melhorar a sintomas da mucosite intestinal, além da baixa toxicidade e mínimos efeitos colaterais. Com base nisso, a troxerrutina figura como uma promissora droga na terapêutica da mucosite intestinal induzida por quimioterápico, com seu modelo hipotético de ação ilustrado na figura 25.

Figura 26. Modelo hipotético da ação farmacológica de TRX na mucosite intestinal induzida por 5-FU.



No modelo hipotético pode-se evidenciar que TRX reverteu a inflamação intestinal por meio inibição de MDA, MPO, COX-2, ERO, mastocitose e inibiu a leucopenia. TRX também estimulou aumento das vilosidades e aumento dos níveis de GSH, um antioxidante. TRX: Troxerrutina; ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; COX-2: Ciclooxigenase 2; MDA: Malondialdeído; MPO: Mieloperoxidase; GSH: Glutattiona reduzida. Setas verde (estimula/aumenta), setas vermelhas (inibe).

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU pode-se concluir que, o flavonoide troxerrutina na dose de 100 mg/kg previne as alterações morfológicas promovidas pelo quimioterápico no segmento duodenal, evidenciado pela manutenção da arquitetura tecidual, prevenção do encurtamento da altura das criptas, edema e necrose das criptas, além de eficácia na prevenção da mielossupressão (e consequentemente leucopenia) e dano oxidativo por meio da diminuição dos níveis de malondialdeído e aumento dos níveis do agente antioxidante GSH. O TRX também previne a degranulação de mastócitos e neutrófilos, evidenciado pelos níveis de MPO, e preveniu dano ao epitélio intestinal por meio da manutenção em níveis basais de células caliciformes. Por meio da docagem molecular, imunomarcagem para COX-2 e avaliação morfométrica, modulando a via COX-2 na mucosite intestinal, acredita-se que muitos dos efeitos protetores da TRX na mucosite intestinal por 5-FU, deve-se a interação molecular deste flavonoide com a enzima COX-2, bem como citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e NF- κ B, e com isso prevenção das alterações morfológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1394-1398, 2011.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- AHMAD, B. A.; RAO, M. U., MUHAMMAD, A.; ZIN, T.; MOHAMAD, N. H.; MOHAMAD, N.; MOHD, K. S. Reviews of herbal and their secondary metabolites in the treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 08, p. 080-090, 2014.
- AL-ASMARI, A. K.; KHAN, A. Q.; AL-QASIM, A. M.; AL-YOUSEF, Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 908–916, 2015.
- AL-ASMARI, A. K.; KHAN, A. Q.; AL-ASMARI, S. A.; AL-RAWI, A.; AL-OMANI, S. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 377-385, 2016.
- ALDEMIR, M.; KARAGUZEL, E.; OKULU, E.; GUDELOGLU, A.; ENER, K.; OZAYAR, A.; EREL, O. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with renal cell carcinoma. **Central European journal of urology**, v. 68, n. 4, p. 415, 2015.
- ALENCAR, N. M. N.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; DE FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; ARAGÃO, K. S.; RAMOS, M. V. 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). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 312-320, 2017.
- ALVES, M. O.; MAGALHÃES, S. C. M.; COELHO, B. A. A regionalização da saúde e a assistência aos usuários com câncer de mama. **Saude soc.**, v. 26, n. 1, p. 141-154, 2017.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**. v. 106, p. 9 14, 2012.
- ANTHONY, L.; BOWEN, J.; GARDEN, A.; HEWSON, I.; SONIS, S. New thoughts on the pathobiology of regimen-related mucosal injury. **Support Care Cancer**, v. 14, p. 516-18, 2006.
- ARAÚJO, C. V.; LAZZAROTTO, C. R.; AQUINO, C. C.; FIGUEIREDO, I. L.; COSTA, T. B.; DE OLIVEIRA ALVES, L. A.; ORIÁ, R. B. Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 6, p. 493-501, 2015a.
- ARAÚJO, A. A.; BORBA, P. B.; DE SOUZA, F. H. D.; NOGUEIRA, A. C.; SALDANHA, T. S.; ARAÚJO, T. E. F.; DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F. In a methotrexate-induced model of intestinal mucositis, olmesartan reduced inflammation and induced enteropathy characterized

by severe diarrhea, weight loss, and reduced sucrose activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 746-752, 2015b.

ARAÚJO, R. S.; BARROS, A. L. B. Intestinal Mucositis Induced by Chemotherapy: na Ovierview. **Journal of molecular Pharmaceutics e organic process research**, v. 3, n. 3, 2015.

ÁVILA, P. H. M. **Ação da formulação mucoadesiva contendo *Bidens pilosa* L (Asteraceae) sobre a mucosite intestinal induzida por 5- fluorouracil em camundongos**. 71p. 2013. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

AZARFARIN, M.; FARAJDOKHT, F.; BABRI, S.; SALEHPOUR, F.; TAGHIZADEH, M.; MOHADDES, G. Effects of troxerutin on anxiety-and depressive-like behaviors induced by chronic mild stress in adult male rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 2018.

BAHMANI, M.; ZARGARAN, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Identification of medicinal plants of Urmia for treatment of gastrointestinal disorders. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 468-480, 2014.

BALUCHNEJADMOJARAD, T.; JAMALI-RAEUFY, N.; ZABIHNEJAD, S.; RABIEE, N.; ROGHANI, M. Troxerutin exerts neuroprotection in 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of PI3K/ER β signaling. **European journal of pharmacology**, v. 801, p. 72-78, 2017.

BABRI, S.; AMANI, M.; MOHADDES, G.; ALIHEMMATI, A.; EBRAHIMI, H. Protective effects of troxerutin on β -amyloid (1-42)-induced impairments of spatial learning and memory in rats. **Neurophysiology**, v. 44, n. 5, p. 387-393, 2012.

BADALZADEH, R.; LAYEGHZADEH, N.; ALIHEMMATI, A.; MOHAMMADI, M. Beneficial effect of troxerutin on diabetes-induced vascular damages in rat aorta: histopathological alterations and antioxidation mechanism. **International journal of endocrinology and metabolism**, v. 13, n. 2, 2015.

BARBOSA, M. L. L. **Efeito protetor da epiisopiloturina no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos: papel da via NO/COX**. 2019. 127p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal de Piau, Parnaíba, 2019.

BARRETT, K. E. **Fisiologia gastrintestinal**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.
BASTOS, C. C. C. **Efeitos da formulação mucoadesiva de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) e *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) no tratamento da mucosite intestinal**. 2014. 80p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BAYANDOR, P.; FARAJDOKHT, F.; MOHADDES, G.; DIBA, R.; HOSSEINDOOST, M.; MEHRI, K.; BABRI, S. The effect of troxerutin on anxiety-and depressive-like behaviours in the offspring of high-fat diet fed dams. **Archives of physiology and biochemistry**, p. 1-7, 2018.

BAYDAR, M.; DIKILITAS, M.; SEVINC, A.; AYDOGDU, I. Prevention of Oral Mucositis Due to 5-Fluorouracil Treatment with Oral Cryotherapy. **Journal of the national medical association**, v. 97, n. 8, p. 1161-64, 2005.

BENITES, A. C.; NEME, C. M. B.; DOS SANTOS, M. A. Significados da espiritualidade para pacientes com câncer em cuidados paliativos. **Estud. psicol.**, v. 34, n. 2, p. 269-79, 2017.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**, v. 94, p. 329-54, 2014.

BIANCHI, M.; CANAVESI, R.; APRILE, S.; GROSA, G.; DEL GROSSO, E. Troxerutin, a mixture of O-hydroxyethyl derivatives of the natural flavonoid rutin: Chemical stability and analytical aspects. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 150, p. 248-257, 2018.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, I. P. F.; ARAUJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digestive diseases and sciences**, v. 49, n. 1, p. 65-72, 2004.

CAVALCANTE, I. M., DE M. L. L. COSTA; F.; GONZAGA, M. L. C.; RIBEIRO, M. E. Microesferas de quitosana/pluronic® f127 por spray-drying: um novo sistema para encapsulamento da troxerrutina. In: IX Congresso Brasileiro de **Polímeros**, Campina Grande. 2007.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; STEIMBACH, V. M. B.; CAMPOS, A.; KRUEGER, C. D. M. A.; FALONI DE ANDRADE, S. 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. 33, n. 1, p. 90-106, 2019.

CESCATO, V. A. S. **Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral**. 2010. 95p. Tese. Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHANG, C. T.; LIN, H.; LIANG, J. A.; HUANG, H. C.; LI, C. C.; HSIANG, C. Y. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e31808, 2012.

CHEAH, K. Y.; HOWARTH, G. S.; YAZBECK, R.; WRIGHT, T. H.; WHITFORD, E. J.; PAYNE, C.; BASTIAN, S. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-

- induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 4, p. 382-390, 2009.
- CHEN, P.; MANCINI, M.; SONIS, S. T.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J.; LIU, J.; COHEN, E. E.; TOBACK, F. G. A Novel Peptide for Simultaneously Enhanced Treatment of Head and Neck Cancer and Mitigation of Oral Mucositis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1-16, 2016.
- CHEN, X. X.; LAM, K. H.; CHEN, Q. X.; LEUNG, G. P. H.; TANG, S. C. W.; SZE, S. C. W.; ZHANG, Z. J. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 49-61, 2017.
- CIOBANU, L. et al. Rifaximin modulates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 23, p. 4993-5001, 2016.
- CLARK, M. A. et al. Fármacos antiinflamatórios. In: CLARK, M. A. et al. **Farmacologia Ilustrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- COON, D. et al. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. **Journal of endodontics**, v. 33, n. 4, p. 432-436, 2007.
- COSTA, D. V. S. **O Efeito do ácido alfa-lipóico na mucosite intestinal experimental por irinotecano**. 2017. 83p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2017.
- COSTA, D. V. S. et al. 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-Dependent Pathway. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 665, 2019.
- COURBAT, P. et al. Contribution à l'étude d'un produit de β - hydroxyéthylation du rutoside. Partie 1. Isolement et identification des constituants majeurs par chromatographie sur papier. **Helvetica Chimica Acta**, v. 49, n. 3, p. 1203-1211, 1966.
- COURBAT, P. **Process for manufacturing o-beta-hydroxyethyl ethers of rutin**. U.S. Patent n. 3,516,984, 23 jun. 1970.
- DEHNAMAKI, F. et al. Treatment with troxerutin protects against cisplatin-induced kidney injury in mice. **Acta Chirurgica Belgica**, p. 1-7, 2018.
- DERISSEN, E. J. B. et al. Exploring the intracellular pharmacokinetics of the 5-fluorouracil nucleotides during capecitabine treatment. **Br J Clin Pharmacol**, v. 81, p. 949-957, 2016.
- DE WINTER, B. Y. et al. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 66-73, 2012.
- D'HONDT, L. et al. Oral mucositis induced by anticancer treatments: physiopathology and treatments. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 2, p. 159-69, 2006.

- DIBA, R. et al. Protective effects of troxerutin on maternal high-fat diet-induced impairments of spatial memory and apelin in the male offspring. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 7, p. 682-687, 2018.
- DOGAN, Y.; UGULU, I. Medicinal plants used for gastrointestinal disorders in some districts of Izmir province, Turkey. **Studies on Ethno-Medicine**, v. 7, n. 3, p. 149-161, 2013.
- DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis — causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, p. 853-74, 2003.
- ELBELTAGY, M. et al. Fluoxetine improves the memory deficits caused by the chemotherapy agente 5-fluorouracil. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 112–117, 2012a.
- ELBELTAGY, M. et al. The effect of 5-fluorouracil on the long term survival and proliferation of cells in the rat hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 88, p. 514–518, 2012b.
- FAN, S. et al. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 91-96, 2009.
- FARAJDOKHT, F. et al. Troxerutin protects hippocampal neurons against amyloid beta-induced oxidative stress and apoptosis. **EXCLI journal**, v. 16, p. 1081, 2017.
- FERREIRA, J. E. V. et al. Chemometric Study on Molecules with Anticancer Properties. In: Varmuza, K. **Chemometrics in Practical Applications**, InTech, 326p. ISBN: 978-953-51-0438-4, 2012.
- FIJLSTRA, M. et al. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 2, p. G283-G291, 2011.
- FOCAC CETTI, C. et al. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. **PLOS ONE**, p. 1-25, 2015.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2011.
- FURST, D. E. et al. Fármacos anti-inflamatórios não-esteroides, fármacos antirreumáticos modificadores da doença, analgésicos não opioides e fármacos usados na gota. In: KATZUNG, B. G. et al. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.
- GALDINO, F. M. P. et al. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 485-492, 2018.

- GANDHI, J. et al. Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 538, 2017
- GAO, Y. et al. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- κ B/iNOS signaling pathways. **Journal of pineal research**, v. 62, n. 2, 2016.
- GAUTAM, R. et al. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 99, 2016.
- GAWISH, S.; OMAR, N.; SARHAN, N. Histological and ultrastructural study of 5-fluorouracil induced small intestinal mucosal damage in rats. **Asian J Cell Biol**, v. 8, n. 1, p. 1-21, 2013.
- GEETHA, R; PRIYA, C.S.; ANURADHA, C. V. Troxerutin attenuates diet-induced oxidative stress, impairment of mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in mice heart. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 1, p. 103-113, 2017.
- GEETHA, R.; PRIYA, C. S.; ANURADHA, C. V. Troxerutin abrogates mitochondrial oxidative stress and myocardial apoptosis in mice fed calorie-rich diet. **Chemico-biological interactions**, v. 278, p. 74-83, 2017.
- GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, p. 1, 2018.
- GENEROSO, S. V.; RODRIGUES, N. M.; TRINDADE, L. M.; PAIVA, N. C.; CARDOSO, V. N.; CARNEIRO, C. M.; MAIOLI, T. U. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 54, 2015.
- GERHARD, D.; SOUSA, F. J. D. S. S.; ANDRAUS, R. A. C.; PARDO, P. E.; NAI, G. A.; NETO, H. B.; MAIA, L. P. Probiotic therapy reduces inflammation and improves intestinal morphology in rats with induced oral mucositis. **Brazilian oral research**, v. 31, 2017.
- GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; KEEFE, D. M. K. Technological advances in mucositis research: new insights and new issues. **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 5, p. 476-482, 2008.
- GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 1-5, 1996.
- GOODSELL, D. S. **Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock**, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GUABIRABA, R. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumour chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1079-93, 2014.

GUI, Y.; LI, A.; CHEN, F.; ZHOU, H.; TANG, Y.; CHEN, L.; DUAN, S. Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, v. 769, p. 234-241, 2015.

GULGUN, M.; ERDEM, O.; OZTAS, E.; KESIK, V.; BALAMTEKIN, N.; VURUCU, S.; KOSEOGLU, V. Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 2, p. 109-115, 2010.

HADDOCK, E. S.; COHEN, P. R. 5-Fluorouracil-induced exacerbation of rosácea. **Dermatology Online Journal**, v. 22, n. 11, 2016.

HAYAT, M.; ABBAS, M.; MUNIR, F.; HAYAT, M. Q.; KEYANI, R.; AMIR, R. Potential of plant flavonoids in pharmaceuticals and nutraceuticals. **Journal of Biomolecules and Biochemistry**, v. 1, n. 1, 2017.

HARRIS, D. J. Cancer treatment-induced mucositis pain: strategies for assessment and management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 251-8, 2006.

HIGUCHI, M. **Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress**. In: *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. 2014. p. 181-199.

HOSKINS, J.; BUTLER, J. S. Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5 fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, p. 861–870, 2007.

HUANG, J.; WANG, X. J.; YU, D.; JIN, Y. N.; ZHEN, L. Z.; XU, N.; HE, J. The effect of palonosetron hydrochloride in the prevention of chemotherapy-induced moderate and severe nausea and vomiting. **Experimental and therapeutic medicine**, v.5, n.5, p.1418–26, 2013.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 11, p. 1349-53, 1981.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Estimativa do câncer no Brasil em 2018**. Acesso em: 10 de Abril de 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.

ITO, K.; MITSUNAGA, M.; ARIHIRO, S.; SARUTA, M.; MATSUOKA, M.; KOBAYASHI, H.; TAJIRI, H. Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms. **BMC Cancer**, v. 16, n. 37, 2016.

JACQUES, F. **Process of preparation of a tri-(hydroxyethyl) ether of rutin**. U.S. Patent n. 2,975,168, 14 mar. 1961

JOHNSON, J. L.; HONG, H.; MONFREGOLA, J.; CATZ, S. D. Increased Survival and Reduced Neutrophil Infiltration of the Liver in Rab27a- but Not Munc13-4-Deficient Mice in Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3607-18, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALITA, B.; RANJAN, R.; SINGH, A.; YASHAVARDDHAN, M. H.; BAJAJ, S.; GUPTA, M. L. A combination of podophyllotoxin and rutin attenuates radiation induced gastrointestinal injury by negatively regulating NF- κ B/p53 signaling in lethally irradiated mice. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168525, 2016.

KART, A.; KOC, E.; DALGINLI, K. Y.; GULMEZ, C.; SERTCELIK, M.; ATAKISI, O. The Therapeutic Role of Glutathione in Oxidative Stress and Oxidative DNA Damage Caused by Hexavalent Chromium. **Biol Trace Elem Res**, 2016.

KADIOGLU, O.; NASS, J.; SAEED, M. E.; SCHULER, B.; EFFERTH, T. Kaempferol is an anti-inflammatory compound with activity towards NF- κ B pathway proteins. **Anticancer research**, v. 35, n. 5, p. 2645-2650, 2015.

KAYE, S. B. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. **British Journal of Cancer**, v. 78, n. 3, p. 1-7, 1998.

KAWASHIMA, R.; FUJIMAKI, M.; IKENOUE, Y.; DANJO, K.; KOIZUMI, W.; ICHIKAWA, T. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon. **Support Care Cancer**, 2015a.

KAWASHIMA, R.; Kawakami, F.; Maekawa, T.; Yamamoto, H.; Koizumi, W.; Ichikawa, T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, p. 269–277, 2015b.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, p. 323–27, 2007.

KHALILI, J.; BILOKLYTSKA, H. F. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. **Oral diseases**, v. 14, n. 8, p. 754-760, 2008.

KHEIROLLAHI, A.; ABBASZADEH, A.; ANBARI, K.; ROSTAMI, B.; AHANGARI, A.; HASANVAND, A.; GHOLAMI, M. Troxerutin protect sperm, seminiferous epithelium and pituitary-gonadal axis from torsion-detorsion injury: An experimental study. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 16, n. 5, p. 315, 2018.

KIM, H. J.; KIM, J. H.; MOON, W.; PARK, J.; PARK, S. J.; AM SONG, G.; LEE, J. H. Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 179-183, 2015.

KINDZELSKII, A. L.; CLARK, A. J.; ESPINOZA, J.; MAEDA, N.; ARATANI, Y.; ROMERO, R.; PETTY, H. R. Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. **European journal of immunology**, v. 36, n. 6, p. 1619-1628, 2006.

KISSOW, H. Glucagon-like peptides 1 and 2: intestinal hormones implicated in the pathophysiology of mucositis. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 9, n. 2, p.196-202, 2015.

- KOBUCHI, S.; ITO, Y.; SAKAEDA, T. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 2016.
- KUCHAY, R. A. H. A review of complementary therapies for chemotherapy induced gastrointestinal mucositis. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 292-299, 2016.
- KUMAR, S. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 415–420, 2010.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9ed, Elsevier: Rio de Janeiro, 928 p. 2013.
- LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2006.
- LALLA, R. V.; FLIEDNER, M. C.; SMIET, A. C. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. **Dent Clin North Am**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 2008.
- LALLA, R. V.; PILBEAM, C. C.; WALSH, S. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M.; PETERSON, D. E. Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. **Supportive Care in Cancer**, v. 18, n. 1, p. 95, 2010.
- LIU, X.; XIE, T.; MAO, X.; XUE, L.; CHU, X.; CHEN, L. MicroRNA-149 Increases the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-Fluorouracil by Targeting Forkhead Box Transcription Factor FOXM1. **Cell Physiol Biochem**, v. 39, p. 617-629, 2016.
- LIM, K. M.; AN, S.; LEE, O. K.; LEE, M. J.; LEE, J. P.; LEE, K. S.; BAE, S. Analysis of changes in microRNA expression profiles in response to the troxerutin-mediated antioxidant effect in human dermal papilla cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 2650-2660, 2015.
- LIMA, F. R. F. **Bacillus clausii atenua a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos**. 2018. 104p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2018.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews-cancer**, v. 3, p. 330-8, 2003.
- LU, J.; WU, D. M.; ZHENG, Y. L.; HU, B.; CHENG, W.; ZHANG, Z. F.; LI, M. Q. Troxerutin counteracts domoic acid–induced memory deficits in mice by inhibiting CCAAT/enhancer binding protein β –mediated inflammatory response and oxidative stress. **The Journal of Immunology**, p. 1202862, 2013.
- MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-150, 1978.
- MCCARTHY, G. M.; AWDE, J. D.; GHANDI, H.; VINCENT, M.; KOCHA, W. I. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. **Oral Oncology**, v. 34, p. 484- 90, 1998.

MEIROVITZ, A.; KUTEN, M.; BILLAN, S.; ABDAH-BORTNYAK, R.; SHARON, A.; PERETZ, T.; BARAK, V. Cytokines levels, Severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer - a prospective pilot study. **Radiation Oncology**, v. 5, n. 16, p. 1-7, 2010.

MELO, I. T. V.; PINTO FILHO, W. A. Dor do câncer. In: ALVES NETO, O. et al. **Dor: Princípios e prática**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MERCADANTE, S.; AIELLI, F.; ADILE, C.; FERRERA, P.; VALLE, A.; FUSCO, F.; VALENTI, M. Prevalence of oral mucositis, dry mouth, and dysphagia in advanced cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 23, p. 3249–55, 2015.

MENEZES-GARCIA, Z.; ARIFA, R. D. N.; FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G. Mechanisms Underlying Chemotherapy-Associated Mucositis: The Role of Inflammatory Mediators and Potential Therapeutic Targets. **EMJ Gastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 82-91, 2018.

MICHALANY, J. **Técnica histológico los anatomia patológica**: Com instruções para o cirurgião, enfermeiro, citotécnico. 3 ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda. 2008. P. 153-5.

MINGHETTI, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 63, n. 9, p. 901-910, 2004.

MINHAS, M. U.; AHMAD, M.; KHAN, S.; ALI, L.; SOHAIL, M. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin hydrogels: crosslinked polymeric network for targeted delivery of 5-fluorouracil. **Cellulose Chem. Technol**, v. 50, n. 2, p. 233-242, 2016.

MIRANDA, J. A. L.; BARRETO, J. E. F.; MARTINS, D. S.; DE SOUZA PIMENTEL, P. V.; DA SILVA COSTA, D. V.; SILVA, R. R.; DA SILVA, D. A.; MEDEIROS, J. V. R.; BRITO, G. A. C.; CERQUEIRA, G. S. Protective Effect of Cashew Gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 51, 2019.

MURI, E. M.; Sposito, M. M. M.; Metsavaht, L. Pharmacology of vasoactive drugs. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 1, p. 22-27, 2010.

MOKHTARI, B.; BADALZADEH, R.; ALIHEMMATI, A.; MOHAMMADI, M. Phosphorylation of GSK-3 β and reduction of apoptosis as targets of troxerutin effect on reperfusion injury of diabetic myocardium. **European journal of pharmacology**, v. 765, p. 316-321, 2015.

MONEIM, A. E. A.; GUERRA-LIBRERO, A.; FLORIDO, J.; SHEN, Y. Q.; FERNÁNDEZ-GIL, B.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G. Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, n. 1003, p. 1-20, 2017.

MONTSEIRÍN, J.; BONILLA, I.; CAMACHO, J.; CONDE, J.; SOBRINO, F. Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: The effect of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, v.107, p. 623-6, 2001.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. **Using AutoDock for ligand-receptor docking**,

in: Curr. Protoc. Bioinforma., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, Â.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979-1012, 2009.

MOURA, R.; WADA, C.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. **Studies of the figurative elements of blood**, 3^a ed.; Atheneu, Ed. São Paulo, 1998.

NARASIMHA, A. J.; WATANABE, J.; ISHIKAWA, T. O.; PRICEMAN, S. J.; WU, L.; HERSCHMAN, H. R.; REDDY, S. T. Absence of myeloid COX-2 attenuates acute inflammation but does not influence development of atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 2, p. 260-268, 2010.

NASCIMENTO JUNIOR, B.J. **Avaliação do efeito do monoterpeno borneol sob mucosite oral induzida por 5-fluorouracil e desenvolvimento de forma farmacêutica para uso odontológico**. 2017. 120p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

NASCIUTTI, L. E.; NARCISO, M. S.; LIMA, A. V. P.; DUARTE, A. S. G.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B. Histologia do tubo digestório. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

NGEOW, W. C.; CHAI, W. L.; ZAIN, R. B. Management of radiation therapy-induced mucositis in head and neck cancer patients. Part II: supportive treatments. **Oncology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 164-182, 2008.

NOBRE, L. M. S. **Abatacept agrava a mucosite intestinal induzida por Irinotecano em camundongos**. 2017. 79p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2017.

NOGUEIRA, L. T.; COSTA, D. V.; GOMES, A. S.; MARTINS, C. S.; SILVA, A. M.; COELHO-AGUIAR, J. M.; BRITO, G. A. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 79, 1-13, 2017.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PADHYE, S.; BANERJEE, S.; CHAVAN, D.; PANDYE, S.; SWAMY, K. V.; ALI, S.; SARKAR, F. H. Fluorocurcumins as cyclooxygenase-2 inhibitor: molecular docking, pharmacokinetics and tissue distribution in mice. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 11, p. 2438-2445, 2009.

PANAT, N. A.; SINGH, B. G.; MAURYA, D. K.; SANDUR, S. K.; GHASKADBI, S. S.

Troloxerutin, a natural flavonoid binds to DNA minor groove and enhances cancer cell killing in response to radiation. **Chemico-biological interactions**, v. 251, p. 34-44, 2016.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, 2016.

PANGENI, R.; CHOI, S. W.; JEON, O. C.; BYUN, Y.; PARK, J. W. Multiple nanoemulsion system for an oral combinational delivery of oxaliplatin and 5-fluorouracil: preparation and in vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6379–6399, 2016.

PAPAYANNOPOULOS, V.; METZLER, K. D.; HAKKIM, A.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J. Cell Biol**, v. 191, n. 3, p. 677-91, 2010.

PENG, X.; LI, J.; TAN, S.; XU, M.; TAO, J.; JIANG, J.; WU, B. COX-1/PGE 2/EP4 alleviates mucosal injury by upregulating β -arr1-mediated Akt signaling in colitis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1055, 2017.

PEREIRA, V. B. M. **Novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-Fluoruracil em camundongos C57BL/6**. 2013. 104p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2013.

PETERS, G. J.; BACKUS, H. H. J.; FREEMANTLE, S.; VAN TRIEST, B.; CODACCI-PISANELLI, G.; VAN DER WILT, C. L.; MCLEOD, H. L. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1587 p. 194–205, 2002.

PETERSON, D. E. Oral and Gastrointestinal mucositis: novel insight into pathophysiology and potential therapies. **Advanced Studies in Medicine**, v. 5, n. 4b, p. 299-310, 2005.

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

PILLAI, S.; ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier, 7. Ed. Brasil, 2015.

PINHO, A. P.; Misorelli, J. C.; Longato, S. E. Mucosite no paciente em tratamento de câncer. **Science in Health**, v. 1, n. 3, p. 145-60, 2010.

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

RAGHAVAN, S.; SUBRAMANIYAM, G.; SHANMUGAM, N. Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 5, p. 1055-1067, 2012.

RAJINIKANTH, P. S.; CHELLIAN, J. Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil. **International Journal of**

Nanomedicine, v. 11, p. 5067–5077, 2016.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, p. 4013-4024, 2012.

RAMSAY, D. B.; Stephen, S.; Borum, M.; Voltaggio, L.; Doman, D. B. Mast Cells in Gastrointestinal Disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 12, p. 772-777, 2010.

RANGEL, G. F. P. **Efeito de proteases isoladas da fração Ipii do látex de *Calotropis procera* na prevenção da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. 2019. 96p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2019.

REINKE, D.; Kritas, S.; Polychronopoulos, P.; Skaltsounis, A. L.; Aligiannis, N.; Tran, C. D. Herbal Substance, Acteoside, Alleviates Intestinal Mucositis in Mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 1, p. 1-9, 2015.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

ROKAYA, MAAN B.; UPRETY, Y.; POUDEL, R. C.; TIMSINA, B.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; ASSELIN, H.; SIGDEL, S. R. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **Journal of ethnopharmacology**, v. 158, p. 221-229, 2014.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S29-S34, 2009.

RUIZ-CRUZ, S.; CHAPARRO-HERNÁNDEZ, S.C.; HERNÁNDEZ-RUIZ, K. L. Flavonoids: Important Biocompounds. In: JUSTINO, G. C. **Food: Flavonoids**, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/67864. Acesso em: <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/flavonoids-important-biocompounds-in-food>.

RYMASZEWSKI, A. L.; TATE, E.; YIMBESALU, J.; GELMAN, A.; JARZEMBOWSKI, J.; ZHANG, H.; VIKIS, H. The Role of Neutrophil Myeloperoxidase in Models of Lung Tumor Development. **Cancers**, v. 6, p. 1111-27, 2014.

SANGEETHA, K.S S.; UMAMAHESWARI, S.; REDDY, C. U. M.; KALKURA, S. N. Flavonoids: Therapeutic potential of natural pharmacological agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 10, p. 3924, 2016.

SANO, T.; UTSUMI, D.; AMAGASE, K.; MATSUMOTO, K.; TOMINAGA, M.; HIGUCHI, K.; TAKEUCHI, T.; KATO, T. Lafutidine, a histamine h2 receptor antagonist with mucosal protective properties, attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice through activation of extrinsic primary afferent neurons. **Journal of physiology and pharmacology**. Kyoto, v. 68, n.1, p.79-90, 2017.

SANTOS, P. S. D. S.; MESSAGGI, A. C.; MANTESSO, A.; DE MAGALHÃES, M. H. C. G. Mucosite oral: perspectivas atuais na prevenção e tratamento. **RGO**, Porto Alegre, v. 57, n. 3,

p. 339-44, 2009.

SASU, A.; HERMAN, H.; MARIASIU, T.; ROSU, M.; BALTA, C.; ANGHEL, N.; HERMENEAN, A. Protective effects of silymarin on epirubicin-induced mucosal barrier injury of the gastrointestinal tract. **Drug and chemical toxicology**, v. 38, n. 4, p. 442-451, 2015.

SCALLON, C.; BELL-SYER, S. E. M.; AZIZ, Z. Flavonoids for treating venous leg ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, 2013.

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

SHAN, Q.; ZHUANG, J.; ZHENG, G.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LU, J.; ZHENG, Y. Troxerutin Reduces Kidney Damage against BDE-47-Induced Apoptosis via Inhibiting NOX2 Activity and Increasing Nrf2 Activity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

SHAN, Q.; ZHENG, G. H.; HAN, X. R.; WEN, X.; WANG, S.; LI, M. Q.; ZHENG, Y. L. Troxerutin Protects Kidney Tissue against BDE-47-Induced Inflammatory Damage through CXCR4-TXNIP/NLRP3 Signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

SHU, L.; ZHANG, W.; HUANG, C.; HUANG, G.; SU, G. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Pi3k/Akt pathway in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1939-1948, 2017.

SILVA, L. C. A. **Desenvolvimentos de novos agentes antiinflamatórios 5-Benzilideno-3-metil-sulfonil-benzil-2-tioxo-imidazolodina-4-ona**. 2011. 101p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SOARES, P. M.; MOTA, J. M. S.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SOUZA, M. H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.

SOARES, P. M.; MOTA, J. M. S.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46-49, 2013.

SONG, M.K.; PARK, M.Y.; SUNG, M.K. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. **Journal of cancer prevention**, v. 18, n. 4, p. 322, 2013.

SONIS, S. T. A Biological Approach to Mucositis. **J Support Oncol**, v. 2, n. 1, p. 21-36, 2004.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury. **Supplement to cancer**, v. 100, n. 9, p. 1995-2025, 2004.

SONIS, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral oncology**, v. 45, n. 12, p. 1015-1020, 2009.

SUBASTRI, A.; HARIKRISHNA, K.; SURESHKUMAR, M.; ALSHAMMARI, G. M.; ARISTATILE, B.; THIRUNAVUKKARASU, C. Effect of troxerutin on 2-aminoanthracene and DNA interaction and its anti-mutagenic property. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 325-334, 2017b.

SUZUKI, N.; NAKAGAWA, F.; MATSUOKA, K.; TAKECHI, T. Effect of a novel oral chemotherapeutic agent containing a combination of trifluridine, tipiracil and the novel triple angiokinase inhibitor nintedanib, on human colorectal cancer xenografts. **Oncology reports**, v. 36, 3123-30, 2016.

THEOHARIDES, T. C.; ALYSANDRATOS, K. D.; ANGELIDOU, A.; DELIVANIS, D. A.; SISMANOPOULOS, N.; ZHANG, B.; KALOGEROMITROS, D. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, p. 21–33, 2012.

THOMAS, S. A.; TOMEH, N.; THEARD, S. Fluorouracil-induced Hyperammonemia in a Patient with Colorectal Cancer. **Anticancer research**, v. 35, p. 6761-64, 2015.

THOMAS, N. S.; GEORGE, K.; ARIVALAGAN, S.; MANI, V.; SIDDIQUE, A. I.; NAMASIVAYAM, N. The in vivo antineoplastic and therapeutic efficacy of troxerutin on rat preneoplastic liver: biochemical, histological and cellular aspects. **European journal of nutrition**, v. 56, n. 7, p. 2353-2366, 2016.

THOMAS, N. S.; GEORGE, K.; SELVAM, A. A. A. Troxerutin subdues hepatic tumorigenesis via disrupting the MDM2–p53 interaction. **Food & function**, v. 9, n. 10, p. 5336-5349, 2018.

THORN, C. F.; MARSH, S.; CARRILLO, M. W.; MCLEOD, H. L.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 4, p. 237–242, 2011.

TOOLEY, K. L. **Detection of small intestinal mucositis utilising the non-invasive 13C-Sucrose Breath test**. 2006. These. Program de Pós-graduate of Philosophy. Centro de Gastroenterology Pediatric and Adolescencet. University of Adelaide. Australia. 267p. 2006.

TOPAL, I.; AKBULUT, U. E.; CIMEN, O.; KOLKIRAN, A.; AKTURAN, S.; CIMEN, F. K.; BILGIN, A. O. Effect of Rutin on Cisplatin-induced Small Intestine (jejunum) Damage in Rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 8, p. 1136-1144, 2018.

TREUTING, P. M.; VALASEK, M. A.; DINTZIS, S. M. Cap. 11: **Upper Gastrointestinal Tract**. Comparative Anatomy and Histology a Mouse and Human Atlas. 1 ed. Elsevier, New York, USA, 2012.

TRUCCI, V. M. Current strategies for the management of oral mucositis induced by radiotherapy or chemotherapy. **Rev. odonto ciênc**, v. 24, n. 3, p. 309-14, 2009.

TURNER, J. R. O Trato Gastrointestinal. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

UDOFOT, O.; AFFRAM, K.; BRIDG'ETTE ISRAEL, E. A. Cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines. **Integr Cancer Sci Therap**, v. 2, n. 5, p. 245-252, 2015.

VANSCHIEDT, W.; RABE, E.; NASER-HIJAZI, B.; RAMELET, A. A.; PARTSCH, H.; DIEHM, C.; GOTZ, V. The efficacy and safety of a coumarin-/troxerutin combination (SB-LOT) in patients with chronic venous insufficiency: A double blind placebo controlled randomised study. **Vasa**, v. 31, n. 3, p. 185-190, 2002.

VARDI, N.; PARLAKPINAR, H.; OZTURK, F.; ATES, B.; GUL, M.; CETIN, A.; OTLU, A. Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate induced intestinal oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3015-3022, 2008.

DA SILVEIRA VASCONCELOS, M.; GOMES-ROCHETTE, N. F.; DE OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; MAIA DE SOUSA, F. Y.; DE MELO, D. F. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 12, p. 1648-1655, 2015.

VINOTHKUMAR, R.; KUMAR, R. V.; KARTHIKKUMAR, V.; VISWANATHAN, P.; KABALIMOORTHY, J.; & NALINI, N. Oral supplementation with troxerutin (trihydroxyethylrutin), modulates lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 174-184, 2014.

XU, G. Y.; TANG, X. J. Troxerutin (TXN) potentiated 5-Fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF- κ B and Bcl-2 signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 95-107, 2017.

XU, P.; ZHANG, W. B.; CAI, X. H.; QIU, P. Y.; HAO, M. H.; LU, D. D. Activating AKT to inhibit JNK by troxerutin antagonizes radiation-induced PTEN activation. **European journal of pharmacology**, v. 795, p. 66-74, 2017b.

YANG, X.; XU, W.; HUANG, K.; ZHANG, B., WANG, H.; ZHANG, X.; HE, X. Precision toxicology shows that troxerutin alleviates ochratoxin A-induced renal lipotoxicity. **The FASEB Journal**, p. fj. 201800742R, 2019.

YEOH, A. S.; GIBSON, R. J.; YEOH, E. E.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; GIAM, K. A.; KEEFE, D. M.. A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor- κ B, COX-1, and COX-2. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 8, p. 2319-2327, 2007.

YU, Y.; ZHENG, G. Troxerutin protects against diabetic cardiomyopathy through NF- κ B/AKT/IRS1 in a rat model of type 2 diabetes. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 6, p. 3473-3478, 2017.

ZAMANIAN, M.; HAJIZADEH, M. R.; ESMAEILI NADIMI, A.; SHAMSIZADEH, A.; ALLAHTAVAKOLI, M. Antifatigue effects of troxerutin on exercise endurance capacity, oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 levels in trained male rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 447-455, 2017.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S. J.; CHEN, W. S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008.

ZHANG, Z. F.; FAN, S. H.; ZHENG, Y. L.; LU, J.; WU, D. M.; SHAN, Q.; HU, B. Troxerutin improves hepatic lipid homeostasis by restoring NAD⁺ depletion-mediated dysfunction of lipin 1 signaling in high-fat diet-treated mice. **Biochemical pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 74-86, 2014.

ZHANG, Z.; WANG, X.; ZHENG, G.; SHAN, Q.; LU, J.; FAN, S.; SUI, J. Troxerutin attenuates enhancement of hepatic gluconeogenesis by inhibiting NOD activation-mediated inflammation in high-fat diet-treated mice. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 31, 2017.

ZUO, T.; LI, X.; CHANG, Y.; DUAN, G.; YU, L.; ZHENG, R.; TANG, Q. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* and its enzymatically degraded fragments could prevent intestinal mucositis induced by chemotherapy in mice. **Food Funct**, v. 6, p. 415-422, 2015.

WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 100, sup. 1, p. 5-9, 2005.

WANG, Y.; WEI, S.; CHEN, L.; PEI, J.; WU, H.; PEI, Y.; WANG, D. Transcriptomic analysis of gene expression in mice treated with troxerutin. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0188261, 2017.

WENANDE, E.; OLESEN, U. H.; NIELSEN, M. M.; JANFELT, C.; HANSEN, S. H.; ANDERSON, R. R.; HAEDERSDAL, M.. Fractional laser-assisted topical delivery leads to enhanced, accelerated and deeper cutaneous 5- fluorouracil uptake. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2016.

WILHELM, M.; MUELLER, L.; MILLER, M. C.; LINK, K.; HOLDENRIEDER, S.; BERTSCH, T.; BIRKMANN, J. Prospective, Multicenter Study of 5-Fluorouracil Therapeutic Drug Monitoring in Metastatic Colorectal Cancer Treated in Routine Clinical Practice. **Clinical Colorectal Cancer**, v., p. 1-7, 2016.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; BORGES, V. F.; WANDERLEY, C. W.; BEM, A. X.; CUNHA, T. M. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139985, 2015.

APÊNDICE A – LISTA DE REAGENTES

| Fármacos | Fabricante |
|---|---------------|
| 5-FU | Eurofarma |
| Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin ®) | Syntec |
| Xilazina 2% (Calmin®) | Agener União |
| Hematoxilina e Eosina | Sigma Aldrich |
| Líquido de Turk | NewProv |
| Ácido tiobarbitúrico – TBARS | Sigma Aldrich |
| 1,1,3,3-tetraetoxipropane | Sigma Aldrich |
| Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) | Sigma Aldrich |
| Azul de toluidina | Meta química |
| Ácido Periódico Schiif (PAS) | EasyPath |
| Solução de H ₂ O ₂ a 3% | Abcam |
| Goat anti- COX-2 | Abcam |
| Complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) | Sigma Aldrich |
| Cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB, DAKO®) | Sigma Aldrich |

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA/UFC



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TROXERRUTINA NO TRATAMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL", protocolada sob o CEUA nº 2413051018 (ID 000634), sob a responsabilidade de **Gilberto Santos Cerqueira e equipe; Joao Antonio Leal de Miranda** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/11/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF TROXERRUTIN IN THE TREATMENT OF INTESTINAL INDUCED MUCOSITE BY 5-FLUOROURACIL", utilizing 42 Heterogenics mice (42 males), protocol number CEUA 2413051018 (ID 000634), under the responsibility of **Gilberto Santos Cerqueira and team; Joao Antonio Leal de Miranda** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 11/20/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [12/2020](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [3 a 5 semanas](#)

N: [42](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: [Biotério do Departamento de Morfologia UFC](#)

Fortaleza, 20 de novembro de 2018

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO B - ARTIGOS E RESUMOS PUBLICADOS



Article

Protective Effect of Cashew Gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil- Induced Intestinal Mucositis

João Antônio Leal de Miranda ^{1,2,*}, João Erivan Façanha Barreto ¹, Dainesy Santos Martins ¹, Paulo Vitor de Souza Pimentel ¹, Deiziane Viana da Silva Costa ¹, Reyca Rodrigues e Silva ², Luan Kelves Miranda de Souza ², Camila Nayane de Carvalho Lima ³, Jefferson Almeida Rocha ⁴, Ana Paula Fragoso de Freitas ¹, Durcilene Alves da Silva ², Ariel Gustavo Scafuri ¹, Renata Ferreira de Carvalho Leitão ¹, Gerly Anne de Castro Brito ¹, Jand Venes Rolim Medeiros ² and Gilberto Santos Cerqueira ^{1,2}

¹ Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, s/n Delmiro de Farias Street, Porangabaçu Campus, 60416-030 Fortaleza, Brazil; joaoantonio@ufpi.edu.br (J.A.L.M.); erivanfacanha@yahoo.com.br (J.E.F.B); dainy.santos@gmail.com (D.S.M.); paulo_vitordeSouza@hotmail.com (P.V.S.P); deiziane2009@gmail.com (D.V.S.C.); paulinhaff2@hotmail.com (A.P.F.F); urologia@gmail.com (A.G.S); leitao_renata@yahoo.com.br (R.F.C.L); gerlybrito@hotmail.com; (G.A.C.B.)

² Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Federal University of Piauí, Parnaíba, 64202-020 Piauí, Brazil; reyka_14@hotmail.com (R.R.S.); luankelves11@gmail.com (L.K.M.S.); jandvenes@ufpi.edu.br (J.V.R.M); durcileneas@yahoo.com.br (D.A.S.)

³ Nucleus of Research and Development of Medications (NPDM), Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo Street, 100, 60430-275 Fortaleza, Brazil; camilacarvalhoenf@yahoo.com.br

⁴ Research Group in Natural Sciences and Biotechnology, Federal University of Maranhão, s/n Avenue Aurila Maria Santos Barros de Sousa, Frei Alberto Beretta, 65940-000 Grajaú-MA, Brazil; jeffersonkalel@hotmail.com

* Correspondence: joaoantonio@ufpi.edu.br; Tel.: +55-85-3366-8492

Received: 31 December 2018; Accepted: 15 March 2019; Published: 3 April 2019

Abstract: Intestinal mucositis is a common complication associated with 5-fluorouracil (5-FU), a chemotherapeutic agent used for cancer treatment. Cashew gum (CG) has been reported as a potent anti-inflammatory agent. In the present study, we aimed to evaluate the effect of CG extracted from the exudate of *Anacardium occidentale* L. on experimental intestinal mucositis induced by 5-FU. Swiss mice were randomly divided into seven groups: Saline, 5-FU, CG 30, CG 60, CG 90, Celecoxib (CLX), and CLX + CG 90 groups. The weight of mice was measured daily. After treatment, the animals were euthanized and segments of the small intestine were collected to evaluate histopathological alterations (morphometric analysis), levels of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), and glutathione (GSH), and immunohistochemical analysis of interleukin 1 beta (IL-1 β) and cyclooxygenase-2 (COX-2). 5-FU induced intense weight loss and reduction in villus height compared to the saline group. CG 90 prevented 5-FU-induced histopathological changes and decreased oxidative stress through decrease of MDA levels and increase of GSH concentration. CG attenuated inflammatory process by decreasing MPO activity, intestinal mastocytosis, and COX-2 expression. Our findings suggest that CG at a concentration of 90 mg/kg reverses the effects of 5-FU-induced intestinal mucositis.

Keywords: intestinal mucositis; heteropolysaccharide; 5-fluorouracil; inflammation

Anatomy

Cashew gum protects the intestinal mucosa from morphological changes promoted by the aggression of 5-Fluorouracil

Gilberto Santos Cerqueira, Luzia Kalyne Almeida Santos Moreira Leal, Paulo Vitor Santos de Souza Pimentel, Luan Kelves Miranda de Santos Souza, ... [Show all Authors](#)

Published Online: 1 Apr 2019 Abstract Number: 767.33

Abstract

Intestinal mucositis is a frequent complication in the treatment of cancer with the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU). So far there is still no effective treatment of this condition. Cashew gum (CG) has been reported as a potent anti-inflammatory. The present study aimed to evaluate the effect of Cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in Swiss mice. The mice (25–30g) were secreted into 5 groups (n = 6): Saline group (NaCl 0.9%), 5-FU group, CG group (90mg/kg CG, vo), CLX group (Celecoxib ip), CLX + CG group (Celecoxib ip, 90mg/kg GC). All animals except Saline group received 5-FU at the concentration of 450mg/kg in the first experimental protocol. Duodenal portions were removed for evaluation of mucositis by histopathological and immunohistochemical analysis for cyclooxygenase-2 (COX-2). The results of the histopathological analysis demonstrated that 5-FU promoted structural alterations of the intestinal mucosa, evidenced by the reduction of villi height, deepening of the crypts, and intense inflammatory infiltrate, in comparison to the Salina group, characterized by the integrity of the villi and crypts and absence of inflammatory infiltrate. CG animals showed a significant reversal of the effects promoted by antineoplastic in the villi, crypts and inflammatory cells infiltration in comparison to the 5-FU group. CLX group, as well as CLX + GC, were able to significantly prevent (p <0.05) destruction of crypts, shortening of villi with cellular vacuolization, and inflammatory infiltrate. Regarding the immunoblotting for expression of COX-2, it can be observed that the saline group showed subtle immunostaining when compared to the 5-FU group (p <0.05), in which intense and generalized immunostaining was observed. In the CG, CLX and CLX + CG groups, there was a decrease in the immunostaining when compared to the 5-FU lesion group. In addition, the amount of COX-2-immunolabelled cells in the CLX + CG group was lower than the CG treated group. It is concluded that CG prevented the intestinal mucosa promoted by the 5-FU antineoplastic, in addition to decreasing the expression of the COX-2 enzyme, an important element in the onset and exacerbation of inflammation.

Support or Funding Information

This study received funding of CNPQ and CAPES

This abstract is from the Experimental Biology 2019 Meeting. There is no full text article associated with this abstract published in *The FASEB Journal*.

**Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Encontros Universitários 2018**

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 'EFEITO DA GOMA DO CAJUEIRO (ANACARDIUM OCCIDENTALE L.) NO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR 5-FU NA MUCOSITE INTESTINAL' do(s) autor(es) JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA e PAULO VITOR DE SOUZA PIMENTEL foi apresentado no XI Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação realizado no período de 24 a 26 de Outubro de 2018.

Fortaleza, 21 de Abril de 2019


Antonio Gomes de Souza Filho
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação


Geanne Matos de Andrade
Coordenadora de Pesquisa

Universidade Federal do Ceará
Escola Integrada de Desenvolvimento e
Inovação Acadêmica
Encontros Universitários 2018
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 'USO DE MAQUETES TRIDIMENSIONAIS NA PRÁTICA DE ENSINO DE BIOQUÍMICA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA' do(s) autor(es) JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA, AMANDA ALVES FEITOSA, ANTÔNIO ORCINI DA COSTA JÚNIOR., ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA e DOMINGOS ANTONIO CLEMENTE MARIA SILVIO MORANO foi apresentado no X Encontro de Docência no Ensino Superior realizado no período de 24 a 26 de Outubro de 2018.

Fortaleza, 21 de Abril de 2019



Tereza Cristina Batista de Lima

Diretora Executiva da Escola Integrada de Desenvolvimento e Inovação Acadêmica



Maria José Albuquerque da Silva
Programa de Formação Docente CASa

**Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis
Encontros Universitários 2018**

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 'EFEITO PROTETOR DA GOMA DO CAJUEIRO (ANACARDIUM OCCIDENTALE L.) NAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDO POR 5-FU' do(s) autor(es) PÂMELA TEIXEIRA VIEIRA SANTOS, LUIZ HENRIQUE RODRIGUES AGUIAR, JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA, VICTOR RODRIGUES BARBOSA ALVES e GILBERTO SANTOS CERQUEIRA foi apresentado no III Encontro de Iniciação Acadêmica realizado no período de 24 a 26 de Outubro de 2018.

Fortaleza, 21 de Abril de 2019


Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto
Pró-Reitor de Assuntos Estudantis


Elidihara Trigueiro Guimarães
Coordenadora de Assistência Estudantil

ANEXO C – CADASTRO DOS PESQUISADORES NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AC29F45

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

| | |
|-----------------------|---|
| Número do cadastro: | AC29F45 |
| Usuário: | MARIA ELENIR NOBRE PINHO RIBEIRO |
| CPF/CNPJ: | 628.561.383-49 |
| Objeto do Acesso: | Patrimônio Genético/CTA |
| Finalidade do Acesso: | Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico |

Espécie

Copernicia prunifera
Auxemma oncocalyx
Dimorphandra mollis
Anacardium occidentale
Spondias purpurea
Dimorphandra gardneriana
Solanum tuberosum
Manihot esculenta
Cucumis melo
Penaeus brasiliensis
Ucides cordatus
Agaricus subrufescens
Lentinula edodes

Mangifera indica
 Adenantha pavonina
 Cocos nucifera
 Libidibia ferrea
 Artocarpus heterophyllus
 Lippia gracilis
 Handroanthus impetiginosus
 Agaricus subrufescens

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Biomateriais poliméricos contendo bioativos da biodiversidade brasileira visando aplicação biomédica**

Equipe

| | |
|-----------------------------------|---|
| MARIA ELENIR NOBRE PINHO RIBEIRO | Universidade Federal do Ceará |
| DEYSE DE SOUSA MAIA | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| MARIA LEÔNIA DA COSTA GONZAGA | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| TICIANE VIEIRA DE PAULA SOUZA | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| SAMIRA ASSUNÇÃO DE OLIVEIRA | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| GILBERTO SANTOS CERQUEIRA | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| ETHANIELDA DE LIMA COELHO | UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA |
| GABRIELA MOTA CARDOSO | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| JOÃO FRANCISCO CÂMARA NETO | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| MATHEUS DA SILVA CÂMPELO | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| JOYCE HENRIQUE FONTE SALES | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| NAGILA MARIA PONTES SILVA RICARDO | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| SANDRA DE AGUIAR SOARES | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| JORGE HENRIQUE FONTE SALES | UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ |
| JOAO ANTONIO LEAL DE MIRANDA | UFC |

Resultados Obtidos

Requerimento de propriedade intelectual