



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

LÁZARO DE SOUSA FIDELES

**RUTINA REDUZ AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO MODELO
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

FORTALEZA

2020

LÁZARO DE SOUSA FIDELES

**RUTINA REDUZ AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO MODELO
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

Defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Biologia celular e tecidual

Orientador: Dr. Gilberto Santos Cerqueira

Co-orientador: Dra. Conceição da Silva Martins

FORTALEZA

2020

LÁZARO DE SOUSA FIDELES

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)

F471r Fideles, Lázaro.

Rutina reduz as alterações morfológicas no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil / Lázaro Fideles. – 2019.

83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.

Coorientação: Profa. Dra. Conceição da Silva Martins.

1. Antineoplásico. 2. Flavonoide. 3. Intestino. 4. Produtos Naturais.. I. Título.

CDD 611

**RUTINA REDUZ AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO MODELO
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

Defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Biologia celular e tecidual

Orientador: Dr. Gilberto Santos Cerqueira

Co-orientador: Dra. Conceição da Silva Martins

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. João Antônio Leal de Miranda
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

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

Prof. Dr. Rafael Senos dos Santos
Tufts University

Dedico,

À Deus primeiramente, por sempre me conceder saúde, amor e guiar-me por toda minha vida, ao meu pai Manuel Messias, minha mãe Veralucia de Sousa, aos meus filhos Levi Fideles, a minha filha Julia fideles, a minha namorada e futura esposa Sueli Ferreira, aos meus familiares e amigos que sempre estiveram comigo durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto com saúde e forças para chegar até o final.

Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Deixo um agradecimento especial ao meu orientador Gilberto Santos Cerqueira, pelo incentivo e dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa, assim como, agradeço seus cuidados, ensinamentos e conselhos.

Também quero agradecer a minha coorientadora Conceição da Silva Martins, pelo incentivo, apoio e oportunidade de aprender.

Agradeço aos amigos que fiz durante a pós-graduação, desde os que conheci no Departamento de morfologia. Sempre lembrarei com muito carinho das palavras de incentivo, dos momentos de troca de ideias e do enorme apoio em vários experimentos. Cada um que tive contato, certamente, me ajudou de alguma forma.

Agradeço ao Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais – LabPIM, em especial à Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, pela valiosa colaboração e disponibilização da droga objeto de estudo.

Deixo um agradecimento especial ao amigo e irmão que Deus me deu, João Leal, ao meu grande irmão e amigo Marlylton, para minhas amigas Lucianny e Larissa aos meus amigos e IC's Paulo Vitor, Barbara e Vitoria pela disponibilidade, dedicação e seriedade na execução dos experimentos, Grato por ter vocês em minha vida.

Agradeço aos técnicos e amigos do NEMPI, Flávia e Junior, por terem me ajudado com o processamento das minhas lâminas para as análises histológicas.

Quero agradecer a Universidade federal do Ceará, o laboratório NEMPI e a todos colaboradores e professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido.

Agradeço a todos que de maneira direta ou indiretamente colaboraram na elaboração e desenvolvimento desse trabalho!

RESUMO

Mucosite intestinal é um efeito adverso comumente associado ao 5-fluorouracil (5-FU), um agente quimioterápico antimetabolito usado na terapêutica do câncer. Para a rotina (RUT), um flavonóide extraído de *Dimorphandra gardneriana*, várias atividades farmacológicas têm sido descritas, como antioxidante e anti-inflamatória. No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito do RUT na mucosite intestinal experimental induzida pelo 5-FU em camundongos Swiss. Os camundongos Swiss foram divididos aleatoriamente em grupos: Salina, 5-FU, RUT-50 (50 mg/kg de RUT), RUT-100 (100 mg/kg de RUT), RUT-200 (200 mg/kg de RUT), Celecoxibe (CLX, 7,5 mg/kg de Celecoxibe) e CLX + RUT-200 (CLX + 200 mg/kg de RUT). O peso dos camundongos foi avaliado diariamente. Após indução da mucosite (administração única de 450 mg/kg de 5-FU, via intraperitoneal) e decorrido os 3 dias consecutivos de tratamento, os animais foram eutanasiados e segmentos do intestino delgado foram coletados para avaliação histopatológica e morfométrica, malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), Glutathiona (GSH), contagem de mastócitos e células calciformes, imunohistoquímica para ciclooxigenase 2 (COX-2). Realizou-se também a docagem molecular para os possíveis sítios de ação da RUT. O 5-FU induziu intensa perda de peso e redução na altura das vilosidades em comparação com o grupo salina. O tratamento com RUT diminuiu as alterações histopatológicas induzidas por 5-FU e diminuiu nível do estresse oxidativo, diminuindo os níveis de MDA e aumentando a concentração de GSH. RUT atenuou o processo inflamatório, diminuindo a atividade da MPO, mastocitose intestinal e expressão da COX-2. Nossos achados sugerem que o flavonóide RUT reverte as alterações morfofuncionais induzida pelo 5-FU e tenha como possível mecanismo de ação a via da COX-2.

Palavras-chave: Antineoplásico. Flavonoide. Intestino. Produtos Naturais.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is an adverse effect commonly associated with 5-fluorouracil (5-FU), an antimetabolite chemotherapeutic agent used in cancer therapy. For rutin (RUT), a flavonoid extracted from *Dimorphandra gardneriana*, several pharmacological activities have been described, such as antioxidant and anti-inflammatory. In the present study, the objective was to evaluate the effect of RUT on experimental intestinal mucositis induced by 5-FU in Swiss mice. Swiss mice were randomly divided into groups: Saline, 5-FU, RUT-50 (50 mg / kg RUT), RUT-100 (100 mg / kg RUT), RUT-200 (200 mg / kg RUT), Celecoxib (CLX, 7.5 mg / kg of Celecoxib) and CLX + RUT-200 (CLX + 200 mg / kg of RUT). The weight of the mice was assessed daily. After mucositis induction (single administration of 450 mg / kg of 5-FU, intraperitoneally) and after 3 consecutive days of treatment, the animals were euthanized and segments of the small intestine were collected for histopathological and morphometric evaluation, malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), Glutathione (GSH), mast cell and goblet cell count, immunohistochemistry for cyclooxygenase 2 (COX-2). Molecular docking was also carried out for possible RUT sites of action. 5-FU induced intense weight loss and reduced villus height compared to the saline group. Treatment with RUT decreased the histopathological changes induced by 5-FU and decreased the level of oxidative stress, decreasing the levels of MDA and increasing the concentration of GSH. RUT attenuated the inflammatory process, decreasing MPO activity, intestinal mastocytosis and COX-2 expression. Our findings suggest that the flavonoid RUT reverses the morphofunctional changes induced by 5-FU and has as a possible mechanism of action the COX-2 pathway.

Key-words: Antineoplastic. Flavonoid. Intestin. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Esquemas terapêuticos do câncer.....	14
FIGURA 02 - Estrutura química do Cisplatina.....	16
FIGURA 03 - Estrutura química do Metotrexato.....	17
FIGURA 04 - Estrutura química do Irinotecano.....	17
FIGURA 05 - Estrutural de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.....	19
FIGURA 06 - Mecanismo de Ação do 5-FU.....	20
FIGURA 07 - Fases da mucosite.....	21
FIGURA 08 - Rutina.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Incidencia estimada de câncer no brasil para o ano 2020..	13
TABELA 02 – Mecanismos de ação dos quimioterápicos no câncer.....	15
TABELA 03 - feitos tóxicos dos quimioterápicos, conforme manifestação após aplicação	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU - Fluorouracil
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CLX - Celecoxibe
COX-2 - Ciclooxigenase
DMSO - Dimetilsufóxido
DNA - Ácido Desoxiribonucléico
ERO- Espécies reativa de oxigênio
GSH - Glutathiona reduzida
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
I-CAMs - Moléculas de Adesão Intracelular
IL - Interleucina
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
MDA - Malondialdéido
MPO- Mieloperoxidase
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NO - Óxido nítrico
PAS - Ácido periódico Schiff
RMN - Ressonância magnética nuclear
RNA - Ácido Ribonucléico
RUT - Rutina
SOD - Superóxido dismutase
TBARS - Ácido tiobarbitúrico
TGI - Trato Gastrintestinal
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
XO - Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer e principais tratamentos.....	13
1.2	Quimioterápicos.....	14
1.3	5-Fluorouracil (5-FU)	18
1.4	Mucosite intestinal por antimetabolitos.....	21
1.5	Mediadores inflamatórios na mucosite intestinal.....	23
1.6	Agentes Antioxidantes e Biomarcadores na mucosite intestinal.....	25
1.6.1	Glutaciona reduzida (GSH)	26
1.6.2	Malondialdeído (MDA)	27
1.6.3	Mieloperoxidase (MPO)	28
1.6.4	Mastócitos.....	29
1.7	Produtos naturais e flavonoides.....	29
1.7.1	Rutina.....	30
2	OBJETIVOS.....	33
2.1.	Objetivo Geral.....	33
2.2.	Objetivos Específicos.....	33
3	DESENVOLVIMENTO.....	34
	ARTIGO.....	35
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
5	REFERÊNCIAS.....	59
6	ANEXOS.....	87
	ANEXO A - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFC.....	88
	ANEXOS B Publicações e certificações obtidas no período do Mestrado.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e principais tratamentos

O câncer é uma doença caracterizada por apresentar o crescimento desordenado de células malignas, das quais podem afetar órgãos e tecidos do corpo, esse crescimento desordenado possui capacidade migratória, podendo essas células cancerígenas deslocar para outras regiões do corpo. Devido a celeridade da divisão, essas células podem ser incontroláveis, podendo provocar tumores ou neoplasias que geram perda da funcionalidade morfológica e fisiológica dos órgãos ou tecidos (PEREIRA et al., 2016; ANDRADE et al., 2019; INCA, 2019;).

O INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER estima que em 2020, no Brasil, surjam milhares de novos casos de câncer, uma média de 309.750 novos casos em homens e 316.280 novos casos em mulheres (INCA, 2019). No sexo masculino destacam-se o câncer de próstata, colorretal, traqueia e pulmão e estômago, e nas mulheres, maior incidência são mama, colorreal, colo uterino, traqueia e pulmão e tireoide (Tabela 01). O índice de mortalidade mundial, é de aproximadamente 7,6 milhões de vítimas fatais no planeta (INCA, 2019).

Tabela 01. Incidência estimada de câncer no Brasil para o ano de 2020

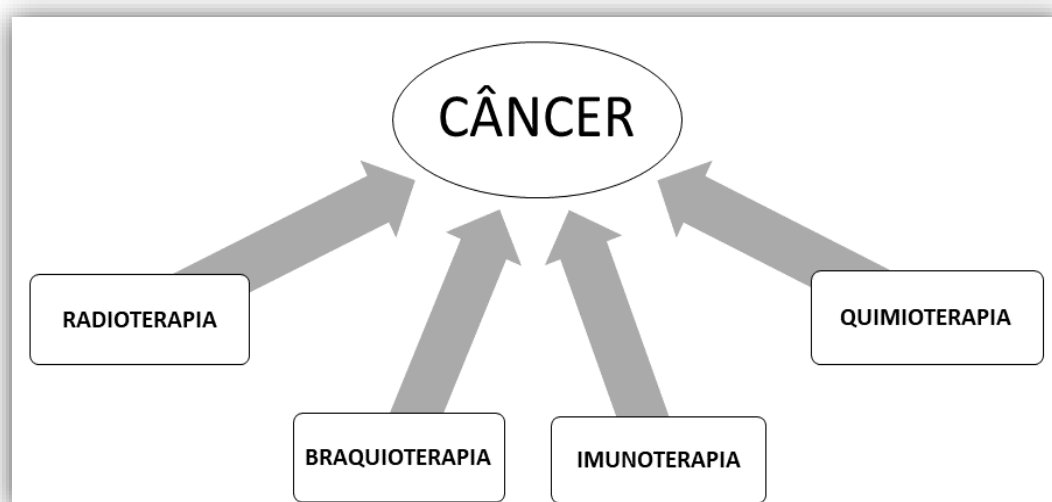
<i>HOMENS</i>			<i>MULHERES</i>		
<i>Localização Primária</i>	<i>Casos</i>	<i>%</i>	<i>Localização Primária</i>	<i>Casos</i>	<i>%</i>
<i>Próstata</i>	65.840	29,2	<i>Mama feminina</i>	66.280	29,7
<i>Cólon e Reto</i>	20.540	9,1	<i>Cólon e Reto</i>	20.470	9,2
<i>Traqueia, Brônquio e Pulmão</i>	17.760	7,9	<i>Colo do útero</i>	16.710	7,5
<i>Estômago</i>	13.360	5,9	<i>Traqueia, Brônquio e Pulmão</i>	12.440	5,6
<i>Cavidade Oral</i>	11.200	5,0	<i>Glândula Tireoide</i>	11.950	5,4
<i>Esôfago</i>	8.690	3,9	<i>Estômago</i>	7.870	3,5
<i>Bexiga</i>	7.590	3,4	<i>Ovário</i>	6.650	3,0
<i>Laringe</i>	6.470	2,9	<i>Corpo do útero</i>	6.540	2,9
<i>Leucemias</i>	5.920	2,6	<i>Linfoma não-Hodgkin</i>	5.450	2,4
<i>Sistema Nervoso Central</i>	5.870	2,6	<i>Sistema Nervoso Central</i>	5.230	2,3
<i>Neoplasias, exceto pele não melanoma</i>	225.980	100,0	<i>Neoplasias, exceto pele não melanoma</i>	223.110	100,0
<i>Todas as Neoplasias</i>	309.750		<i>Todas as Neoplasias</i>	316.280	

Fonte: Adaptado de INCA, 2019.

Com altos índices de morbimortalidade, várias medidas terapêuticas são lançadas objetivando a diminuição destes índices. Dentre as medidas terapêuticas para tratamento dessas doenças oncológicas podemos destacar algumas

modalidades, como a radioterapia, técnica que usa radiação ionizante para irradiar células cancerígenas para controlar ou destruir essa doença no paciente oncológico. (RIBEIRO et al., 2020; INCA, 2016; SOVERI et al., 2014). Como a imunoterapia, um tratamento de estimulação do sistema imunológico e tem atualmente como seu principal foco os tumores malignos (JÚNIOR, et al., 2020) e a quimioterapia que usa fármacos para destruir células cancerígenas e age para impedi-las que se espalhem pelo corpo (DE LIMA et al., 2020; NICOLUSSI et al., 2014). E a braquiterapia que faz uso de materiais radiativos no paciente oncológico, além de tudo, essas modalidades de tratamentos podem ser combinadas também com possível remoção cirúrgica, como podemos citar uma radio-quimioterapia combinada ou combinado com a braquiterapia (DA SILVA et al., 2019; INCA, 2017; CHEN et al., 2016) (Figura 02).

Figura 01. Esquemas terapêuticos do câncer.



Fonte: Autoria própria.

1.2 Quimioterápicos

A quimioterapia constitui uma das modalidades que envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas no paciente oncológico com objetivo de destruir e evitar a migração de células cancerígenas (FERREIRA et al., 2017; NICOLUSSI et al., 2014). A terapia alvo utiliza medicamentos que foram desenvolvidos para localizar, bloquear e destruir células cancerosas do organismo, com base nas características específicas que definem cada tipo de câncer, esse método de terapia alvo poderá ser indicada pela equipe médica após o teste molecular. (GUERRA, et al., 2019).

Atualmente, estão a disposição no mercado diversos tipos de agentes quimioterápicos, capaz de promover erradicação das células cancerígenas por diversos mecanismos de ação, a exemplo, os alquilantes, antimetabólitos, inibidores da topoisomerase (Tabela 02). Apesar da existência de diversos mecanismos, a maior parte dos agentes antineoplásicos culmina em ações sobre o DNA, impedindo a duplicação celular, atuando em todas as fases do ciclo, em uma fase específica ou em células que não estão no ciclo celular (SOVERI et al., 2014).

Tabela 02. Mecanismos de ação dos quimioterápicos no câncer.

Agente Quimioterápico	Mecanismo de ação
<i>Agentes alquilantes</i>	<i>Acrescenta grupos alquila ao N-7 ou 0-6 da Guanina</i>
<i>Antimetabólitos</i>	<i>Inibem a síntese de DNA ou RNA</i>
<i>Venenos da tubulina</i>	<i>Bloqueiam a polimerização tubular ou despolimerização</i>
<i>Inibidores da topoisomerase</i>	<i>Interferem no desenrolar / reparo do DNA</i>
<i>Compostos de platina</i>	<i>Interrompem o reparo do DNA</i>

Fonte: Adpatado de LONGO et al., 2013.

Na quimioterapia os fármacos são utilizados com objetivo de agirem principalmente na população de células malignas, porem esses farmacos também exercem efeitos profundos sobre as células normais (CHEN et al., 2016). Esses efeitos colaterais provocados pelos os quimioterápicos durante o tratamento poderá provocar graves sintomas adversos, poderá gerar interrupção do tratamento e um impacto negativo na qualidade do tratamento paliativo do paciente oncológico, (CHEN et al., 2016; LONGO et al., 2013).

Dentre tais células afetadas encontram-se as do sistema hematopoiético, células da mucosa do trato gastrointestinal, folículos capilares, medula óssea, provocando efeitos adversos; como o comprometimento no processo de cicatrização, a esterilidade, pode provocar alopecia, mucosite, pode afetar a arcada dentaria, (CHEN et al., 2016). Essa interação com os tecidos com alta taxa mitótica acarreta uma série de efeitos secundários, os quais podem apresentar-se de forma precoce ou tardia. (INCA, 2016). A Tabela 3 retrata os principais efeitos secundários oriundo do uso de quimioterápico.

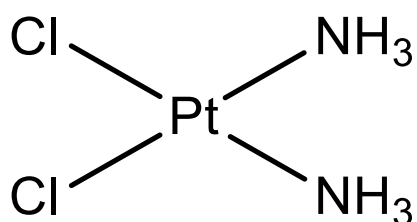
Tabela 03. Efeitos tóxicos dos quimioterápicos, conforme manifestação após a aplicação.

Precoces (0 a 3 dias)	Imediatos (7 a 21 dias)	Tardio (meses)
Náuseas e mal-estar	Mucosites	Miocardiopatia devida aos antracíclicos
<i>Vômitos</i>	<i>Cistite hemorrágica devida à ciclofosfamida.</i>	<i>Alopécia</i>
<i>Adinamia</i>	<i>Imunossupressão.</i>	<i>Pneumonite devida à bleomicina</i>
<i>Exantemas</i>	<i>Mielossupressão, granulocitopenia, plaquetopenia anemia.</i>	<i>Neurotoxicidade causada pela vincristina, pela</i>
<i>Artralgia e Flebite</i>	<i>Potencialização dos efeitos das radiações devida à actinomicina D</i>	<i>Nefrotoxicidade devida à cisplatina</i>

Fonte: Autoria própria, adaptado de INCA, 2016

Estudos recentes na investigação da mucosite indicam múltiplos fatores que contribuem para a lesão da mucosa. Os medicamentos citotóxicos mais frequentemente associada à mucosite incluem 5-fluorouracil, cisplatina, ifosfamida, metotrexato, vinblastina, vincristina e irinotecano (HARRIS et al., 2006; CURRA et al., 2018). A Cisplatina corresponde quimioterápico derivado de compostos de platina, cujo mecanismo de ação baseia-se na interrupção do reparo do DNA. Dessa forma, ao estabelecer ligações cruzadas com as fitas de DNA, denominadas de interfitas (75-85%), interferem em sua ação, que culmina em inibição preferencial da síntese de DNA em relação a síntese de RNA e proteínas. Com estudos e inserção no mercado desde a década de 70, a cisplatina, cis-[diamindicloroplatina (II)] ou cis-[PtCl₂(NH₃)₂] vem sendo utilizada em tumores localizados, como câncer testicular e ovariano, e é constituída por arranjo cis de duas moléculas de Cloro e duas aminas (NH₃), ambas conectadas à molécula central platina (Pt) (Figura 02) (FONTES; ALMEIDA, 1997; MOTA, 2004). Assim como metais pesados, a cisplatina apresenta entre os efeitos adversos nefrotoxicidade, ototoxicidade, mielossupressão, mucosite e neuropatia.

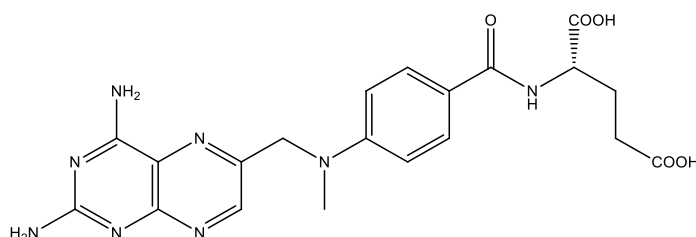
Figura 02. Estrutura química do Cisplatina.



Fonte: Adaptado de FONTES; ALMEIDA, 1997.

A molécula 4-amino-N10 metil ácido pteuroglutâmico, conhecida como Metotrexato (MTX) (Figura 03), é um fármaco antimetabólito análogo ao ácido fólico. Aprovado pelo FDA como droga oncológica em 1953, o mecanismo de ação do MTX consiste na inibição de forma competitiva e irreversível a enzima diidrofolato redutase, sendo considerado então como um quimioterápico específico da fase S (de síntese) do ciclo celular (MARTINS; ARRUDA, 2004; BRESSAN et al., 2010).

Figura 03. Estrutura química do Metotrexato.

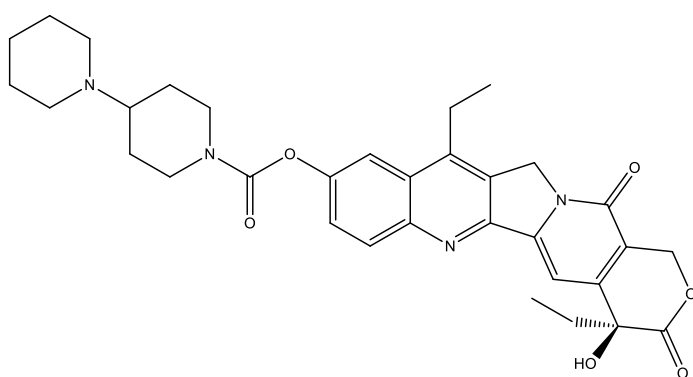


Fonte: Adaptado de Martins et al., 2004.

Atualmente, o MTX apresenta uma vasta aplicação clínica. Como agente quimioterápico é utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), coriocarcinoma, tumores trofoblásticos, linfomas de Burkitt e não-Hodgkin, carcinomas de mama, cabeça, pescoço, ovário e bexiga (BARBISAN, 2014). Todavia apesar de vasta utilidade e grande eficácia na terapia do câncer, efeitos adversos são relatos comuns dos pacientes, dentre eles, mucosite, conjuntivite, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade. (LEITE et al., 2020).

Pertencente ao grupo de produtos derivados de plantas capazes de inibir mitose e topoisomerase, destaca-se o irinotecano (CPT-11) (Figura 04), um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcaloide extraído de vegetais como a *Camptotheca acuminata*. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall et al., em 1966, de uma planta nativa na China (HOLANDA, 2018).

Figura 04. Estrutura química do Irinotecano.



Fonte: HOLANDA, 2018.

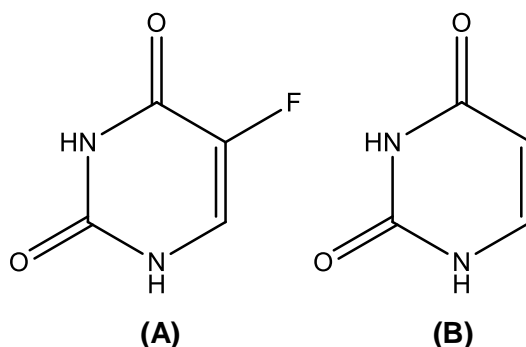
O irinotecano é um pró-fármaco convertido pelo plasma, pela mucosa intestinal e pelas enzimas hepáticas em um metabólito ativo (SN-38), ocasionando danos irreversíveis ao DNA e RNA, além de apoptose. A topoisomerase I é uma enzima encontrada em alta concentração em algumas células malignas, tais como as de adenocarcinoma de cólon e de LNH. A presença de níveis aumentados de topoisomerase I torna essas células mais sensíveis à ação do irinotecano (HOFF, 2016; DE ALENCAR et al., 2017). Nos últimos anos, o CPT-11 conhecido como o irinotecano, tem sido utilizado como agente no tratamento de alguns tipos de cânceres, como o câncer colorretal, câncer de ovário, linfoma de Hodgking, câncer de pulmão, pâncreas, mama e de estômago, porém desenvolve alguns efeitos colaterais considerados danosos aos pacientes (; BELARMINO FILHO, 2010; DE ALENCAR et al., 2017). Dos efeitos colaterais relacionados ao uso do irinotecano, podemos citar mielossupressão, mucosite, diarreia, dispnéia (CARMO et al., 2019; MOTA, 2004).

1.3 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; ZAMITH et al., 2019.), ou seja, são drogas que interferem nos processos metabólicos normais dentro das células. Descobertos por Farber, em 1948, os antimetabólitos tem sido utilizado há pelo menos 50 anos no tratamento do câncer (; KAYE, 1998; ZAMITH et al., 2019).

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 (MIRANDA et al., 2019; ZHANG et al., 2008); trata-se de um análogo de uracila com um átomo de flúor na posição C-5 (Figura 06), 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 05. Estrutural de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.



Fonte: adaptado de PIZZORNO et al., 2003. A: 5-Fluorouracil; B: Uracila.

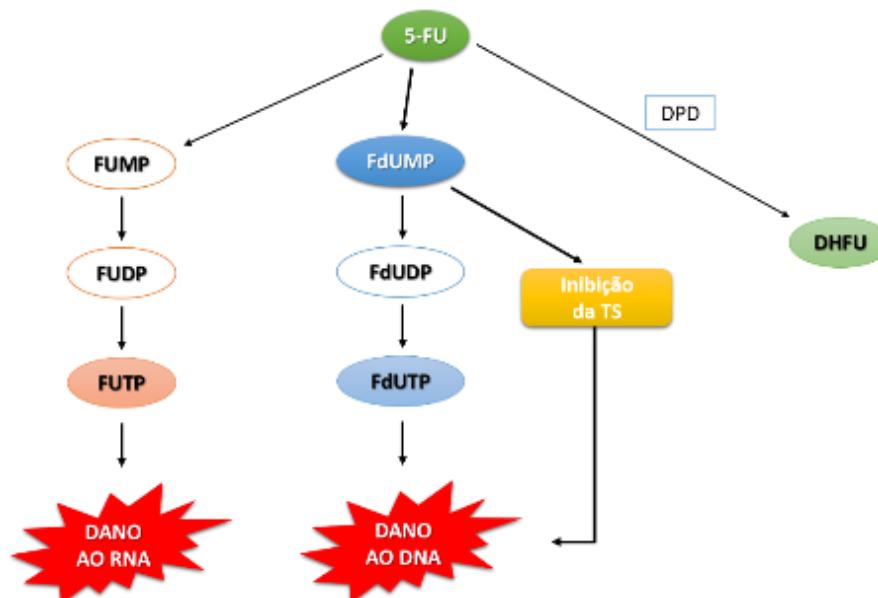
O 5-FU pode ser administrado na forma direta ou na forma de pró-droga, como exemplo a Capecitabina (N4-pentiloxicarbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina), uma solução administrada oralmente de fluoropirimidina carbamato 5-FU. A pró-droga é convertida em 5-FU através de uma cascata enzimática envolvendo três enzimas chaves, entre elas a timidina fosforilase (TP), culminando ao final, na liberação de 5-FU (FOCACETTI 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) (ZHANG et al., 2019; 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 (NOORDHUIS et al., 2004; HOSKINS; WANG et al., 2018.). Com isso, a FUTP provoca alterações no processamento e função do RNA, já a FdUTP e a FdUMP causam danos ao DNA (MIURA et al., 2010; MIRANDA et al., 2019).

O limiar de concentração e atividade do 5-FU é avaliado pela velocidade do 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 07) (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 06. Mecanismo de Ação do 5-FU.



Fonte: Adaptado de SONIS, 2011.

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.

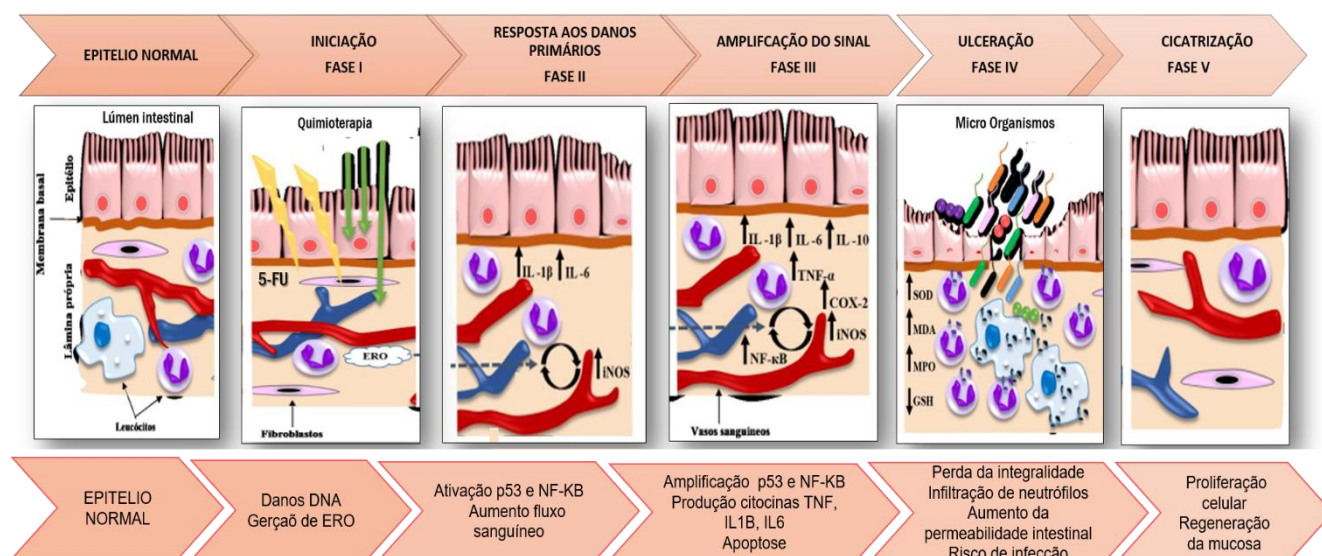
O 5-FU é uma das drogas mais prescritas no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo mama, pâncreas, cabeça, pescoço e gastrointestinal (CARDANI et al., 2014; ABDELRAHMAN et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Vários são os efeitos adversos no tratamento quimioterápico com o 5-FU, devido sua toxicidade, destacam-se neurotoxicidade, através da redução da neurogênese e consequentemente problemas cognitivos (ELBELTAGY et al., 2012; ZHANG et al., 2016), cardiotoxicidade, culminando em isquemia, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatia (FOCACCETTI et al., 2015), hepatotoxicidade, mielosupressão (KUMAR et al., 2010; KOBUCHI et al., 2016), alopecia, 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., 2015).

1.4 Mucosite intestinal por antimetabolitos

A mucosa que reveste o trato gastrointestinal (TGI) forma uma barreira seletiva entre o meio interno e externo. Da boca ao reto, a terapia citotóxica para o câncer (radiação e quimioterapia) pode levar à disfunção e ruptura deste revestimento mucoso com uma fisiopatologia envolvendo morte celular epitelial e endotelial, bem como a ativação do sistema imune da mucosa (VILLA; SONIS, 2015; BASTOS et al., 2016)

A mucosite induzida por antineoplásicos é um fator limitante na terapia anticâncer. Essa inflamação na mucosa é um termo clínico utilizado para caracterizar ulcerações da mucosa de todo o trato digestivo, e sintomas pertinentes (SONIS, 2004; LALLA et al., 2014; TANG et al., 2016). Esta constitui-se uma das complicações mais comuns da quimioterapia, em especial com as drogas que afetam a síntese de DNA (agentes específicos da fase S, tais como fluorouracil, metotrexato e citarabina, pois conduz à atrofia das vilosidades, dificultando a absorção de nutrientes necessários para o funcionamento normal do corpo. (KARBELKAR et al., 2016). Em 40% dos pacientes acontece após a quimioterapia de dose padrão, e em 100% dos pacientes submetidos à quimioterapia de dose elevada e transplante de células estaminais ou medula óssea e não só contribui para a morbidade do tratamento, mas também ao custo do tratamento (SUKHOTNIK et al., 2014; OLIVEIRA et al, 2019).

Figura 07. Fases da mucosite



Fonte: Adaptado de SONIS, 2011.

A patogênese da mucosite induzida por quimioterapia inclui cinco fases (Figura 08): iniciação pela quimioterapia, a sobre-regulação e geração de sinais de mensageiro, a sinalização por citocinas pró-inflamatórias e amplificação de lesão da mucosa, ulceração da mucosa e, finalmente, a cura. (VILLA; SONIS, 2015; BASTOS et al., 2016).

De início, a aplicação de radiação e/ou quimioterapia danifica diretamente o DNA e causa quebras nas fitas, resultando em morte das células basais epiteliais. Dano ainda mais significativo a nível tecidual é a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) com o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, os quais atuam como um marcador para células do sistema imunológico (SONIS, 2009; SUKHOTNIK et al., 2014).

O excesso de espécies reativas de oxigênio geradas nas fases iniciais e de indução da mucosite e, conseqüentemente o consumo de grandes quantidades de antioxidantes gera um desequilíbrio com instalação do estresse oxidativo (MONDIN et al., 2016; YOSHINO et al., 2016). Arifa et al. (2014) em estudo realizado relatam presença de estresse oxidativo em mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Na segunda fase, denominada resposta a danos primários, ocorrem diversos eventos simultâneos (figura 08). Os danos causados ao DNA pelo quimioterápico, EROs e espécies reativas de nitrogênio promovem ativação de fatores de transcrição como p53 relacionado à regulação do ciclo celular e apoptose e NF- κ B envolvido na regulação da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (VILLA; SONIS, 2015; KARBELKAR et al., 2016).

O acúmulo de sucessivas alterações biológicas induzidas por radiação e/ou quimioterapia resulta em uma cascata de eventos que culmina com a destruição da mucosa intacta. No decorrer da fase de sinalização e amplificação, muitas das moléculas induzidas pela resposta primária podem (através de feedback positivo ou negativo) alterar a resposta do tecido local (SONIS et al., 2007; REOLON et al., 2017). Produtos de parede celular, como lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico, antígenos de parede celular penetram na submucosa rica em macrófagos para estimular as células a continuar secretando citocinas pró-inflamatórias (SONIS, 2009; LEOCÁDIO, 2013). A fase ulcerativa é o maior evento associado com mucosite. Sua evolução se dá como consequência direta ou indireta dos mecanismos acima citados, causando danos e

alterações apoptóticas ao epitélio da mucosa. As ulcerações provenientes da mucosite são profundas e rapidamente colonizadas por bactérias (SONIS, 2011; LEOCÁDIO, 2013).

Após a fase ulcerativa ocorre a fase de cicatrização, onde a mesma ocorre espontaneamente. A cura das ulcerações é o resultado de um processo biológico ativo em que sinalizadores da matriz extracelular da submucosa guiam a proliferação, migração e diferenciação do epitélio ao redor da úlcera (DOS SANTOS FILHO et al., 2016).

1.5 Mediadores inflamatórios na mucosite intestinal

Evidências crescentes sugerem que nos processos inflamatórios ocorre intensa participação de citocinas pró-inflamatórias, que incluem interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β e citocinas anti-inflamatórias, tais como Interleucina-10 (IL-10), as quais estão envolvidas neste processo (MONDIN et al., 2016).

O TNF- α , produzido principalmente por macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória que interage com uma variedade de sinais resultando em uma estimulação indireta de inflamação e agindo em diferentes partes do corpo promovendo uma resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (VITALE; RIBEIRO, 2007; HAAGEN et al., 2009; MONDIN et al., 2016). O TNF- α é o principal fator presente no processo de regulação da função da barreira intestinal sobre os processos inflamatórios, sendo uma citocina evidente na doença inflamatória intestinal (KANAREK et al., 2014; Alvarenga et al., 2016).

De Araújo Júnior et al. (2014) encontraram níveis elevados de TNF- α em modelos de mucosite intestinal decorrente do uso de metotrexato. Freitas et al. (2012) estudando modelos de mucosite oral em hamster tratados com 5-FU mostraram por imunohistoquímica um aumento na expressão de TNF- α . TNF- α , IL-1 β são citocinas importante que estão envolvidas na ativação da via de NF-kB. (Freitas et al., 2012).

A interleucina-1 (IL-1 β) é um mediador pró-inflamatório presente na inflamação aguda ou crônica e é um poderoso indutor da resposta imune. A IL-1 β é produzida por células hematopoiéticas tais como monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e

células dendríticas em respostas à diversos estímulos. A mesma pode ainda induzir sua própria produção e processamento, sendo este um passo fundamental na patogênese de muitas doenças inflamatórias. A IL-1 β é conhecida por desempenhar um papel chave na inflamação e tem relevância específica na inflamação intestinal, podendo estar envolvida no processo de apoptose das células de criptas produzindo perda na arquitetura do intestino (CHANG et al., 2012; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; VAN TASSELL et al., 2013; SPEZZIA et al., 2020.).

IL-1 β e TNF- α geram indução de moléculas de adesão endotelial, tais como as I-CAMs (moléculas de adesão intracelular) que são essenciais nas fases iniciais da resposta inflamatória (LOGAN et al., 2007; VAN TASSELL et al., 2013). A regulação positiva da IL-1 β após dano ao DNA é observada em pacientes com câncer com mucosite e que o tratamento com anti-IL-1 β pode melhorar a mucosite assim como os múltiplos distúrbios associados à permeabilidade da barreira (KANAREK et al., 2014). Aumento nos níveis de IL-1 β foram encontrados em linhagens de células tratadas com metotrexato. VERRI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Ativação de NF-kB é induzida por uma variedade de agentes, incluindo bactérias, vírus, citocinas, estresse oxidativo, além de radiação ionizante e quimioterapia. Uma vez ativado, NF-kB regula positivamente uma quantidade elevada de genes, muitos dos quais são potencialmente importantes em doenças e lesões da mucosa, além de genes associados à expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão. NF-kB também tem como alvo uma variedade de genes relacionado à apoptose (CURRA et al., 2015).

A COX-2 é uma forma indutível da enzima cicloxigenase e é expressa principalmente em resposta a estímulos inflamatórios e medeia a produção de prostaglandinas que intensificam o processo inflamatório. A expressão de COX-2 é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 e TNF- α em muitas células, incluindo células endoteliais, macrófagos e fibroblastos. Recentemente, observou-se aumento da expressão de COX-2 em fibrose de alguns tecidos, como fígado, mucosa oral e coração (GUNTER et al., 2016, WONG et al., 2015).

Estudos indicam que a COX-2 tem um papel importante na patogênese da mucosite. Descobriu-se que o aumento na expressão de COX-2 apresentou-se

paralelo ao desenvolvimento de mucosite ulcerativa, contribuindo com o aumento na duração do quadro inflamatório e/ou aumentando a gravidade das úlceras formadas (SONIS et al., 2009, WONG et al., 2015).

Mucosite oral em hamster que receberam 5-FU apresentaram forte marcação imunohistoquímica para COX-2 evidenciando severidade significativa no curso da mucosite quando comparado ao grupo controle (FREITAS et al., 2012). Tratamento com irinotecano aumenta a expressão de COX-2 em segmentos intestinais de camundongos (WONG et al., 2015; ALVARENGA et al., 2016; ALENCAR et al., 2017).

Em resposta ao aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias ocorre durante o processo à nível transcricional elevação na atividade da enzima óxido nítrico sintase indutível resultando em maior produção de óxido nítrico (NO) sendo este um dos mediadores tóxicos durante a patogênese da mucosite (LEITÃO et al., 2011; SKEFF et al., 2014; FANGEL et al., 2019.).

O NO apresenta efeitos biológicos complexos, desempenhando papéis benéficos e prejudiciais. Os efeitos prejudiciais podem incluir uma ação citotóxica para tecidos hospedeiros adjacentes, resultando em dor e lesões nos tecidos. A produção de grandes quantidades de NO pela iNOS foi evidenciada por desempenhar um papel importante nas reações imunes e em muitos processos inflamatórios, incluindo a mucosite (SKEFF et al., 2014). Bastos Moura et al. (2015) em modelos de mucosite oral por radioterapia evidenciou aumento na expressão de iNOs.

Pesquisas mostram que o quadro de mucosite induzida por antineoplásicos pode ser modulado negativamente pela inibição do óxido nítrico sintase induzível, sugerindo um papel prejudicial do óxido nítrico na patogênese (LIMA JÚNIOR et al., 2012; LIMA JÚNIOR et al., 2014).

1.6 Agentes Antioxidantes e Biomarcadores na mucosite intestinal

A instalação da mucosite se deve uma cascata de eventos, todavia os eventos de dano direto ao DNA e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERNs), são peça-chave para desencadear o processo inflamatório e ulcerativo característico na mucosite. Diante disso, no âmbito científico, usualmente tem-se utilizado o malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), glutathiona (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase como possíveis biomarcadores capazes de

mensurar a inflamação e estresse oxidativo, e com isso predizer sobre a eficácia de produtos e/ou métodos de terapêutica às novas drogas que tem se avaliado no tratamento nas doenças inflamatórias do TGI, em especial na mucosite.(Dias et al., 2019)

1.6.1. Glutathiona Reduzida (GSH)

O trato gastrointestinal (GI) é uma fonte crucial na produção radicais livre. Apesar da barreira protetora proporcionada pela camada epitelial, materiais ingeridos e agentes patogênicos podem causar inflamação do epitélio, ativação dos neutrófilos e os macrófagos e, estes aumentar a inflamação por meio de citocinas e outros mediadores que contribuem aumento dos radicais livres nas formas de ROS e RNS, que são subprodutos do metabolismo celular normal (BHATTACHARYYA et al., 2014). No tratamento do câncer por agentes quimioterapêuticos e radioterapias depende em grande parte formação de ROS e/ou RNS para destruir células malignas por apoptose. No entanto, o desequilíbrio entre a geração radicais livres e a capacidade antioxidante representa um grave problema para a homeostase corporal, conhecido como estresse oxidativo (ALDEMIR et al., 2015).

Considerado o mais importante antioxidante não enzimático, a Glutathiona, é encontrada das células eucarióticas, em geral na sua forma reduzida, GSH (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Trata-se de tripeptídeo tiol (sulfidrilo) e tem como precursor os aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico (glutamato). Embora expresso de forma ubíqua, a biossíntese da GSH ocorre, predominantemente no fígado. Para o desenvolvimento da atividade protetora da glutathiona expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, que se dá pela atividade de três grupos de enzimas: a glutathiona peroxidase (GSH-Px ou GPX), a glutathiona oxidase (GSH-O ou GO) e a glutathiona redutase (GSH-Rd ou GR) que formam o sistema de glutathiona. As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER; ALMEIDA, 2008; CHENG et al., 2017).

O estado redox intracelular (níveis GSH/GSSG) da célula é frequentemente usado como um marcador da capacidade antioxidante das células. A manutenção de uma alta relação intracelular GSH/GSSG (> 90%) minimiza a acumulação de

dissulfetos e fornece um ambiente redutor dentro da célula. Em muitas doenças inflamatórias no trato gastrointestinal, o esgotamento dos níveis de GSH intracelular ou aumento dos níveis de GSSG está presente em concomitante com a indução de mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (RAHMAN; MACNEE, 2000; GAURAV et al., 2012; SCHMITT et al., 2015). E a avaliação dos níveis de GSH intracelular ilustra um breve panorama da capacidade antioxidante frente a um processo inflamatório, onde níveis elevados de GSH sugere capacidade protetora ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose, enquanto que a diminuição dos níveis de GSH sugere baixo efeito antioxidante e/ou exacerbação do estresse oxidativo/inflamação (CHENG et al., 2017).

1.6.2 Malondialdeído (MDA)

O desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, denominado de estresse oxidativo pode culminar em danos estruturais e/ou funcionais (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008). Enquanto alguns deles podem ser altamente prejudiciais ao organismo, lesionando membranas dos eritrócitos, proteínas, DNA e danificando células e tecidos, outros reagem apenas com os lipídeos, produzindo peroxidação lipídica. A degradação dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA) e outros aldeídos, são especialmente danosos (ELIAS et al., 2010; HEBER, 2014).

A peroxidação lipídica (PL), também denominada de lipoperoxidação, é uma cadeia de reações mediada por radicais livres que, uma vez iniciada, desencadeando à deterioração oxidativa dos lipídios poli-insaturados de membrana. Uma vez iniciado o processo, as espécies reativas desencadeia uma série de reações oxidativas sucessivas que levam a formação de hidroperóxido lipídico, tal composto é instável e, sua fragmentação resulta na formação de aldeídos altamente reativos tóxicos, tal como N-(epsilon)-(2-propenal) [malondialdeído (MDA)] (GROTTO et al., 2009; RAGHAVAN et al., 2012). Considerado um dos produtos finais da PL, o MDA é um aldeído de baixo peso molecular de três carbonos e, atua como segundos mensageiros tóxicos que potencializam a lesão e morte celular já iniciada pelos radicais livres, além de promover mutações e danos ao DNA (GROTTO et al., 2009; KULKARNI et al., 2011; RAGHAVAN et al., 2012; VYAS et al., 2016).

Dessa forma, o MDA é, de longe, o indicador mais importante biomarcador de peroxidação lipídica (SULISTYOWATI et al., 2014; VYAS et al., 2016) e, pode ser utilizada como marcador de lesão da membrana celular (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008; GROTTTO et al., 2009).

1.6.3 Mieloperoxidase (MPO)

Os neutrófilos são glóbulos brancos altamente móveis e de curta duração, densamente preenchidos com grânulos de secreção, que são sintetizados na medula óssea (MO), amadurecem, e migram para o sangue e tecidos, onde são a primeira linha de defesa celular do inato sistema imunológico. No entanto, a acumulação e superativação dos neutrófilos exacerba processo inflamatório e, acarreta efeitos prejudiciais ao tecido. O processo lesivo da ativação neutrofílica se deve a liberação de mediadores, em geral proteínas, derivados dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (MONTESEIRÍN et al., 2001; LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; JOHNSON et al., 2011; RYMASZEWSKI et al., 2014).

Os neutrófilos contêm em seu interior, grânulos primários, também chamados de grânulos azurofílicos, que são os principais locais de armazenamento dos mediadores tóxicos, denominados de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET), que incluem elastase, catepsinas, defensinas e mieloperoxidase (MPO) (LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

Expressa e secretada pelos neutrófilos, a MPO é uma enzima hemo-peroxidase altamente catiônica de peso 144 kDa capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) como mecanismo de remoção de patógenos. A partir da ativação de neutrófilos, os grânulos primários contendo MPO podem se fundir com a membrana plasmática para secretar o conteúdo no meio extracelular. Durante a explosão respiratória, a MPO utiliza H_2O_2 para produzir em conjunto com halogenetos (geralmente o Cl^-) compostos oxidantes como o ácido hipocloroso (HClO), que por sua vez, reage com proteínas, ácidos gordos insaturados e qualquer grupo oxidável, e, dessa maneira, induz mutações genéticas, alteração na síntese proteica e influencia nos caminhos de sinalização. Desta maneira, os neutrófilos ao mesmo tempo, liberar espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, além de recrutar leucócitos adicionais para a região da inflamação (MONTESEIRÍN et al., 2001; KINDZELSKII et al., 2006; LACY, 2006; RYMASZEWSKI et al., 2014).

A atividade da enzima MPO, estritamente produzida por neutrófilos, permite estimar o influxo celular na lâmina própria intestinal. Com isso, o MPO tem sido utilizado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo, inflamação e infiltração de granulócitos em vários tecidos, incluindo o trato gastrointestinal (LORIA et al., 2008; JUSTINO et al., 2014; KREMSEROVA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

1.6.4 Mastócitos

Assim como os neutrófilos, os mastócitos, desempenham um papel crítico na regulação da imunidade inata, em resposta à infecções bacterianas e parasitárias, bem como modulação da inflamação (WALLACE, 2005; RAMSAY et al., 2010). 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, conseqüentemente 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 o alargamento das vilosidades e mudanças no tamanho da cripta no intestino delgado. Ao avaliar a população de mastócitos na mucosa intestinal tem-se um breve panorama do processo inflamatório e dano tecidual atrelado à inflamação.

1.7 Produtos naturais e flavonoides

Os produtos naturais vêm se tornando grande aliado no tratamento e prevenção de diversas doenças, plantas, sementes, folhas, flavonoides, caules como exemplos, estas, têm sido valorizadas como produtos naturais importantes para a manutenção da saúde humana, por serem fontes promissoras em tratamento, prevenção de diversas doenças, se tornam cada vez mais fontes de estudos científicos. (ATANASOV et al., 2015; CASANOVA et al., 2017.) Diversos produtos naturais têm sido

intensivamente explorados, para serem utilizados para terapia de diversos cânceres, uma vez que podem melhorar a eficácia da quimioterapia, reduzir a resistência de tumores ao tratamento, podem reduzir os efeitos adversos, detoxificar o corpo de quimioterápicos e podem aumentar a qualidade de vida do paciente. (ANDRADE et al., 2019).

Alguns produtos naturais geram esses benefícios devido a ação dos compostos presentes, principalmente, nos óleos essenciais e em tumericos de diversas plantas com potencial terapêutico (NEMA et al., 2013). Numerosos estudos exploraram metabólitos secundários de plantas medicinais, como flavonóides, com o objetivo de encontrar metabólitos que exibem atividade farmacológica contra vários distúrbios da saúde humana (AHMAD et al., 2016). Vários flavonóides com propriedades antiespasmódicas, antissecretórias, antidiarreicas e antiulcerosas no trato gastrointestinal foram relatados (MOTA et al., 2009; ROKAYA et al., 2014; PAULETTO et al., 2017). Para esses flavonóides, suas atividades biológicas estão associadas à sua capacidade de modular enzimas-chave envolvidas na estimulação de processos inflamatórios, oxidativos e catabólicos, incluindo xantina oxidase (XO), ciclooxigenase (COX), lipoxigenase e fosfoinositida 3-cinases (PANCHE et al., 2016).

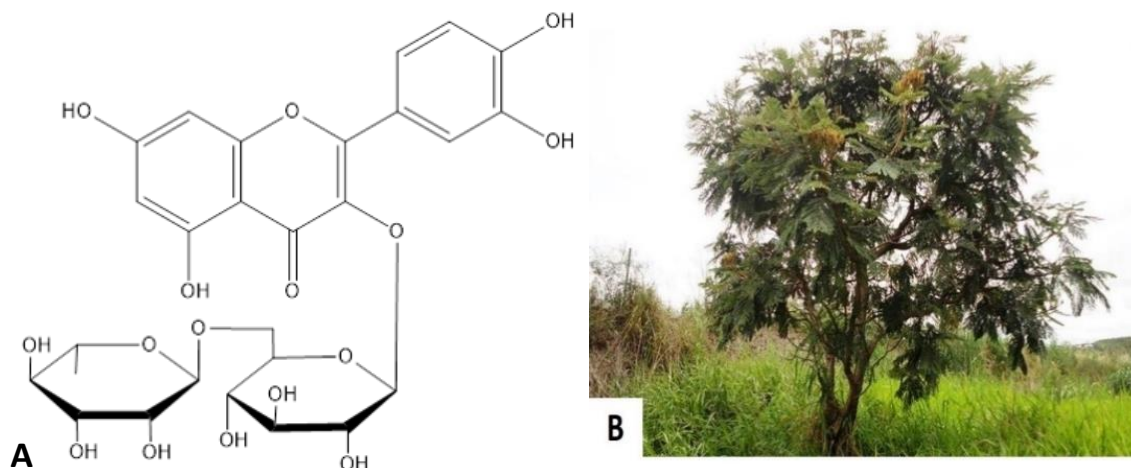
1.7.1 Rutina

A rutina, composto natural, composta por (quercetin-3-rutinosídeo, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3 ramnoglicosídeo, RUT) é um composto pertencente à classe dos flavonoides, esta importante classe de substâncias naturais apresenta um largo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes, vasodilatadores, anti-inflamatórios, antialérgicos, antivirais e estimulantes do sistema imunológico (PEDRIALI, 2005; ALVES et al., 2017; KARAK, 2019) e está amplamente distribuída por todo o reino vegetal sendo conhecida, até o presente, mais de 4200 variedades de flavonoides (SIMÕES et al., 2007; BONECHI et al., 2018).

O flavonóide é extraído da *Dimorphandra gardneriana*, conhecido popularmente como Fava D'Anta (BIANCHI et al., 2018). A *D. gardneriana* é uma planta extremamente abundante no bioma brasileiro, encontrada principalmente na região nordeste do país (MONTANO et al., 2007), devido aos seus frutos serem fontes ricas em flavonoides rutina, que possuem promissoras propriedades farmacológicas de interesse comercial, tem sido amplamente utilizada pela indústria farmacêutica

principalmente pelos efeitos vasodilatadores e antioxidantes. (DAMASCENO et al., 2019.).

Figura 08. Rutina



Fonte: **A** : autoria Propria adaptado de DE OLIVEIRA, Ines Rosane Welter Zwirter et al,2009. , **B** - Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da fava d'anta / Bruno de Carvalho Filizola. – Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2013

A: Estrutura química da Rutina; **B:** *Dimorphandra gardneriana* in natura.

Com estrutura química de um flavonoide do subtipo flavonol e ligação a um dissacarídeo (raminose + glicose) à posição 3 do anel pirano, a RUT tem sido intensamente pesquisada e os resultados obtidos tem despertado interesse constante da indústria farmacêutica, em especial devido a suas atividades antioxidantes (KAMEL; MOSTAFA, 2015), anti-inflamatórias (MASCARAQUE et al., 2014), anti-apoptóticas e citoprotetoras (FERNANDES et al., 2010; KHAN et al., 2012; HAFEZ et al., 2015).

As propriedades farmacológicas deste bioflavoide não se resume em apenas sua atuação na inflamação e estresse oxidativo, Também foi relatado como agente anti-plaquetário, vasoprotetor, antiaterosclerótico, neuroprotetor, antiviral, antimicrobiano, antifúngico, antialérgico, antitumoral, hipolipidêmico, anticonvulsivante, antiosteoporóticos, analgésico, diurético, antidiabético (DA SILVA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BECHO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; FLAMBÓ, 2013; AL-DHABI et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

No que tange a seus efeitos no TGI, estudos tem relatado a eficácia gastroprotetora da RUT no tratamento de úlcera gástrica em modelos experimentais

(GUERRERO et al., 1994; LA CASA et al., 2000). Para modelos de lesão gástrica, forma evidenciados de RUT diminui o dano histológico, os níveis de MPO, MDA e inibe a atividade do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (LIU et al., 2013).

Os mecanismos de ação da RUT em doenças de cunho inflamatório e crônicas no TGI, como colite ulcerativa e Doença de Crohn, destacam-se inibição de Prostaglandina E2 (PGE2), Angiotensina II, biossíntese dos eicosanóides, lipoxigenase, COX-2, Fosfolipase A2 (PLA2) e iNOS (CHOI et al., 2014; AL-DHABI et al., 2015). Atrelado a isso, pesquisas apontam que a maior vantagem da utilização de flavonoides, como a RUT, deve-se ao fato da baixa toxicidade (SHARMA et al., 2013; DE ALCÂNTARA., 2020.).

Apesar de já relacionado efeitos antifinflatórios e antioxidantes relevantes em diversas desordens e modelos experimetais, o efeito da RUT nos processos inflamatórios no intestino, especialmente na mucosite promovida por agentes antineoplásicos, ainda não foi relatado. Neste estudo, investigamos o papel da RUT na mucosite intestinal induzida por 5-FU experimental e exploramos os possíveis mecanismos subjacentes de sua ação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

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

3 DESENVOLVIMENTO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta dissertação foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob número 6595260719 (Anexo A).

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no § 7º do Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Este capítulo consta de uma cópia do artigo científico de autoria do candidato publicado no periódico "*Molecules*", Fator de Impacto (2018) = 3.060 e QUALIS B1 em Ciências Biológicas, conforme exigência no § 8º do Artigo 37º no regimento da Pós-Graduação para defesa de Mestrado e Doutorado.



Article

Role of Rutin in 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: Prevention of Histological Damage and Reduction of Inflammation and Oxidative Stress

Lázaro de Sousa Fideles¹, João Antônio Leal de Miranda^{1,*} , Conceição da Silva Martins¹, Maria Lucianny Lima Barbosa¹, , Helder Bindá Pimenta¹, Paulo Vitor de Souza Pimentel¹, Claudio Silva Teixeira¹, Marina Alves Sampaio Scafuri², Samuel de Osterno Façanha³, João Erivan Façanha Barreto^{1,3}, Poliana Moreira de Medeiros Carvalho⁴, Ariel Gustavo Scafuri^{1,2}, Joabe Lima Araújo⁵, , Jefferson Almeida Rocha⁶, Icaro Gusmão Pinto Vieira⁷, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo⁸ , Matheus da Silva Campelo⁸, , Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro⁸, , Gerly Anne de Castro Brito¹ and Gilberto Santos Cerqueira¹

¹ Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, s/n Delmiro de Farias Street, Porangabuçu Campus, Fortaleza 60416-030, Brazil; lazarofideles@gmail.com (L.d.S.F.); josycristophe@hotmail.com (C.d.S.M.); marialucianny@gmail.com (M.L.L.B.); hbinda@uea.edu.br (H.B.P.); paulo_vitordeSouza@hotmail.com (P.V.d.S.P.); claudioanatomia@yahoo.com.br (C.S.T.); erivanfacanha@yahoo.com.br (J.E.F.B.); urologia@gmail.com (A.G.S.); gerlybrito@hotmail.com (G.A.d.C.B.); giufarmacia@hotmail.com (G.S.C.)

² Scafuri Institute of Human Sexuality, 1513 Republic of Lebanon Street, Varjota, Fortaleza 60175-222, Brazil; drmarinalvess@gmail.com

³ Christus University Center (Unichristus), 133 Adolfo Gurgel Street, Fortaleza 63010-475, Brazil; samuelosterno@hotmail.com

⁴ University Center of Juazeiro do Norte (UNIJUAZEIRO), 1224 San Francisco Street, Juazeiro do Norte-CE 63010-475, Brazil; polyfarma2004@yahoo.com.br

⁵ Department of Genetics and Morphology, s/n Darcy Ribeiro University Campus, University of Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil; joabearaujobiotec@gmail.com

⁶ Medicinal Chemistry and Biotechnology Research Group (QUIMEBIO), Federal University of Maranhão (UFMA), São Bernardo/MA 65550-000, Brazil; ja.rocha@ufma.br

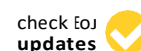
⁷ Technological Development Park, Federal University of Ceará, Humberto Monte Avenue, 2977, Pici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; icarogpv@uol.com.br

⁸ Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Pici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; naricard@ufc.br (N.M.P.S.R.); matheus.campelo@hotmail.com (M.d.S.C.); elenir.ribeiro@ufc.br (M.E.N.P.R.)

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

Academic Editors: Maurizio Battino, Jesus Simal-Gandara and Esra Capanoglu

Received: 9 May 2020; Accepted: 14 June 2020; Published: 17 June 2020



Abstract: Intestinal mucositis, characterized by inflammatory and/or ulcerative processes in the gastrointestinal tract, occurs due to cellular and tissue damage following treatment with 5-fluorouracil (5-FU). Rutin (RUT), a natural flavonoid extracted from *Dimorphandra gartneriana*, exhibits antioxidant, anti-inflammatory, cytoprotective, and gastroprotective properties. However, the effect of RUT on inflammatory processes in the intestine, especially on mucositis promoted by antineoplastic agents, has not yet been reported. In this study, we investigated the role of RUT on 5-FU-induced experimental intestinal mucositis. Swiss mice were randomly divided into seven groups: Saline, 5-FU, RUT-50, RUT-100, RUT-200, Celecoxib (CLX), and CLX + RUT-200 groups. The mice were weighed daily. After treatment, the animals were euthanized and segments of the small intestine were collected to evaluate histopathological alterations (morphometric analysis); malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), and glutathione (GSH) concentrations; mast and goblet cell counts; and cyclooxygenase-2 (COX-2) activity, as well as to perform immunohistochemical analyses. RUT treatment (200 mg/kg) prevented 5-FU-induced histopathological changes and reduced oxidative stress by decreasing MDA

concentrations and increasing GSH concentrations. RUT attenuated the inflammatory response by decreasing MPO activity, intestinal mastocytosis, and COX-2 expression. These results suggest that the COX-2 pathway is one of the underlying protective mechanisms of RUT against 5-FU-induced intestinal mucositis.

Keywords: flavonoid; inflammation; antimetabolites; intestine

1. Introduction

The use of chemotherapeutic agents is a major strategy for destroying cancer cells and maintaining normal cell development in cancer patients [1]. 5-Fluorouracil (5-FU), an antimetabolic chemotherapeutic agent used mostly to treat various types of cancer and tumors, is a fluorinated pyrimidine whose anticancer activity is based on its capacity to interfere with nucleotide metabolism, as well as RNA and DNA synthesis [2-5]. However, several adverse effects are associated with 5-FU therapy, including nausea, vomiting, diarrhea, myelosuppression, and intestinal mucositis [6-11].

Intestinal mucositis is characterized by inflammatory and/or ulcerative processes in the gastrointestinal tract, resulting in cellular and tissue damage caused by 5-FU treatment [12]. Notably, the incidence of mucositis in cancer patients ranges between 40 and 100% [13-15]. Owing to the lack of efficacious therapeutic tools for the treatment of intestinal mucositis, new alternative therapeutics that can reduce the side effects of 5-FU, without impairing cancer treatment, are being studied.

Numerous studies have explored secondary metabolites from medicinal plants such as flavonoids with the aim of finding metabolites that exhibit pharmacological activity against several human health disorders [16]. Several flavonoids with antispasmodic, antisecretory, antidiarrheal, and antiulcer properties within the gastrointestinal tract have been reported [17,18]. For these flavonoids, their biological activities are associated with their capacity to modulate key enzymes involved in the stimulation of inflammatory, oxidative, and catabolic processes, including xanthine oxidase (XO), cyclooxygenase (COX), lipoxygenase, and phosphoinositide 3-kinases [19].

Rutin (quercetin-3-rutinoside, RUT), a natural flavonoid extracted from *Dimorphandra gardneriana*, Fabaceae, popularly known as anta fava [20]. *D. gardneriana* is an extremely abundant plant in the Brazilian biome, naturally occurring in the northeastern region of the country [21] and has been widely used by the pharmaceutical industry in Brazil to extract RUT [22]. For RUT, a phytochemical with superior therapeutic potential, it has been reported to exhibit antioxidative [23], anti-inflammatory [24], anti-apoptotic and cytoprotective [25-27] activities, as well as gastroprotective efficacy [28,29]. However, the effect of RUT on inflammatory processes in the intestine, especially on mucositis promoted by antineoplastic agents, has not yet been reported. In this study, we investigated the role of RUT on experimental 5-FU-induced intestinal mucositis and explored the possible underlying mechanisms of its action.

2. Results

2.1. Extraction and Characterization of the RUT Flavonoid

The chromatographic fractionation of *D. gardneriana* extracts facilitated the isolation of a yellow crystalline solid with a melting point of 194 °C (with decomposition), homogeneous in thin layer chromatography (TLC) and soluble in methanol and dimethyl sulfoxide (DMSO). The method resulted in the purification of 12.42 g RUT.

Based on the infrared spectrum analysis of RUT (Figure 1B), it was possible to verify the major functional groups present in its chemical structure (Figure 1A). The broad and strong band at 3429 cm⁻¹ indicated the stretching of the O-H bond of the hydroxyl groups, indicating alcohol and phenol chemical structures. The band observed at 2931 cm⁻¹ was attributed to the asymmetric stretch of the C-H bond. Additionally, the doublet present between 1661 and 1595 cm⁻¹ indicated the stretching of the C=O bond of the carbonyl function and the C=C bond of the aromatic rings, respectively.

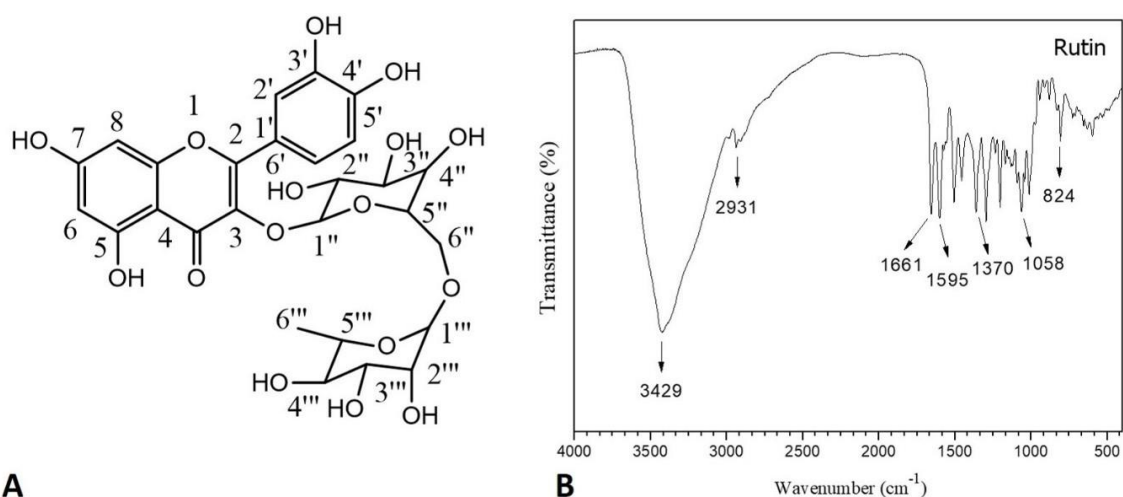


Figure 1. Characterization of Rutin (RUT). (A) Chemical structure of RUT; (B) Absorption spectroscopy in the infrared region of RUT.

The band present at 1370 cm^{-1} indicated the vibrations of the C-O bond, while the band present at 1058 cm^{-1} indicated the stretching of the C-O-C bond, as well as the presence of conjugated carbohydrates in the chemical structure of the molecule. Moreover, absorption at 824 cm^{-1} indicated a substituted aromatic ring. The assignments are consistent with those reported by Vu et al. [30] and Deepika et al. [31].

The Differential Scanning Calorimetry (DSC) curve of RUT isolated from *D. gardneriana* (Figure 2) showed the presence of three endothermic peaks ranging from 134 to 185 $^{\circ}\text{C}$, and two exothermic peaks at 230 and 244 $^{\circ}\text{C}$. The peak at 134 $^{\circ}\text{C}$ refers to the loss of residual water present in the physical structure of the drug. The melting temperature refers to the peaks between 169 and 185 $^{\circ}\text{C}$. The exothermic peaks at 230 and 244 $^{\circ}\text{C}$ are attributed to the boiling temperatures.

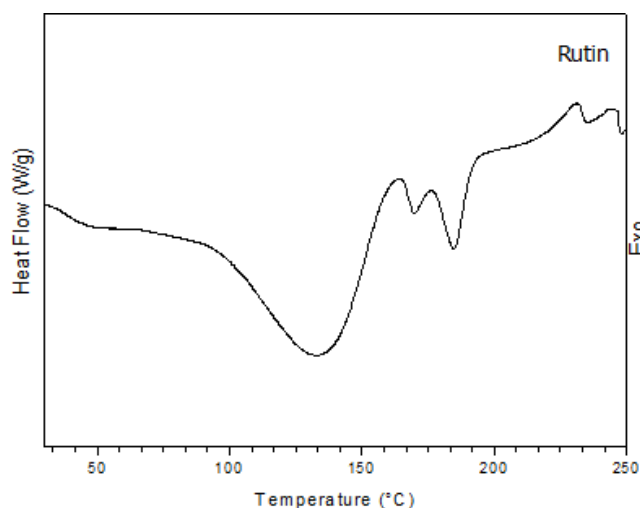


Figure 2. Differential Scanning Calorimetry (DSC) curve of RUT under N_2 atmosphere.

The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C -NMR) spectrum of RUT isolated from *D. gardneriana* demonstrated 27 spectral lines facilitating the identification of 15 absorptions associated with unsaturated carbons in the δ 177.8–94.0 range and 12 absorptions associated with saturated carbons in the δ 122.0–18.2 range when compared with the ^{13}C -distortionless enhancement of polarization transfer DEPT-NMR spectra (135°). Furthermore, the proton (^1H) NMR spectrum revealed hydroxyl groups from a singlet at δ 12.6, indicating the presence of four absorptions associated with unsaturated carbon hydrogens, demonstrating chemical displacements in the δ 7.5–6.2 range. The assignments are listed in Table 1 and are in line with the proposals of Xiao et al. [32] and Xu et al. [33].

Table 1. ^1H NMR and ^{13}C NMR profile of RUT (DMSO- d_6 , δ , multiplicity).

^1H NMR		^{13}C NMR	
Rutin	δ (ppm)	Rutin	δ (ppm)
5-OH	12.6 (s)	4-C	177.8
2'-Ar	7.5 (s)	7-C	164.5
5'-Ar	6.8 (m)	9-C	161.7
8-Ar	6.4 (s)	5-C	157.1
6-Ar	6.2 (s)	2-C	156.9
1''-H	5.4 (d)	3'-C	148.9
1'''-H	4.4 (s)	4'-C	145.2
9H-rhamnoglucosyl	3.7-3.1	3-C	133.8
3H-rhamnosyl	1.0 (m)	1'-C	122.0
		6'-C	121.6
		5'-C	116.7
		2'-C	115.7
		1''-C	101.6
		1'''-C	101.2
		6-C	99.1
		8-C	94.0
		3''-C	76.9
		5''-C	76.4
		2''-C	74.5
		4'''-C	72.3
		2'''-C	71.0
		4''-C	70.8
		3'''-C	70.5
		6''-C	68.7
		5'''-C	67.4
		6'''-C	18.2

Figure 3 shows the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) chromatogram (A) and the absorption spectrum in the UV-Vis region of the isolated RUT from *D. gardneriana* (B). The isolated RUT had a retention time of 9.50 min and a purity of 97% HPLC grade. In addition, the scanning spectrum in the UV-Vis region indicated a maximum absorbance peak at 350 nm.

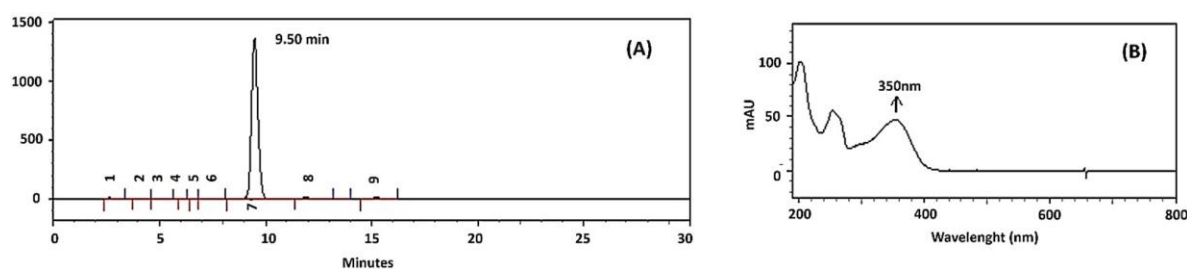


Figure 3. HPLC chromatogram (A) and UV-Vis spectrum (B) of the isolated RUT from *D. gardneriana*.

2.2. Weight Analysis

Weight loss is one of the most common side effects of 5-FU chemotherapy. The experimental mouse model of 5-FU-induced intestinal mucositis demonstrated significant weight loss. As shown in Figure 4, from the second day, all mice with 5-FU-induced intestinal mucositis presented progressive weight loss, which was significant when compared to the saline group ($p < 0.05$). However, pretreatment with RUT at any dose failed to prevent weight loss in the 5-FU-induced mucositis animals ($p < 0.05$).

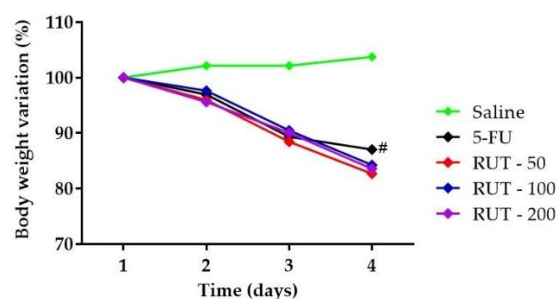


Figure 4. Body weight variation in mice subjected to induced intestinal mucositis (5-FU, 450 mg/kg, intraperitoneally, single dose) and treated with RUT (50, 100, and 200 mg/kg for 3 days). The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of the weight evaluation percentage of the initial weight, for a minimum of 6 animals per group. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ vs. saline.

2.3. Histopathological and Morphometric Analysis

As shown in Table 2, the administration of 5-FU induced changes in the intestinal mucosa of mice, as evidenced by reduced villus height, crypt necrosis and hypoplasia, intense inflammatory cell infiltration, vacuolization, and edema of intestinal mucosal and muscular layer cells. In the 5-FU-administered group, this resulted in a significant increase in the microscopic score when compared to the saline group ($p < 0.05$) in the three intestinal segments. Notably, RUT treatment (200 mg/kg) significantly decreased ($p < 0.05$) the histopathological scores when compared to the 5-FU lesion group, demonstrating the reversal of decreased villus height and vacuolization, as well as the attenuation of crypt necrosis and inflammatory cell infiltration into the intestinal mucosa in the duodenal and jejunal segments. In the three intestinal segments, RUT (50 and 100 mg/kg) demonstrated no significant decrease ($p > 0.05$) in the histopathological scores induced by 5-FU.

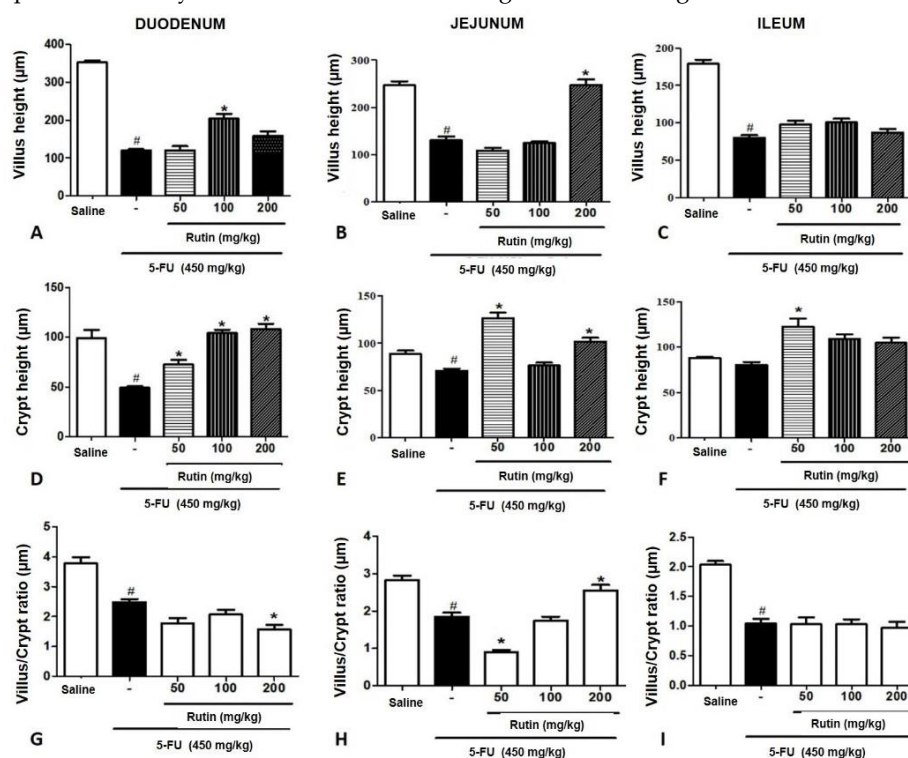
Table 2. Histopathological scores of mice subjected to 5-FU-induced intestinal mucositis and pretreated with RUT.

Segments	Groups				
	Saline	5-FU	RUT (mg/kg)		
			50	100	200
Duodenum	0 (0-1)	3 (2-3) ^a	2 (1-3)	2 (1-2)	1 (1-3) ^b
Jejunum	0 (0-1)	3 (1-3) ^a	2 (1-3)	1,5(1-3)	1 (1-2) ^b
Ileum	0 (0-0)	3 (1-3) ^a	3 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)

Values are expressed as median, where **a** $p < 0.05$ vs saline and **b** $p < 0.05$ vs 5-FU ($n = 6$ /group). The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

Additionally, the villi heights were measured in the three intestinal segments (Figure 5A-C); 5-FU significantly decreased the villi height in the duodenum, jejunum, and ileum ($p < 0.05$, when compared to the saline group in corresponding segments). In the duodenum and the jejunum, pretreatment with RUT (100 and 200 mg/kg) revealed a significant reversal in villi shortening induced by 5-FU ($p < 0.05$). However, in the ileum, all RUT doses failed to reverse the villi shortening caused by 5-FU treatment.

Figure 5. Morphometric analyses of the mice intestinal segments following 5-FU-induced intestinal mucositis.



Experimental groups: Saline, 5-FU, RUT-50, RUT-100, and RUT 200 mg/kg. (A–C): Villi height in the duodenal, jejunal, and ileal segments, respectively. (D–F): Crypt depth of the duodenal, jejunal, and ileal segments, respectively. (G–I): Villus/crypt ratio of the duodenal, jejunal, and ileal segments, respectively. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance, followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ vs. saline group and * $p < 0.05$ vs. group 5-FU. Villus height (μm), Crypt height (μm), Villus/Crypt ratio (μm). 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

We demonstrated that 5-FU significantly decreased crypt depths in the duodenal segment when compared with the depths in the saline group; RUT 50, 100, and 200 mg/kg prevented the decrease in crypt depths when compared with the 5-FU treatments ($p < 0.05$). Additionally, in the jejunum, a significant decrease in crypt depths was induced by 5-FU ($p < 0.05$) treatment when compared to the crypts in the saline group; RUT 50 and 200 mg/kg reversed the decreases in crypt depth induced by 5-FU. In the ileum, no significant differences ($p < 0.05$) were observed in crypt depths between the 5-FU and saline groups.

According to the results of the villus/crypt ratio analyses among the three intestinal segments (Figure 5G–I), the villus/crypt ratio in the duodenum decreased significantly following treatment with 5-FU when compared with the saline group ($p < 0.05$). No RUT treatment increased the villus/crypt ratio significantly when compared with the ratio in the 5-FU group. In the jejunum, 5-FU decreased villus/crypt ratio significantly when compared with the saline group ($p < 0.05$), and treatment with RUT 200 mg/kg could reverse the decrease in villus/crypt ratio promoted by the 5-FU ($p < 0.05$). In the ileum, 5-FU decreased the villus/crypt ratio significantly when compared with the saline group ($p < 0.05$); however, none of the tested RUT doses promoted a significant increase ($p < 0.05$) in villus/crypt ratio when compared to the 5-FU group.

Figure 6 illustrates that 5-FU reduced villi heights, and induced necrosis, loss of crypt architecture and an increase in the inflammatory infiltrate when compared with observations in the saline group.

The results suggest that RUT prevented histological alterations induced by 5-FU treatment, and its protective effects on the jejunal segment and the effects of 200 mg/kg RUT were particularly evident.

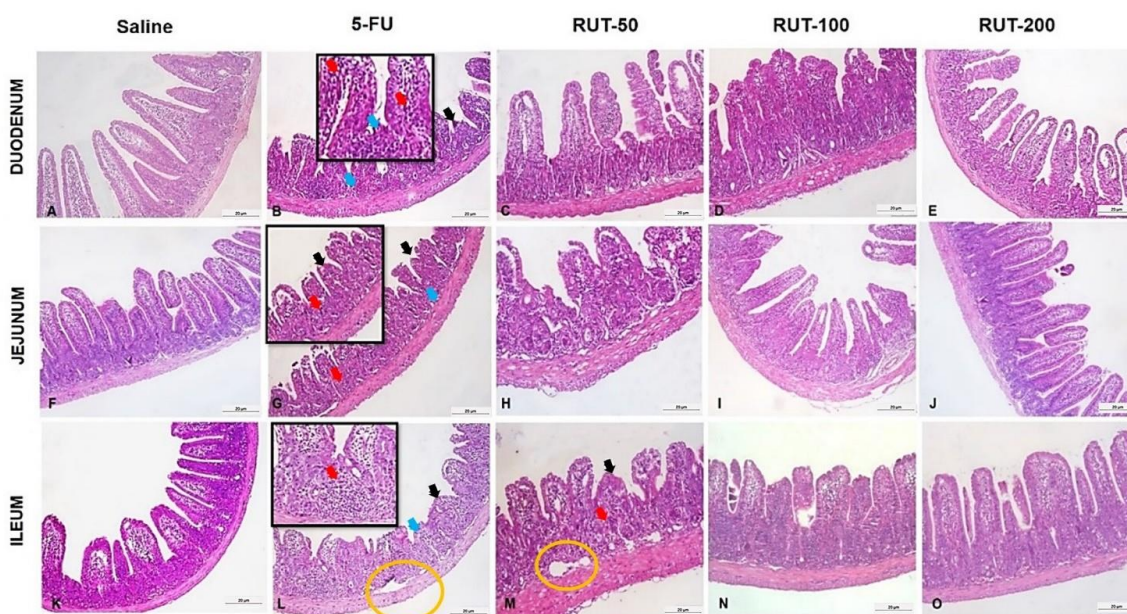


Figure 6. Histopathological analyses of intestinal segments of mice with 5-FU-induced intestinal mucositis. Horizontally, the duodenum is illustrated in (A–E), corresponding to the saline, 5-FU, RUT 50, 100, and 200 mg/kg groups, respectively. The jejunum is illustrated in (F–J), representing the saline, 5-FU, RUT 50, 100, and 200 mg/kg, groups, respectively. The ileum is illustrated in (K–O), representing the saline, 5-FU, RUT 50, 100, and 200 mg/kg, respectively. Black arrows: Shortened villi; red arrows: inflammatory infiltrates, blue arrows: loss of crypt architecture, and yellow circle: edema. In all segments, 5-FU induces shortened villi, loss of crypt architecture, and intense inflammatory infiltration. Histological changes are notably reduced following pretreatment with RUT 200 mg/kg, especially in the duodenal and jejunal segments. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

2.4. Myeloperoxidase Assay (MPO)

To investigate the effects of RUT pretreatment on neutrophil recruitment in 5-FU-induced intestinal mucositis, we evaluated the levels of myeloperoxidase (MPO), a neutrophil marker, in the jejunum. As shown in Figure 7, 5-FU significantly increased MPO levels per mg of tissue in the jejunal segment when compared to the saline group ($p < 0.05$). Conversely, RUT 200 mg/kg significantly decreased MPO levels when compared to the 5-FU group ($p < 0.05$) and, therefore, decreased neutrophil infiltration (Figure 7).

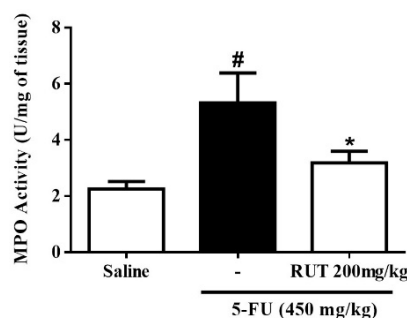


Figure 7. Myeloperoxidase (MPO) assay. Values are presented as mean \pm SEM of MPO activity expressed in Unit (U) of MPO/mg in tissue. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance followed by the Tukey's test. # $p < 0.05$ vs. saline group and * $p < 0.05$ vs. group 5-FU.

2.5. Malondialdehyde (MDA) and Glutathione (GSH) Levels

To investigate the effects of RUT pretreatment on 5-FU-induced oxidative stress in the jejunum, MDA and GSH levels (final products of oxidative stress) were evaluated. In the jejunum, 5-FU treatment increased MDA levels when compared to those observed following saline treatment ($p < 0.05$, Figure 8A). Administration of 200 mg/kg RUT decreased MDA concentrations when compared to the concentrations observed under the 5-FU treatment ($p < 0.05$). Animals treated with 5-FU exhibited significantly decreased GSH concentrations when compared with animals in the saline group ($p < 0.05$). However, GSH levels increased significantly in the RUT 200 mg/kg group when compared with levels in the 5-FU group ($p < 0.05$, Figure 8B).

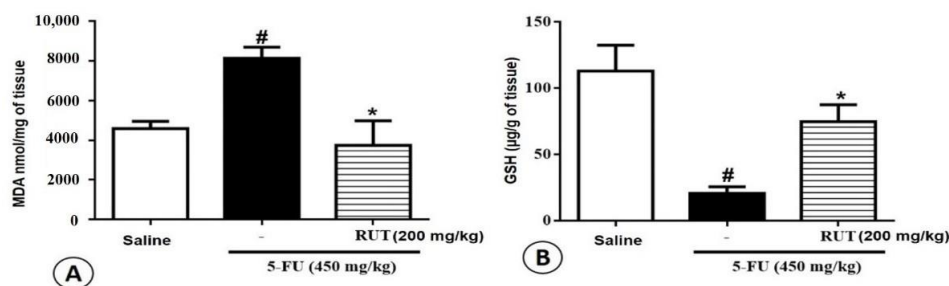


Figure 8. Analysis of oxidative stress. (A) Malondialdehyde (MDA), (B) Glutathione (GSH). Experimental groups: Saline, 5-FU, and RUT 200 mg/kg. Values are presented as mean \pm SEM. For the statistical analyses, one-way analysis of variance was used, followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ vs. saline group and * $p < 0.05$ vs. group 5-FU. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

2.6. Cell Count in the Intestinal Mucosa: Mast and Goblet Cells

To evaluate the effect of RUT pretreatment on 5-FU-induced mastocytosis, the number of mast cells in the jejunum was determined (Figure 9). 5-FU treatment significantly increased the number of mast cells per field when compared with saline treatment ($p < 0.05$). Additionally, the administration of 200 mg/kg RUT (Figure 9C) reduced the number of mast cells in turn, preventing 5-FU-induced mastocytosis and degranulation in mouse intestines (Figure 9B,D).

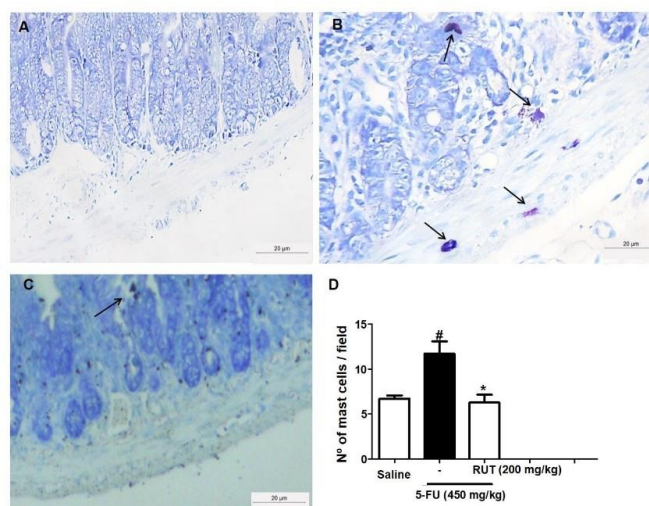


Figure 9. Mast cell counts in the jejunal segment based on Toluidine Blue staining. Saline (A); 5-FU (B); RUT-200 (C); Statistical representation of experimental groups (D). Black arrows indicate mast cells. All the panels were obtained at 400 \times magnification. Values are presented as mean \pm SEM of the number of mast cells per field. For the statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ in 5-FU vs. Saline group; * $p < 0.05$ in RUT-200 vs. 5-FU group. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

Analysis of goblet cells in the jejunal segment (Figure 10) revealed that 5-FU treatment significantly decreased the number of goblet cells in the intestinal mucosa ($p < 0.05$) when compared to saline treatment. However, treatment with 200 mg/kg RUT retained the goblet cell number (Figure 10C), when compared with that of 5-FU treatment ($p < 0.05$, Figure 10B,D).

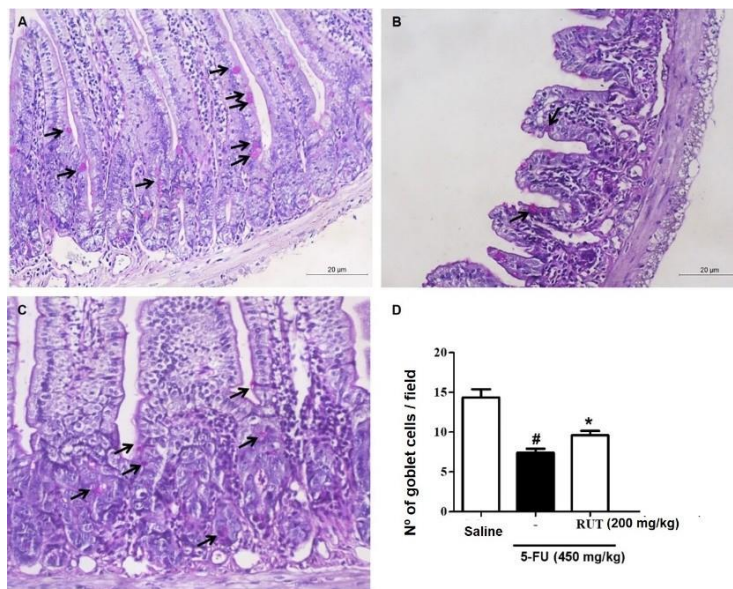


Figure 10. Goblet cell counts in the jejunal segment based on Schiff periodic acid (PAS) staining. Saline (A); 5-FU (B); RUT-200 (C); Statistical representation of experimental groups (D). Black arrows indicate goblet cells. Values are presented as mean \pm SEM for the number of goblet cells per field. For the statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ in 5-FU vs. Saline group; * $p < 0.05$ in RUT-200 vs. 5-FU group. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

2.7. Effect of RUT on Cyclooxygenase-2 Pathway Based on Histopathological and Morphometric Analyses

As illustrated in Figure 11F, 5-FU significantly reduced the jejunal villi height when compared with the saline group ($p < 0.05$). Conversely, 200 mg/kg RUT reversed the reduced villi height when compared with 5-FU treatment. Treatment with the COX-2 inhibitor, celecoxib (CLX), significantly suppressed a decrease in villi height when compared with the 5-FU group. Compared with the 5-FU treatment, 200 mg/kg RUT in combination with CLX could prevent a decrease in villi height ($p < 0.05$). The group treated with a combination of 200 mg/kg RUT and CLX exhibited a greater extent of reversal of decreased villi height when compared with groups treated with monotherapy of RUT 200 or CLX ($p < 0.05$).

Regarding the jejunal crypts and the villus/crypt ratio in Figure 11G,H, no significant differences were observed between the 5-FU and the saline group ($p < 0.05$). Additionally, no significant difference was observed between the 5-FU group and the 200 mg/kg RUT and/or CLX groups.

The photomicrographs are presented in Figure 11A–E, demonstrating that 5-FU reduced villi height in addition to impairing villi and crypt architecture, inducing edema, and increasing inflammatory infiltrates when compared to the saline group. Furthermore, RUT 200 mg/kg and/or CLX treatment groups exhibited reduced levels of 5-FU-induced histopathological damage.

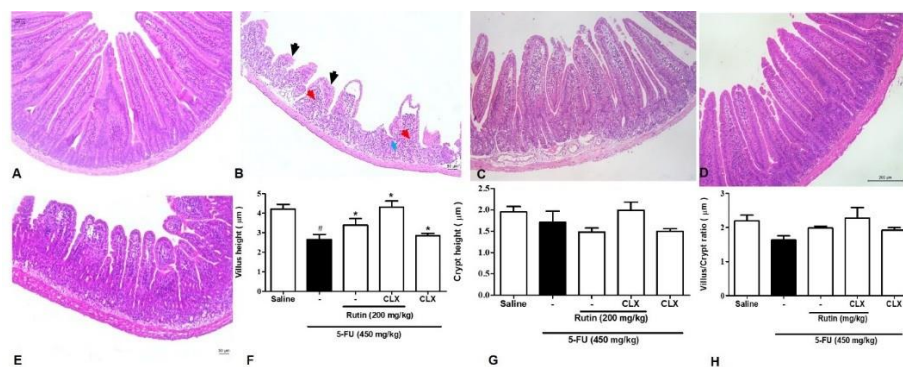


Figure 11. Effect of RUT on the COX-2 pathway evaluated by histopathological and morphometric analysis in jejunal sections. hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed for morphometric and histopathological analysis of tissues after incubation with celecoxib. Saline (A); 5-FU (B); RUT-200 (C); CLX (D); RUT and CLX (E); Height of villi (F); Depth of crypts (G); Villus/Crypt ratio (H). The histopathological issues are indicated by arrows. Inflammatory cell infiltration (red arrow), decreased intestinal villi (black arrow), and loss of intestinal crypt architecture (blue arrow). Values are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by the Tukey test. # $p < 0.05$ vs. saline group, * $p < 0.05$ vs. 5-FU group. 5-FU, 5-fluorouracil; RUT, rutin.

2.8. Immunohistochemistry for the Detection of COX-2 Activity

Using immunohistochemical analyses, we investigated the effects of 200 mg/kg RUT in the presence or absence of CLX on the COX-2 expression levels in 5-FU-induced intestinal mucositis. 5-FU promoted the intense immunostaining of COX-2 (Figure 12B) in the jejunal mucosa when compared with the saline group ($p < 0.05$) (Figure 12A,F). As shown in Figure 12C, pretreatment with 200 mg/kg RUT decreased COX-2 immunostaining when compared with the 5-FU group ($p < 0.05$). Similarly, CLX alone (Figure 12D) or the CLX and RUT 200 mg/kg combination (Figure 12D,E) decreased COX-2 immunostaining in mice presenting 5-FU-induced intestinal mucositis, when compared with the 5-FU group ($p < 0.05$).

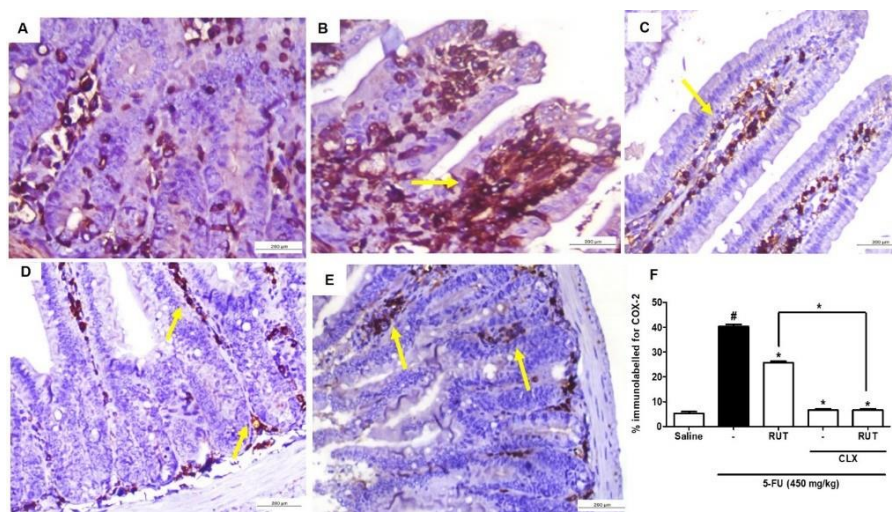


Figure 12. Immunohistochemical analysis of COX-2 expression. Saline (A); 5-FU (B); RUT-200 (C); CLX (D); RUT and CLX (E). % immunolabelled for COX-2 (F). Values are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. # $p < 0.05$ vs. saline group, * $p < 0.05$ vs. group 5-FU.

2.9. Molecular Docking

To investigate the underlying protective mechanisms of RUT against the 5-FU-induced intestinal mucositis, we performed a molecular docking analysis of the potential RUT target sites with COX-1 and COX-2 enzymes. Molecular docking of the RUT complex/COX-1 revealed a binding energy of $-7.28 \text{ Kcal mol}^{-1}$ and inhibition constant of $4.62 \mu\text{M}$. Three hydrogen bond interactions at Gln203, His207, and His388 amino acid sites; the Gln203 residue demonstrated two hydrogen bond interactions at distances of 2.62 and 3.10 Å (Figure 11A). This site revealed the most concentrated molecular interactions of the complex, with high interaction energy near the edge of the active site of the receptor. The amino acids Thr206, Phe210, His386, Tyr385, Ala202, Leu390, Trp387, Met391, Leu298, Leu294, Leu295, Leu408, Ile444, and Val447 participated in the hydrophobic interactions (Figure 13A).

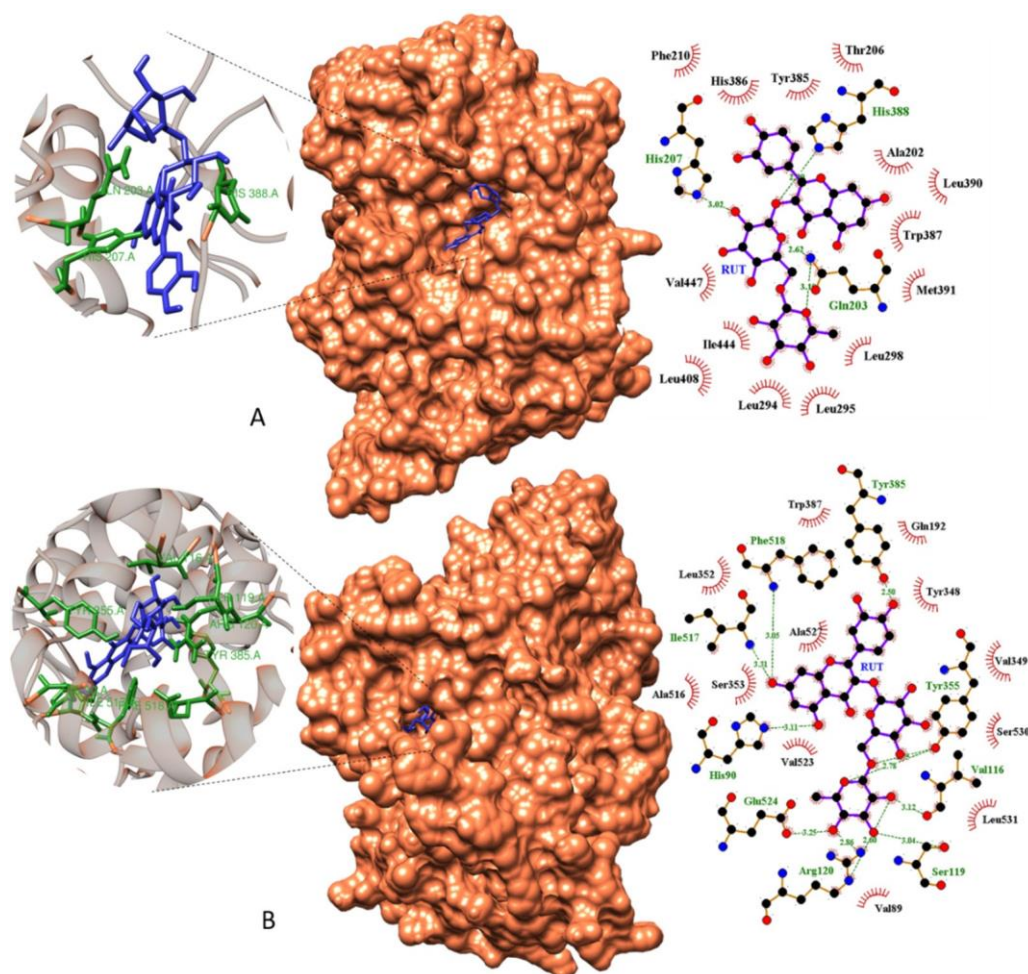


Figure 13. Molecular docking models of RUT with COX-1 (A) and COX-2 (B). Surface docking poses and Ligplot 2D diagrams show details of hydrogen bonds and hydrophobic interactions in complexes RUT/COX-1 (A) and RUT/COX-2 (B). RUT, rutin; COX, cyclooxygenase.

In the biological potency studies, the most attractive target observed was Cox-2, where RUT exhibited a high molecular affinity when coupled to the active site of the receptor, with a $-10.07 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ binding energy and an inhibition constant of 41.682 nM . This molecular affinity was expressed with the nine hydrogen bonds formed in amino acids Arg120, Glu524, His90, Ile517, Phe518, Ser119, Tyr355, Tyr385, and Val116, acting directly at the receptor binding site, which was the most vulnerable Cox-2 site (Figure 13B). The amino acids Trp387, Leu352, Ala516, Ser353, Val523, Ala527, Val89, Leu531, Ser530, Val349, Tyr348, and Gln192 were responsible for the hydrophobic interactions between the receptor and the ligand (Figure 13B).

3. Discussion

The assignments of Infrared Absorption Spectroscopy (FTIR) and ^1H and ^{13}C -NMR suggested that RUT was the main flavonoid extracted from the beans of *D. gardneriana*. On the other hand, the two endothermic peaks shown in the DSC curve can be justified by the occurrence of polymorphisms in the crystalline structure of the RUT, as reported in the literature [34]. However, the isolation of RUT as a major compound was only confirmed with HPLC, based on retention time and UV-Vis spectrum data. The results obtained are in line with those reported by other authors [35,36].

Flavonoids represent a highly diverse class of secondary metabolites, with various biological activities demonstrating beneficial properties on the gastrointestinal system, such as antispasmodic, antisecretory, antidiarrheal, and antiulcer properties [17,18,37]. In the present study, we reported the effects of RUT on 5-FU-induced intestinal mucositis, demonstrating that 200 mg/kg RUT could reverse the deleterious effects of an antineoplastic agent, 5-FU, on the intestines, including oxidative damage, neutrophil recruitment, mastocytosis, depletion of goblet cells, and histological and morphometric alterations.

During 5-FU chemotherapy, weight loss is considered a common side effect. Therefore, body mass assessment is one of the parameters evaluated daily to assess whether intestinal mucositis was induced by 5-FU. Similar to our results, previous studies have reported a decrease in animal body weight following 5-FU-induced intestinal mucositis [38–40]. In the present study, we demonstrated that RUT failed to reverse the weight loss induced by 5-FU. Furthermore, weight loss is a side effect that activates inflammatory responses followed by gastrointestinal dysfunction [41]. Therefore, RUT could prevent morphophysiological changes in mucositis by mechanisms independent of weight loss. Histopathological alterations, such as decreased villi height, crypt necrosis, edema, vacuolization, inflammatory infiltrates, and loss of architecture, are typically reported as adverse effects of 5-FU. In the present study, we demonstrated the histological changes stated above following the induction of intestinal mucositis in mice. Furthermore, RUT prevented histopathological alterations at the 200 mg/kg dose. The protective abilities of RUT in the gastrointestinal tract have been reported in the literature [42,43] at doses similar to those used in the present study, corroborating the results obtained. In addition to the histopathological alterations, myelosuppression in the form of leukopenia is atypical adverse effect reported extensively following the use of antineoplastic agents. In the present study, 5-FU induced intense leukopenia, as reported by Soares et al. [44] and Quaresma [45], following single-dose 5-FU (450 mg/kg) administration; however, RUT could reverse the adverse effects at all test doses.

Flavonoids act via different mechanisms to attenuate the damaging effects of mucositis. Regarding the MPO concentrations, we observed that RUT prevented increased MPO levels in the jejunum induced by 5-FU treatment. Similarly, Bastos et al. [46], Justino et al. [47], and De Ávila et al. [48] have reported increased MPO activity following the induction of intestinal mucositis using 5-FU. MPO has been used as a quantitative marker of neutrophil infiltration in various organs, including the gastrointestinal tract. Moreover, the inflammatory properties in other lesion models in the gastrointestinal tract, as well as different systems, have reported the anti-inflammatory potential of RUT [42,49–51].

RUT, like many flavonoids, has demonstrated antioxidant properties [52], in addition to the ability to relieve oxidative stress in biological systems. We observed that RUT exhibited antioxidant effects against intestinal mucositis, increasing GSH levels and decreasing MDA levels in mice presenting 5-FU-induced intestinal mucositis; this was consistent with the findings of previous studies that demonstrated that RUT exerts antioxidant effects by decreasing MDA levels [53,54] and increasing GSH and superoxide dismutase levels [55–57].

In addition to causing an antioxidant imbalance and exacerbating inflammation, mucositis promotes the disorganization of tissue architecture and, in turn, alters the proportions of intestinal mucosa resident cells, such as mast cells and goblet cells, which are critical for the maintenance of intestinal epithelial homeostasis.

In the present study, RUT reversed the increase in mast cell numbers induced by 5-FU. Flavonoids act via several mechanisms of action, and as reported in previous studies, this class of biomolecules can interfere with the release of histamine and proton pump activity, as is the case with quercetin [17].

Mast cells are powerful immunological modulators of the tissue microenvironment, which act in a distinct manner, depending on the nature of surface receptors and mediators involved. They facilitate gastrointestinal homeostasis, through immune protection, regulation of the architecture and permeability of the epithelial barrier, and remodeling of mucous tissue, by stimulating fibroblast growth [58]. Conversely, they are considered critical in the pathogenesis of inflammatory processes based on their overexpression, which amplifies the inflammatory response due to the selective release of mediators [59,60]. When activated, the cells release a variety of biologically active products, followed by a wave of synthesis and secretion from the mediator [61]. Consequently, by attenuating the increase in mast cell count, the protective effect of RUT was evident in intestinal mucosa and submucosa lesions induced by 5-FU. The data are consistent with results presented by De Miranda et al. [62], where a decrease in mast cells was observed following the administration of troxerutin, a flavonoid derived from RUT, in mice with 5-FU-induced intestinal mucositis.

In the present study, a decrease was observed in the number of goblet cells induced by 5-FU when compared to the saline group. Additionally, RUT attenuated goblet cell loss in the intestinal mucosa. Carneiro-Filho et al. [63], Stringer et al. [64], and Gawish et al. [65] have reported that chemotherapy with 5-FU mainly causes a marked disturbance in the membranes at brush borders and absorptive dysfunction, largely due to a decrease in the number of goblet cells in the intestinal mucosa. In addition to the absorptive dysfunction induced by 5-FU, a decrease in the number of goblet cells and deregulation mucus release occurs, which, in turn, would result in the depletion of mucus storage by residual goblet cells, as well as premature stem cell death, which reflects the renewal of all cell lines, including goblet cell lines, as reported by Gawish et al. [65]. Consequently, RUT potentially promotes mucosal protection by attenuating goblet cell loss and enhancing the integrity of the mucous barrier and its absorptive capacity.

In gastrointestinal disorders, the therapeutic effects of flavonoids are largely attributed to their antioxidant and anti-inflammatory properties. In terms of anti-inflammatory activity, flavonoids can inhibit cyclic adenosine monophosphate and COX activity, as well as protein phosphorylation [66–70]. In the case of RUT, its anti-inflammatory effects have been attributed to its capacity to suppress the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), as well as its ability to activate nuclear factor B (NF-kB) and extracellular kinases [71]. Therefore, in the molecular docking and histopathological analyses performed to investigate the interaction between RUT and CLX, and COX-1 and 2 enzymes, RUT stably bound to the target sites of COX-2 and COX-1 (in decreasing order of interaction, respectively).

In the histological analysis, in addition to observing that RUT (200 mg/kg) reversed the deleterious effects of 5-FU, CLX reversed villi shortening and increased the villus/crypt ratio. Furthermore, pretreatment with RUT in combination with CLX led to a superior reversal of the morphometric alterations than with pretreatment with RUT (200 mg/kg) or CLX individually. In COX-2 immunohistochemistry analyses, a decrease in the proportion of immunostaining was observed following treatment with RUT, CLX, and RUT in combination with CLX.

Considering that COX-2 plays a key role in the management of inflammation through the release of arachidonic acid, and, in turn, eicosanoid biosynthesis, as an example of a prostaglandin involved in various immune and inflammatory responses, the results obtained in the present study are consistent with our understanding of CLX and COX-2 functions against intestinal inflammatory disorders. According to Short et al. [72], low CLX doses could be therapeutically utilized to protect the intestinal barrier in patients with inflammatory bowel disorders, owing to its capacity to reduce COX-2 expression. Javle et al. [73] have reported that a combination of irinotecan and CLX has demonstrated antitumor effects, with an improvement in irinotecan-induced diarrhea and mortality. Additionally, RUT (200 mg/kg) monotherapy or in combination with CLX could decrease 5-FU-induced

COX-2 expression in the jejunum. The results observed in the present study are consistent with the findings of Gawish et al. [65], who observed that RUT could inhibit the enzymatic activity of COX-1, COX-2, and 15-lipoxygenase (15-LOX) with 75.63, 81.00, and 80.43% inhibition, respectively. Therefore, they proposed that the pharmacological action of RUT in 5-FU-induced intestinal mucositis occurs as illustrated in Figure 14.

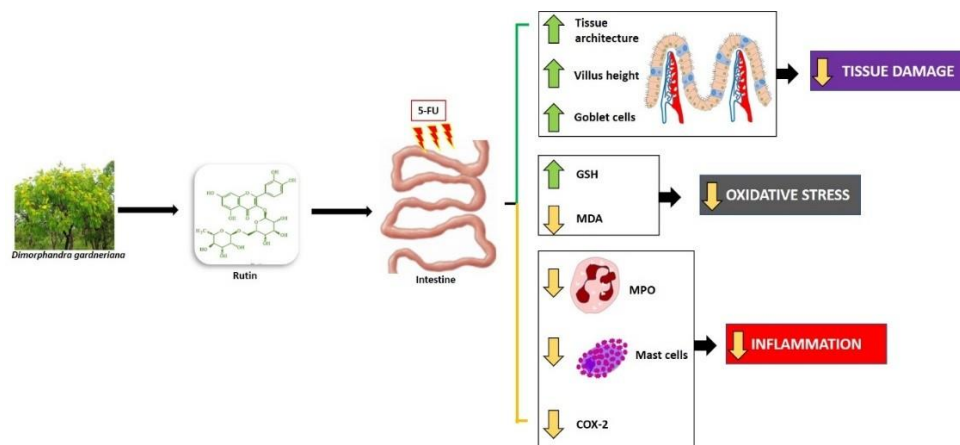


Figure 14. Hypothetical chemopreventive effect of RUT in intestinal mucositis induced by 5-FU. RUT prevents intestinal inflammation by inhibiting MDA, MPO, COX-2, oxidative stress, mastocytosis. RUT also stimulates increased villi and increased levels of the antioxidant GSH. RUT, Rutin; COX-2, Cyclooxygenase 2; MDA, Malondialdehyde; MPO, Myeloperoxidase; GSH, Reduced Glutathione. Green arrows (stimulate/increase), yellow arrows (inhibit).

As observed in our work, other studies investigating the effect of flavonoids such as luteolin, quercetin and troxerutin on intestinal mucositis promoted by antineoplastic agents, indicated, among the possible causes of protective and therapeutic effect, the anti-inflammatory, antioxidant and inhibition properties of apoptosis, and consequently the ability to promote tissue recovery [62,74,75].

4. Materials and Methods

4.1. Extraction and Characterization of the RUT Flavonoid

D. Gardneriana beans were collected in the city of Crato in the state of Ceará, Brazil. The aerial parts of plants were deposited at the Prisco Bezerra Herbarium under the accession number 32339. RUT was extracted from the *D. Gardneriana* beans and characterized according to Vila-Nova et al. [76].

D. Gardneriana beans (150 g) were added to a Soxhlet extractor and RUT was extracted with hexane, ethyl acetate, methanol, and water. The solvents were concentrated in a rotary evaporator. Hexane (0.38 g), ethyl acetate (4.47 g), methanol (47.53 g), and aqueous (8.49 g) extracts were obtained. After extract analysis using TLC, the ethyl acetate and methanol extracts were combined and dispersed in 200 mL of cold water. After stirring, the mixture was filtered and the resulting residue was washed with an additional 100 mL of water. After filtering again, the residue was dried in a 100 °C oven, yielding 18.0 g of a yellow powder. The material was subjected to column chromatography on a silica gel column, and then eluted with mixtures of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol with increasing polarity. The fractions were collected and compared by TLC. This method resulted in the purification of 12.42 g of RUT. Spectral data were compared to those found in the literature [77].

4.1.1. Infrared Absorption Spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectrum was obtained with a Vertex 70v spectrometer, Bruker (San Diego, CA, USA), using KBr tablets, in a spectral region between 4000 and 500 cm^{-1} , with a resolution of 2 cm^{-1} from 128 scans.

4.1.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Approximately 5.0 mg of RUT was weighed and added to a hermetically sealed aluminum pan. The analysis was carried out under the following conditions: nitrogen atmosphere with flow rate of 50 mL min⁻¹, heating ramp from 25 to 500 °C and heating rate of 10 °C min⁻¹ in a DSC 50 Shimadzu equipment (Kyoto, Japan).

4.1.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

The ¹³C-NMR and ¹H-NMR data were obtained using the Fourier transform Bruker Avance-DRX 500 spectrometer (San Diego, CA, USA), equipped with an inverse detection probe operating at a frequency of 125 MHz (¹³C) and 499.9 MHz (¹H). The experiment was performed by dissolving 20.0 mg of RUT in 0.6 mL of deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-D₆). The analysis was carried out in 5 mm tubes and the chemical shifts (δ) were expressed in ppm.

4.1.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Chromatographic analysis of RUT was performed using a Shimadzu LC-10AD pump (Kyoto, Japan), Shimadzu SPD-M10AVP (Kyoto, Japan) photodiode array detector. The methodology proposed by [35] with some modifications was used. The mobile phase was prepared using an isocratic system, consisted of a solution of acetonitrile/phosphoric acid pH 3 (20:80, *v/v*), which was injected in a flow of 1.2 mL min⁻¹ at a temperature of 40 °C. For the determination of RUT, a wavelength of 350 nm and a HIBAR chromatographic column (250 × 4.6 mm, 5 μ m) were used. It was possible to determine the purity of RUT by normalizing the area, as well as identifying it through the scanning spectrum in the UV-Vis region and retention time.

4.2. Drugs and Reagents

Two drugs were used for mucositis induction and treatment, respectively: 5-FU (FauldFluor[®], Libbs, São Paulo, Brazil) celecoxib (CLX-Celebra[®], Pfizer, São Paulo, Brazil). RUT was dissolved in distilled water with Tween 20 (1%) before use. All drugs and reagents were prepared immediately before use.

4.3. Animals

The animals were obtained from the Department of Surgery at the Federal University of Ceará (UFC). Male Swiss mice (25–30 g) were housed in polypropylene cages, lined with wood, in a controlled environment with a temperature of 23 ± 2 °C, at a 12 h light/12 h dark cycle, with free access to water and standard feed. The procedures and experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) under number 6595260719.

4.4. Experimental Protocol of 5-FU-induced Intestinal Mucositis

The experimental model of intestinal mucositis was established using Swiss mice as described by De Miranda et al. [62]. 5-FU (450 mg/kg) was administered intraperitoneally (i.p) as a single dose on the first day of the experimental protocol. To evaluate the effective dose of RUT against 5-FU-induced morphological changes, 50, 100, and 200 mg/kg RUT were administered orally on the first, second, and third days, respectively. The first dose of RUT was administered 1 h before 5-FU injection, whereas, the second and third doses were administered 24 and 48 h after 5-FU injection, respectively. On the fourth day of the experimental protocol, the animals were euthanized using an anesthetic overdose of ketamine and xylazine (270 and 15 mg/kg, respectively). Intestinal samples were collected. To confirm the experimental model of 5-FU induced intestinal mucositis, mice body weights were assessed daily before the administration of treatment. In the current study, RUT doses were considered in accordance with those in previously published studies [42,65,78–80].

With the analysis of the parameters (weight analysis, histopathological and morphometric), the effective dose of RUT in the treatment of intestinal mucositis and the intestinal segment with the best response to treatment with RUT were determined. Starting from the best dose of RUT (200 mg/kg), the evaluation of the other parameters (mast cell and goblet cell count, MPO, GSH and MDA measurements) was continued, as well as the modulation of the COX-2 pathway.

To investigate the role of COX-2 during RUT treatment in 5-FU-induced intestinal mucositis, COX-2 was blocked by an i.p. injection of 7.5 mg/kg CLX. Starting with the effective dose of RUT (200 mg/kg) for the treatment of intestinal mucositis, a 5-FU mucositis induction protocol was initiated, similar to the first investigation. Here, mice were divided into three treatment groups, i.e., RUT-200 (200 mg/kg orally), CLX (7.5 mg/kg, i.p), and RUT + CLX (RUT: 200 mg/kg orally and CLX: 7.5 mg/kg, i.p), and two control groups, saline and 5-FU. Overall, during the current study, mice were randomly divided to the following groups ($n = 6$ in each group): Saline (0.9% NaCl), 5-FU (450 mg/kg of 5-FU + 0.9% NaCl), RUT-50 (5-FU + 50 mg/kg RUT), RUT-100 (5-FU + 100 mg/kg RUT), RUT-200 (5-FU + 200 mg/kg RUT), CLX (5-FU + 7.5 mg/kg of CLX), and RUT + CLX (5-FU + 200 mg/kg RUT + 7.5 mg/kg CLX).

4.5. Histopathological and Morphometric Analysis

After euthanasia, intestinal samples were collected and fixed in 10% formaldehyde for histopathological and morphometric analysis [44,81]. These samples were embedded in paraffin, sectioned to 4 μm slices, and stained with H&E. A blinded and randomized histopathological analysis was performed by an experienced histopathologist to assess the severity of mucositis using a scoring system [82]. Tissues ranged from 0 (no lesion/normal histological findings) to 3 (maximal grade lesion), indicating shortened villi, vacuolated cells, crypt necrosis, intense inflammatory cell infiltration, vacuolization and edema in the mucous and muscle layers with edema, vacuolization, and neutrophilic infiltrate. The effective dose of RUT for the treatment of intestinal mucositis was determined based on the histological analysis, leukocyte count, and weight measurement.

4.6. MPO Assay

MPO activity was determined by the technique described by Bradley et al. [83]. Briefly, samples from the jejunal segment (50–100 mg), corresponding to the animals in the saline, RUT 200 mg/kg, and 5-FU (50–100 mg) groups, were homogenized in 1 mL potassium buffer containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and centrifuged (4000 rpm, 7 min, 4 °C). MPO activity was analyzed by measuring absorbance at 450 nm using diisocyanate dihydrochloride and 1% hydrogen peroxide in the resuspended pellet. The results were recorded as MPO units per mg of tissue.

4.7. Measurement of GSH and MDA Levels

For estimating GSH and MDA levels, samples from the jejunal segment were obtained from the animals in the saline, RUT-200, and 5-FU groups, and were homogenized in cold EDTA or KCl (1:9, *v/v*) to prepare a 10% homogenate suspension. The GSH levels were estimated according to the method described by Sedlak and Lindsay [84], with minor modifications. Aliquots (400 μL) of homogenized tissue were mixed with 320 μL distilled water and 80 μL trichloroacetic acid (50%, *w/v*) and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant (400 μL) was mixed with 800 μL Tris buffer (0.4 M, pH 8.9), followed by the addition of 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.01 M). GSH absorbance was read at 405 nm and its concentration was expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue. Conversely, lipid peroxidation was determined by assessing the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measured as MDA [85]. The homogenates were incubated at 37 °C for 1 h and added to 400 μL of 35% perchloric acid. The mixture was centrifuged (5000 rpm, 10 min at 4 °C) and 400 μL of 0.6% thiobarbituric acid was added to the supernatant, followed by incubation at 98 °C for 1 h. After cooling, the MDA absorbance was read at 532 nm and its concentration was expressed as nmol/mg tissue.

4.8. Intestinal Mucosa Cell Count: Goblet and Mast Cells

To enable the identification and quantification of mast cells and mucus-secreting cells (goblet), the paraffin blocks with jejunal segment samples, corresponding to the saline, RUT-200, and 5-FU groups, were selected for toluidine blue staining, according to Michalany et al. [86] and periodic acid Schiff (PAS) according to Sano et al. [87]. Staining was performed after de-paraffinization of the slides with xylol, followed by hydration with absolute alcohol, and a series of 90%, 80%, and 70% alcohol dilutions. Then, the slides were washed with distilled water, stained with toluidine blue for 8 min, washed, and dried. For PAS, the slides were incubated in periodic acid, the Schiff reagent, and Carazzi hematoxylin dyes for 1, 10, and 10 min, respectively, followed by successive washing with distilled water, as recommended by EasyPath[®] (Erveigas, Indaiatuba, SP, Brazil). To enumerate mast and goblet cells present on slides, with the aid of an optical microscope and image acquisition system (LEICA, Wetzlar, Germany), digital images were captured for subsequent counting of at least 10 fields, using the ImageJ[®] software version 1.8.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Results represent the average of 10 fields from each group.

4.9. Immunohistochemistry for the Detection of COX-2

The jejunal sections were deparaffinized in an oven at 60 °C, followed by three cycles of xylol immersion for 5 min each. Then, the sections were rehydrated in decreasing alcohol concentrations (100, 90, 80, and 70%). Next, the histological sections were washed with distilled water for 10 min, followed by antigenic recovery in citrate buffer (pH 7.0, DAKO[®], São Paulo, Brazil) for 20 min in a water bath (95 °C). The slides were then washed with phosphate-buffered saline solution (PBS) for 5 min at room temperature. Next, endogenous peroxidase blockade was performed with 3% hydrogen peroxide solution (H₂O₂) for 30 min. The sections were then incubated overnight with goat anti-COX-2 primary antibody (SantaCruz[®], Dallas, TX, USA), diluted in antibody diluent (1:100) for 60 min. After the slides were washed with PBS and incubated with rabbit IgG (GBI Labs[®], Bothell, WA, USA), the secondary antibody was diluted (1:400) for 30 min. For visualization, the sections were incubated with the streptavidin-conjugated peroxidase complex (ABC complex) for 30 min and chromogen 3,30 diaminobenzidine peroxide, DAB (DAKO[®], São Paulo, Brazil), followed by counterstaining with hematoxylin (DAKO[®], São Paulo, Brazil) for 10 min. Simultaneously, negative controls were processed as described above, with the primary antibody replaced with the antibody diluent. The procedures were performed in an automated manner using Autostainer Plus (DAKO[®], São Paulo, Brazil). For the COX-2 immunostaining images, quantification was performed by measuring the % immunolabelled area with the aid of Adobe Photoshop10. All images were captured using an optical microscope and an image acquisition system (LEICA, Wetzlar, HE, Germany).

4.10. Molecular Docking and Determination of RUT Binding Sites

The 3D structures of COX-1 and COX-2 enzyme targets were obtained from the PDB protein database (Protein Data Bank, 2019). Molecular docking calculations were performed using the Autodock 4.2[®] program [88–90]. Proteins and ligands were prepared for molecular docking using the Autodock Tools (ADT) version 1.5.6 program. The receptor was considered rigid, while each ligand was considered flexible. The Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) with global search and pseudo-Solis and Wets with local search methods were used for molecular docking, and 100 independent runs were performed for each simulation [91]. The remaining docking parameters were set to default values. Molecular docking analyses focused on the low-energy clusters, and the conformation with the lowest energy combined with visual inspection was chosen for detailed analysis.

4.11. Statistical Analysis

For parametric distribution, data are expressed as mean \pm SEM; for non-parametric distribution (e.g., histological scores), data are expressed as the median. Data normality was analyzed using the Shapiro–Wilk test.

The results demonstrating a parametric distribution were analyzed using ANOVA, followed by the post hoc Tukey test, using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The data presenting non-parametric distribution were analyzed using the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s test (multiple comparisons). A *p*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

The chemical characterization showed that RUT was the main flavonoid extracted from the *D. gardneriana*'s beans with 97% purity. In summary, RUT prevented functional and inflammatory changes induced by 5-FU in intestinal mucositis, observed as the reversal of histopathological and morphometric changes, oxidative damage, neutrophilic infiltration, mastocytosis, and goblet cell depletion. The effects of RUT are likely to be mainly associated with the COX-2 pathway, directly and indirectly (through the inhibition of transcription factors such as NF- κ B, interleukins, and pro-inflammatory enzymes), based on a decrease in COX-2 immunostaining and molecular docking that revealed the binding affinity between RUT and COX-2 binding sites. However, further studies are required to elucidate the underlying molecular mechanisms of RUT effects following the expression of pro-inflammatory cytokines, in addition to evaluating other potential mechanisms by which RUT prevents chemotherapy-induced intestinal mucositis.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments, L.d.S.F., J.A.L.d.M., C.d.S.M., N.M.P.S.R., M.E.N.P.R., G.A.d.C.B., and G.S.C.; performed the experiments, L.d.S.F., J.A.L.M., C.d.S.M., M.L.L.B., J.E.F.B., H.B.P., S.d.O.F., M.A.S.S., P.V.d.S.P., C.S.T., A.G.S., J.A.R., J.L.A., and I.G.P.V.; analyzed the data, L.d.S.F., J.A.L.M., M.E.N.P.R., G.A.d.C.B. and G.S.C.; wrote the paper, L.d.S.F., J.A.L.M., J.A.R., P.M.d.M.C., M.d.S.C., M.L.L.B., and G.S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES)–Finance Code 001 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank CNPq for the research grant (N.M.P.S.R.-No307837/2017-3) and appreciate the financial support from MCTI/CNPq/Universal (M.E.N.P.R.-No424179/2016-4).

Acknowledgments: This research was supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico–FUNCAP. The authors are thankful to the department of Microscopy and Image Processing Core (NEMPI) and to the Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) at Federal University of Ceará and the Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/CAPES for the support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chabner, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*, 12th ed.; Bruton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C., Eds.; McGraw-Hill Interamericana: Rio de Janeiro, Brazil, 2012; pp. 1667–1676.
2. Thomas, S.A.; Tomeh, N.; Theard, S. Fluorouracil-induced Hyperammonemia in a Patient with Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 6761–6764. [[PubMed](#)]
3. Rajinikanth, P.S.; Chellian, J. Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5067–5077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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 Opin. Drug Deliv.* **2017**, *14*, 307–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. 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.* **2016**, *39*, 617–629. [[CrossRef](#)]

6. Chang, C.-T.; Ho, T.-Y.; Lin, H.; Liang, J.-A.; Huang, H.-C.; Li, C.-C.; Lo, H.-Y.; Wu, S.-L.; Huang, Y.-F.; Hsiang, C.-Y. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Udofot, O.; Aram, K.; Bridgette Israel, E.A. Cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines. *Integr. Cancer Sci. Ther.* **2015**, *2*, 245–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wilhelm, M.; Mueller, L.; Miller, M.C.; Link, K.; Holdenrieder, S.; Bertsch, T.; Kunzmann, V.; Stoetzer, O.J.; Suttman, I.; Braess, J. Prospective, multicenter study of 5-fluorouracil therapeutic drug monitoring in metastatic colorectal cancer treated in routine clinical practice. *Clin. Colorectal. Cancer* **2016**, *15*, 381–388. [[CrossRef](#)]
9. 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* **2016**, *24*, 1609–1616. [[CrossRef](#)]
10. 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.* **2015**, *76*, 269–277. [[CrossRef](#)]
11. Kobuchi, S.; Ito, Y.; Sakaeda, T. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2017**, *42*, 707–718. [[CrossRef](#)]
12. Peterson, D.E.; Bensadoun, R.J.; Roila, F. ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 78–84. [[CrossRef](#)]
13. Mercadante, S.; Aielli, F.; Adile, C.; Ferrera, P.; Valle, A.; Fusco, F.; Caruselli, A.; Cartoni, C.; Massimo, P.; Masedu, F. Prevalence of oral mucositis, dry mouth, and dysphagia in advanced cancer patients. *Support. Care Cancer* **2015**, *23*, 3249–3255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, H.J.; Kim, J.H.; Moon, W.; Park, J.; Park, S.J.; Am Song, G.; Han, S.H.; Lee, J.H. Rebamipide attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in a mouse model. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 179–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. De Araújo, A.A.; Borba, P.B.; De Souza, F.H.D.; Nogueira, A.C.; Saldanha, T.S.; Araújo, T.E.F.; Da Silva, A.I.; 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. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 746–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ahmad, B.A.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. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 80–90. [[CrossRef](#)]
17. Mota, K.S.L.L.; Dias, G.E.N.; Pinto, M.E.F.; Luiz-ferreira, A.; Souza-brito, A.R.M.; Lima, C.A.H.; Batista, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* **2009**, *14*, 979–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rokaya, M.B.B.; Uprety, Y.; Poudel, R.C.; Timsina, B.; Münzbergová, Z.; Asselin, H.H.; Sigdel, S.R. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *158*, 221–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
20. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *150*, 248–257. [[CrossRef](#)]
21. Montano, H.G.; Silva, G.S.; Rocha, R.C.; Jimenez, N.Z.A.; Pereira, R.C.; Brioso, P.S.T. Phytoplasma in “fava d’anta” tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. *Bull. Insectology* **2007**, *60*, 147–148.
22. Gonçalves, A.C.; Reis, C.A.F.; Vieira, F.A.; Carvalho, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região Norte de Minas Gerais, Brasil. *Braz. J. Bot.* **2010**, *33*, 325–332. [[CrossRef](#)]
23. Kamel, R.; Mostafa, D.M. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *153*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mascaraque, C.; Aranda, C.; Ocón, B.; Monte, M.J.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; De Medina, F.S. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4⁺ CD62L⁺ T cell transfer model of colitis. *Pharmacol. Res.* **2014**, *90*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Fernandes, A.A.H.; Novelli, E.L.B.; Okoshi, K.; Okoshi, M.P.; Di Muzio, B.P.; Guimarães, J.F.C.; Junior, A.F. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, 214–219. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
26. Khan, R.A.; Khan, M.R.; Sahreen, S. CCl₄-induced hepatotoxicity: Protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 178. [[CrossRef](#)]
27. Hafez, M.M.; Al-Harbi, N.O.; Al-Hoshani, A.R.; Al-Hosaini, K.A.; Al Shrari, S.D.; Al Rejaie, S.S.; Al-Shabanah, O.A. Hepato-protective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Biol. Res.* **2015**, *48*, 30. [[CrossRef](#)]
28. Guerrero, C.P.; Martin, M.J.; Marhuenda, E. Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: Role of endogenous prostaglandins. *Gen. Pharmacol.* **1994**, *25*, 575–580. [[CrossRef](#)]
29. La Casa, C.; Villegas, I.; De La Lastra, C.A.; Motilva, V.; Calero, M.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 45–53. [[CrossRef](#)]
30. Vu, H.T.; Hook, S.M.; Siqueira, S.D.; Müllertz, A.; Rades, T.; McDowell, A. Are phytosomes a superior nanodelivery system for the antioxidant rutin? *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 82–91. [[CrossRef](#)]
31. Deepika, M.S.; Thangam, R.; Sakthidhasan, P.; Arun, S.; Sivasubramanian, S.; Thirumurugan, R. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Food Control* **2018**, *90*, 282–294. [[CrossRef](#)]
32. Xiao, Y.M.; Mao, P.; Zhao, Z.; Yang, L.R.; Lin, X.F. Regioselective enzymatic acylation of troxerutin in non aqueous medium. *Chin. Chem. Lett.* **2010**, *21*, 59–62. [[CrossRef](#)]
33. Xu, J.D.; Zhang, L.W.; Liu, Y.F. Synthesis and antioxidant activities of flavonoids derivatives, troxerutin and 3', 4', 7-triacetoxyethoxy quercetin. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, *24*, 223–226. [[CrossRef](#)]
34. Costa, E.M.; Filho, J.M.B.; Nascimento, T.G.; Macedo, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochim. Acta* **2002**, *392–393*, 79–84. [[CrossRef](#)]
35. Satinsky, D.; Jägerová, K.; Havlíková, L.; Solich, P. A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology. *Food Anal. Methods* **2013**, *6*, 1353–1360. [[CrossRef](#)]
36. Landim, L.P.; Feitoza, G.S.; Costa, J.G.M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, *23*, 58–64. [[CrossRef](#)]
37. Ruiz-Cruz, S.; Chaparro-Hernández, S.; Hernández-Ruiz, K.L.; Cira-Chávez, L.A.; Estrada-Alvarado, M.I.; Ortega, L.E.G.; Mata, M.A.L. Flavonoids: Important biocompounds in food. In *Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health*; Justino, J.G., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 353–369.
38. Yeung, C.Y.; Chan, W.T.; Jiang, C.B.; Cheng, M.L.; Liu, C.Y.; Chang, S.W.; Lee, H.C. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138746. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
39. Carvalho, R.D.; Breyner, N.; Menezes-Garcia, Z.; Rodrigues, N.M.; Lemos, L.; Maioli, T.U.; Chatel, J.M. Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 27. [[CrossRef](#)]
40. Li, Y.; Liu, M.; Zuo, Z.; Liu, J.; Yu, X.; Guan, Y.; Sun, R. TLR9 regulates the NF- κ B-NLRP3-IL-1 β pathway negatively in salmonella-induced NKG2D-mediated intestinal inflammation. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 761–773.
41. Song, M.K.; Park, M.Y.; Sung, M.K. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *J. Cancer Prev.* **2013**, *18*, 322. [[CrossRef](#)]
42. Gautam, R.; Singh, M.; Gautam, S.; Rawat, J.K.; Saraf, S.A.; Kaithwas, G. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 99. [[CrossRef](#)]
43. 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. *Int. J. Pharmacol.* **2018**, *14*, 1136–1144. [[CrossRef](#)]
44. 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* **2013**, *61*, 46–49. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]

45. Quaresma, M.; Damasceno, S.; Monteiro, C.; Lima, F.; Mendes, T.; Lima, M.; Soares, P. Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutr. Cancer* **2019**, 1–11. [[CrossRef](#)]
46. Bastos, C.C.C.; De Ávila, P.H.M.; Dos Santos Filho, E.X.; De Ávila, R.I.; Batista, A.C.; Fonseca, S.G.; Valadares, M.C. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. *Toxicol. Rep.* **2016**, *3*, 279–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Justino, P.F.; Melo, L.F.; Nogueira, A.F.; Costa, J.V.; Silva, L.M.; Santos, C.M.; Ribeiro, R.A. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1611–1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. De Ávila, P.H.M.; De Ávila, R.I.; Dos Santos Filho, E.X.; Bastos, C.C.C.; Batista, A.C.; Mendonça, E.F.; Valadares, M.C. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 563–573. [[CrossRef](#)]
49. Comalada, M.; Camuesco, D.; Sierra, S.; Ballester, I.; Xaus, J.; Gálvez, J.; Zarzuelo, A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 584–592. [[CrossRef](#)]
50. Patel, K.; Patel, D.K. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 457–479.
51. Rabiskova, M.; Bautzova, T.; Dvorackova, K.; Spilkova, J. Beneficial effects of rutin, quercitrin and quercetin on inflammatory bowel disease. *Ces. Slov. Farm* **2009**, *58*, 47–54.
52. Yang, J.; Guo, J.; Yuan, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *Lebenson Wiss Technol.* **2008**, *41*, 1060–1066. [[CrossRef](#)]
53. Azevedo, M.I.; Pereira, A.F.; Nogueira, R.B.; Rolim, F.E.; Brito, G.A.; Wong, D.V.T.; Vale, M.L. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol. Pain* **2013**, *9*, 1744–8069. [[CrossRef](#)]
54. Nassiri-Asl, M.; Naserpour Farivar, T.; Abbasi, E.; Sadeghnia, H.R.; Sheikhi, M.; Lotfizadeh, M.; Bazahang, P. Effects of rutin on oxidative stress in mice with kainic acid-induced seizure. *J. Integr. Med.* **2013**, *11*, 337–342. [[CrossRef](#)]
55. Erdogan, E.; Ilgaz, Y.; Gurgor, P.N.; Oztas, Y.; Topal, T.; Oztas, E. Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cir. Bras.* **2015**, *30*, 778–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. AlDrak, N.; Abudawood, M.; Hamed, S.S.; Ansar, S. Effect of rutin on proinflammatory cytokines and oxidative stress in toxin-mediated hepatotoxicity. *Toxin Rev.* **2018**, *37*, 223–230. [[CrossRef](#)]
57. Nkpaa, K.W.; Onyeso, G.I. Rutin attenuates neurobehavioral deficits, oxidative stress, neuro-inflammation and apoptosis in fluoride treated rats. *Neurosci. Lett.* **2018**, *682*, 92–99. [[CrossRef](#)]
58. Hamilton, M.J.; Frei, S.M.; Stevens, R.L. The multifaceted mast cell in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 2364–2378. [[CrossRef](#)]
59. De Winter, B.Y.; Van den Wijngaard, R.M.; De Jonge, W.J. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 66–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Theoharides, T.C.; Alysandratos, K.D.; Angelidou, A.; Delivanis, D.A.; Sismanopoulos, N.; Zhang, B.; Kalogeromitros, D. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 21–33. [[CrossRef](#)]
61. Bulfone-Paus, S.; Nilsson, G.; Draber, P.; Blank, U.; Levi-Schaffner, F. Positive and negative signals in mast cell activation. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 657–667. [[CrossRef](#)]
62. De Miranda, J.A.L.; Martins, C.D.S.; Fideles, L.D.S.; Barbosa, M.L.L.; Barreto, J.E.F.; Pimenta, H.B.; Dos Santos Luciano, M.C.; Cerqueira, G.S. Troxerutin Prevents 5-Fluorouracil Induced Morphological Changes in the Intestinal Mucosa: Role of Cyclooxygenase-2 Pathway. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 10. [[CrossRef](#)]
63. 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. *Dig. Dis. Sci.* **2004**, *49*, 65–72. [[CrossRef](#)]
64. Stringer, A.M.; Gibson, R.J.; Logan, R.M.; Bowen, J.M.; Yeoh, A.S.; Hamilton, J.; Keefe, D.M. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp. Biol. Med.* **2009**, *234*, 430–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gawish, S.; Omar, N.; Sarhan, N. Histological and ultrastructural study of 5-fluorouracil induced small intestinal mucosal damage in rats. *Asian J. Cell Biol.* **2013**, *8*, 1–21. [[CrossRef](#)]

66. Vezza, T.; Rodríguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Utrilla, M.P.; Rodríguez-Cabezas, M.E.; Galvez, J. Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review. *Nutrients* **2016**, *8*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Da Silva, V.C.; De Araújo, A.A.; Araújo, D.F.D.S.; Lima, M.C.J.S.; Vasconcelos, R.C.; de Araújo Júnior, R.F.; Guerra, G.C.B. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of the Aqueous Extract from *Ipomoea asarifolia* in DNBS-Induced Colitis in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zaragozá, C.; Villaescusa, L.; Monserrat, J.; Zaragozá, F.; Álvarez-Mon, M. Potential Therapeutic Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Dihydroflavones, Flavones, and Flavonols. *Molecules* **2020**, *25*, 1017. [[CrossRef](#)]
69. Zhang, Q.Y.; Wang, F.X.; Jia, K.K.; Kong, L.D. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1253. [[CrossRef](#)]
70. Sangeetha, K.S.; Umamaheswari, S.; Reddy, C.U.M.; Kalkura, S.N. Flavonoids: Therapeutic potential of natural pharmacological agents. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2016**, *7*, 3924. [[CrossRef](#)]
71. Rodrigues, K.; Chibli, L.A.; Santos, B.; Temponi, V.S.; Pinto, N.C.; Scio, E.; Sousa, O.V. Evidence of bioactive compounds from *Vernonia polyanthes* leaves with topical anti-inflammatory potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1929. [[CrossRef](#)]
72. Short, S.S.; Wang, J.; Castle, S.L.; Fernandez, G.E.; Smiley, N.; Zobel, M.; Ford, H.R. Low doses of celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis. *Lab. Investig.* **2013**, *93*, 1265–1275. [[CrossRef](#)]
73. Javle, M.M.; Cao, S.; Durrani, F.A.; Pendyala, L.; Lawrence, D.D.; Smith, P.F.; Rustum, Y.M. Celecoxib and mucosal protection: Translation from an animal model to a phase I clinical trial of celecoxib, irinotecan, and 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 965–971. [[CrossRef](#)]
74. Sukhotnik, I.; Moati, D.; Shaoul, R.; Loberman, B.; Pollak, Y.; Schwartz, B. Quercetin Prevents Small Intestinal Damage and Enhances Intestinal Recovery During Methotrexate-Induced Intestinal Mucositis of Rats. *Food Nutr. Res.* **2018**, *62*, e1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Boeing, T.; de Souza, P.; Speca, S.; Somensi, L.B.; Mariano, L.N.B.; Cury, B.J.; Dos Anjos, M.F.; Quintão, N.L.M.; Dubuqoy, L.; Desreumax, P.; et al. Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 2393–2408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Vila-Nova, N.S.; Morais, S.M.; Falcão, M.J.; Bevilaqua, C.M.; Rondon, F.; Wilson, M.E.; Andrade, H.F. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2012**, *32*, 1164–1168. [[CrossRef](#)]
77. Agrawal, P.K.; Bansal, M.C. Flavonoid Glycosides. In *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, 1st ed.; Agrawal, P.K., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1989.
78. Jeong, C.S. Evaluation for Protective Effect of Rutin, a Natural Flavonoid, against HCl/Ethanol-Induced Gastric Lesions. *Biomol. Ther.* **2009**, *17*, 199–204. [[CrossRef](#)]
79. Abdel-Raheem, I.T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *107*, 742–750. [[CrossRef](#)]
80. Hussein, S.A.; Zaid, O.A.A.; Abdel-Maksoud, H.A.; Khadija, A.A. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of rutin on 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in rats. *BVM J.* **2014**, *27*, 208–220.
81. Dos Santos Filho, E.X.; Ávila, P.H.M.; Bastos, C.C.C.; Batista, A.C.; Naves, L.N.; Marreto, R.N.; Lima, E.M.; Mendonca, E.F.; Valadares, M.C. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. *Toxicol. Rep.* **2016**, *3*, 55–62. [[CrossRef](#)]
82. MacPherson, B.; Pfeiffer, C. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* **1978**, *17*, 135–150. [[CrossRef](#)]
83. Bradley, P.P.; Priebe, D.A.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206–209. [[CrossRef](#)]
84. Sedlak, J.; Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **1968**, *25*, 192–205. [[CrossRef](#)]
85. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358. [[CrossRef](#)]
86. Michalany, J. *Histological Technique Pathological Anatomy: With Instructions for the Surgeon, Nurse, Cytotechnician*, 3rd ed.; Michalany: São Paulo, Brazil, 2008.
87. 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. *J. Physiol. Pharmacol.* **2017**, *68*, 79–90. [[PubMed](#)]
88. Goodsell, D.S.; Morris, G.M.; Olson, A.J. Automated docking of flexible ligands: Applications of autodock. *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 1–5. [[CrossRef](#)]

89. Goodsell, D.S. Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock. In *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, Golemis, E.A., Adams, P.D., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2005.

90. Morris, G.M.; Huey, R.; Olson, A.J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. In *Current Protocols in Bioinformatics*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008.

91 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. *J. Mol. Model.* **2012**, *18*, 4013–4024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the main compounds are available from the authors.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo avaliamos o efeito do flavonoide rutina (RUT) na mucosite intestinal experimental induzida pelo antineoplásico 5-FU em camundongos, e pode-se concluir que RUT atenuou o dano histológico (característico na mucosite intestinal) e impediu alterações funcionais e inflamatórias induzidas por 5-FU, como dano oxidativo, infiltração neutrofílica, mastocitose e depleção de células caliciformes. Propõem-se que os efeitos da RUT estejam associados à via da COX-2, direta e indiretamente (através da inibição de fatores de transcrição como NF- κ B, interleucinas e enzimas pró-inflamatórias), com base na diminuição da COX-2 imunomarcagem e acoplamento molecular que revelaram a afinidade de ligação entre os locais de ligação RUT e COX-2. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes dos efeitos da RUT após a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de avaliar outros mecanismos potenciais pelos quais a RUT impede a mucosite intestinal induzida pela quimioterapia.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, LUCIANA NALONE. Contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 5, n. 2, p. 119, 2019.
- ARIFA, R.D.N.; MADEIRA, M.F.M.; PAULA, T.P.; LIMA, R.L. et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through il-1b and il-18 in mice. **The American Journal of Pathology**, v.184, n. 7, 2014.
- ATANASOV, A. G., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E. M., LINDER, T., WAWROSCH, C., UHRIN, P., ROLLINGER, J. M. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do Metotrexato na resposta citotóxica de células mononucleares periféricas do sangue**. Programa de Pós-graduação em Farmacologia (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. 82p.
- BASTOS MOURA, J. F., MOTA, J. M. S. C., LEITE, C. A. V., WONG, D. V. T., BEZERRA, N. P., BRITO, G. A. D. C., RIBEIRO, R. A. A novel model of megavoltage radiation-induced oral mucositis in hamsters: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. **International journal of radiation biology**, v. 91, n. 6, p. 500-509, 2015.
- BASTOS, C.C.C., ÁVILLA, P.H.M., SANTOS FILHO, E.X.,ÁVILLA, R.I.,BATISTA,A.C.,FONSECA, S.G.,LIMA, E.M., MARRETO,R.N., MENDONÇA, E.F.,VALADARES, M.C.Use of *Bidens pilosa* L.(Asteraceae) and *Curcuma longa* L.(Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 279-287, 2016.
- BECHO, J. R. M., MACHADO, H., DE OLIVEIRA GUERRA, M. Rutina—estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2009.
- BELARMINO FILHO, J. N. **Modulação da resposta inflamatória com Dexametasona reverte a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. Programa de Pós-graduação em Farmacologia (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010. 93f.
- BHATTACHARYYA, A. et al. 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.

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.

BRESSAN, A. L., FONTENELLE, E., SILVA, R. S., GRIPP, A. C. Imunossupressores na Dermatologia. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 1, p. 9-22, 2010.

CARDANI, D., SARDI, C., LA FERLA, B., D'ORAZIO, G., SOMMARIVA, M., MARCUCCI, F., OLIVERO, D., TAGLIABUE, E., KOEPESELL, H., NICOTRA, F., BALSARI, A., RUMIO, C. Sodium glucose cotransporter 1 ligand BLF501 as a novel tool for management of gastrointestinal mucositis. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

CARMO, Luana David do. Efeito protetor de uma proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* L. na mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. 2019.

CARVALHO, R. D. et al. Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 27, p. 1-11, 2017.

CASANOVA, Livia Marques; COSTA, Sônia Soares. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: BRUTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª edição. McGraw-Hill Interamericana, Rio de Janeiro, p. 1667-1676, 2012.

CHANG, C.T., HO, T. Y., 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.

CHEN, P. et al. 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.

CHENG, S. B. et al. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2017.

CHOI, K.S. et al. A rutina inibe a expressão de COX-2 e iNOS induzida por radiação UVB na pele de camundongo sem pêlos: p38 MAP cinase e JNK como alvos em potencial. **Arch Biochem Biophys.**, v. 559, p. 38-45, 2014.

CORDEIRO, Susana Arruda et al. Combate Aos Radicais Livres Através da Alimentação. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab241, 2018.

CURRA, M. et al. Protocolos quimioterápicos e incidência de mucosite bucal. Revisão integrativa. **Einstein**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2018.

CURRA, M., PELLICOLI, A. C. A., KRETZMANN FILHO, N. A., OCHS, G., MATTE, Ú., SANT'ANA FILHO, M., MARTINS, M. D. Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF- κ B. **Journal of biomedical optics**, v. 20, n. 12, p. 125008-125008, 2015.

DA SILVA, R. R. et al. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 3, p. 258-264, 2001.

DA SILVA, Rosilaine et al. A BRAQUITERAPIA NO TRATAMENTO ONCOLÓGICO DO SISTEMA REPRODUTOR HUMANO. **Anais do Salão de Iniciação Científica Tecnológica ISSN-2358-8446**, 2019.

DAMASCENO, Sarah Soares; DA SILVA SOUSA, Vitoria Cynara. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA RUTINA, OBTIDA A PARTIR DA *Dimorphandra gardneriana*, NO CONTROLE DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL DE SOJA. **Jornada de Iniciação Científica e Extensão**, v. 14, n. 1, p. 52, 2019.

DE ALCÂNTARA, Micaelle Sônia et al. Effects of different levels of exploration on the ecological processes of *Dimorphandra gardneriana*, a tropical savanna tree. **Environ Monit Assess**, v. 192, p. 378, 2020.

DE ALENCAR, Nylane Maria Nunes et al. Side-effects of Irinotecan (CPT-11), the clinically used drug for colon cancer therapy, are eliminated in experimental animals treated with latex proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 312-320, 2017.

DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F., DA SILVA REINALDO, M. P. O., DE CASTRO BRITO, G. A., DE FRANÇA CAVALCANTI, P., DE MOURA FREIRE, M. A., DE MEDEIROS, C. A. X., & DE ARAÚJO, A. A. Olmesartan decreased levels of IL-1 β and TNF- α , down-regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and up-regulated SOCs-1 in an intestinal mucositis model. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114923, 2014.

DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F., DA SILVA REINALDO, M. P. O., DE CASTRO BRITO, G. A., DE FRANÇA CAVALCANTI, P., DE MOURA FREIRE, M. A., DE MEDEIROS, C. A. X., & DE ARAÚJO, A. A. Olmesartan decreased levels of IL-1 β and TNF- α , down-regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and up-regulated SOCs-1 in an intestinal mucositis model. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114923, 2014.

DE LIMA, João Alberto Lins et al. Avanços na quimioterapia do câncer ginecológico: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 43553-43584, 2020.

DE OLIVEIRA, Ines Rosane Welter Zwirtes et al. Immobilization of laccase in microparticles of chitosan obtained by spray drying and used in the biosensors construction. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

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.

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.

DIAS, Isabel Astrid Bandeira Roseira. **Agentes antioxidantes como alternativa na prevenção e no tratamento de lesões na mucosa oral por cancro**. 2019. Tese de Doutorado.

DOS SANTOS FILHO, E.X; P.H.M. ÁVILA, C.C.C. BASTOS, A.C. BATISTA, L.N. NAVES, R.N. MARRETO, E.M. LIMA, E.F. MENDONCA, M.C. VALADARES, Curcuminoids from *Curcuma longa*L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects, **Toxicol. Rep**, v. 3, p. 55–62, 2016.

DOS SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

DRIES, Samuel Selbach et al. Oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin. **Scientia Medica**, v. 27, n. 2, p. 4, 2017.

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.

ELIAS, D. B. D. et al. Avaliação das concentrações de malonaldeído e nitrito em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxuureia. **Einstein**, v. 8, n. 4, p. 414-8, 2010.

FANGEL, Leticia Meda Vendrusculo; VALENTIM, Ana Paula Tomaz. NÍVES DE CITOCINAS O ÓXIDO NÍTRICO EM MULHERES COM DOR CRÔNICA CAUSADA POR ARTRITE REUMATÓIDE. In: **I Mostra de Trabalhos de Conclusão de Curso de Enfermagem da FCE/UnB**. 2019.

FERNANDES, A. A. H. et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2010.

FERREIRA, Rebeca Garcia; DE REZENDE FRANCO, Laura Ferreira. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento quimioterápico no câncer de mama: revisão

bibliográfica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 2, p. 633-638, 2017.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades biológicas dos flavonoides: Atividade antimicrobiana. 2013. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmaceuticas (Mestrado). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013, 43f.

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.

FONTES, A. P. S., ALMEIDA, S. G. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química nova**, v. 20, n. 4, p.398-406, 1997.

FREITAS, A. P. F. et al. Protein fraction of Calotropis procera latex protects against 5- fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 10, p. 981-990, 2012.

GANESHPURKAR, A., SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C.A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, 2013.

GAURAV, K. et al. Glutamine: A novel approach to chemotherapyinduced toxicity. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 33, n. 1, p. 13-20, 2012.

GONÇALVES, A.C.; REIS, C.A.F.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região Norte de Minas Gerais, Brasil. **Braz. J. Bot.**, v. 33, 325–332, 2010.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, 169-74, 2009.

GUERRA, Renata Leborato et al. Custo-utilidade de terapias-alvo comparadas à dacarbazina para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático no Sistema Único de Saúde do Brasil. **Value in health regional issues**, v. 20, p. 103-109, 2019.

GUERRERO, C. P.; MARTÍN, M. J.; MARHUENDA, E. Prevention by Rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of endogenous prostaglandins. **General Pharmacology**, 1994.

GUNTER, B. R., BUTLER, K. A., WALLACE, R. L., SMITH, S. M., HARIRFOROOSH, S. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 2016.

HAAGEN, J., KROHN, H., RÖLLIG, S., SCHMIDT, M., WOLFRAM, K., DÖRR, W. Effect of selective inhibitors of inflammation on oral mucositis: preclinical studies. **Radiotherapy and oncology**, v. 92, n. 3, p. 472-476, 2009.

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

HAFEZ, M. M. et al. Hepato-protective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl4-induced hepatotoxicity in rats. **Biological Research**, 2015.

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.

HEBER, D. Oxidative Stress Markers and Inflammation: The Role of Spices and Herbs. **Nutrition Today**, v. 49, n. 5, p. 4-6, 2014.

HOFF, P. M. G. **Evolução do tratamento clínico do câncer de cólon e reto**. Programa de Pós-graduação em Medicina (Doutorado). Academia Nacional de Medicina. Rio de Janeiro, 2016. 59f.

HOLANDA, R. B. F. **Papel de receptores toll-like tipo 4 e polimorfismos asp299gly e thr399ile na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico irinotecano**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2018. 93f.

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.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-79, 2008.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. [S.l: s.n.], 2017.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. [S.l: s.n.], 2020.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 122 p, 2016

ITAGAKI, S. et al. Protective effects of quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. **Food chemistry**, v. 118, n. 2, p. 426-429, 2010.

JOHNSON, J. L. et al. 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.

JONES, C. D., GUIOT, L., MIKE, S., GORMAN, M., TEHRANI, H. The use of chemotherapeutics for the treatment of keloid scars. **Dermatology reports**, v. 7, n. 2, 2015.

JÚNIOR, Aldren Thomazini Falçoni et al. Immunoterapia. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 2, p. 148-155, 2020.

JUSTINO, P. F. C. et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1611-21, 2014.

KAMEL, R.; MOSTAFA, D. M. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2015.

KANAREK, N., GRIVENNIKOV, S. I., LESHETS, M., LASRY, A., ALKALAY, I., HORWITZ, E., PAGANO, M Critical role for IL-1 β in DNA damage-induced mucositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. E702-E711, 2014.

KARAK, P. Biological activities of flavonoids: An overview. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 10, n. 4, p. 1567-1574, 2019.

KARBELKAR, S. A., [MAJUMDAR](#), A.S., Altered systemic bioavailability and organ distribution of azathioprine in methotrexate-induced intestinal mucositis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 241, 2016.

KAWASHIMA, R. et al. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, p. 269–277, 2015b.

KAWASHIMA, R. et al. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon. **Support Care Cancer**, 2015a.

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

KHALILI, J.; BILOKLYTSKA, H. F. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. **Oral Diseases**, v. 14, p. 754-60, 2008.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. CCl₄-induced hepatotoxicity: Protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

- KINDZELSKII, A. L. et al. Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. **Eur. J. Immunol**, v. 36, p. 1619-28, 2006.
- KOBUCHI, S. et al. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 2016.
- KREMSEROVA, S. et al. Lung Neutrophilia in Myeloperoxidase Deficient Mice during the Course of Acute Pulmonary Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.
- KULKARNI, R. et al. Role of Tumor necrosis factor alpha, Malondialdehyde & serum Iron in Anemic Tuberculosis Patients. **Biomedical Research**, v. 22, n. 1, p. 69-72, 2011.
- KUMAR, S. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 415–420, 2010.
- LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000.
- LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2006.
- LALLA, R. V., BOWEN, J., BARASCH, A., ELTING, L., EPSTEIN, J., KEEFE, D. M., DOROTHY M. KEEFE, D.M., MCGUIRE, D.B., MIGLIORATI, C., OURANIA, N.G., SHARON, E. RABER-DURLACHER, J. E. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-1461, 2014.
- LEITÃO, R.F.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; BRAGA-NETO, M.B. et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterology**, n. 11, v. 90, 2011.
- LEITE, Renata Aparecida et al. Via auditiva em tronco encefálico de crianças com leucemia linfóide aguda em quimioterapia com metotrexato. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 78, n. 2, p. 63-69, 2020.
- LEOCÁDIO, P.C.L.; ANTUNES, M.M.; TEIXEIRA, L.G.; LEONEL, A.J. et al. L-Arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-fu in mice. **Nutrition and cancer**, v.0, n. 0, p.1-8, 2015.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P., Freitas, H. C., Wong, D. V. T., Wanderley, C. W. S., Nunes, L. G., Leite, L. L., Teixeira, M. M., BRITO, G.A.C., RIBEIRO, R.A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335-2350, 2014.

- LIMA-JÚNIOR, R.C. P., FIGUEIREDO, A. A., FREITAS, H. C., MELO, M. L. P., WONG, D. V. T., LEITE, C. A. V., ORIÁ, R. B et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.
- LIU, Yi. et al. Protective effect of rutin against acute gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 7, p. 914-919, 2013.
- LOGAN, RICHARD M., STRINGER, A. M., BOWEN, J. M., YEOH, A. S. J., GIBSON, R. J., SONIS, S. T., KEEFE, D. M. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer treatment reviews**, v. 33, n. 5, p. 448-460, 2007.
- LONGLEY, D. B. et al. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews-cancer**, v. 3, p. 330-8, 2003.
- LONGO, D. L et al. **Quimioterapia do Câncer**. In: LONGO, D. L et al. Manual de Medicina de HARRISON. 18ª ed. AMGH: Porto Alegre, 2013.
- LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, n. 135625, p. 1-4, 2008.
- MARTINS, G. A., ARRUDA, L. Systemic treatment of psoriasis-Part I: methotrexate and acitretin. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 3, p. 263-278, 2004.
- MASCARAQUE, C. et al. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4+ CD62L+ T cell transfer model of colitis. **Pharmacological Research**, 2014.
- MINHAS, M. U. et al. 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.
- MINHAS, M. U. et al. 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, João Antônio Leal de. Troxerrutina previne alterações morfológicas na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil: papel da via ciclooxigenase-2. 2019.
- MIURA, K. et al. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. **Cancers**, v. 2, p. 1717-1730, 2010.
- MONDIN, T. C., DE AZEVEDO CARDOSO, T., MOREIRA, F. P., WIENER, C., OSES, J. P., DE MATTOS SOUZA, L. D., [JANSEN](#), K., [MAGALHÃES](#), P.V.S., [KAPCZINSKI](#), F., DA SILVA, R. A. Circadian preferences, oxidative stress and inflammatory cytokines in bipolar disorder: A community study. **Journal of Neuroimmunology**, v.9, n.1. 2016.

MONTANO, H.G.; SILVA, G.S.; ROCHA, R.C.; JIMENEZ, N.Z.A.; PEREIRA, R.C.; BRIOSE, P.S.T. Phytoplasma in “fava d’anta” tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. **Bull. Insectology**, v.60, 147–148, 2007.

MONTESEIRÍN, J. et al. Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: The effect of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, v.107, p. 623-6, 2001.

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

MOTA, M. L. S. **Avaliação dos efeitos do agente citoprotetor amifostina na mucosite oral e disfunção da barreira intestinal: modelo experimentais em ratos e pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia neoplásica**. Program de Pós-graduação em Farmacologia (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2004. 119f.

NEMA, R.; KHARE, S.; PRADHAN, A.; GUPTA, A. et al. Natural products potential and scope for modern cancer research. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 1270-1277, 2013.

NICOLUSSI, A.C.; SAWADA, N.O; CARDOZO, F.M.C; ANDRADE, V., PAULA, J.M. Health-related quality of life of cancer patients undergoing chemotherapy. **Northeast Network Nursing Journal**, v. 15, n. 1, 2014.

NOGUEIRA, L. T. et al. 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. et al. 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.

NOSRATI, Hamed et al. Glutathione (GSH) peptide conjugated magnetic nanoparticles as blood–brain barrier shuttle for mri-monitored brain delivery of paclitaxel. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 4, p. 1677-1685, 2019.

OLIVEIRA, Erika Lira et al. MUCOSITE-UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **Revista Campo do Saber**, v. 4, n. 5, 2019.

OLIVEIRA, T. T. et al. Effect of different doses of flavonoids on hyperlipidemic rats. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: An overview. **J. Nutr. Sci.**, v.5, 2016.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J. Cell Biol**, v. 191, n. 3, p. 677-91, 2010.

PAULETTO, Guilherme et al. Produtos à base de extratos naturais com potencial fotoprotetor como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento do câncer bucal: uma revisão de literatura. **Revista da Mostra de Iniciação Científica e Extensão**, v. 3, n. 1, 2017.

PEREIRA, V. B.M., MELO, A. T., ASSIS-JÚNIOR, E. M., WONG, D. V., BRITO, G. A., ALMEIDA, P. R., RIBEIRO, R.A., LIMA-JÚNIOR, R. C. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 323-332, 2016.

PETERS, G. J. et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1587 p. 194–205,

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

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

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

PRAKASH, O.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; AJEET. Anticancer potential of plants and natural products: a review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 104-115, 2013.

RAGHAVAN, S. et al. Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1055-67, 2012.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **Eur Respir J**, v. 16, p. 534-54, 2000.

RAMSAY, D. B. et al. Mast Cells in Gastrointestinal Disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 12, p. 772-777, 2010.

REOLON, Luiza Zanette et al. Impacto da laserterapia na qualidade de vida de pacientes oncológicos portadores de mucosite oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 46, n. 1, p. 19-27, 2017.

RIBEIRO, Mariana Alves et al. Fatores Preditores de Complicações após Radioterapia Conformacional 3D em Pacientes com Adenocarcinoma de Próstata. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 2020.

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

- RODRIGUES, H. G. et al. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. **Revista de nutrição-campinas**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.
- ROKAYA, M.B.B.; UPRETY, Y.; POUDEL, R.C.; TIMSINA, B.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; ASSELIN, H.H.; SIGDEL, S.R. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **J. Ethnopharmacol**, v. 158, 158, 221–229, 2014.
- RYMASZEWSKI, A. L. et al. The Role of Neutrophil Myeloperoxidase in Models of Lung Tumor Development. **Cancers**, v. 6, p. 1111-27, 2014.
- SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2012, 2012.
- SANTOS, Stéfany Silva et al. Mastócitos em biópsias renais de pacientes pediátricos com nefrite lúpica. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 42, n. 1, p. 59-66, 2020.
- SCHMITT, B. et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. **Redox Biology**, v. 6, p. 198-205, 2015.
- SHARMA, S. et al. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 22, n. 8, p. 1063-1079, 2013.
- SKEFF, M. A.; BRITO, G. A.; DE OLIVEIRA, M. G.; BRAGA, C. M. et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **PLoS One**, v.9, n.12, p.1-25, 2014.
- SONIS, S. T. A Biological Approach to Mucositis. **J Support Oncol**, v. 2, n. 1, p. 21–36, 2004.
- SONIS, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral oncology**, v. 45, n. 12, p. 1015-1020, 2009.
- SONIS, S. T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol**, v. 5, n. 9 Suppl 4, p. 3-11, 2007.
- SONIS, S.T. The quest for effective treatments of mucositis. **The journal of supportive oncology**, v. 9, n. 5, p. 170-171, 2011.
- SOUZA, LUCIO MARQUES VIEIRA et al. MALONDIALDEÍDO E GRUPO SULFIDRILA COMO MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE. In: **Congresso Internacional de Atividade Física, Nutrição e Saúde**. 2017.
- SOVERI, L. M., HERMUNEN, K., DE GRAMONT, A., POUSSA, T., QUINAUX, E., BONO, P., ANDRE, T., ÖSTERLUND, P. Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity?. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 17, p. 2966-2974, 2014.

- SPEZZIA, Sérgio. MUCOSITE ORAL EM PACIENTES CANCEROSOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO. **Revista Ciências e Odontologia**, v. 4, n. 1, p. 36-40, 2020.
- SUKHOTNIK, I., POLLAK, Y., CORAN, A. G., PILATOV, J., BEJAR, J., MOGILNER, J. G., BERKOWITZ, D. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutrition & metabolism**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.
- SULISTYOWATI, A. D. et al. The relationship between sérum malondialdehyde levels and severity of acne vulgaris on male. **J Med Sci**, v. 46, n. 4, p. 167-73, 2014.
- TANG, Y., WU, Y., HUANG, Z., DONG, W., DENG, Y., WANG, F., YUAN, J. Administration of probiotic mixture DM 1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, 2016.
- THEOHARIDES, T. C. et al. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, p. 21–33, 2012.
- THOMAS, S. A. et al. Fluorouracil-induced Hyperammonemia in a Patient with Colorectal Cancer. **Anticancer research**, v. 35, p. 6761-64, 2015.
- THORN, C. F. et al. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 4, p. 237–242, 2011.
- UDOFOT, O. et al. 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.
- VAN TASSELL, B. W., TOLDO, S., MEZZAROMA, E., ABBATE, A. Targeting interleukin-1 in heart disease. **Circulation**, v. 128, n. 17, p. 1910-1923, 2013.
- VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.
- VILLA, A.; SONIS, S.T. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, p. 159–164, 2015.
- VITALE, R.F; RIBEIRO, F. A.Q. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 1, p. 123-127, 2007.
- VYAS, S. et al. Role of malondialdehyde in the serum of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **J Postgrad Med Inst**, v. 30, n. 1, p. 58-61, 2016.
- 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, Meng et al. Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy. **Cell death & disease**, v. 9, n. 12, p. 1-14, 2018.
- WILHELM, M. et al. 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.
- YASUDA, M., KATO, S., YAMANAKA, N., IIMORI, M., MATSUMOTO, K., UTSUMI, D., TAKEUCHI, K., KYTAHARA, Y., AMAGASE, K., HORIE, S., TAKEUSHI, K. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 6, p. 1388-1400, 2013.
- YOSHIDA, K., YOSHIOKA, M., OKAMURA, H., MORIYAMA, S., KAWAZOE, K., GRENIER, D., HINODE, D. Preventive effect of Daikanzoto (TJ-84) on 5-fluorouracil-induced human gingival cell death through the inhibition of reactive oxygen species production. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112689, 2014.
- YOSHINO, F., YOSHIDA, A., TOYAMA, T., WADA-TAKAHASHI, S., TAKAHASHI, S L. α -Glucosyl hesperidin suppressed the exacerbation of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in the hamster cheek pouch. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 223-231, 2016.
- ZAMITH, Maria Novais Barbosa Forrester. Interação fármaco-nutriente em doentes oncológicos. 2019.
- ZHANG, J. T., ZHOU, W. L., HE, C., LIU, T., LI, C. Y., WANG, L. 5-Fluorouracil induces apoptosis of colorectal cancer cells. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 2016.
- ZHANG, N. et al. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008
- ZHANG, Qian et al. Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 320, 2019.

ANEXOS

ANEXO A. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFC



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RUTINA NO TRATAMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 6595260719 (ID 001329), sob a responsabilidade de **Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro e equipe; Gilberto Santos Cerqueira; Lázaro de Sousa fideles** - 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 15/10/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF RUTINE ON THE TREATMENT OF 5-FLUOROURACIL-INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE", utilizing 18 Heterogenics mice (18 males), protocol number CEUA 6595260719 (ID 001329), under the responsibility of **Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro and team; Gilberto Santos Cerqueira; Lázaro de Sousa fideles** - 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 10/15/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2019 a 03/2021

Área: Departamento de Química Orgânica E Inorgânica

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 5 semanas

N: 18

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

Local do experimento: Biotério Prof. Eduardo Torres do departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF)

Fortaleza, 13 de fevereiro de 2020

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

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXOS B. Publicações e certificações obtidas no período do Mestrado





Certificamos que BÁRBARA BARBOSA PIRES, ANA VITÓRIA PEREIRA DE NEGREIROS DA SILVA, LAZARO DE SOUSA FIDELES, GILBERTO SANTOS CERQUEIRA, CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS E RAFAEL SOUZA DA SILVA VASCONCELOS apresentaram o trabalho USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO DIAGNÓSTICO DE MICROCEFALIA INTRAUTERINA, na I JORNADA SOBRALENSE DE ANATOMIA E IV JORNADA CEARENSE DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS, realizada na Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA, no período de 24/08/2018 À 25/08/2018.

Sobral - CE, 12 de setembro de 2018



II International and Latin American
Clostridium difficile Symposium: epidemiology,
pathogenesis, prevention and treatment
June 06-07, 2019 - Fortaleza - Ceará - Brazil

This is to certify that **Bárbara Barbosa Pires**, has participated in **poster presentation** in the II International and Latin American *Clostridium difficile* Symposium: epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment held on June 6-7th, 2019 at the Federal University of Ceara, *Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos* (NPDM) – Drug Research and Development Center, Fortaleza, CE, Brazil.

Title: TROXERRUTIN EFFECT ON OXIDATIVE DAMAGE IN INTESTINAL MUCOSITIS' EXPERIMENTAL MODEL INDUCED BY 5-FLUOROURACIL

Author(s): Bárbara Barbosa Pires, Ana Vitória Pereira de Negreiros da Silva, Paulo Vitor de Souza Pimentel, Maria Lucianny Lima Barbosa, João Antônio Leal de Miranda, Lázaro de Sousa Fideles, Conceição da Silva Martins, Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, Gilberto Santos Cerqueira.

Realization: Support:

Gerly Anne de Castro Brito
Gerly Anne de Castro Brito
Coordinator of the Symposium

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, Lázaro de Sousa Fideles, Amanda Alves Feitosa, and João Antônio Leal de Miranda

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*.

The FASEB Journal/Volume 34, Issue S1

Pharmacology

Rutin flavonoid attenuates oxidative stress and decreases morphological changes in experimental mucositis model

Leticia Cavalcante Campos, Levi Costa Carioca, Lázaro de Sousa Fideles, João Antônio Leal de Miranda, Maria Luciany Lima Barbosa, Náglia Maria Pontes Silva Ricardo, Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, Gilberto Santos Cerqueira ... See fewer authors

First published: 19 April 2020

<https://doi.org/10.1098/facebj.2020.34.e1.07143>

Abstract

Intestinal mucositis is a frequent complication in the treatment of cancer with 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapeutic agent. Rutin bioflavonoid extracted from *Dimorphandra gardneriana* has been reported as a potent anti-inflammatory and antioxidant agent. Therefore, this study aims to investigate whether rutin reverses morphological elevations and oxidative stress promoted by 5-fluorouracil in an experimental model of intestinal mucositis in mice. Swiss mice stratified into the following groups were used: Saline group (0.9% NaCl), 5-FU group, Rutin group (RUT) (200 mg/kg Rutin, *vo*). For the oxidative damage evaluation, the levels of the reduced antioxidant glutathione and the lipid peroxidation product, malondialdehyde, of the duodenal segments were determined. To investigate the morphological changes, hematoxylin and eosin staining was performed. The 5-FU group showed a significant increase in MDA levels (8127 ± 561.5 , $p < 0.05$) when compared to the saline group (4587 ± 367.5 , $p < 0.05$). For GSH levels, 5-FU (20.48 ± 4.89 , $p < 0.05$) promoted a significant decrease in duodenum antioxidant levels when compared to the saline group (112.8 ± 19.45 , $p < 0.05$). Pretreatment with RUT 200 mg/kg decreased MDA levels (3750 ± 405.3 , $p < 0.05$) and increased GSH levels (74.67 ± 12.73 , $p < 0.05$) when compared to the 5-FU injury group. The results of the histopathological analysis showed that 5-FU promoted structural alterations of the intestinal mucosa, reduction of villus height, deepening of the crypts and inflammatory infiltrate, compared to the Saline group, characterized by the integrity of the villi and crypts and absence of inflammatory infiltrate. Rutin-treated animals showed a significant reversal of antineoplastic-induced morphological changes. From the results we found that rutin promotes attenuation of oxidative stress by reducing the levels of Malonylaldehyde and increasing the levels of the antioxidant glutathione. In addition, we found that rutin reverses antineoplastic-induced morphological changes.

CAPÍTULO 3

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E MARCADORES BIOQUÍMICOS NA MUCOSITE INTESTINAL

Data de acesso: 18/05/2020

Data de submissão: 05/02/2020

João Antônio Leal de Miranda

Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Morfologia, Fortaleza –
Ceará

<http://lattes.cnpq.br/1968711165659584>

Lázaro de Sousa Fideles

Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Morfologia, Fortaleza –
Ceará

<http://lattes.cnpq.br/2810292375594113>

Amanda Alves Feitosa

Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do
Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/7957998822257291>

Isabel Cabral Gonçalves

Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do
Norte – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/8573813057148833>

Camila Bantim da Cruz Diniz

Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do
Norte - Ceará

<http://lattes.cnpq.br/5518678355934036>

Ígor Santhiago de Oliveira Costa Ribeiro

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio
(UNILEÃO), Coordenação de Biomedicina,

Juazeiro do Norte - Ceará

Jefferson Almeida Rocha

Universidade Federal do Maranhão,
Campus São Bernardo, Maranhão

<http://lattes.cnpq.br/7613552342859114>

Mikael Leandro Duarte de Lima Tolentino

Universidade Federal do Piauí, Hospital
Veterinário Universitário, Bom Jesus - Piauí

<http://lattes.cnpq.br/2453348048874025>

Cledivan Afonso de Brito

Universidade Federal do Piauí,
Coordenação de Biomedicina,
Parnaíba – Piauí

<http://lattes.cnpq.br/3170452175736793>

Maria Lucianny Lima Barbosa

Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Morfologia, Fortaleza -
Ceará

<http://lattes.cnpq.br/3417118131868615>

Claudio Silva Teixeira

Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Morfologia, Fortaleza -
Ceará

<http://lattes.cnpq.br/2389572202518617>

Gilberto Santos Cerqueira

Universidade Federal do Ceará,
Departamento de Morfologia, Fortaleza –
Ceará

<http://lattes.cnpq.br/6780676773042373>

CAPÍTULO 28

UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA PRÁTICA DE ENSINO DE BIOQUÍMICA: UMA EXPERIÊNCIA NO ENSINO SUPERIOR

Data de aceite: 12/12/2019

João Antônio Leal de Miranda

Universidade Regional do Cariri, Centro de
Ciências Biológicas, Crato - Ceará.

Lázaro de Sousa Fideles

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza
- Ceará

Maria Lucianny Lima Barbosa

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza
- Ceará

João Vitor da Silva Alves

Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará
da Serra - Mato Grosso

Maria de Fátima Faustino Araújo

Universidade Regional do Cariri, Centro de
Ciências Biológicas, Campos Sales - Ceará

Amanda Alves Feitosa

Universidade Regional do Cariri, Centro de
Ciências Biológicas, Crato - Ceará

Luciene Ferreira de Lima

Universidade Regional do Cariri, Centro de
Ciências Biológicas, Crato - Ceará

Cleidivan Afonso de Brito

Universidade Federal do Piauí, Parnaíba - Piauí

Claudio Silva Teixeira

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Departamento de Morfologia, Fortaleza
- Ceará

Gilberto Santos Cerqueira

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Departamento de Morfologia Fortaleza
- Ceará.

RESUMO: O estudo da bioquímica, como área interdisciplinar que permeia as mais diversas áreas, figura entre as disciplinas básicas de grande importância para o currículo dos cursos de ciências da saúde e biológicas. Entretanto, a dificuldade na verticalização do conhecimento é perceptível. O uso de metodologias ativas e diferenciadas em sala de aula tem facilitado a aprendizagem e, tomado mais interessante o ensino para o aluno. Objetivou-se com o presente estudo relacionar algumas metodologias alternativas e diferenciadas, como a monitoria acadêmica e o uso de maquetes didáticas, na abordagem do conteúdo da bioquímica de forma harmoniosa e estimulante para os acadêmicos envolvidos. Percebeu-se com o uso das maquetes e as atividades de monitoria significativa evolução no desempenho da turma em relação à qualidade do aprendizado referente aos assuntos abordados em sala de aula nas disciplinas de bioquímica, bem como estimulação do trabalho colaborativo entre os estudantes.

PALAVRAS-CHAVE: Aprendizagem;
Bioquímica; Maquetes; Monitoria.

CAPÍTULO 18

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO NO ESTADO DO PIAUÍ

Data de aceite: 16/12/2019

Antônio Afonso Santos Guimaraes Júnior
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio
(UNILEÃO), Juazeiro do Norte - Ceará

Lázaro de Sousa Fideles
Universidade Federal do Ceará, Departamento de
Morfologia, Fortaleza - Ceará

Amanda Alves Feltosa
Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do Norte
- Ceará

Adriana Bezerra Leite Pereira Silva
Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do Norte
- Ceará

Camila Bantim da Cruz Diniz
Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do Norte
- Ceará

Isabel Cabral Gonçalves
Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do Norte
- Ceará

Josicleide dos Santos Frazao
Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN),
Coordenação de Enfermagem, Juazeiro do Norte
- Ceará

Cleidivan Afonso de Brito
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio
(UNILEÃO), Juazeiro do Norte - Ceará

João Antônio Leal de Miranda
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio
(UNILEÃO), Juazeiro do Norte - Ceará

RESUMO: O câncer do colo uterino (CCU) é considerado como um grave problema de saúde pública apresentando alta incidência em todo o mundo. Sendo o teste de Papanicolaou o principal método de prevenção e diagnóstico de câncer do colo uterino. O estudo objetiva analisar o perfil epidemiológico do câncer do colo do útero no estado do Piauí. Realizou-se um estudo descritivo, retrospectivo. A população do estudo foi composta por todos os casos de CCU ocorridos no estado, registrados no SISCAN e disponíveis na plataforma Web do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), correspondente ao ano de 2014. As mulheres na faixa etária de 30 a 39 foram os grupos que apresentaram maior incidência de alterações celulares, principalmente LSIL e HSIL. Quanto ao nível de escolaridade, percebeu-se que mulheres com menor grau de instrução apresentaram maior incidência de alterações celulares como LSIL e CEI. E mulheres, mesmo com histórico de realização de prevenção recente (1 e 2 anos), apresentaram maiores índices de alterações

Article

Trolox Prevents 5-Fluorouracil Induced Morphological Changes in the Intestinal Mucosa: Role of Cyclooxygenase-2 Pathway

João Antônio Leal de Miranda ^{1,*}, Conceição da Silva Martins ¹, Lázaro de Sousa Fideles ¹, Maria Luclanny Lima Barbosa ¹, João Erivan Façanha Barreto ¹, Helder Blandá Pimenta ¹, Francisco Orlando Rafael Freitas ¹, Paulo Vitor de Souza Pimentel ¹, Claudio Silva Tebetra ¹, Ariel Gustavo Scafuri ¹, Maria Claudia dos Santos Luciano ², Joabe Lima Araújo ³, Jefferson Almeida Rocha ², Icaro Gusmão Pinto Vieira ⁴, Náglia Maria Pontes Silva Ricardo ⁵, Matheus da Silva Campelo ⁵, Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro ⁵, Gerly Anne de Castro Brito ¹ and Gilberto Santos Cerqueira ¹

- ¹ Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, s/n Delmiro de Farias Street, Porangaba Campus, Fortaleza 60416-030, Brazil; joaycrisostophe@hotmail.com (C.d.S.M.); lazaro.fideles@gmail.com (L.d.S.F.); marialuclanny@gmail.com (M.L.L.B.); erivanfacanha@yahoo.com.br (J.E.F.B.); hbinda@ua.br (H.B.P.); francisco.orlando@gmail.com (F.O.R.F.); paulo_vitorde Souza@hotmail.com (P.V.d.S.P.); claudioisratomia@yahoo.com.br (C.S.T.); unologia@gmail.com (A.G.S.); gerlybrito@hotmail.com (G.A.d.C.B.); gjiufarmacia@hotmail.com (G.S.C.)
 - ² Nucleus of Research and Development of Medications (NIPDM), Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo Street, 100, Fortaleza 60430-275, Brazil; claudia_santos_luciano@hotmail.com
 - ³ Research Group in Natural Sciences and Biotechnology, Federal University of Maranhão, s/n Avenida Aurilvia Maria Santos Barros de Sousa, Frei Alberto Baretta, Grajaú-MA 65940-000, Brazil; joabearaujbiotec@gmail.com (J.L.A.); jeffersonkaki@hotmail.com (J.A.R.)
 - ⁴ Technological Development Park, Federal University of Ceará, Humberto Monte Avenue, 2877, Fici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; icarogpv@uol.com.br
 - ⁵ Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; nairicard@ufc.br (N.M.P.S.R.); matheus.campelo@hotmail.com (M.d.S.C.); elenir.ribeiro@ufc.br (M.E.N.P.R.)
- * Correspondence: joaantonio@ufpi.edu.br; Tel.: +55-85-3366-8492

Received: 6 December 2019; Accepted: 4 January 2020; Published: 8 January 2020



Abstract: Intestinal mucositis is a common complication associated with 5-fluorouracil (5-FU), a chemotherapeutic agent used for cancer treatment. Trolox (TRX), a semi-synthetic flavonoid extracted from *Dioscorea guburiana*, has been reported as a potent antioxidant and anti-inflammatory agent. In the present study, we aimed to evaluate the effect of TRX on 5-FU-induced intestinal mucositis. Swiss mice were randomly divided into seven groups: Saline, 5-FU, TRX-50, TRX-100, TRX-150, Celecoxib (CLX), and CLX + TRX-100. 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), glutathione (GSH), mast and goblet cell counts, immunohistochemical analysis, and cyclooxygenase-2 (COX-2) activity. Compared to the saline treatment, the 5-FU treatment induced intense weight loss and reduction in villus height. TRX treatment (100 mg/kg) prevented the 5-FU-induced histopathological changes and decreased oxidative stress by decreasing the MDA levels and increasing GSH concentration. TRX attenuated inflammatory process by decreasing MPO activity, intestinal mastocytosis, and COX-2 expression. TRX also reversed the depletion of goblet cells. Our findings suggest that TRX at a concentration of 100 mg/kg had chemopreventive effects on 5-FU-induced intestinal mucositis via COX-2 pathway.

Keywords: chemoprevention; inflammation; flavonoid; intestine

Article

Role of Rutin in 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: Prevention of Histological Damage and Reduction of Inflammation and Oxidative Stress

Lázaro de Sousa Fideles ¹, João Antônio Leal de Miranda ^{1,*}, Conceição da Silva Martins ¹, Marta Luciany Lima Barbosa ¹, Helder Bindá Pimenta ¹, Paulo Vitor de Souza Pimentel ¹, Claudio Silva Tebeteira ¹, Marina Alves Sampato Scafuri ², Samuel de Osterno Façanha ³, João Erivan Façanha Barreto ^{1,2}, Poliana Moreira de Medeiros Carvalho ⁴, Ariel Gustavo Scafuri ^{1,2}, Joabe Lima Araújo ⁵, Jefferson Almeida Rocha ⁶, Icaro Gusmão Pinto Vieira ⁷, Náglia Maria Pontes Silva Ricardo ⁸, Matheus da Silva Campelo ⁸, Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro ⁸, Gerly Anne de Castro Brito ¹ and Gilberto Santos Cerqueira ¹

¹ Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, s/n Delmiro de Farias Street, Porangabaçu Campus, Fortaleza 60416-030, Brazil; lazaro.fideles@gmail.com (L.d.S.F.); joycechristoph@hotmail.com (C.d.S.M.); marialucianny@gmail.com (M.L.L.B.); hbinda@uece.edu.br (H.B.P.); paulo_vitordeSouza@hotmail.com (P.V.d.S.P.); claudioanatomia@yahoo.com.br (C.S.T.); erivanfacanha@yahoo.com.br (J.E.F.B.); urologia@gmail.com (A.G.S.); gerlybrito@hotmail.com (G.A.d.C.B.); gjfarmacia@hotmail.com (G.S.C.)

² Scafuri Institute of Human Sexuality, 1513 Republic of Lebanon Street, Varjota, Fortaleza 60175-222, Brazil; drmarinalbessa@gmail.com

³ Christus University Center (Unichristus), 133 Adolfo Gargel Street, Fortaleza 63010-475, Brazil; samuelosterno@hotmail.com

⁴ University Center of Juazeiro do Norte (UNIJUAZEIRO), 1224 San Francisco Street, Juazeiro do Norte-CE 63010-475, Brazil; polyfarma2004@yahoo.com.br

⁵ Department of Genetics and Morphology, s/n Darcy Ribeiro University Campus, University of Brasília, Brasília-DF 70910-900, Brazil; joabearaujobiotes@gmail.com

⁶ Medicinal Chemistry and Biotechnology Research Group (QUIMEBIO), Federal University of Maranhão (UFMA), São Bernardo/MA 65550-000, Brazil; ja.rocha@ufma.br

⁷ Technological Development Park, Federal University of Ceará, Humberto Monte Avenue, 2977, Fici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; icarogpv@uol.com.br

⁸ Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fici Campus, Fortaleza 60440-900, Brazil; naricard@ufc.br (N.M.P.S.R.); matheus.campelo@hotmail.com (M.d.S.C.); elenirribeiro@ufc.br (M.E.N.P.R.)

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

Academic Editors: Maurizio Battino, Jesus Simal-Gandera and Eisea Capanoglu
Received: 9 May 2020; Accepted: 14 June 2020; Published: 17 June 2020



Abstract: Intestinal mucositis, characterized by inflammatory and/or ulcerative processes in the gastrointestinal tract, occurs due to cellular and tissue damage following treatment with 5-fluorouracil (5-FU). Rutin (RUT), a natural flavonoid extracted from *Dioscorea glandulosa*, exhibits antioxidant, anti-inflammatory, cytoprotective, and gastroprotective properties. However, the effect of RUT on inflammatory processes in the intestine, especially on mucositis promoted by antineoplastic agents, has not yet been reported. In this study, we investigated the role of RUT on 5-FU-induced experimental intestinal mucositis. Swiss mice were randomly divided into seven groups: Saline, 5-FU, RUT-50, RUT-100, RUT-200, Celecoxib (CLX), and CLX + RUT-200 groups. The mice were weighed daily. After treatment, the animals were euthanized and segments of the small intestine were collected to evaluate histopathological alterations (morphometric analysis); malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), and glutathione (GSH) concentrations; mast and goblet cell counts; and cyclooxygenase-2 (COX-2) activity, as well as to perform immunohistochemical analyses.