



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

**BÁRBARA DE CERQUEIRA FIORIO**

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Euterpe oleracea* MART. (AÇAÍ) MODULA A  
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM  
CAMUNDONGOS POR MEIO DA SINALIZAÇÃO TLR-4/MyD88/PI3K $\alpha$ /mTOR/NF-  
 $\kappa$ Bp65**

**FORTALEZA**

**2020**

BÁRBARA DE CERQUEIRA FIORIO

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Euterpe oleracea* MART. (AÇAÍ) MODULA A  
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS  
POR MEIO DA SINALIZAÇÃO TLR-4/MyD88/PI3K $\alpha$ /mTOR/NF- $\kappa$ Bp65

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Monteiro.

FORTALEZA

2020

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)

---

F552e Fiorio, Bárbara de Cerqueira.

Extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* mart. (açai) modula a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos por meio da sinalização TLR-4/MyD88/PI3Ka/mTOR/NF-kBp65 / Bárbara de Cerqueira Fiorio. – 2020.

133 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Eduardo Monteiro .

1. 5-fluorouracil. 2. Mucosite intestinal. 3. ASE. I. Título.

CDD 611

---

BÁRBARA DE CERQUEIRA FIORIO

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Euterpe oleracea* MART. (AÇAÍ) MODULA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS POR MEIO DA SINALIZAÇÃO TLR-4/MyD88/PI3K $\alpha$ /mTOR/NF- $\kappa$ Bp65

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

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

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Monteiro (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

---

Prof. Dr. Álvaro Xavier Franco  
Centro Universitário Unifanor

---

Profª. Dra. Alana de Freitas Pires  
Centro Universitário Estácio do Ceará



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que todas as experiências tenham sido possíveis.

À minha mãe, Maria Selma, por toda a dedicação de uma vida, por acreditar e me incentivar incondicionalmente.

Ao meu marido, Alexandre, pela paciência, suporte e incentivos diários.

Aos meus familiares que, por vezes, compreenderam minha ausência durante a dedicação à esse trabalho.

À todos os meus amigos que, diretamente ou indiretamente, me ofereceram apoio, ferramentas e suporte para perseverar em meus objetivos e sonhos.

À todos os professores que colaboraram através de seus estudos e conhecimentos em toda a trajetória do curso de doutorado.

Aos meus amigos do LEFFAG que me auxiliaram, me ensinaram, me ajudaram nos experimentos e na partilha de conhecimentos.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Álvaro, Prof. Dr. André e Profa. Dra. Alana pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao meu co-orientador, Carlos Eduardo, pela dedicação, compreensão e suporte durante a escrita deste trabalho.

Ao meu orientador, Pedro Marcos, por acreditar em mim e por toda a orientação concedida.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos.”*

*Marcel Proust.*

## RESUMO

5-fluorouracil (5-FU) é um antineoplásico eficaz no tratamento de tumores sólidos. No entanto, ele apresenta importantes efeitos colaterais que limitam o tratamento, incluindo a mucosite intestinal. *Euterpe oleracea* Mart. é uma planta da região amazônica conhecida popularmente como açaí que possui alta atividade antioxidante e anti-inflamatória atribuídas aos compostos fenólicos presentes na fruta. Esse trabalho teve por objetivo avaliar alterações histopatológicas e funcionais, estresse oxidativo e inflamação em camundongos com lesões da mucosa intestinal induzidas por 5-FU e os efeitos do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE) sobre esses parâmetros. Camundongos Swiss, pesando de 25-30g, foram separados em cinco grandes grupos: um recebeu uma única injeção intraperitoneal de 5-FU (450 mg/kg, i.p.), outro recebeu solução salina (5 mL/Kg, v.o.) e os demais foram separados em três grupos que receberam um tratamento de ASE, 30 min. antes da indução da mucosite com o 5-FU, nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.; esse tratamento permaneceu pelos próximos 3 dias, até 30 min. antes da eutanásia. Perda de peso dos animais foi avaliado por 3 dias. No dia 3 após o tratamento com 5-FU, os animais foram eutanasiados e amostras do intestino foram coletadas e avaliadas quanto aos escores histopatológicos; níveis de glutathione (GSH), malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO) e mieloperoxidase (MPO); nível das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; esvaziamento gástrico; integridade da barreira intestinal; expressão gênica de TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65 e expressão proteica de TLR-4 e NF- $\kappa$ Bp65. 5-FU induziu perda de peso nos animais, lesões intestinais, comprometimento significativo da função de barreira epitelial, encurtamento das vilosidades intestinais, vacuolização celular, infiltração de células polimorfonucleares, perda de células epiteliais, produção de radicais livres (NO), depleção de GSH, aumento de MDA, aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , retardo do esvaziamento gástrico, aumento da expressão dos genes TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65, aumento da expressão das proteínas TLR-4 e NF- $\kappa$ B. ASE (100 mg/kg) reduziu significativamente a perda de peso dos animais, reverteu lesões intestinais, recuperou a altura das vilosidades, diminuiu infiltração de neutrófilos e níveis de MPO, diminuiu níveis de nitrato e MDA, aumentou a concentração de glutathione, reduziu níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , restaurou a integridade da barreira intestinal, reduziu a expressão dos genes TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65 e a expressão das proteínas TLR-4 e NF- $\kappa$ B. Concluímos que o tratamento com ASE reduziu inflamação e estresse oxidativo, reverteu alterações histológicas e atenuou alterações funcionais por meio da redução na expressão gênica da via TLR-4/MyD88/PI3K $\alpha$ /mTOR/NF- $\kappa$ Bp65.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil. Mucosite intestinal. ASE.

## ABSTRACT

5-fluorouracil (5-FU) is an antineoplastic agent effective in the treatment of solid tumors. However, it has important side effects that limit treatment, including intestinal mucositis. *Euterpe oleracea* Mart. is a plant from the Amazon region popularly known as açai that has high antioxidant and anti-inflammatory activity attributed to the phenolic compounds present in the fruit. This study aimed to evaluate histopathological and functional changes, oxidative stress and inflammation in mice with intestinal mucosa lesions induced by 5-FU and the effects of treatment with hydroalcoholic açai stone extract (ASE) on these parameters. Swiss mice, weighing 25-30g, were separated into five large groups: one received a single intraperitoneal injection of 5-FU (450 mg / kg, ip), another received saline (5 mL / kg, orally) and the others were separated into three groups that received an ASE treatment, 30 min. before mucositis induction with 5-FU, at doses of 10, 30 or 100 mg / kg, orally; this treatment remained for the next 3 days, up to 30 min. before euthanasia. Weight loss of the animals was evaluated for 3 days. On day 3 after 5-FU treatment, the animals were euthanized and intestinal samples were collected and evaluated for histopathological scores; levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and myeloperoxidase (MPO); level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  cytokines; gastric emptying; intestinal barrier integrity; gene expression of TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR and NF- $\kappa$ Bp65 and protein expression of TLR-4 and NF- $\kappa$ Bp65. 5-FU induced weight loss in animals, intestinal lesions, significant impairment of epithelial barrier function, shortening of intestinal villi, cell vacuolization, infiltration of polymorphonuclear cells, loss of epithelial cells, free radical production (NO), GSH depletion, increased MDA, increased levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , delayed gastric emptying, increased expression of the TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR and NF- $\kappa$ Bp65 genes, increased expression of TLR-4 and NF- $\kappa$ B. ASE (100 mg / kg) significantly reduced the animals' weight loss, reversed intestinal lesions, recovered villus height, decreased neutrophil infiltration and MPO levels, decreased nitrate and MDA levels, increased glutathione concentration, reduced levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , restored the integrity of the intestinal barrier, reduced the expression of the TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR and NF- $\kappa$ Bp65 genes and the expression of the TLR-4 and NF- $\kappa$ B proteins. We concluded that ASE reduced inflammation and oxidative stress, reversed histological changes and attenuated functional changes by reducing the gene expression of the TLR-4/MyD88/PI3K $\alpha$ /mTOR/NF- $\kappa$ Bp65 pathway.

**Keywords:** 5-fluoracil. Intestinal mucositis. ASE.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas do 5-FU, uracila e timina.....	28
Figura 2	Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.....	30
Figura 3	Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil na enzima timidilato sintetase.....	31
Figura 4	Fisiopatologia da mucosite.....	34
Figura 5	Representação esquemática dos subtipos de receptores toll like.....	40
Figura 6	Esquema representativo do TLR-4.....	41
Figura 7	Cascata de sinalização do TLR4 dependente e independente de MyD88.....	43
Figura 8	Via de sinalização de TLR-4.....	44
Figura 9	Estrutura química dos polifenóis.....	53
Figura 10	Sementes e frutos das espécies comerciais do açaí.....	57
Figura 11	Esquema da indução da mucosite intestinal por 5-fluorouracil e o tratamento com ASE em camundongos.....	67
Figura 12	Desenho esquemático do estudo da RET em Câmara de Üssing.....	75
Figura 13	Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína.....	76
Figura 14	Efeito do ASE nos níveis de glutathiona em intestino de camundongos tratados com 5-FU.....	78
Figura 15	Efeito do ASE nos níveis de MDA em intestino de camundongos tratados com 5-FU.....	79
Figura 16	Efeito do ASE nos níveis de nitrato em intestino de camundongos tratados com 5-FU.....	81
Figura 17	Efeito do ASE na variação de peso corporal nos grupos experimentais.....	82
Figura 18	Efeito do ASE na leucopenia induzida pelo 5-FU.....	83
Figura 19	Efeito do tratamento com o ASE nas alterações histopatológicas no duodeno, jejuno e íleo induzidas por 5-FU em camundongos.....	84

Figura 20	Efeito do ASE na infiltração neutrofílica causada na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	85
Figura 21	Efeito do tratamento com o ASE nos níveis de IL-1 $\beta$ em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	87
Figura 22	Efeito do tratamento com o ASE nos níveis de TNF- $\alpha$ em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	88
Figura 23	Efeito do ASE nos níveis de mRNA para TLR-4 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU.....	89
Figura 24	Efeito do ASE nos níveis de mRNA para MyD88 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU.....	90
Figura 25	Efeito do ASE nos níveis de mRNA para PI3K $\alpha$ em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU.....	90
Figura 26	Efeito do ASE nos níveis de mRNA para mTOR em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU.....	91
Figura 27	Efeito do ASE nos níveis de mRNA para NF- $\kappa$ Bp65 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU.....	92
Figura 28	Efeito do ASE na expressão proteica de TLR-4 em íleo de camundongos tratados com 5-FU.....	93
Figura 29	Efeito do ASE na expressão proteica de NF- $\kappa$ Bp65 em íleo de camundongos tratados com 5-FU.....	94
Figura 30	Efeito do ASE no esvaziamento gástrico em camundongos tratados com 5-FU.....	95
Figura 31	Efeito do ASE no trânsito intestinal em camundongos tratados com 5-FU.....	95
Figura 32	Efeito do ASE na resistência elétrica transepitelial da mucosa intestinal em camundongos tratados com 5-FU.....	97
Figura 33	Efeito do ASE na permeabilidade da mucosa intestinal em camundongos tratados com 5-FU.....	98
Figura 34	Hipótese das vias que são moduladas pelo ASE.....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer.....	69
Tabela 2	Análise histologia do intestino de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com ASE.....	83

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classes farmacológicas de agentes quimioterápicos.....	26
Quadro 2	Produtos naturais e seus efeitos na mucosite intestinal.....	50
Quadro 3	Subclasses dos Flavonoides e suas principais fontes alimentares.....	55
Quadro 4	Grupos experimentais para a avaliação do efeito do ASE.....	65
Quadro 5	Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados.....	72
Quadro 6	Valores das expressões relativas de TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65 e análise estatística.....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	Subunidade ribossomal 18S
5-FU	5- Fluorouracil
ABCG8	Cassete de ligação de ATP subfamília G membro 8
ABTS	2,2 -azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico
ACC	Acetil-coa carboxilase
Akt	Proteína quinase B
ALT	Alanino-aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AMs	Macrófagos alveolares
ANOVA	Análise de variancia
AP-1	Fator de transcrição da proteína 1
ASE	Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí ( <i>Euterpe olerácea</i> )
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-3	Proteína codificada em linfoma de células B
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
CRAMPs	Peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina
CAT	Catalase
CD14	Cluster de diferenciação 14
cDNA	DNA complementar
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC
cGMP	Guanilato ciclase solúvel
CI	Intervalo de confiança
COX	Ciclooxigenases
CRH	Hormônio estimulante de corticotrofina
CT, Ct ou Cq	Ciclo qualitativo
DAMPs	Moléculas padrão associado ao dano
DHFU	Diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos

DPD	Diidropirimidina desidrogenase
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic acid
dTTP	Trifosfato de deoxitimidina
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
E.P.M.	Erro padrão da média
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Enzimático
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
Etc.	Et cetera
FdUDP	Difosfato de fluordeoxiuridina
FdUMP	Monofosfato de fluordeoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluordeoxiuridina
FRAP	Capacidade de redução férrica
FUDP	Difosfato de fluoruridina
FUDR	Fluordeoxiuridina
FUTP	Trifosfato de fluoruridina
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT-4	Transportador de glicose-4
GPx	Glutathione peroxidase
Grx	Glutaredoxina
GSE	Extratos de sementes de uva
GSH	Glutathione
GSSG	Dissulfeto de glutathione
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-coa
HOMA	Avaliação do modelo homeostático
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
HYP	Região hiper variável
i.p.	Intraperitoneal
ICAM -1	Molécula de adesão intercelular 1
IECs	Células epiteliais colônicas
IF	Intensidade de fluoresceína
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina -1
IKKs	Complexo Ikb quinase
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IPANs	Neurônios aferentes primários intrínsecos
IR	Receptores de insulina
IRAKs	Receptor de interleucina 1 associado a quinase
IRFs	Fator regulador de interferon
IκB	Inibidor do fator nuclear kappa B
IκB-α	Inibidor do fator nuclear kappa B subunidade alfa
JAK	Quinase-Sinal de Janus
JAM	Moléculas de adesão juncional
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
LRRs	Repetição extracelular rica em leucina
MAL	Domínio TIR contendo proteína adaptadora
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MAPKK	MAP quinase quinase
MAPKKK	MAP quinase quinase quinase
MCF-7	Linhagem celular de células cancerígenas mamárias
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MD2	Proteína de diferenciação mielóide 2
MDA	Malondialdeído

MEKK	MAP quinase quinase quinase
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
NaEDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLPR3	Receptor semelhante a NOD, família de domínio pirina contendo 3
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintetase
Nrf2	Fator de transcrição 2
ORAC	Capacidade de absorbância do radical de oxigênio
pAkt	Proteína quinase b fosforilada
pAMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada
PAMPs	Moléculas padrão associada ao patógeno
PAs	Proantocianidinas
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
PPAR $\gamma$	Proliferador de peroxissoma $\gamma$
PRRs	Receptores padrões de reconhecimento
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
Rel-	Família relish
RET	Resistência elétrica transepitelial
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUT	Rutina
SARM	Proteína contendo SAM e ARM
SH	Grupo sulfidríla
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
STAT	Transdutor e ativador de transcrição
T2R	Receptores de sabor do tipo 2
TABs	Proteínas de ligação ao TAK-1
TAK	Fator de transformação do crescimento beta
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TGI	Trato gastrointestinal
TICAM-1	Molécula adaptadora 1 de TIR ou TRIF
TICAM-2	Molécula adaptadora contendo TIR-2
TIR (ou IL-1R)	Sinalizador intracelular da família interleucina-1R
TIRAP	Domínio TIR contendo proteína adaptadora
TIRP	Proteína contendo TIR ou TRAM
TJs	<i>Tight junctions</i>
TK	Timidina quinase
TLRs	Receptores do tipo toll
TMB	3, 3', 3, 3'- tetramethylbenzidine
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Timidina fosforilase
TRAF-6	Fator 6 associado ao receptor de TNF da proteína ligada à ubiquitina
TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	Domínio TIR contendo ifn $\beta$ indutor de adaptador.
TRKB	Receptor tropomiosina da quinase B
TS	Timidilato sintetase
UDG	Uracil-DNA glicosilase
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Universidade Federal do Ceará

UMPO	Unidade de MPO
v.o.	Via oral
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VE-caderina	Caderina endotelial vascular
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO	Organização Mundial da Saúde
ZOs	Zônulas ocludentes

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{CH}_2\text{THF}$	5,10- metileno tetra-hidrofolato
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Ácido fosfórico
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
cm	Centímetro
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
$\text{CaCl}_2$	Cloreto de cálcio
$\text{MgCl}_2$	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
$\varepsilon$	Episilon
$\text{NaPO}_4$	Fosfato de sódio
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Fosfato dipotássico
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato monopotássico
$\gamma$	Gama
g	Gramas
$^\circ\text{C}$	Grau célsius
NaOH	Hidróxido de sódio
h	Horas
$\kappa$	Kappa
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca registrada
$\mu\text{A}$	Micro ampère
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ms	Milissegundo
min.	Minutos
“	Minutos

M	Molar
nm	Nanomêtros
nmol	Nanomol
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NO <sub>2</sub>	Nitrito
<i>p</i>	Nível descritivo ou probabilidade de significância
N	Normal
Ω	Ohm
NO	Óxido de nitrogênio
%	Percentual
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
pg	Picograma
KDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
Σ	Somatório



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Câncer e tratamento.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1</b>	<b><i>Terapias farmacológicas no câncer.....</i></b>	<b>25</b>
<b>2.1.2</b>	<b><i>O Antineoplásico 5-Fluoracil (5-FU) .....</i></b>	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>A mucosite intestinal.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1</b>	<b><i>Fisiopatologia da mucosite intestinal.....</i></b>	<b>32</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Alterações histopatológicas na mucosite intestinal.....</i></b>	<b>34</b>
<b>2.2.3</b>	<b><i>Alterações bioquímicas na mucosite intestinal.....</i></b>	<b>35</b>
<b>2.2.4</b>	<b><i>Alterações funcionais na mucosite intestinal.....</i></b>	<b>37</b>
<b>2.2.5</b>	<b><i>Processo inflamatório na mucosite intestinal.....</i></b>	<b>39</b>
<b>2.2.5.1</b>	<b><i>Receptores do tipo Toll (TLR) .....</i></b>	<b>39</b>
<b>2.2.5.1.1</b>	<b>Receptores do tipo Toll – 4 (TLR-4) .....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.5.1.2</b>	<b>A ativação do mediador fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da via da rapamicina (mTOR) .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.5.2</b>	<b><i>O fator de transcrição NF-κB.....</i></b>	<b>46</b>
<b>2.3</b>	<b>O Tratamento da mucosite intestinal.....</b>	<b>47</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Os compostos fenólicos ou polifenóis.....</i></b>	<b>51</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Os flavonóides.....</i></b>	<b>54</b>
<b>2.4</b>	<b>O Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) .....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.1</b>	<b><i>O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) .....</i></b>	<b>58</b>
<b>2.4.2</b>	<b><i>O efeito farmacológico do ASE.....</i></b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais e grupos experimentais.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (Açaí).....</b>	<b>66</b>
<b>5.3</b>	<b>Indução da mucosite intestinal e tratamento com extrato hidroalcoólico do caroço do açaí.....</b>	<b>66</b>

5.4	<b>Avaliação dos parâmetros relacionados ao dano oxidativo.....</b>	67
5.4.1	<i>Análise da glutathiona.....</i>	67
5.4.2	<i>Análise do malondialdeído.....</i>	67
5.4.3	<i>Análise de nitrato e nitrito.....</i>	68
5.5	<b>Avaliação da perda da massa corporal e contagem sanguínea de leucócitos totais.....</b>	68
5.6	<b>Avaliação dos parâmetros inflamatórios.....</b>	69
5.6.1	<i>Avaliação histopatológica.....</i>	69
5.6.2	<i>Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) .....</i>	69
5.6.3	<i>Análise dos níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	70
5.7	<b>Análise da expressão de marcadores inflamatório por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....</b>	71
5.7.1	<i>Extração do RNA total.....</i>	71
5.7.2	<i>Síntese de cDNA.....</i>	71
5.7.3	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para os genes: TLR-4, MyD88, PI3K<math>\alpha</math>, mTOR e NF-<math>\kappa</math>Bp65) .....</i>	71
5.8	<b>Análise da expressão proteica de TLR-4 e NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	73
5.9	<b>Avaliação dos parâmetros funcionais da mucosite intestinal.....</b>	73
5.9.1	<i>Avaliação do esvaziamento gástrico e tempo de transito intestinal .....</i>	73
5.9.2	<i>Avaliação da integridade da barreira intestinal ex vivo.....</i>	74
5.9.2.1	<i>Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....</i>	74
5.9.2.2	<i>Avaliação da Permeabilidade.....</i>	75
5.10	<b>Análise Estatística.....</b>	76
6	<b>RESULTADOS.....</b>	77
6.1	<b>Efeito de ASE no dano oxidativo induzido por 5-FU.....</b>	77
6.1.1	<i>Análise da glutathiona.....</i>	77
6.1.2	<i>Análise do malondialdeído.....</i>	78
6.1.3	<i>Análise de nitrato.....</i>	80
6.2	<b>Efeito do ASE na perda de peso.....</b>	81
6.3	<b>Efeito do ASE na leucopenia.....</b>	82
6.4	<b>Efeito do ASE nos parâmetros inflamatórios.....</b>	83
6.4.1	<i>Efeitos do ASE nas alterações histopatológicas .....</i>	83
6.4.2	<i>Efeitos do ASE na atividade da MPO.....</i>	85

6.4.3	<i>Efeitos do ASE nos níveis de citocinas pró inflamatórias (IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math>).....</i>	86
6.5	<b>Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios: TLR-4, MyD88, PI3K<math>\alpha</math>, mTOR e NF-<math>\kappa</math>Bp65.....</b>	89
6.5.1	<i>Avaliação da transcrição gênica de TLR-4.....</i>	89
6.5.2	<i>Avaliação da transcrição gênica de MyD88.....</i>	89
6.5.3	<i>Avaliação da transcrição gênica de PI3K<math>\alpha</math>.....</i>	90
6.5.4	<i>Avaliação da transcrição gênica de mTOR.....</i>	91
6.5.5	<i>Avaliação da transcrição gênica de NF-<math>\kappa</math>Bp65.....</i>	91
6.6	<b>Efeito do ASE na expressão proteica de marcadores inflamatórios: TLR-4 e NF-<math>\kappa</math>Bp65.....</b>	93
6.7	<b>Efeito do ASE nos parâmetros funcionais da mucosite intestinal.....</b>	94
6.7.1	<i>Esvaziamento gastrointestinal.....</i>	94
6.7.2	<i>Efeito do ASE na resistência elétrica transepitelial (RET).....</i>	96
6.7.3	<i>Permeabilidade da mucosa intestinal.....</i>	97
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	99
8	<b>CONCLUSÃO .....</b>	113
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	114
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APRVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA.....</b>	133

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Ele foi o responsável por cerca de uma em cada seis mortes, em 2018. Os cânceres de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns em homens, enquanto o de mama, colorretal, pulmonar, colo do útero e de tireoide são os mais comuns entre as mulheres (World Health Organization, 2020). No Brasil, a incidência estimada para o ano de 2020 é de 626.030 novos casos, dos quais 27.080 devem ser diagnosticados só no estado do Ceará (INCA, 2020).

Terapias com cirurgia, radioterapia ou quimioterapia são utilizadas para o tratamento, sendo mais usual a combinação entre os vários tipos existentes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Contudo, a quimioterapia é bastante utilizada com o objetivo de eliminar células neoplásicas, o que compromete a viabilidade dessas células, bloqueando vias metabólicas e/ou bioquímicas sensíveis ao efeito do fármaco utilizado (LIMA, 2004; RANG *et al.*, 2007).

O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), bastante utilizado no tratamento de adenocarcinomas (DIASIO; HARRIS, 1989; MITCHELL *et al.*, 2006; GIFONI, 2012), principalmente os de mama, do cólon e do reto (DIASIO; HARRIS, 1989), atua incorporando-se ao RNA e impedindo a replicação celular (MCCARTHY *et al.*, 1998; LEITÃO *et al.*, 2007a). Entretanto, ele apresenta diversos efeitos secundários relacionados ao trato gastrointestinal (TGI), com destaque para a mucosite, encontrada em cerca de 40% dos pacientes (SONIS, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010).

A mucosite pode se manifestar ao longo de todo o TGI, desde a boca até o ânus, sendo caracterizada por um dano às membranas mucosas, resultando em alterações estruturais, funcionais e imunológicas (SANGILD *et al.*, 2018; CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020). Esse processo se inicia com a ação do quimioterápico, ou outro agente antineoplásico, diretamente sobre as células epiteliais e sobre a microbiota residente (SONIS, 2004; SONIS, 2010). Essas células lesionadas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas padrão associadas ao patógeno (PAMPs) e moléculas padrão associadas ao dano (DAMPs) (PICO *et al.*, 1998; BASILE *et al.*, 2019), resultando em ativação de receptores específicos, como o receptor do tipo toll-4 (TLR-4), responsável por reconhecer fragmentos da parede celular de bactérias gram-negativas, os lipopolissacarídeos (LPS), um tipo de PAMP (FANG *et al.*, 2017). A ativação desse receptor desencadeia a produção e fosforilação de mediadores como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (JUSTINO, 2016), o fator 6 associado ao receptor de TNF da proteína ligada à ubiquitina (TRAF-6) (KAWAI *et al.*, 2004), o

fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), a proteína quinase B (Akt ou PKB) e o alvo de mamífero da rapamicina (mTOR) (KIM *et al.*, 2004) que culminam no estímulo para a transcrição de diversos mediadores inflamatórios (AHMAD *et al.*, 2013). Outras repercussões da produção dessas moléculas e ativação desses receptores são a utilização de sistemas enzimáticos antioxidantes celulares como a glutatona (GSH), a catalase (CAT), e a superóxido dismutase (SOD); dano oxidativo aos lipídios de membrana celular, com aumento de malondialdeído (MDA) (RTIBI *et al.*, 2018; MENDES, 2019; QUARESMA *et al.*, 2019); produção de diversos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4 (SOARES *et al.*, 2013) e IL-6; aumento do infiltrado neutrofílico (SOARES *et al.*, 2008) e ativação de grandes vias de sinalização inflamatória, a via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a via Proteína-quinase ativada por mitógenos (MAP quinase) (JUSTINO, 2016).

Diversos tratamentos têm sido explorados com intuito em reduzir ou reverter o processo inflamatório e oxidante, característicos da fisiopatologia da mucosite (VAN SEBILLE *et al.*, 2015). Saleem *et al.* (2018) relatam que os compostos fenólicos são utilizados como potentes antioxidantes, sendo utilizados com eficiência contra doenças inflamatórias.

Estudos conduzidos por Rocha *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2014) demonstram que o caroço de açaí apresenta maior teor de compostos fenólicos que a polpa e a casca, e que o extrato hidroalcoólico do caroço (ASE) apresenta maior conteúdo desses polifenóis que o extrato do açaí e que o extrato aquoso.

Os efeitos farmacológicos do ASE foram comprovados no modelo experimental de hipertensão vascular (MATHEUS *et al.*, 2006), disfunção cardíaca e endotelial (ROCHA *et al.*, 2007; DA COSTA *et al.*, 2012; ZAPATA-SUDO *et al.*, 2014), lesão renal (DA COSTA *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2017), obesidade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010), diabetes tipo II (DE BEM *et al.*, 2018 b) e inflamação pulmonar (DE MOURA *et al.*, 2012). Diversos estudos prévios demonstraram ainda a ausência de toxicidade nas doses de 200 mg/kg e 300 mg/kg por dia, relatando efeito anti-inflamatório nos parâmetros avaliados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; DA COSTA *et al.*, 2012; DE MOURA *et al.*, 2012; DE BEM *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; DA CONTA *et al.*, 2017; DE BEM *et al.*, 2018b; DA SILVA *et al.*, 2020; DE BEM *et al.*, 2020)

Baseado na literatura, o presente trabalho destinou-se a investigar os efeitos farmacológicos do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí e possível participação das vias inflamatórias TLR-4/NF- $\kappa$ B e MyD88/PI3K/mTOR nesse efeito, em modelo experimental de mucosite intestinal induzido por 5-Fluorouracil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer e tratamento

O termo câncer se refere às neoplasias malignas, comumente conhecidas como tumores. Essas são caracterizadas pelo crescimento anormal de células, que excede aos tecidos normais, mesmo após a interrupção dos estímulos que deram origem à mudança (MITCHELL *et al.*, 2006).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. Os tipos de cânceres mais comuns no mundo são: pulmão (com cerca de 2.09 milhões de casos), mama (cerca de 2.09 milhões de casos), colorretal (cerca de 1.80 milhões de casos), próstata (em torno de 1.28 milhões de casos), pele (não melanoma) (cerca de 1.04 milhões de casos) e estômago (em torno de 1.03 milhões de casos). Dentre os tipos que apresentam maior mortalidade estão, o câncer de pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama. Estima-se que cerca de 70% das mortes ocorrem em países de baixa e média rendas (World Health Organization, 2018).

No Brasil, os tipos de cânceres mais comuns são: próstata, traqueia, brônquio e pulmão e colorretal, para os indivíduos do sexo masculino, e mama colorretal e colo de útero para as mulheres. A incidência estimada para o ano de 2020 é de 309.230 casos nos homens e 316.140 casos em indivíduos do sexo feminino. Esses mesmos tipos foram os que mais levaram os brasileiros ao óbito no ano de 2017. A estimativa para novos casos, em 2020, na região Nordeste do Brasil é de 69.140 casos nos homens e 67.070 nas mulheres. Para o estado do Ceará, esses números serão cerca de 27.080 novos casos em 2020, sendo 8.230 na capital e o restante no interior do estado. Os tipos mais incidentes nos homens serão: próstata (36,9%); estômago (8,05%); traqueia, brônquio e pulmão (7,29%); e colorretal (5,44%). Para as mulheres, esperam-se que 26,7% das ocorrências sejam nas mamas; 10,7% no colo do útero; 6,59% na traqueia, brônquio e pulmão; 6,38% na traqueia e que 4,2% sejam no colon e reto (Instituto Nacional de Câncer, 2019).

Para o tratamento do câncer são utilizados vários métodos, sendo os mais tradicionais a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia. Mais recentemente têm-se utilizado outras formas terapêuticas que incluem a terapia de fotorradiação e a imunoterapia. O objetivo de cada um desses tratamentos é a cura da neoplasia, normalmente pela combinação de mais de uma das técnicas citadas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A cirurgia leva à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástases. A radioterapia, que normalmente utiliza raios gama, radioisótopos como o cobalto 60, raios-X e até prótons e mésons, é usada junto à cirurgia, para a diminuição de tumores grandes, de recorrência e da chance de metástases. A fotorradiação permite a localização e a destruição do tumor com maior seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (de 620 a 640 nm de comprimento de onda) para a detecção utilizando fibras óticas. A imunoterapia trabalha estimulando as próprias defesas do corpo, sendo usada como adjuvante e, principalmente, para destruir células cancerosas residuais. A quimioterapia é a utilização de um fármaco para a destruição de células neoplásicas, tentando preservar as normais (ALMEIDA *et al.*, 2005).

### ***2.1.1 Terapias farmacológicas no câncer***

A quimioterapia no câncer pode ser usada como monoterapia ou adjunta de outros tipos de tratamento (RANG *et al.*, 2007). O objetivo do tratamento é a erradicação de células neoplásicas, com menor lesão possível aos tecidos saudáveis. Os quimioterápicos induzem as células tumorais à morte ou comprometem a viabilidade dessas células, bloqueando vias metabólicas ou bioquímicas sensíveis ao efeito do fármaco (LIMA, 2004).

Os principais fármacos anticâncer podem ser divididos de acordo com sua estrutura química e função a nível celular em: fármacos citotóxicos, hormônios e antagonistas hormonais, derivados de plantas e outros agentes, como exposto no Quadro 1 (RANG *et al.*, 2007).

Quadro 1 – Classes farmacológicas de agentes quimioterápicos.

<b>Categoria dos fármacos</b>	<b>Sub-classificação</b>	<b>Exemplos</b>
Citotóxicos	Agentes alquilantes	Mostardas nitrogenadas, nitrossouréias, bussulfano, cisplatina, dacarbazina.
	Antimetabólitos	Metotrexato, Fluorouracil, citarabina, gencitabina, fludarabina, pentostatina.
	Antibióticos citotóxicos	Doxorrubicina, dactinomicina, bleomicina, mitomicina, procarbazona, hidroxycarbamida.
Antagonistas hormonais	Antiestrógenos	Tamoxifeno, toremifeno, anastrozol, letrozol, aminoglutetina.
	Antiandrogênicos	Flutamida, bicalutamida.
	Inibidores da síntese de hormônio supra-renal	Trilostano.
	Isótopos radioativos	Iodo radioativo.
Hormônios	Glicocorticóides	Prednisolona, dexametasona.
	Estrógenos	Dietilestilbestrol, etinilestradiol.
	Progestágenos	Megestrol, norgestrona, medroxiprogesterona.
	Análogos do hormônio liberador de gonadotrofina	Gossirelina, busserrelina, octreotida, lanreotida.
Derivados de plantas	Alcalóides da vinca	vincristina, vimblastina, vindesina.
	Taxanos	Paclitaxel, docetaxel.
	Etoposídeos	Etoposídeo.
	Campotecinas	Irinotecano, topotecano.
Outros	Inibidores da tirosinase	Imatinibe.
	Anticorpos monoclonais	Rituximabe, trastuzumabe.
	Modificadores da resposta biológica	$\alpha$ -interferona, aldesleucina, tretinoína.

Fonte: Adaptado de RANG *et al.* (2007).



Os fármacos citotóxicos afetam de modo específico a função microtubular e, portanto, a formação do fuso mitótico. Os agentes alquilantes possuem grupos químicos na molécula capaz de formar ligações covalentes com substâncias nucleofílicas particulares nas células. Os antimetabólitos incluem: antagonistas de folato (principal é o metotrexato), análogos de pirimidina (o Fluorouracil) e análogos da purina (fludarabina, pentostatina, cladribina, mercaptopurina e tioguanina); eles bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA. Os antibióticos citotóxicos têm origem em produtos do metabolismo microbiano e evitam a divisão celular em mamíferos (RANG *et al.*, 2007).

Os derivados de plantas exercem efeitos citotóxicos potentes. Neste grupo estão incluídos os alcaloides da vinca, que se ligam à tubulina e inibem a mitose na metáfase; os taxanos, que se ligam aos microtúbulos, congelando-os; o etoposídeo, que inibe a síntese de DNA por ação na topoisomerase II; e as campotecinas, que inibem a topoisomerase I (RANG *et al.*, 2007).

Os hormônios (ou seus antagonistas) atuam em tumores sensíveis a hormônios, seja inibindo a produção endógena ou inibindo com ações opostas (antagônicas). Os principais hormônios são glicocorticóides, estrógenos, andrógenos e análogos do hormônio liberador de ganadotrofina. Os principais antagonistas hormonais são antiestrógenos, antiandrógenos, inibidores da síntese de hormônio supra-renal e isótopos radioativos (RANG *et al.*, 2007).

Dentre os outros fármacos classicamente utilizados destaca-se a procarbazina, responsável por inibir a síntese de DNA e RNA; a crisantaspase, que decompõe a asparagina em ácido aspártico e amônia; a hidroxycarbamida, que inibe a ribonucleotídeo redutase; a ansacarina age sobre a topoisomerase II; a mitoxantrona causa quebra da cadeia de DNA; o trilostano inibe a síntese de esteroide adreno cortical; os anticorpos monoclonais, que podem ativar o sistema imune do hospedeiro para que a célula cancerosa seja destruída pelo sistema complemento, ou fixam-se nas células defeituosas bloqueando receptores do fator de crescimento e promovendo a apoptose (ambos agem lisando linfócitos B); o imatinibe, que é um inibidor das vias da tirosina quinase (ele é um inibidor competitivo do sítio de ATP, bloqueando a atividade da enzima tirosina quinase ao impedir que o substrato seja fosforilado. Este bloqueio previne a transdução de sinais de energia necessários para a proliferação celular e apoptose) e os modificadores da resposta biológica, que agem intensificando a resposta do hospedeiro (RANG *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2017).

A toxicidade dos medicamentos antineoplásicos depende de fatores relacionados aos medicamentos e aos pacientes. A respeito dos medicamentos, o regime de quimioterapia

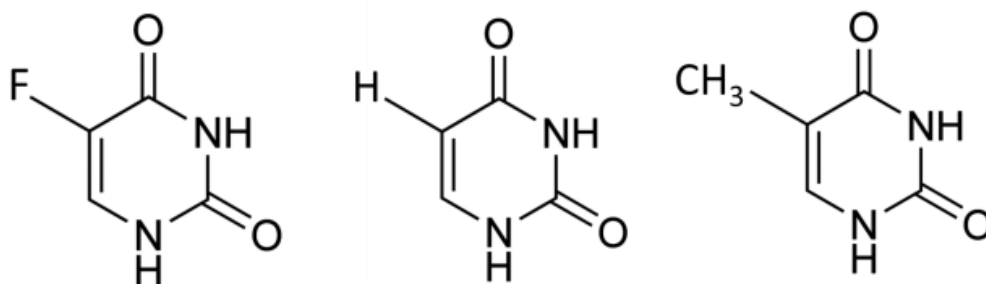
administrado, a dose do medicamento utilizado, a via de administração, a via de eliminação e o sinergismo dos medicamentos devem ser considerados. Os fatores mais importantes dependentes do paciente são: estado fisiológico, idade, a administração de tratamentos anteriores de quimioterapia ou radioterapia, patologias concomitantes do paciente (presença de metástases, desnutrição, etc.) e, finalmente, a existência de insuficiência hepática ou renal (FERREIRO *et al.*, 2003).

Nesse contexto, destacamos o 5-Fluorouracil (5-FU), que é amplamente utilizado em tumores oriundos de células epiteliais com padrão de crescimento glandular (adenocarcinomas) de diversas etiologias. Ele é apontado como eficaz no tratamento de cânceres que sofreram metástases, ou que tem a possibilidade de fazê-lo. Entretanto, o 5-FU apresenta toxicidade importante o que limita o esquema terapêutico isoladamente, sendo necessário, por vezes, utilizá-lo em combinação com outros quimioterápicos, juntamente com tratamentos cirúrgicos ou radioterápicos (MCCARTHY *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2006; LEITÃO *et al.*, 2007a; GIFONI, 2012). Neurotoxicidade, pericardites, perda ponderal, mucosite, mielotoxicidade, cistite e toxicidade pulmonar são efeitos adversos associados ao uso desse fármaco (FERREIRO *et al.*, 2003; LIMA, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; VERDE, 2007).

### 2.1.2 O Antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-FU é um fármaco antimetabólico, análogo da uracila, preparada a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor, na posição cinco, mais estável (Figura 1) (WOHLHUETER; MCIVOR; PLAGEMANN, 1980). Dessa maneira, a droga, após absorvida, é incorporada ao RNA e impede a conversão do nucleotídeo uracila em timina, impedindo a replicação celular (PINEDO; PETERS, 1988).

Figura 1 – Estruturas químicas do 5-FU, uracila e timina.

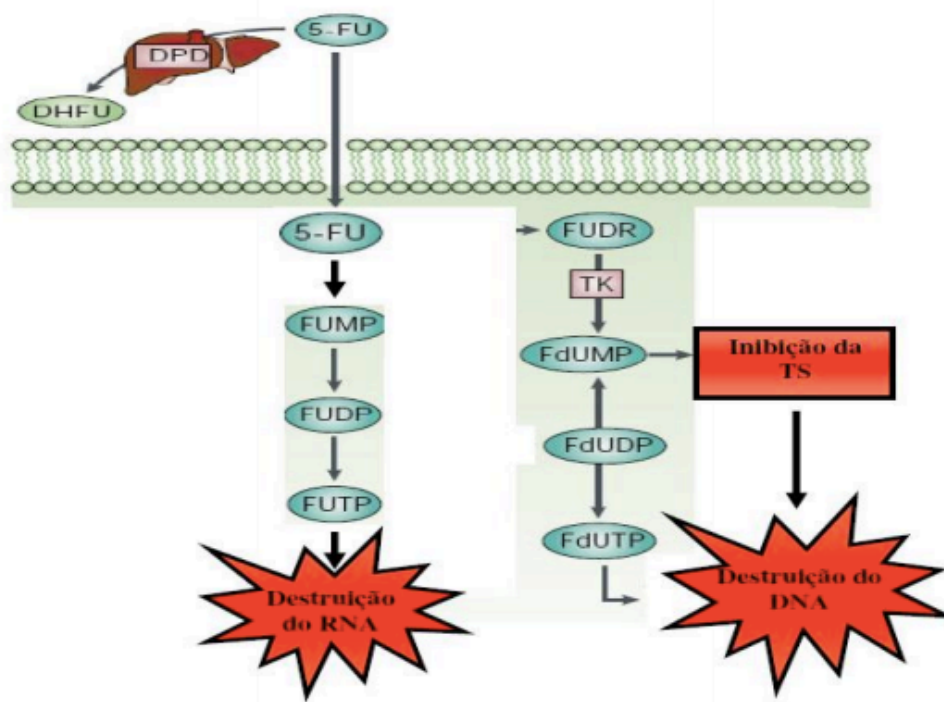


Fonte: Adaptado de LONGLEY, HARKIN E JOHNSTON (2003).  
Da esquerda para a direita: 5-Fluorouracil, Uracila e Timina.

O 5-Fluorouracil foi inicialmente sintetizado na segunda metade da década de 50 e tem sido utilizado, desde então, para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (DIASIO; HARRIS, 1989). Ele é utilizado para o tratamento de cânceres sólidos, dentre eles, o de mama, o colorretal (apresentando importante terapêutica), o de ovário e o de cabeça e pescoço (DIASIO; HARRIS, 1989; NOORDHUIS *et al.*, 2004; SHIGA; HIRAIDE, 2020). A principal forma de administração é endovenosa. Ele pode ser administrado como um pró-fármaco oral, entretanto, por essa via, a biodisponibilidade é consideravelmente reduzida (GOIRAND *et al.*, 2018).

O 5-FU pode ser convertido em três metabólitos ativos: o monofosfato de fluordeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluordeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluoruridina (FUTP). A ativação do 5-Fluorouracil inicia-se pela conversão em monofosfato de fluoruridina (FUMP), que, em seguida, é fosforilado em difosfato de fluoruridina (FUDP), o qual, finalmente, poderá ser fosforilado no metabólito ativo, o trifosfato de fluoruridina (FUTP), ou convertido em difosfato de fluordeoxiuridina (FdUDP). Esse composto intermediário do metabolismo de 5-FU pode ser fosforilado ou desfosforilado dando origem aos metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Uma via alternativa é a catalisação pela timidina fosforilase (TP) que converte 5-FU em fluordeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilado em FdUMP pela timidina quinase. A conversão do 5-Fluorouracil em diidrofluorouracil (DHFU) pela diidropirimidina desidrogenase (DPD) é a etapa limitante do catabolismo de 5-FU, tanto em células normais como em células cancerígenas. Nenhum dos metabólitos produzidos por essa via metabólica apresenta efeito terapêutico. O fígado é o principal local de metabolização do 5-FU, cerca de 80%. Esse fármaco possui uma eliminação rápida e meia vida curta, cerca de 10 min. Uma baixa quantidade de 5-FU é eliminada através da depuração urinária (<10%) e geralmente é considerada insignificante (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; GOIRAND *et al.*, 2018) como visto na Figura 2.

Figura 2 - Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.

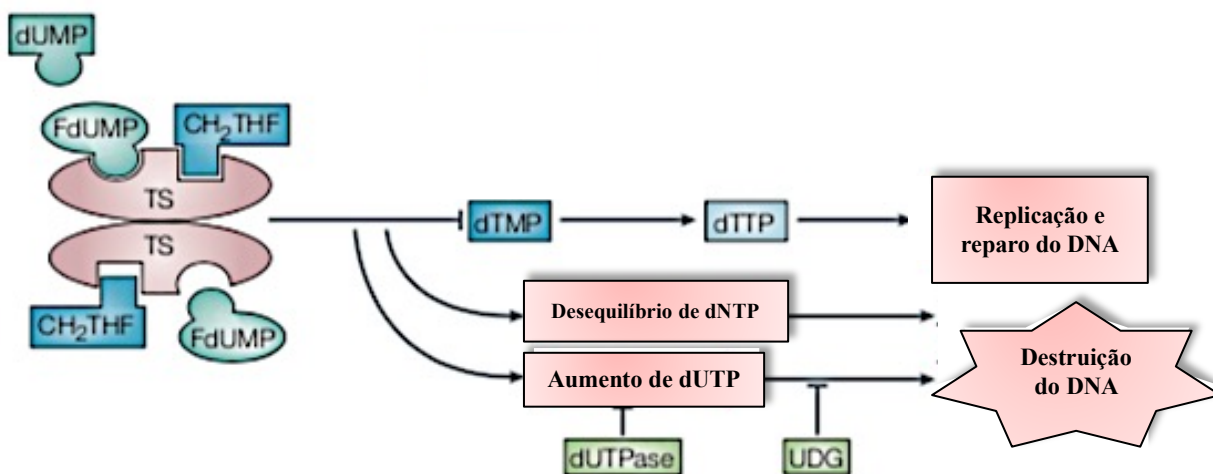


Fonte: Adaptado de LONGLEY, HARKIN E JOHNSTON (2003).

5-FU – 5-Fluorouracil; DPD – diidropirimidina desidrogenase; DHFU – dihidrofluorouracil; FUMP – monofosfato de fluorouridina; FUDP – difosfato de fluorouridina; FUTP – trifosfato de fluorouridina; FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS – timidilato sintetase; TK – timidina quinase; FUDR - fluorodeoxiuridina.

Acredita-se que o principal mecanismo de citotoxicidade do 5-Fluorouracil seja devido à sua capacidade de incorporar fluoronucleotíneo no DNA e/ou RNA. Outro mecanismo atribuído a este antineoplásico é a inibição da enzima timidilato sintetase, demonstrado na Figura 3. Essa é responsável pela conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP), utilizando o 5,10-metileno tetra-hidrofolato ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) como um doador de grupos metil, entretanto, quando o metabólito ativo do 5-FU, que é o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), está presente, esse se acopla ao sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS/ $\text{CH}_2\text{THF}$ . Esse complexo impede o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo, inibindo a síntese de dTMP. Essa reação causa um desequilíbrio nas concentrações de deoxinucleotídeos (dNTP), assim como, aumenta os níveis de deoxiuridina trifosfato (dUTP). Ambas as situações causam destruição do DNA. A extensão ao dano do DNA causado pela dUTP é dependente dos níveis das enzimas pirofosfato dUTPase e uracil-DNA glicosilase (UDG) (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Figura 3 – Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil na enzima timidilato sintetase.



Fonte. Adaptado de LONGLEY, HARKIN E JOHNSTON (2003).

TS - enzima timidilatosintase; cofator CH<sub>2</sub>THF - 5,10-metilenotetrahidrofolato; dUMP - deoxiuridina trifosfato; dTMP - deoxitimidina monofosfato; dTTP - trifosfato de deoxitimidina; FdUMP - monofosfato de fluorodeoxiuridina.

O 5-FU apresenta diversos efeitos secundários que variam de acordo com o tratamento, a dose utilizada e a via de administração. Esses efeitos são mais notáveis em células com alta atividade mitótica, como tecidos de rápida proliferação (KIM *et al.*, 2006).

Devido à natureza não seletiva do 5-FU entre células neoplásicas e células normais é comum encontrar toxicidade gastrointestinal associada ao uso desse medicamento (CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020). Portanto, os efeitos colaterais desse antineoplásico mais estudados são aqueles associados ao trato gastrointestinal, que resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite e colite (KOENIG; PATEL, 1970). Além dos efeitos citados, Chartier, Howarth e Mashtoub (2020) afirmam que perda de apetite, náusea e diarreia estão entre os efeitos mais relatados.

Aproximadamente, entre 40% e 60% dos pacientes que recebem o tratamento com o 5-FU apresentam mucosite, podendo esse índice chegar a 100%, quando há a necessidade de se utilizar altas doses. Esses efeitos contribuem para a interrupção do tratamento, a mudança no fármaco ou no esquema terapêutico, podendo trazer grande prejuízo para a eficácia do tratamento oncológico, refletindo na saúde e na qualidade de vida dos pacientes (SONIS, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010; JUSTINO, 2016; CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020).

## 2.2 A mucosite intestinal

A mucosite intestinal é caracterizada pela deterioração e ulceração da membrana mucosa intestinal (CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020). Esse processo tem início com a lesão das células epiteliais, levando ao aumento do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas. Isso desencadeia a utilização de sistemas enzimáticos antioxidantes celulares como a glutatona (GSH), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Essas espécies reativas também estão associadas ao dano oxidativo aos lipídios de membrana celular, levando ao aumento de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica. A lesão epitelial, agravada pelo desbalanço oxidativo, leva à ativação e produção de diversos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4 e IL-6; ao aumento do infiltrado neutrofílico, indicado pelo aumento da enzima mieloperoxidase e à ativação de vias do fator de necrose tumoral kappa B (NF- $\kappa$ B), produzindo mais citocinas pró-inflamatórias. Esses mediadores retroalimentam o processo inflamatório e levam às alterações características da mucosite intestinal (PICO *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2008; JUSTINO, 2016; RTIBI *et al.*, 2018; QUARESMA *et al.*, 2019; MENDES, 2019).

As manifestações clínicas observadas no curso da mucosite são vários sinais e sintomas, incluindo dor abdominal, diarreia, disfagia, dispepsia, náusea, vômitos e úlceras orais (PARRILI *et al.*, 1989; PEREIRA *et al.*, 2016). Essas alterações, que podem aparecer ao longo de todo o Trato Gastrointestinal (TGI), desde a boca até o ânus, são caracterizadas como um dano às membranas mucosas, levando a alterações estruturais, funcionais e imunológicas, podendo comprometer a absorção de nutrientes e fluidos, funções endócrinas do TGI e a integridade da barreira intestinal (SANGILD *et al.*, 2018; CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020).

### 2.2.1 Fisiopatologia da mucosite intestinal

A fisiopatologia da mucosite é dividida em 5 estágios (Figura 4). O primeiro é a Iniciação: essa fase tem início pela exposição ao tratamento anticâncer, seja a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou outro. São induzidos danos diretos ao DNA, com geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente aumento do estresse oxidativo. A lesão nas camadas epiteliais e submucosas no intestino, provoca a liberação de moléculas padrão associado ao dano (DAMPs), a liberação de moléculas padrão associada ao dano endógeno

(Peptídeo antimicrobiano relacionado à Catelina - CRAMPs) e moléculas padrão associado patógeno (PAMPs), essa última, liberada pela destruição da microbiota residente (SONIS, 2004; SONIS, 2010; BASILE *et al.*, 2019).

A segunda fase é a resposta ao dano primário ou fase da desregulação/ ativação. Nesse estágio, ROS, a resposta imune inata e as ligações de DAMPs, CAMPs e PAMPs aos seus receptores, aumentam a propagação dos danos celulares e ativam diversas vias de transcrição, dentre essas, a via do NF- $\kappa$ B. Dessa forma, várias citocinas pró-inflamatórias começam a ser produzidas, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, respondedores ao estresse como ciclooxygenase-2 (COX-2), moduladores de citocinas por fibroblastos e células endoteliais, que, por sua vez, levam à ativação de genes relacionados à apoptose celular. Nesta fase há também uma expressão aumentada de genes relacionados a moléculas de adesão e angiogênese. Concomitante a esses processos, as drogas antineoplásicas ativam enzimas que aumentam a morte celular programada (LOGAN *et al.*, 2007; SONIS, 2010; BASILE *et al.*, 2019).

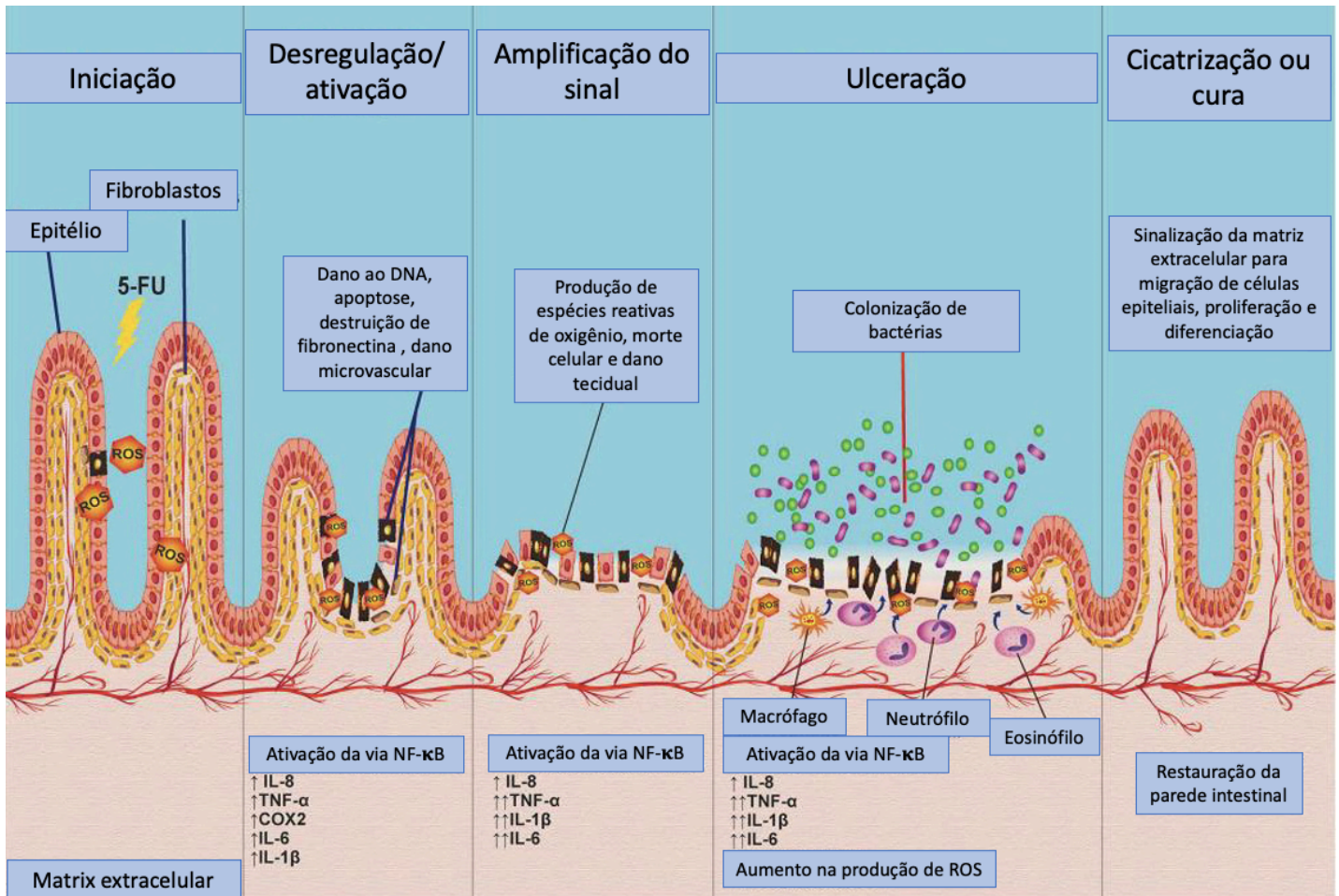
A fase seguinte, ou terceira fase, é a amplificação do sinal. Nessa fase, a resposta primária desencadeia a expressão de várias moléculas que influenciam a resposta local. O NF- $\kappa$ B é regulado positivamente pelo TNF- $\alpha$ , que inicia a sinalização de Proteína Quinase Ativada por Mitogênio (MAPK), levando à ativação da sinalização de jun N-terminal quinase. As vias apoptóticas são ativadas nas células das camadas basais e submucosa, levando a ulcerações no tecido intestinal. As metaloproteinases (MMPs), especialmente a 1 e 3, causam a destruição do colágeno da matriz subepitelial, colaborando para a destruição tecidual, e promove a disseminação de outros sinalizadores danosos (SONIS, 2004; BASILE *et al.*, 2019). Nessa fase, também aumenta a expressão da oxido nítrico sintetase induzida (iNOS) com consequente produção de óxido nítrico (LEITÃO *et al.*, 2007a).

O quarto estágio é a ulceração: Nessa fase, a integridade da mucosa é rompida e terminações nervosas ficam expostas, aparecem as ulcerações profundas e clinicamente sintomáticas, levando a dor intensa. A colonização das úlceras pela microbiota residente resulta na liberação de mais citocinas que levam ao maior dano tecidual. As bactérias presentes podem, ainda, invadir a lâmina própria e atingir vasos levando ao quadro de septicemia. Essa fase é considerada a mais significativamente sintomática, responsável pelo aumento no custo da assistência médica. Na mucosite intestinal, esse estágio fica evidente de 1 a 2 dias após a administração do tratamento (CAMPOS *et al.*, 2014; BASILE *et al.*, 2019).

O último estágio é a cicatrização ou cura: nessa etapa ocorre a cicatrização

espontânea das úlceras. A fase é caracterizada pela diminuição gradual da resposta inflamatória e o predomínio de estímulos reparadores, com proliferação epitelial, migração e diferenciação estimulada pela matriz extracelular e restabelecimento da microbiota intestinal local. A resolução desse estágio depende da condição sistêmica do paciente (SONIS, 2004; CAMPOS *et al.*, 2014; BASILE *et al.*, 2019).

Figura 4 – Fisiopatologia da mucosite.



Fonte: Adaptado de BATISTA *et al.* (2020).

### 2.2.2 Alterações histopatológicas na mucosite intestinal

A mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil leva a diversas alterações histopatológicas e morfométricas, como a perda da arquitetura normal das criptas intestinais, junto com o encurtamento dos vilos, redução na relação vilo/cripta, presença de vacúolos celulares, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, edema, necrose, morte celular, infiltração neutrofilica na camada muscular e por último, ruptura da barreira



epitelial intestinal (SOARES *et al.*, 2013; DE MIRANDA *et al.*, 2019; DE MIRANDA *et al.*, 2020).

Outros marcadores relacionados a manutenção da estrutura tecidual intestinal e que encontram-se reduzidos na mucosite intestinal são: a quantidade de vilina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (ARAUJO *et al.*, 2015). A vilina é um componente estrutural das microvilosidades que forma a borda em escova do intestino delgado e desempenha um papel fundamental na manutenção da organização da borda em escova ao se ligar à F-actina em uma rede de filamentos (ATHMAN; LOUVARD; ROBINE, 2002) e o IGF-1 circulante têm sido implicado no controle da proliferação epitelial intestinal por meio de interações com nutrientes tróficos intestinais, hormônios múltiplos e fatores de crescimento (GORDON *et al.*, 2004)

O tratamento com o 5-FU é ainda capaz de aumentar significativamente o número de mastócitos degranulados e diminuir o número de células caliciformes (células de Goblet) no duodeno (DE MIRANDA *et al.*, 2020). Araújo *et al.* (2015) acrescentam que as células caliciformes estão reduzidas nas vilosidades e nas criptas e as que as células de Paneth encontram-se reduzidas nas criptas, contribuindo para a deficiência na absorção de nutrientes e na perda de peso.

Costa *et al.* (2019) demonstraram que essas alterações ocorrem a nível de sistema nervoso entérico com presença de inflamação nas células da glia e diminuição de neurônios entéricos em animais tratados com o 5-FU.

### ***2.2.3 Alterações bioquímicas na mucosite intestinal***

Os sistemas antioxidantes podem ser de dois tipos: o enzimático como SOD, CAT, GPx, tioredoxina e peroxiredoxina; ou não enzimático como ascorbato, tocoferóis, GSH, bilirrubina e ácido úrico. Os danos oxidativos causados na membrana e nas proteínas podem ser avaliados pela formação de produtos como o MDA e a carboxilação de proteínas (DE MOURA; RESENDE, 2016).

Nas membranas celulares, os lipídios, são particularmente suscetíveis a danos induzidos por ROS, resultando em peroxidação lipídica e produção MDA. Esse composto é produzido a partir de ácidos graxos poli-insaturados, tanto por reações químicas quanto por reações catalisadas por enzimas. O MDA é o principal subproduto das chamadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e é um dos biomarcadores mais medidos para o estresse oxidativo

(BARRERA, 2012; TSIKAS, 2017). Encontra-se elevado em muitas doenças, incluindo a patogênese de doenças intestinais relacionadas à inflamação (TSIKAS, 2017; SOTTERO *et al.*, 2018).

Outro marcador do estresse oxidativo alterado na mucosite intestinal é o GSH, um tripeptídeo formado por L-glutamato, L-glicina e L-cisteína, que está presente no citosol de células epiteliais do intestino, como a forma de tiol reduzido biologicamente ativo. Sua oxidação ao dissulfeto de glutathione (GSSG) é frequentemente associada ao estresse oxidativo. A homeostase redox de GSH na mucosa é mantida pela sua síntese, pela regeneração a partir de GSSG e pela captação de GSH na mucosa, através da membrana apical. A defesa antioxidante intrainestinal é mediada por enzimas dependentes de GSH que são compartimentadas dentro do citosol, mitocôndrias e núcleo. As isoenzimas da glutaredoxina (Grx) e da glutathione peroxidase (GPx) são as principais envolvidas no equilíbrio redox intestinal (CIRCU; AW, 2012; DIAZ DE BARBOZA *et al.*, 2017). O GSH é um antioxidante multifuncional que desempenha um papel crucial na eliminação de radicais livres, desempenhando um papel essencial para o funcionamento de células imunológicas. A oxidação do GSH ao GSSG e a subsequente diminuição da quantidade de GSH / GSSG geralmente são indicações úteis do aumento da produção de ROS e diminuição da defesa antioxidante (KURUTAS, 2016; DIAZ DE BARBOZA *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2019).

Estudos têm mostrado que a mucosite intestinal induzida por 5-FU leva a alterações na regulação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), com aumento da concentração de malondialdeído (MDA) e diminuição dos níveis de glutathione (GSH), ambos marcadores finais do estresse oxidativo (MENDES *et al.*, 2019; QUARESMA *et al.*, 2019; DE MIRANDA *et al.*, 2020).

Outro marcador importante é o óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula que contém um elétron desemparelhado, um radical livre, tornando-a altamente reativa, com meia vida de 2 a 30 segundos. Após a transmissão do sinal essa molécula transforma-se espontaneamente em nitrito e nitrato (FORD; MIRANDA, 2020). O NO é associado a uma infinidade de funções fisiológicas; no TGI regula a integridade da barreira epitelial, através da modulação do fluxo sanguíneo, da inibição da agregação plaquetária e da adesão leucocitária (CHRISTOPHERSON; BREDT, 1997; LEITAO, 2007b; LEITÃO *et al.*, 2011). Essa molécula é sintetizada a partir de L-arginina por um grupo de isoenzimas coletivamente denominadas NO sintase (NOS). Existem três isoformas distintas: a isoforma endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS) (LEITAO, 2007b; WANG *et al.*, 2020). A iNOS é uma isoforma independente de cálcio

e constantemente induzível. Portanto, a iNOS pode produzir grande quantidade de NO por um período prolongado. Além disso, a iNOS é uma enzima que pode ser estimulada por estresse oxidativo, vias pró-inflamatórias e citocinas inflamatórias (WANG *et al.*, 2020). Os níveis elevados de óxido nítrico (NO) no soro e nos tecidos afetados, sintetizado, principalmente pela iNOS, é um dos principais biomarcadores da inflamação intestinal, contribuindo para a exacerbação dessa inflamação (KAMALIAN *et al.*, 2020).

Outros marcadores de estresse oxidativo encontrados na mucosite intestinal são: aumento da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (AL-ASMARI *et al.*, 2016b), aumento de NO (JUSTINO, 2011), aumento da carbonilação de proteínas, de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), depleção significativa de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como grupos glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e sulfidril (-SH) (RTIBI *et al.*, 2018).

A infiltração neutrofílica no tecido intestinal é indicada pelo aumento do conteúdo de mieloperoxidase (MPO) tecidual. A MPO é uma enzima catiônica contendo heme, encontrada em grânulos azuropilícos primários de neutrófilos e, em menor grau, nos lisossomos primários de monócitos, sendo a mielotoxicidade um dos principais efeitos colaterais em pacientes recebendo tratamento com 5-FU (BHATTACHARYYA, *et al.*, 2014; ARATANI, 2018).

Outros marcadores que se encontram alterados são: aumento da expressão de COX-2 (DE MIRANDA *et al.*, 2020), de moléculas de adesão, como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1, (ICAM-1) e VE-caderina (do inglês, *vascular endothelial cadherin*), todas contribuintes do processo inflamatório na mucosite intestinal (LI *et al.*, 2017).

#### **2.2.4 Alterações funcionais na mucosite intestinal**

A permeabilidade intestinal é a propriedade que permite a troca de solutos e fluidos entre o lúmen e os tecidos, função determinada principalmente pela integridade do epitélio, pelas TJs que “selam” o espaço paracelular e pela camada de muco (ODENWALD; TURNER, 2013; CHANG *et al.*, 2020a). As células epiteliais são interconectadas por complexos de junção apical, que são formados por TJs, junções aderentes e desmossomos. As TJs são compostas por proteínas do núcleo, como as proteínas transmembrana, incluindo claudinas, ocludina e moléculas de adesão juncional (JAMs). Essas moléculas se ligam diretamente a proteínas de

estrutura periplasmática (intracelular), as zonulas ocludens (ZOs). ZOs são os componentes mais importantes para a construção de uma barreira constitutiva de células epiteliais e regulam a permeabilidade da barreira por meio da ancoragem de proteínas das TJs (CHANG *et al.*, 2020a). Essas estruturas regulam fortemente a permeabilidade paracelular, facilitando o movimento de água e solutos entre as células, enquanto bloqueiam a translocação de antígenos maiores. A estabilidade e a estrutura de TJs podem ser reguladas por uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo citocinas e fatores de crescimento, estresse celular, presença de patógenos, probióticos e peptídeos dietéticos (ODENWALD; TURNER, 2013; GALIPEAU; VERDU, 2016). A ruptura das TJs epiteliais dá origem aos distúrbios da barreira paracelular e aumento da permeabilidade de mucosa, estando associadas às doenças inflamatórias intestinais (KUO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020b).

O aumento da permeabilidade intestinal está relacionada com a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na camada epitelial intestinal e resultam em mudanças na função de barreira devido à modificações do citoesqueleto de actina nas células que compõem o epitélio (EDENS *et al.*, 2002). Além dessa alteração, o aumento de PMN implica na ocorrência de diarreias (MADARA *et al.*, 1993), presente no modelo experimental de mucosite intestinal por 5-FU (SOARES *et al.*, 2013).

Outros marcadores implicados na disfunção da barreira são a expressão de TNF $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , as quais estão relacionadas com o aumento na permeabilidade da parede intestinal, pela diminuição na expressão de TJs (NUNES *et al.*, 2019), a expressão do fator transformador de crescimento beta (TGF-1), uma citocina multifuncional que pode normalizar a barreira epitelial ao regular positivamente a expressão de TJs (HOWE *et al.*, 2005).

O processo inflamatório resulta em prejuízo na função da barreira intestinal uma vez que as citocinas liberadas atuam sobre as *tight junctions* promovendo aumento da permeabilidade, dificultando a absorção de nutrientes e influenciando na perda de peso observado no modelo (OSHIMA; MIWA, 2016; SOARES *et al.*, 2008). Outros processos observados além da perda de peso são diarreia sanguinolenta e encurtamento do tamanho do cólon (LI *et al.*, 2017).

Soares *et al.* (2008) demonstraram, também, uma alteração no padrão contrátil do intestino, relacionado a uma hiper-reatividade do músculo intestinal a agonistas, como o carbacol, durante a mucosite intestinal por 5-FU. Essa alteração se mostrou presente tanto na fase inflamatória (do terceiro ao décimo quinto dia após a indução da mucosite), quanto na pós-inflamatória (após o décimo quinto dia). Justino (2011) e Quaresma *et al.* (2019) demonstraram

que o uso do antineoplásico resulta em um retardo no esvaziamento gástrico e um aumento da retenção no segmento medial do intestino e redução no segmento distal. Além disso, Lima (2018) também mostrou que a permeabilidade intestinal, a resistência elétrica transepitelial (TEER) e o transporte intestinal de água e eletrólitos encontram-se alterados no modelo experimental de mucosite intestinal por 5-FU.

### **2.2.5 Processo inflamatório na mucosite intestinal**

A inflamação presente na mucosite parece ter início com a destruição de células epiteliais pelo uso de quimioterápicos (SONIS, 2004). Esses danos causados ao epitélio resultam na ativação de macrófagos da lâmina própria e do inflamassoma NLPR3 (do inglês, *NOD-like receptor, family pyrin domain-containing 3*). O inflamassoma é um complexo proteico citoplasmático responsável pela ativação de respostas inflamatórias contra estressores intra ou extracelulares via clivagem da caspase-1 e subsequente ativação e secreção da citocina pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (NAKATA *et al.*, 2019).

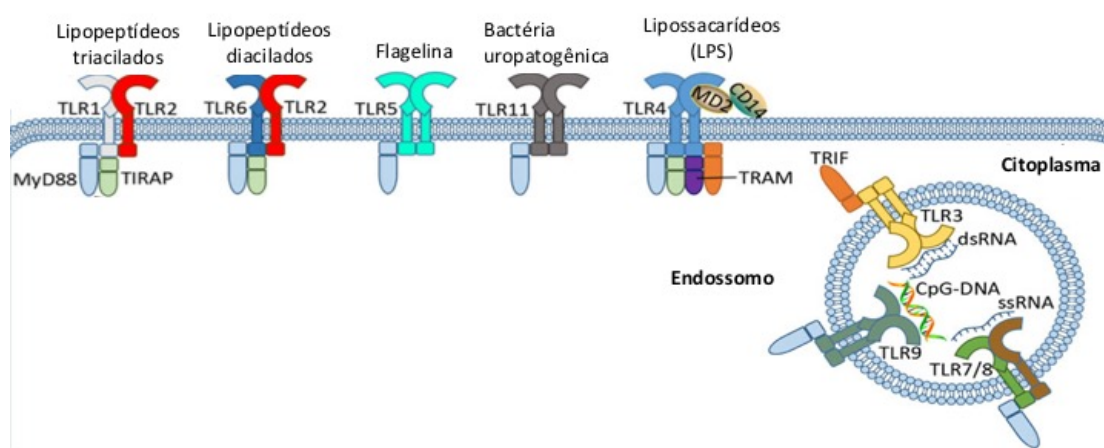
O tratamento com o 5-FU também é associado com alterações na composição da microbiota intestinal, levando à quadros diarreicos, característicos do comprometimento funcional do intestino (STRINGER *et al.*, 2013). Essas alterações levam ao desequilíbrio da microbiota local, com aumento na liberação de lipopolissacarídeos (LPS), uma proteína encontrada na parede de bactérias gram negativas, no lúmen intestinal. Esse LPS é reconhecido por receptores do tipo Toll (TLRs), presentes nas células intestinais e em monócitos, macrófagos e células dendríticas (DOYLE; O'NEILL, 2006; FRANK *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2017). Após a ativação, os TLRs tornam-se dimerizados e desencadeiam a ativação subsequente de cascatas de sinalização a jusante, como a indução de uma variedade de citocinas inflamatórias por transcrição, mediante a fosforilação do inibidor do fator nuclear kappa B (I $\kappa$ B) para ativar NF- $\kappa$ B e dando início a todo o processo inflamatório (LU *et al.*, 2018).

#### **2.2.5.1 Receptores do tipo toll (TLR)**

Os receptores do tipo toll (TLRs) são conhecidos como receptores padrões de reconhecimento (PRRs), importantes iniciadores da resposta imune inata, e reconhecem uma grande diversidade de patógenos (bactérias, fungos, vírus e parasitas em animais) que são comumente chamados de padrão molecular associado ao patógeno (PAMPs) (DOYLE;

O'NEILL, 2006; RATHINAM; CHAN, 2018). Eles reconhecem também os DAMPs, liberados de tecidos danificados, que por sua vez são capazes de ativar a resposta imune (DU *et al.*, 2016). Existem onze TLRs identificados em humanos, classificados em dois subgrupos de acordo com sua localização. Os TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11 estão localizados na superfície celular e respondem principalmente aos PAMPs, os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados nos endossomos e reconhecem, principalmente, ácidos nucleicos de vírus e bactérias (Figura 5) (KAWAI; AKIRA, 2004; DU *et al.*, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática dos subtipos de receptores toll like.



Fonte: Adaptado de DU *et al.* (2016).

TLR - receptores do tipo toll; LPS - Lipopolissacarídeos; MD2 - proteína de diferenciação mieloide 2; CD14 - *cluster of differentiation 14*; TIRAP - domínio TIR contendo proteína adaptadora; MyD88 - Fator de diferenciação mieloide 88; TRAM - molécula adaptadora relacionada ao TRIF; TRIF - domínio TIR contendo IFN $\beta$  indutor de adaptador; TIR - Sinalizador intracelular da família interleucina-1R.

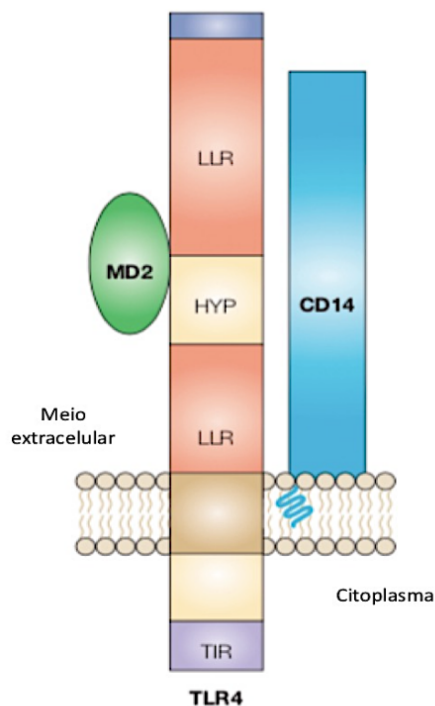
Os TLRs são caracterizados por um domínio de repetição extracelular rica em leucina (LRRs – do inglês *Leucine Rich Repeats*) e duas a quatro estruturas de cisteína conservadas evolutivamente que medeiam o reconhecimento de PAMPs. Eles sinalizam através de um caminho conservado na família interleucina-1R (IL-1R ou TIR). O domínio TIR está presente em todos os membros da família TLRs. (KAWAI; AKIRA, 2004; DU *et al.*, 2016; RATHINAM; CHAN, 2018).

#### 2.2.5.1.1 Receptores do tipo toll – 4 (TLR-4)

O TLR-4 foi o primeiro da família toll a ser identificado e é um dos mais estudados. Vários trabalhos demonstram que ele apresenta uma super expressão em doenças relacionadas ao TGI (LU *et al.*, 2018). O TLR-4 é um dos mais importantes receptores para o reconhecimento de bactérias gram negativas; dentre os ligantes produzidos por essas bactérias, destacamos os

flagelos, as lipoproteínas, peptidoglicanos e LPS. O reconhecimento desses microrganismos ocorre em grande parte no receptor de LPS dos mamíferos - o complexo TLR-4 – MD2 (proteína de diferenciação mieloide 2) – CD14 (do inglês: *cluster of differentiation* 14) - que está presente em muitos tipos de células, incluindo macrófagos e células dendríticas (MILLER, ERNST, BADER, 2005) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema representativo do TLR-4.



Fonte: Adaptado de MILLER, ERNST e BADER (2005).

Componentes do TLR-4: complexo TLR4-MD2-CD14 (Receptor do tipo toll 4 - proteína de diferenciação mieloide 2 - *cluster of differentiation* 14); LLR (domínio de repetição extracelular rica em leucina); HYP (região hiper variável) e o domínio intracelular TIR (caminho conservado na família interleucina-1R).

Justino *et al.* (2019) demonstraram que a mucosite intestinal induzida por 5-FU ativa a resposta imune inata através da ativação dos receptores tipo toll 2 e 4. Essa ativação conta com a participação da proteína MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), que ativa vias celulares inflamatórias como a MAPK e NF- $\kappa$ B.

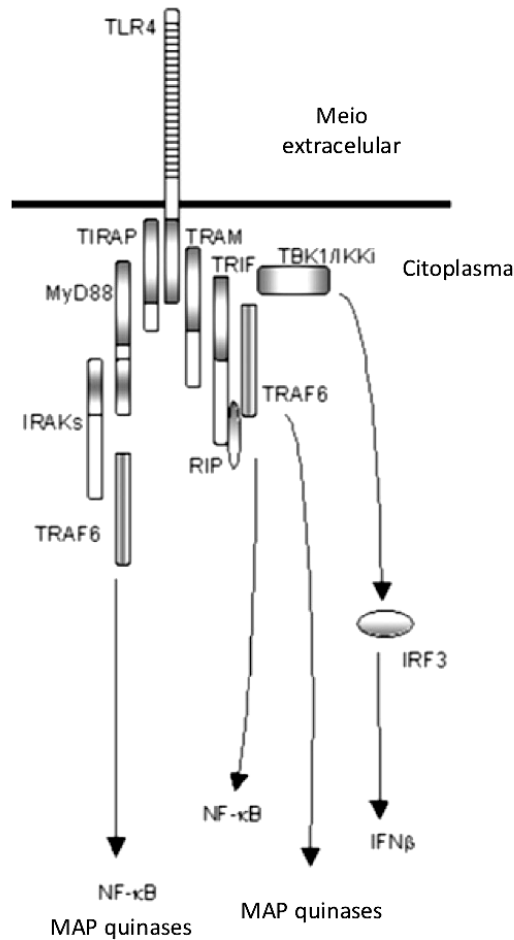
Em 1994 descobriu-se que uma proteína conhecida por estar envolvida na diferenciação mieloide (MyD88) estava relacionada aos domínios TIR (caminho conservado na família interleucina-1R). Posteriormente, foi confirmada sua participação como membro do subgrupo TIR/TLR. Em seguida, outras proteínas adaptadoras, também conhecidas como domínios TIR, foram identificadas; são elas: domínio TIR contendo proteína adaptadora (TIRAP ou MAL); domínio TIR contendo IFN $\beta$  indutor de adaptador (TRIF), também

conhecido como molécula adaptadora 1 de TIR (TICAM-1); molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM), também conhecida como proteína contendo TIR (TIRP) e molécula adaptadora contendo TIR-2 (TICAM-2) e proteínas contendo SAM e ARM (SARM). O recrutamento diferencial dessas proteínas adaptadoras aos TLRs formam a base da especificidade nos processos de sinalização ativadas pelos TLRs (DOYLE; O'NEILL, 2006).

Existem duas cascatas de sinalização inflamatória para o TLR-4, uma dependente de MyD88 e outra independente. Na primeira, o domínio TIRAP se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLRs, levando a ativação da expressão de genes inflamatórios produzidos pelo NF- $\kappa$ B (KAWAI *et al.*, 1999). Os receptores TLR-3 e TLR-4 são capazes de ativar a via de sinalização independente de MyD88, que é mediada pelas moléculas adaptadoras TRIF e TRAM, com resultados distintos. Essa via é capaz de fosforilar moléculas reguladoras de interferons (IRFs), resultando na síntese de interferons do tipo I, tais como o IFN- $\gamma$  e  $\beta$  (DOYLE; O'NEILL, 2006) (Figura 7).



Figura 7 - Cascata de sinalização do TLR-4 dependente e independente de MyD88.



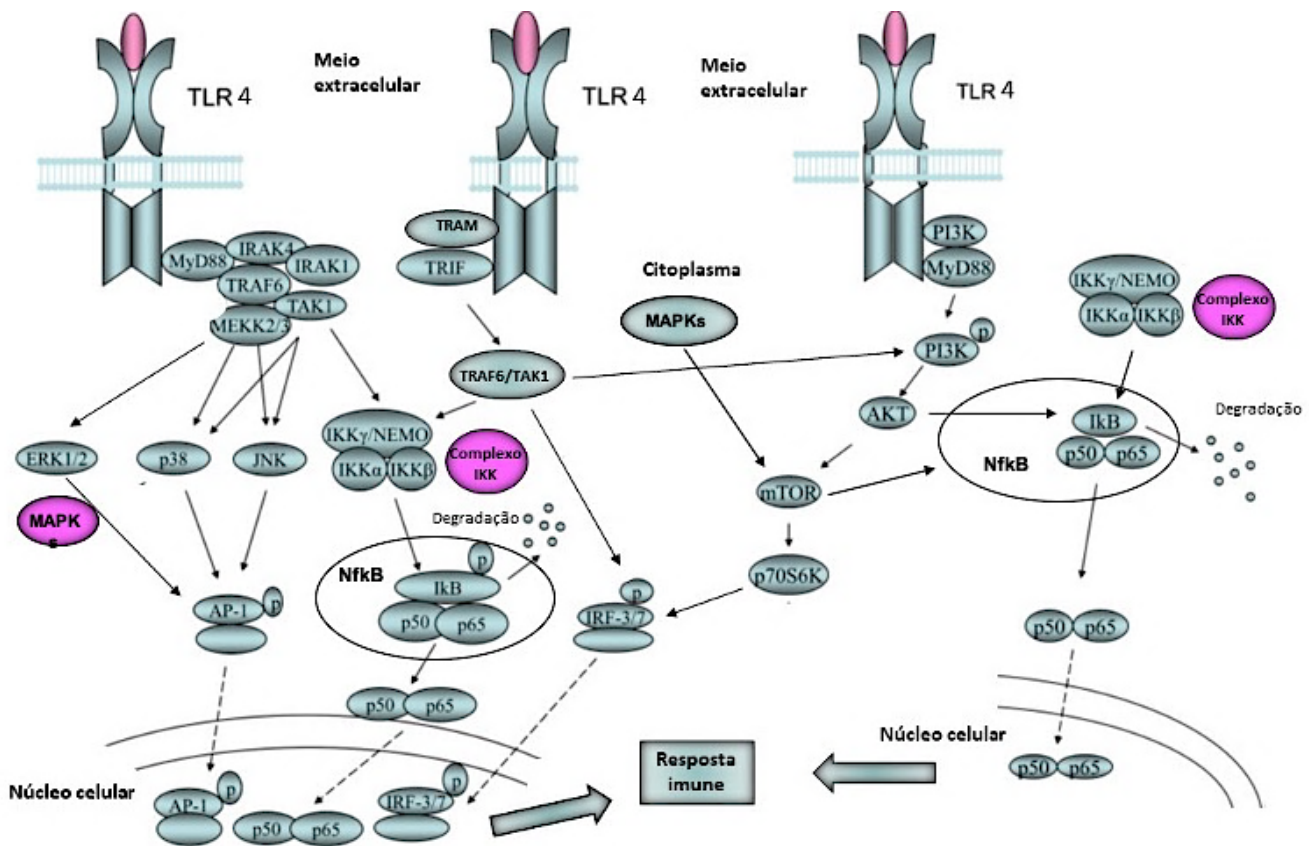
Fonte: Adaptado de KAWAI *et al.* (2004).

TLR-4 - Receptor do tipo toll 4; TIRAP - domínio TIR contendo proteína adaptadora; MyD88 - Fator de diferenciação mieloide 88; IRAKs - Receptor de interleucina 1 associado a quinase; TRAF-6 - fator 6 associado ao receptor de TNF da proteína ligada à ubiquitina; NF-κB - fator nuclear kappa B; TRAM - molécula adaptadora relacionada ao TRIF; TRIF - domínio TIR contendo IFNβ indutor de adaptador; Complexo TBK/IKK - Inibidor da k quinase; IRF - fator regulador de interferon; IFN-β - interferon beta.

A proteína MyD88, possui um domínio TIR C-terminal e um domínio de N-terminal, que se associam ao domínio TIR dos TLRs e após a ligação recruta o receptor de interleucina 1 associado a quinase- 4 (IRAK-4) para o complexo; esta, por sua vez, medeia a fosforilação da IRAK-1. A IRAK-1 fosforilada se dissocia do complexo receptor e se associa ao fator 6 associado ao receptor de TNF da proteína ligada à ubiquitina (TRAF-6). O IRAK -1 e o TRAF-6 se dissociam do complexo receptor e interagem com um complexo pré-associado ligado à membrana da quinase ativada por fator de transformação do crescimento beta (TAK-1) e duas proteínas de ligação ao TAK-1 (TAB) denominadas TAB-1 e TAB-2. Em seguida o TAK-1 é ativado e pode fosforilar alvos a jusante, como o complexo IκB quinase (IKKs) e as vias da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPKs). Uma vez ativado, o complexo IKK induz a

fosforilação e subsequente degradação de IκB, fazendo com que o NF-κB seja liberado, culminando na ativação do NF-κB e na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como exemplificado na Figura 8 (MILLER, ERNST, BADER, 2005; DOYLE; O'NEILL, 2006; KOGUT *et al.*, 2012).

Figura 8 - Via de sinalização de TLR-4.



Fonte: Adaptado de LI, JIANG E TAPPING (2010); FANG *et al.* (2017) e ZHOU *et al.* (2018).

TLR-4- receptor do tipo toll; MyD88- Fator de diferenciação mieloide 88; IRAK- Receptor de interleucina 1 associado a quinase; TRAF- fator associado ao receptor de TNF da proteína ligada à ubiquitina; TAK-; MEKK- MAP quinase quinase quinase; JNK- do inglês: c-Jun NH2 terminal kinase ; ERK1/2- do inglês: extracellular signal regulated kinase; AP1- fator de transcrição da proteína 1; TRAM- molécula adaptadora relacionada ao TRIF; TRIF- domínio TIR contendo IFN-β indutor de adaptador; complexo IKK- ou IκB quinase, inibidores enzimáticos do NF-κB; IRF- fator regulador de interferon; PI3K- fosfatidilinositol-3-quinase; Akt- ou PKB, proteína quinase B; mTOR- via da rapamicina; NF-κB- fator nuclear κB.

As MAP quinases são vias de sinalização celular muito conservadas ao longo da evolução. A cascata clássica consiste na ativação da MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), que fosforila a MAP quinase quinase (MAPKK), que ativa a MAP quinase específica, resultando na ativação de numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, levando a uma transdução do sinal. Três grandes grupos de MAP quinases são

reconhecidos em células de mamíferos: ERK1/2 (do inglês, *extracellular signal regulated kinase*), p38 e JNK (do inglês, *c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase*); essas juntamente com o NF- $\kappa$ B controlam a resposta celular ao estresse e à inflamação (WAETZIG; SCHREIBER, 2003; CUSCHIERI; MAIER, 2005; JUSTINO, 2016). A via MAPK ativa o fator de transcrição da proteína 1 (AP-1), que também é responsável pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (KOGUT *et al.*, 2012).

#### 2.2.5.1.2 A ativação do mediador fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da via da rapamicina (mTOR)

Hyam *et al.* (2013) afirmam que o TRAF6, TAK-1, TAB-1 e 2, além de poder ativar o complexo I $\kappa$ B quinase (IKKs), iniciam a fosforilação do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).

PI3Ks são enzimas que catalisam a fosforilação de um ou mais fosfolípidos de inositol na posição 3 do anel inositol. Ambos os substratos e produtos dessas reações são fosfolípidos cativos da membrana e a ação das PI3Ks é gerar mensageiros moleculares específicos nas membranas sobre as quais atuam. Existem oito PI3Ks em células de mamíferos que são classificadas em três famílias; quatro isoformas da classe I (PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), três isoformas da classe II (PI3K $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) e uma única isoforma da classe III. Alguns dos principais processos celulares regulados pela sinalização de classe I de PI3K incluem crescimento, movimento e diferenciação. A atividade da classe III de PI3K ainda é pouco compreendido, mas é provável que envolva vários eventos de fosforilação catalisados por quinases anteriores à ela na via. As PI3Ks de classe II são ainda menos compreendidas, mas evidências sugerem que podem desencadear eventos regulatórios análogos aos que ocorrem quando lipídios são sintetizados por PI3Ks classe III/I (HAWKINS; STEPHENS, 2015).

O PI3K é ativado pelo receptor tirosina quinase, que ativa várias moléculas de sinalização, sendo a proteína quinase B (Akt ou PKB) seu alvo preferido (AHMAD *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2017). O Akt pode, em seguida, fosforilar IKK- $\alpha$  (uma das subunidades do complexo I $\kappa$ B) no T23 (posição 23 correspondente à treonina na proteína) e essa fosforilação é um pré-requisito para a fosforilação em S534 (posição 534 correspondente à serina na proteína), do p65 de IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ . Assim, a fosforilação de I $\kappa$ B leva a ativação de NF- $\kappa$ B (DAN *et al.*, 2008; BAI; UENO; VOGT, 2009; AHMAD *et al.*, 2013). O alvo da via da rapamicina (mTOR) também participa na sinalização a jusante do TLR-4, desempenhando papéis de crescimento celular e na regulação imunológica (FANG *et al.*, 2017).

O mTOR é uma proteína quinase serina/treonina altamente conservada, que consiste em duas formas de complexos denominados complexo mTOR1 (mTORC1) e complexo mTOR2 (mTORC2). Evidências revelaram que a ativação de mTORC1 está associada a uma ampla gama de vias de sinalização complexas, incluindo sua proteína ribossômica alvo a jusante S6 (RPS6), bem como respostas inflamatórias (NEWTON *et al.*, 2015).

Zhou *et al.* (2018) esclarecem que a ativação de mTOR desempenha um papel essencial na ativação de neutrófilos e macrófagos desencadeada por TLR-4, através da sinalização MyD88-MAPK (p38 quinase, JNK e ERK) e a via NF- $\kappa$ B a jusante, como demonstra a Figura 8. Um estudo conduzido em leitões, com inflamação intestinal induzida por LPS, mostrou a ativação das vias PI3K/Akt/mTOR, TLR4/NF- $\kappa$ B e IFN tipo I, repercutindo em intenso estresse oxidativo e produção de mediadores apoptóticos e de remodelação tecidual (YI *et al.*, 2017). Além disso, o mTOR também tem sido associado à fosforilação e ativação do IRF-7, bem a como à produção aprimorada de IFNs do tipo I (LI, JIANG e TAPPING, 2010). Schaeffer *et al.* (2011) encontraram que células mononucleares incubadas com LPS reduzem a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-6, e sugerem que o status de ativação da via mTOR pode ser um marcador para identificar pacientes com alto risco de desenvolver síndrome da resposta inflamatória sistêmica e complicações pós-traumáticas. Da mesma maneira, Zhou *et al.* (2018) relataram que o mTOR ativado e a autofagia prejudicada, levam à piora da colite intestinal por meio da ativação de mediadores inflamatório (TLR4/MyD88/MAPK e a via NF- $\kappa$ B a jusante) e ao aumento do estresse oxidativo.

#### 2.2.5.2 O fator de transcrição NF- $\kappa$ B

O fator nuclear kappa B é um fator transcricional necessário para a coordenação de respostas imune inata e adaptativa e é crucial para a expressão gênica de muitos mediadores celulares (ZINGARELLI *et al.*, 2003). Ele foi descrito inicialmente em 1986, por Sen e Baltimore, como um fator capaz de se ligar à cadeia leve kappa ( $\kappa$ ) de imunoglobulina de linfócitos B, onde ele regula a transcrição (SEM; BALTIMORE, 1986).

Nos vertebrados a família NF- $\kappa$ B compreende cinco subunidades, denominadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB. Essas subunidades podem homodimerizar e heterodimerizar em várias combinações, as mais comuns consistem em dois polipeptídeos de 50 KDa (p50) e 65 KDa (p65). Nas células em repouso, o NF- $\kappa$ B reside no citoplasma

associado fisicamente a proteínas conhecidas como inibidoras  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). São conhecidas sete espécies de I $\kappa$ Bs: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100 e p105. A ativação do NF- $\kappa$ B requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos, em resíduos de serina específicos. Esse processo de fosforilação é mediado pelo complexo de três proteínas quinases (IKKs) as IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  e IKK- $\gamma$  que desencadeiam a degradação das I $\kappa$ Bs pelo proteossoma 26S. A degradação permite que o NF- $\kappa$ B transloque até o núcleo onde regula a expressão de centenas de genes importantes nas respostas imunes e inflamatórias. Esses, incluem citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas, receptores necessários para adesão e transmigração de neutrófilos através das paredes dos vasos sanguíneos, receptores envolvidos no reconhecimento imune, como membros do complexo principal de histocompatibilidade e proteínas envolvidas na apresentação de antígenos. Expressa vários genes que neutralizam o processo apoptótico de morte celular, regulam a proliferação e a sobrevivência celular, modulam a sobrevivência de neutrófilos, além da diferenciação dos linfócitos B e T no local da infecção, permitindo que essas células mediem suas funções antimicrobianas e imunológicas (ZINGARELLI, 2005).

Dentre os produtos liberados após a ativação no NF- $\kappa$ B destacam-se: ciclooxigenase-2 (COX-2), a forma induzida de óxido nítrico sintase (iNOS) (ZINGARELLI, 2005) e uma enorme variedade de citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-8, IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (JUSTINO *et al.*, 2019).

Além de genes pró inflamatórios, o NF- $\kappa$ B induz a expressão do seu próprio inibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , sendo capaz de atenuar a ativação contínua do fator nuclear  $\kappa$ B. Além disso, o I $\kappa$ B $\alpha$  recém-sintetizado entra no núcleo para ligar o NF- $\kappa$ B ativado e poder transportá-lo de volta ao citoplasma para finalizar a transcrição dependente de NF- $\kappa$ B. Posteriormente, um novo mecanismo foi descrito para a desativação de NF- $\kappa$ B envolvendo acetilação e desacetilação da subunidade p65 (ZINGARELLI *et al.*, 2003).

### **2.3 O Tratamento da mucosite intestinal**

Atualmente, os tratamentos para a mucosite são paliativos e tem o objetivo de realizar a reidratação oral, a reposição de eletrólitos, ou o uso de fármacos que reduzam a perda de líquidos, ou diminuam a motilidade intestinal. Várias substâncias são utilizadas na prática clínica, tais como: Sulfato de zinco, antimicrobianos, analgésicos, antioxidantes, terapias de produtos naturais, probióticos, entre outros (VAN SEBILLE *et al.*, 2015).

Mais especificamente, para o tratamento da mucosite intestinal por 5-FU são

descritos tratamentos com vitamina E, diminuindo MDA e aumentando grupos sulfidríla em ratos (SUBRAMANIAM; SUBRAMANIAM; SHYAMALA DEVI, 1995); com o dipeptídeo alanil-glutamina, melhorando permeabilidade e morfologia intestinal de ratos (BAI; JIANG; LIU, 1996; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004); com fibras dietéticas, protegendo a estrutura intestinal e a função da barreira intestinal de ratos (DENG *et al.*, 1998) ou fibra alimentar solúvel, reduzindo a toxicidade causada pelo quimioterápico (FUKUDOME *et al.*, 2014); com um extrato de alho envelhecido protegendo o intestino delgado de ratos (HORIE *et al.*, 2001); com o hormônio do crescimento, em ratos (CLAVIJO *et al.*, 2004); com anti-inflamatório capaz de inibir a produção de NF- $\kappa$ B, IFN- $\gamma$  e IL-12 (ZHAO *et al.*, 2004); com o uso de fármacos que inibem seletivamente tirosina-quinases (ZLOTNIK *et al.*, 2005); com óleo de peixe, preservando o número de linfócitos no intestino e os níveis de IgA (FUKATSU *et al.*, 2008), com óleo de emu e oliva, reduzindo MPO e danos teciduais em ratas (MASHTOUB; TRAN; HOWARTH, 2013) ou com o ácido graxo ômega-3 diminuindo o dano à mucosa em camundongos (GENEROSO *et al.*, 2015); com antibióticos, como a minociclina em camundongos (HUANG *et al.*, 2009); com rebamipida, usado para proteção de mucosas (KIM *et al.*, 2015); com L-arginina, promovendo a recuperação parcial da mucosa, reduzindo a inflamação e melhorando a permeabilidade intestinal (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; BALMANT *et al.*, 2018), L-citrulina, atenuando danos teciduais e diminuindo a permeabilidade intestinal (ANTUNES *et al.*, 2016) ou taurina, prevenindo complicações em ratos (AL-ASMARI *et al.*, 2016a). Os tratamentos mais recentes utilizam a administração de “bióticos” (BATISTA *et al.*, 2020), sejam eles probióticos, revertendo parâmetros inflamatórios, oxidativos e funcionais (JUSTINO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018; QUARESMA *et al.*, 2019; JUSTINO *et al.*, 2019); prebióticos, que são fibras utilizadas pelos organismos da microbiota durante o processo de fermentação, resultando na produção de diversos compostos capazes de modular a função das células imunes no intestino, apresentando principalmente efeitos anti-inflamatórios (LUU; VISEKRUNA, 2019), como por exemplo o uso de butirato, um tipo de ácido graxo de cadeia curta (SCFA) (FERREIRA *et al.*, 2012); simbióticos, que é a formulação de probióticos e prebióticos juntos; paraprobióticos, que são organismos inativados (BATISTA *et al.*, 2020) ou pós-bióticos, que se referem a fatores solúveis, que podem ser produtos (ou subprodutos metabólicos) secretados por bactérias viáveis ou liberados após sua lise (CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

Além desses compostos citados acima, vários compostos derivados de produtos naturais foram usados no tratamento da mucosite intestinal por 5-FU, reduzindo seus efeitos

adversos, como glicoglicerolipídios extraídos do espinafre (SHIOTA *et al.*, 2010), extrato aquoso de *Ganoderma lucidum* (WATANABE *et al.*, 2013), extrato glicólico de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) (DE ÁVILA *et al.*, 2015) e proantocianidinas de *Ficus virens* (CHEN *et al.*, 2017).

Os produtos naturais, incluindo extratos brutos, frações enriquecidas com componentes bioativos e compostos puros derivados de ervas, bem como fórmulas de ervas podem reduzir a mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia, a toxicidade gastrointestinal, a hepatotoxicidade, a nefrotoxicidade, a lesão do sistema hematopoiético, a cardiotoxicidade e a neurotoxicidade (ZHANG *et al.*, 2018).

Evidências recentes têm demonstrado que o uso de diversos fitoterápicos e produtos naturais apresentaram alta eficácia no tratamento de doenças intestinais. Dentre esse compostos, destacam-se aqueles capazes de manter a integridade da barreira epitelial intestinal, regular a ativação de macrófagos, modular a atividade de moléculas mediadoras de resposta imune inata e adaptativa e inibir desordens imunes, modulando TNF- $\alpha$  (GUO *et al.*, 2017).

Outros mecanismos apontados no tratamento da mucosite intestinal, tratados com produtos naturais são: efeitos antieméticos, redução de apoptose e necrose epitelial, inibição do estresse oxidativo e inflamação, inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, reparos em danos do DNA e redutor da motilidade intestinal, explicitados no Quadro 2.

Quadro 2 – Produtos naturais e seus efeitos na mucosite intestinal.

<b>Produto natural</b>	<b>Efeito biológico</b>	<b>Ingrediente ou fonte</b>	<b>Referência</b>
Ginseng vermelho	Anti-inflamatório	Ginsenosídeos	KIM <i>et al.</i> (2017b)
6-Gingerol	Antiemético pela inibição de receptores de neuroquinina-1, serotonina e dopamina	O composto mais abundante no gengibre	KONMUN <i>et al.</i> (2017)
<i>Rehmannia glutinosa</i>	Inibição da inflamação e do estresse oxidativo	Glicosídeos iridoides, glicosídeos fennetilalcool e derivados furfurais	SHI <i>et al.</i> (2016)
Rutina	Antioxidante e anti-inflamatório	Uma flavona glicosilada encontrada no chá preto e na casca da maçã	GAUTAM <i>et al.</i> (2016)
Ácido glicirrizínico -18β	Inibidor de NF-κB e caspases	Um derivado triterpenoíde pentacíclico obtido da planta licorice	RASHID <i>et al.</i> (2017)
Chá verde	Antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano e anti motilidade	Produto fonte de catequinas	EMAMI <i>et al.</i> (2014)
Proantocianidinas	Reparo do dano ao DNA dependente da ativação imune e melhora da disfunção mitocondrial	Uma classe dos polifenóis	KATIYAR, PAL e PRASAD (2017); YANG <i>et al.</i> (2017)



Diversos estudos tem demonstrado que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias de vários agentes derivados de plantas possuem potencial significativo no tratamento da mucosite intestinal, reduzindo os efeitos adversos causados pelo tratamento anticâncer (YAZBECK; HOWARTH, 2009; CHEN *et al.*, 2016; GAUTAM *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2017b; ZHANG *et al.*, 2018; BOEING *et al.*, 2020).

Nesse contexto, diversos compostos derivados de produtos naturais foram pesquisados e demonstraram exercer propriedades anti-inflamatórias potentes (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016). Os metabólitos secundários fenólicos são um grande grupo de compostos orgânicos com vasta variedade de constituintes químicos. Eles são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes e seu papel protetor nos processos de doenças mediadas por radicais livres. Por essa razão, eles também são relatados como eficazes contra doenças inflamatórias. As classes mais comuns desse grupo de compostos são flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, entre outros (SALEEM *et al.*, 2018).

### ***2.3.1 Os compostos fenólicos ou polifenóis***

Nesse contexto, os polifenóis são sintetizados no metabolismo secundário de plantas a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico, a qual é menos significativa (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os compostos fenólicos protegem os tecidos da planta contra injúria, insetos e ataque de animais, além de atrair animais para a polinização ou dispersão de sementes. Eles são constituintes de vários alimentos. Possuem sabor amargo, odor e coloração característicos, oferecendo proteção contra processos oxidativos (MANACH *et al.*, 2004; TANIGAWA; FUJII; HOU, 2007; VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Eles são largamente encontrados em frutas, bagas, caules, flores, legumes secos, cereais, ervas e especiarias, vinho tinto, chá, café e chocolates. Assim, esses compostos antioxidantes são encontrados em maior quantidade nos alimentos quando comparado com os demais fitoquímicos dietéticos (HUSSAIN *et al.*, 2016). A quantidade pode diferir segundo a variedade do fruto, a maturação, o momento da colheita, o armazenamento e fatores ambientais, sendo à exposição solar o maior determinante na produção desses compostos (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Os métodos de preparo culinário também influem na quantidade de polifenóis nos alimentos. O descasque simples de frutas e legumes pode eliminar uma porção significativa de polifenóis, porque essas substâncias geralmente estão presentes em concentrações mais altas

nas partes externas do que nas partes internas. Além disso o cozimento também influi reduzindo significativamente o teor desses compostos (MANACH *et al.*, 2004).

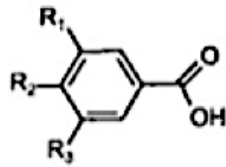
A biodisponibilidade dos compostos fenólicos depende de vários parâmetros, incluindo digestão, absorção e metabolismo (HUSSAIN *et al.*, 2016). A maioria dos polifenóis está presente nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma ativa. Eles devem ser primeiramente hidrolisados por enzimas intestinais ou por microbiota colônica antes de serem absorvidos. Durante a absorção, os polifenóis são conjugados no intestino delgado e posteriormente no fígado. Esse processo inclui principalmente metilação, sulfatação e glucuronidação. Este é um processo de desintoxicação metabólica comum a muitos xenobióticos que restringe seus potenciais efeitos tóxicos e facilita sua eliminação biliar e urinária, aumentando sua hidrofiliabilidade. Os polifenóis em circulação são derivados conjugados que são extensivamente ligados à albumina. Eles são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente naqueles onde são metabolizados. Esses compostos e seus derivados são eliminados principalmente na urina e na bile. Os polifenóis são secretados pela via biliar no duodeno, onde são submetidos à ação de enzimas bacterianas, especialmente a glucoronidase, nos segmentos distais do intestino, após o que podem ser reabsorvidos, caracterizando a circulação entero-hepática, o que levar a uma presença mais longa de polifenóis no corpo (MANACH *et al.*, 2004; HUSSAIN *et al.*, 2016).

Os polifenóis constituem um grupo de compostos que vêm sendo largamente estudados em função de sua ação anti-inflamatória, antibiótica e moduladora do fator de transcrição 2 (Nrf2), que está associado à proteção celular contra o estresse oxidativo e a inflamação (CARDOZO *et al.*, 2013). A atividade antioxidante dos polifenóis possui relação com a capacidade de neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição. Ele pode agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Até o momento, mais de oito mil compostos fenólicos foram identificados nas plantas. Eles compreendem uma grande variedade de moléculas que possuem uma estrutura fenólica (isto é, vários grupos hidroxila em anéis aromáticos), ou moléculas com um anel fenol, como ácidos fenólicos e álcoois fenólicos. Os polifenóis são divididos em várias classes, de acordo com o número de anéis de fenol que eles contêm e com os elementos estruturais que ligam esses anéis entre si. Os principais grupos de polifenóis são: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (Figura 9) (MANACH *et al.*, 2004; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; PANDEY; RIZVI, 2009; YAHFOUFI *et al.*, 2018).

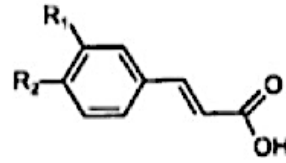
Figura 9 - Estrutura química dos polifenóis.

**Ácidos hidrobenzóico**



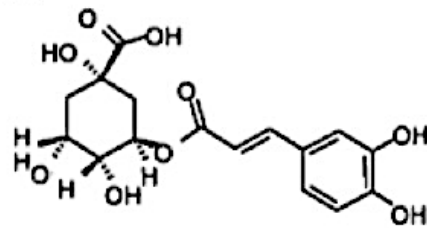
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$ : Ácido protocatequínico  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$ : Ácido gálico

**Ácidos hidroxicinâmico**



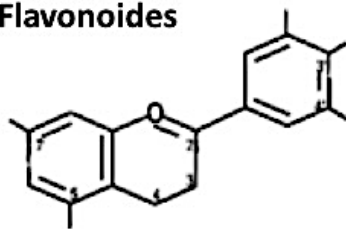
$R_1 = OH$ : Ácido Cumárico  
 $R_1 = R_2 = OH$ : Ácido cafeico  
 $R_1 = OCH_3, R_2 =$  Ácido ferrúlico

**Ácidos fenólicos**

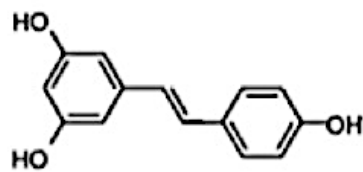


Ácido clorogênico

**Flavonoides**

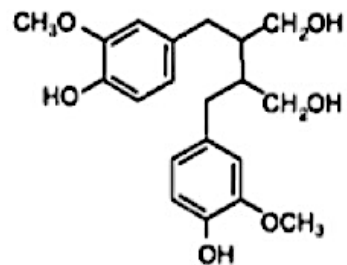


**Estibenos**



Resveratrol

**Lignanas**

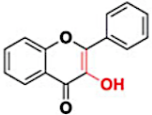
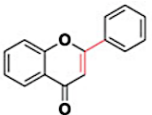
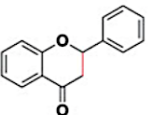
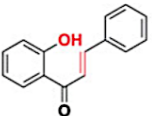
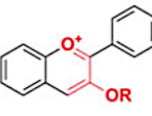
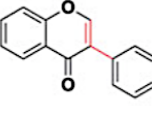


Fonte: Adaptado de MANACH *et al.* (2004).

### 2.3.2 Os flavonóides

Os flavonoides, uma das classes dos polifenóis, são compostos fenólicos amplamente encontrados em alimentos de origem vegetal. Todos os componentes dessa classe possuem um esqueleto de quinze carbonos com dois anéis aromáticos ligados a três carbonos, formando um anel heterocíclico. A presença e posição dos elementos estruturais que ligam os anéis entre si, e a depender do estado de oxidação do anel central do pirano, determinam as ações bioquímicas e a divisão dos flavonoides em seis subclasses, conforme Quadro 3: flavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanois (MANACH *et al.*, 2004; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; NABAVI *et al.*, 2015).

Quadro 3 – Subclasses dos Flavonoides e suas principais fontes alimentares.

Subclasse	Estrutura química	Exemplos de componentes	Fontes alimentares
Flavonois		Quercetina, Campferol, Miricetina	Maçã; figos frescos; cranberies frescos, secos e adoçados; couve de bruxelas; trigo sarraceno; chicória; cerejas Morello; mirtilo; groselha; aspargos assados; goji berries; cebola roxa; alface; rabanete; salsa secas e alcaparras frescas
Flavonas		Luteolina, Apigenina, Tangeretina	Uvas vermelhas; limões; chicória; aipo; pimenta verde; alcachofra; salsinha; orégano desidratado; salsa desidratada
Flavanonas		Naringerina, Eriodictiol, Hesperedina	Alcachofras; suco de toranja; laranja; limões; uvas; orégano desidratado
Flavanois		Catequinas, Epicatequinas, Epigalocatequinas, Proantocianidinas	Maçã e suco de maçã; favas cozidas; damasco; amora silvestre; pêssegos; cacau em pó seco; chocolate escuro; vinho tinto; chá preto; noz pecan; chá verde
Antocianidinas		Pelargonidina, Cianidina, Delfinidina, Petunidina, Malvidina	Avelãs; cereja Morello; peras; uvas pretas; vinho tinto; noz pecan; morango; mirtilos; framboesa; repolho roxo; groselha; amora silvestre; grão de bico
Isoflavonas		Daidzeína, Genisteína	Tremoço; brócolis; couve-flor; cevada; fava; extrato de vinho tinto; linhaça; soja

Fonte: Adaptado de KOZŁOWSKA; SZOSTAK-WEGIEREK (2014); FENG *et al.* (2018) e KO (2014).

Fontes alimentares importantes de flavonóides são vegetais, frutas, sementes, alguns cereais, além de vinho, chá e certas especiarias. O Quadro 3 demonstra exemplos de alimentos que contém flavonóides segundo suas subclasses.

As frutas conhecidas como *berries* (morangos, framboesas, amoras, mirtilos, groselhas, açaí e romã) são fontes de nutrientes bioativos, como os flavonoides. Diversos estudos têm mostrado que o consumo regular desses alimentos pode ajudar a prevenir uma ampla gama de patologias (FOLMER *et al.*, 2014). Dentre as atividades descritas destacam-se as funções antioxidante, a anti-inflamatória, a antidiabética e a neuro protetiva (FENG *et al.*, 2018). Kozłowska e Szostak-Wegierek (2014) confirmam essas atividades ao afirmar que o consumo regular de fontes alimentares de flavonoides está associado com uma redução no risco de doenças crônicas incluindo cânceres, doenças cardiovasculares e desordens neurodegenerativas. As atividades anti-inflamatórias moleculares dos flavonóides incluem a inibição de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e proteína-1 ativadora (AP-1) e, assim como o proposto para o grupo dos polifenóis, a ativação do fator 2 relacionado ao fator nuclear-eritróide (Nrf2) (SERAFINI; PELUSO & RAGUZZINI, 2010).

Dentre as *berries* com grande capacidade antioxidante, o açaí, um fruto encontrado na região norte do Brasil, apresenta efeitos potentes contra doenças crônicas não transmissíveis, motivo pelo qual vários estudos tem sido conduzidos para investigar seu efeito antioxidante e anti-inflamatório (FRAGOSO *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2017).

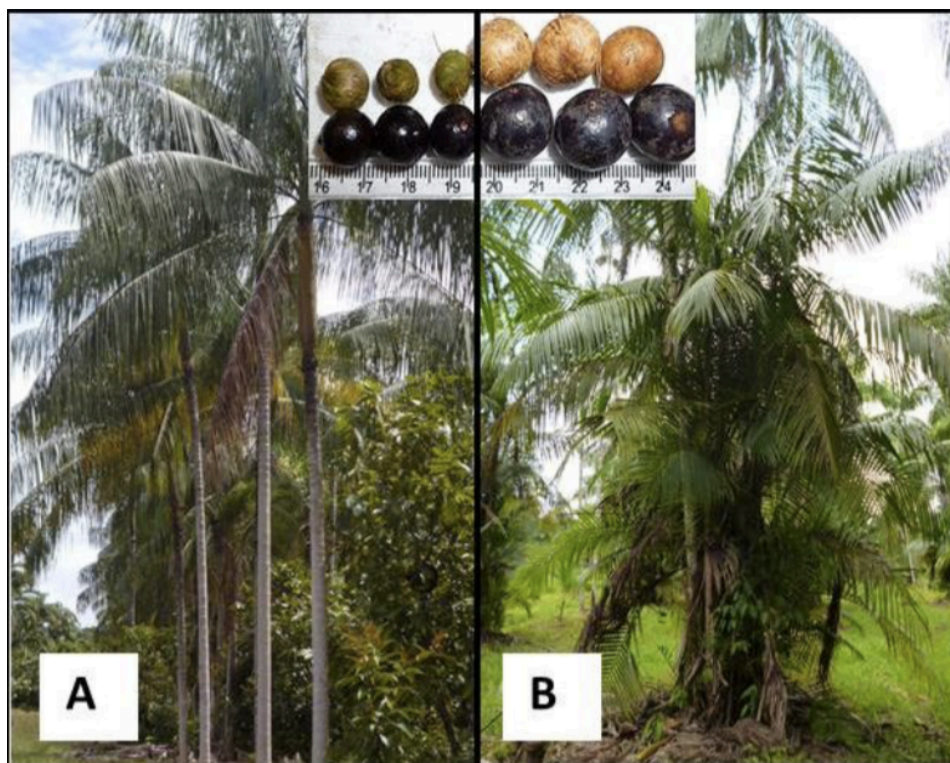
#### **2.4 O Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**

Os produtos mais explorados do açaizeiro são os palmitos e os frutos. Esses últimos continuam o principal produto de interesse científico (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; FREITAS, 2010). A polpa extraída desses frutos tem se destacado no cenário científico, devido aos benefícios à saúde, atribuídos ao seu consumo. A espécie *Euterpe* tem um elevado potencial econômico, pois seus frutos são utilizados na preparação de bebidas energéticas e exportadas para todo o mundo (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

O Gênero *Euterpe* possui cerca de 28 (vinte e oito) espécies localizadas nas Américas Central e Sul, distribuídas por toda a bacia amazônica, entretanto, apenas a *E. oleracea* e a *E. precatória* tem os frutos explorados comercialmente (Figura 10). A *E. precatória* é nativa do estado do Amazonas, conhecido popularmente como "açaí-do-amazonas" e é encontrado na bacia do rio Amazonas (CHOI *et al.*, 1998). A *E. oleracea*, popularmente conhecida como "açaí-pará", é encontrada principalmente em terras baixas e em áreas de

floresta inundada do estuário do rio Amazonas, nas propriedades brasileiras do Pará, Maranhão, Tocantins, Amapá e também na Guiana e Venezuela (MUÑIZ-MIRET, *et al.*, 1996).

Figura 10 – Sementes e frutos das espécies comerciais do açaí.



Fonte: Adaptado de YAMAGUCHI *et al.* (2015).  
A – *E. precatória* e B – *E. olerácea*.

Cada fruto de açaí pesa aproximadamente 2g e a cor da fruta madura é roxa escura. Eles contêm uma semente marrom clara que representa cerca de 90% do diâmetro da fruta, (de 1 a 2 cm) e até 90% do seu peso (de 0,7 a 1,9g). Essas sementes são cobertas por uma camada de fibra rugosa (casca) sobre uma polpa violeta comestível fina. Para separar as sementes da polpa, os frutos são macerados com água morna e fiados em retificadoras especiais (RODRIGUES *et al.*, 2006; ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018).

A polpa de açaí é composta por aproximadamente 48% de lipídios, 13% de proteína, 8% de aminoácidos, 25% de açúcares totais e compostos menores, como fibras e vitaminas. Os lipídios representam cerca de 90% do total de calorias presentes no suco de açaí, portanto, o consumo desse produto fornece uma boa ingestão de ácidos graxos mono e polinsaturados. Além disso, a polpa é rica em vários fitoquímicos, incluindo lignanas, compostos fenólicos (antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides) e resveratrol, em baixas concentrações (YAMAGUCHI *et al.*, 2015; ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018).

Silva *et al.* (2014) demonstraram em seus estudos que o caroço de açaí apresenta maior teor de compostos fenólicos (28,3%) do que o fruto inteiro (25,5%) e a casca (15,7%), e que essa composição química está associada aos efeitos farmacológicos relacionados ao uso do extrato do caroço do açaí (ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018). Rocha *et al.* (2007) corroboraram esses resultados ao mostrar que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí apresentou efeito vasodilatador mais potente que o extrato do açaí e o extrato aquoso do caroço do açaí, indicando que esse tipo de extração proporciona maior teor de fitoquímicos com ação antioxidante.

#### **2.4.1 O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)**

A análise do extrato hidroalcoólico obtido das sementes do açaí (*Euterpe oleracea*) (ASE) demonstrou a presença de dezoito procianidinas, além de dezenove compostos fenólicos, incluindo catequinas e epicatequinas (MELO *et al.*, 2016). A avaliação do extrato por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) revelou que ele é composto por 88% de proantocianidinas e, em menor percentual, por catequinas e epicatequinas. A análise química e espectrométrica revelou que o ASE é composto predominantemente de procianidinas poliméricas (dímeros até pentâmeros), heteropolímeros com uma unidade de galocatequina e, em menor grau, de procianidinas galilizadas (RODRIGUES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Esse perfil de fitoquímicos é apontado como o responsável pelo potente efeito antioxidante do ASE (RODRIGUES *et al.*, 2006). Para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos, que é resultado de uma mistura de diferentes compostos bioativos com diferentes mecanismos de ação, funcionando por interações sinérgicas, é necessário combinar mais de um ensaio, *in vitro*. O ASE mostrou uma redução potente no radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e no método ABTS (2,2 -azinobis-3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico), ambos utilizados para avaliar a capacidade antioxidante do composto. Além dessas metodologias, a avaliação do ASE, através dos métodos FRAP (*Ferric Reducing Ability* - Capacidade de redução férrica) e ORAC (capacidade de absorbância do radical de oxigênio), reforçou a alta capacidade antioxidante do composto, sugerindo que ele pode ter papel protetivo contra o câncer de pulmão (MARTINEZ *et al.*, 2018). O ASE apresentou, ainda, boa capacidade antioxidante contra os radicais peroxil, peroxinitrito e hidroxila, (RODRIGUES *et al.*, 2006). Esses resultados comprovam o alto potencial antioxidante para o uso em alimentos, produtos de saúde e no tratamento de patologias com perfil oxidante (MARTINEZ *et al.*, 2018).



#### 2.4.2 O efeito farmacológico do ASE

O ASE apresentou efeito antioxidante em modelo de ratos hipertensos com lesão renovascular. Os resultados demonstraram que o extrato aumenta a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase; aumenta a expressão de SOD-1 e SOD-2 e diminui a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS). Nesse mesmo estudo, o ASE preveniu o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), da proteína carbonil, o remodelamento vascular e o aumento da expressão de metaloproteinase 2 (MMP-2) (DA COSTA *et al.*, 2012). O ASE apresentou ainda diminuição na produção de óxido nítrico (NO) através da inibição da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) em modelos de disfunção cardíaca em ratos (ZAPATA-SUDO *et al.*, 2014) e em cultura de células RAW 264.7 (MATHEUS *et al.*, 2006). Esse extrato foi capaz, também, de reduzir os níveis de 8-isoprostrano, um marcador de estresse oxidativo, em tecido adiposo branco de ratos obesos (SANTOS *et al.*, 2020).

Diversos outros estudos apontam o papel antioxidante do ASE na redução da inflamação, como por exemplo no estudo de Da Costa *et al.* (2017) que demonstrou melhora na lesão renal, prevenindo a albuminúria e o aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina. Além disso, o ASE foi associado à diminuição dos danos glomerulares e fibrose renal em ratos hipertensos com lesão renovascular. Cordeiro *et al.* (2018) associou o uso dos polifenóis existentes no extrato do caroço do açaí na prevenção da disfunção renal, na melhora da barreira da filtração renal e na preservação da morfologia renal em ratos diabéticos e espontaneamente hipertensos, concluindo que o ASE fornece um recurso nutricional para a prevenção de nefropatia diabética e hipertensiva, através da redução da pressão arterial sistólica e com ações vasodilatadoras.

O efeito antioxidante e vasodilatador também foi identificado como mecanismo para evitar a disfunção endotelial e alterações estruturais vasculares na hipertensão. Esses efeitos são resultado da ativação da NOS e inibição da ativação da MMP-2 (ROCHA *et al.*, 2007; DA COSTA *et al.*, 2012).

O aumento da biodisponibilidade do NO e as ações antioxidantes também foram relacionados com a vasodilatação da artéria uterina, permitindo melhor fluxo sanguíneo de oxigênio e para o fornecimento de nutrientes ao feto em ratas grávidas, com dieta pobre em proteína. Esse protocolo contribuiu para a melhoria dos parâmetros avaliados na prole relativos à deficiência de proteína no desenvolvimento intrauterino (DE BEM *et al.*, 2014). O ASE também foi efetivo em proteger as alterações cardiovasculares maternas, em modelo

experimental de pré-eclâmpsia, e as mudanças e restrições de crescimento intrauterino da prole. O efeito protetor foi parcialmente atribuído à sua propriedade antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2020).

Ainda sobre o efeito vasodilatador, o ASE é capaz de impedir a intolerância ao exercício, a hipertrofia e disfunção cardíaca e a fibrose em ratos com infarto miocárdial (ZAPATA-SUDO *et al.*, 2014). Além da disfunção endotelial, o extrato protege camundongos alimentados com dieta rica em gordura contra a obesidade, a hipercolesterolemia, a hiperglicemia e a resistência à insulina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Outras atividades relacionadas ao uso do ASE são: diminuição da ingestão de alimentos e o ganho de massa corporal, melhora da adiposidade e da esteatose hepática. O mecanismo envolvido conta com a expressão reduzida do gene SREBP-1c, que codifica fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol, e aumento da expressão de pAMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada), que modula negativamente a ACC (acetil-CoA carboxilase) e a HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Ratos diabéticos que receberam ASE e que foram induzidos ao treinamento físico reduziram a esteatose hepática. O mecanismo envolve a diminuição da lipogênese hepática mediada por AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), inibição da montagem e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de colesterol total e a elevação da excreção de colesterol na bile pelo transportador ABCG8 (do inglês, *ATP-binding cassette sub-family G member 5*) (DE BEM *et al.*, 2018b). Na obesidade, o extrato demonstrou capacidade de modular o processo adipogênico, atuando na regulação da diferenciação e maturação de adipócitos e, conseqüentemente, na inibição do processo de adipogênese (TRINDADE *et al.*, 2019). Atuou, também, controlando a produção de mediadores inflamatórios no tecido adiposo branco, como IL-6, TNF- $\alpha$  e a proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1) (SANTOS *et al.*, 2020). Em ratos diabéticos o ASE aumentou a expressão de proteínas sinalizadoras de insulina nos músculos esqueléticos e no tecido adiposo e aumentou o peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1), hormônio intestinal que leva à secreção de insulina, no plasma. Associada ao treinamento físico, o extrato potencializou a redução da glicemia, diminuindo os níveis de TNF- $\alpha$ , aumentando as expressões de pAkt (proteína quinase b fosforilada) e adiponectina no tecido adiposo e as expressões de receptores de insulina (IR) e pAMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada) no músculo esquelético (DE BEM *et al.*, 2018a).

O Extrato do caroço do açaí atua reduzindo a inflamação pulmonar induzida pela

fumaça de cigarros, diminuindo significativamente os níveis de macrófagos alveolares (AMs) e número de neutrófilos (PMNs), MPO, SOD, CAT, NO e TNF- $\alpha$ , aumentando GPx (DE MOURA *et al.*, 2012). O efeito anti-inflamatório também foi observado em respostas nociceptivas à dor aguda/inflamatória em camundongos, reduzindo a hiperalgesia térmica, a contorção induzida por ácido acético e a hiperalgesia térmica induzida por carragenina. Além disso, a administração de ASE reduziu as fases neurogênica e inflamatória após injeção intraplantar de formalina em ratos; preveniu a dor crônica em um modelo de ligação do nervo espinhal, incluindo hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (SUDO *et al.*, 2015).

O ASE também foi eficaz em reduzir a ansiedade em ratos que foram separados precocemente de suas mães. Esse efeito é mediado pela correção nos níveis do hormônio estimulante de corticotrofina (CRH), na expressão de receptores de cortisol e nos níveis de norepinefrina. Os mecanismos subjacentes a este efeito benéfico do ASE podem envolver a redução de hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HPA), a ativação da via NO-BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) -TRKB (Receptor tropomiosina da quinase B) no sistema nervoso central e sua propriedade antioxidante que contribui para a melhora da neuroplasticidade, do sistema monoaminérgico e comportamento ansioso (DE BEM *et al.*, 2020).

O uso de ASE, *in vitro*, em células cancerosas mamárias (MCF-7) demonstrou potente efeito citotóxico por estímulo de apoptose, autofagia e necrose das células neoplásicas (SILVA *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2017). Em culturas de células humanas de carcinoma de pulmão, esse extrato foi capaz de modular o ciclo celular e a taxa de apoptose, inibindo efetivamente o crescimento celular (MARTINEZ *et al.*, 2018).

Os efeitos do uso de açaí foram verificados em diversos tipos de extratos, como polpa, suco, óleo e sementes. Uma revisão relatou que eles tem sido administrados principalmente pela via oral, por gavagem ou como parte integrante da dieta. A dose administrada varia de 30 mg/Kg a 40.000 mg/Kg a depender do tipo de extrato (ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018). Vários estudos demonstram a ausência de toxicidade do açaí. Sua utilização revelou que o peso corporal, o consumo alimentar, a mortalidade, a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, a expressão citoplasmática e nuclear de  $\beta$ -catenina, parâmetros oftalmológicos, hematológicos e bioquímicos, exame de urina, peso da bexiga e do rim, marcadores bioquímicos renais, toxicidade renal e pulmonar, proteínas hepáticas e estresse oxidativo do músculo e do fígado permaneceram inalterados (STONER *et al.*, 2010; SCHAUSS *et al.*, 2010; FRAGOSO *et al.*, 2012; FRAGOSO *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2016; MONGE-FUENTES *et al.*, 2017).

Os trabalhos conduzidos exclusivamente com o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí demonstraram ausência de toxicidade em doses até 300 mg/Kg, administrados diariamente por via oral, em modelos experimentais.

O uso de 200 mg/Kg de ASE não alterou a pressão arterial sistólica; o MDA e proteínas carboniladas, no plasma, no fígado, no rim e no cérebro; a enzima superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, no plasma, no fígado, no cérebro e no rim; a enzima óxido nítrico sintetase endotelial; o peso do fígado; esteatose hepática; as enzimas AST (aspartato-aminotransferase) e ALT (alanino-aminotransferase); glicemia; colesterol total, triglicerídeos (TG), colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) (DA COSTA *et al.*, 2012; DE BEM *et al.*, 2014; DE BEM *et al.*, 2017; DA COSTA *et al.*, 2017; DE BEM *et al.*, 2018a; DE BEM *et al.*, 2020). O uso dessa dose, associado ao exercício físico, também não modificou a dosagem de hemoglobina glicada, utilizada para analisar o perfil glicêmico; a insulina sérica e o índice de HOMA (do inglês, *homeostatic model assessment*), que avalia a presença de resistência à ação da insulina; o HOMA-BETA, utilizado para avaliar a atividade das células pancreáticas; a expressão do receptor de insulina, GLUT-4; dos níveis de leptina, adiponectina e GLP-1; de Akt e pAkt e das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  (DE BEM *et al.*, 2018a). Permaneceram inalterados volume e fibrose renal; número de glomérulos (por área e por rim) e volume glomerular médio; ureia, creatina, albumina, renina, sódio e potássio séricos e volume urinário e excreção urinária de proteínas (DE BEM *et al.*, 2014; DA COSTA *et al.*, 2017).

O uso de 300 mg/kg do extrato do caroço não alterou os seguintes parâmetros: ganho de peso corporal; gordura abdominal; variação na pressão arterial sistólica; TG, colesterol total, colesterol LDL e HDL séricos; TG e colesterol hepáticos; carbonilação de proteínas e MDA hepáticos; glicemia; teste de tolerância oral à glicose, insulina sérica; índice de HOMA; HOMA-IR; MDA sérico; leptina e adiponectina plasmáticos; quantidade de neutrófilos e macrófagos alveolares; infiltrado e MPO pulmonares; quantidade de nitrito, SOD, CAT, GPx, razão glutathione reduzida/oxidada, 8-isoprostano, TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 (quimioatratantes de monócitos) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; DE MOURA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2020).

### 3. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das doenças mais incidentes no mundo, sendo a segunda principal causa de morte nos últimos anos (WHO, 2020). O 5-Fluoruracil é amplamente utilizado em adenocarcinomas de diversas etiologias, sendo apontado como eficaz no tratamento de cânceres que sofreram metástases, ou que tem a possibilidade de o fazer (MCCARTHY *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2006; LEITÃO *et al.*, 2007a; GIFONI, 2012). É indicado nos tratamentos de câncer colorretal e de mama, que estão entre os mais incidentes no Ceará, no Brasil e no Mundo (WHO, 2020; INCA, 2020). Entretanto, esse tratamento pode trazer vários efeitos colaterais debilitantes, entre eles a mucosite intestinal (FERREIRO *et al.*, 2003).

A mucosite é caracterizada por inflamação intestinal que causa alterações epiteliais como ulcerações e alterações significativas na estrutura da membrana mucosa como a infiltração de leucócitos polimorfonucleares com danos subsequentes à barreira epitelial (SOARES *et al.*, 2013; JUSTINO *et al.*, 2015), aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (QUARESMA *et al.*, 2019) e ativação de vias inflamatórias importantes como a TLR-4/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK e a via PI3K/AKT/mTOR (YI *et al.*, 2017; JUSTINO *et al.*, 2019). É seguida ainda por manifestações clínicas, tais como dor, náuseas, dispepsia, disfagia, vômitos e diarreia. (PEDROSO *et al.*, 2015). Existe grande quantidade de substâncias em investigação para o tratamento da mucosite intestinal; entre essas, extratos oriundos de produtos naturais se mostraram bastante promissores em reduzir a toxicidade gastrointestinal induzida por quimioterapia e radioterapia (ZHANG *et al.*, 2018). Dentre esses extratos, o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí possui efeito antioxidante e anti-inflamatório, como o demonstrado no modelo de inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarros, reduzindo significativamente o número de neutrófilos, mieloperoxidase, SOD, CAT, GPx, de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  (DE MOURA *et al.*, 2012). Em adição, o efeito anti-inflamatório também foi observado quando utilizado uma dose de 100 mg/Kg por dia em respostas nociceptivas à dor aguda/inflamatória em camundongos (SUDO *et al.*, 2015).

Dado o exposto, no presente trabalho, objetivamos analisar o efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) nos padrões inflamatório e funcionais no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil. Acredita-se que esse tratamento pode ser utilizado como coadjuvante na terapia anticâncer, reduzindo os efeitos colaterais causados pelo antineoplásico 5-FU. Ademais, inexitem na literatura estudos com o ASE na mucosite intestinal, induzida pelo 5-FU, fazendo deste trabalho um estudo inovador.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito farmacológico do extrato hidroalcoólico do caroço de *Euterpe oleracea* Mart (açáí) (ASE) em eventos inflamatórios, oxidantes e alterações funcionais, bem como investigar o mecanismo de ação molecular na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

### 4.2 objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ASE na perda de massa corporal dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil;
- Investigar o efeito do ASE nas alterações histopatológicas e infiltração neutrofílica na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos;
- Avaliar o efeito do ASE através da atividade da MPO nos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal, seguida da mensuração dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$ );
- Investigar o efeito do ASE através da análise da atividade da enzima glutathione redutase, níveis de MDA e nitrato/nitrito nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos com mucosite intestinal;
- Avaliar o efeito do ASE nas alterações funcionais (esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal, e integridade da mucosa intestinal) em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Analisar o efeito do ASE na expressão gênica de TLR-4, MyD88, PI3K, mTOR e NF- $\kappa$ B na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos;
- Analisar o efeito do ASE na expressão protéica de TLR4 e NF- $\kappa$ B na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais e grupos experimentais

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos (25 e 30g) foram utilizados nos experimentos, provenientes do Biotério Setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, mantidos em ambiente à temperatura de 22°C e umidade relativa entre 50-60%. Os ciclos de 12 h claro/escuro foram controlados. Os animais receberam ração padrão (Purina Chow®) e água “*ad libitum*”.

Os grupos experimentais foram formados com 6 a 8 camundongos. Os grupos foram divididos segundo o Quadro 4.

Quadro 4: Grupos experimentais para a avaliação do efeito do ASE.

<b>Grupo Salina</b>	Animais receberam uma única administração de solução salina (5mL/kg, i.p.).
<b>Grupo 5-FU</b>	Animais receberam uma única dose de 5-Fluorouracil (450 mg/kg, i.p.).
<b>Grupo ASE 10 mg/kg</b>	Animais foram pré-tratados com ASE (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes da administração de 5-Fluorouracil (450mg/Kg, i.p.). O tratamento com ASE permaneceu diariamente, a cada 24h, até o 4º dia, 30 min. antes da eutanásia.
<b>Grupo ASE 30 mg/kg</b>	Animais foram pré-tratados com ASE (30 mg/kg, v.o.) 30 min antes da administração de 5-Fluorouracil (450mg/Kg, i.p.). O tratamento com ASE permaneceu diariamente, a cada 24h, até o 4º dia, 30 min. antes da eutanásia.
<b>Grupo ASE 100 mg/kg</b>	Animais foram pré-tratados com ASE (100 mg/kg, v.o.) 30 min antes da administração de 5-Fluorouracil (450mg/Kg, i.p.). O tratamento com ASE permaneceu diariamente, a cada 24h, até o 4º dia, 30 min. antes da eutanásia.

Fonte: Elaboração própria.

Os protocolos experimentais desenvolvidos obedeceram aos Padrões de Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Ceará. Esta pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC (CEPA), tendo sido aprovado sob Protocolo N°5133091118 (Anexo 1). Todos os procedimentos adotados foram realizados com o intuito de reduzir o número de animais, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

## 5.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí)

O extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) foi fornecido cortesmente pelo Laboratório de Farmacologia e Plantas Medicinais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) foram coletados na Baía da Amazônia (Belém do Pará, Brasil) e as amostras foram identificadas no museu Goeldi (Belém do Pará, Brasil), espécime depositado sob o número MG 205222. Extratos hidroalcoólicos foram obtidos a partir da decocção dos caroços dos frutos, como descrito por De Moura *et al.* (2012).

O estudo da composição química do ASE, usando HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e espectrometria de massa, foi caracterizado e publicado por De Oliveira *et al.* (2015). Baseado no estudo de HPLC, proantocianidinas foi o componente encontrado em maior quantidade no extrato, seguido de catequina e epicatequina, os quais tem demonstrado efeitos anti-inflamatório e antioxidante (DE MOURA *et al.*, 2011; DE MOURA *et al.*, 2012; DE FREITAS CASTRO *et al.*, 2019).

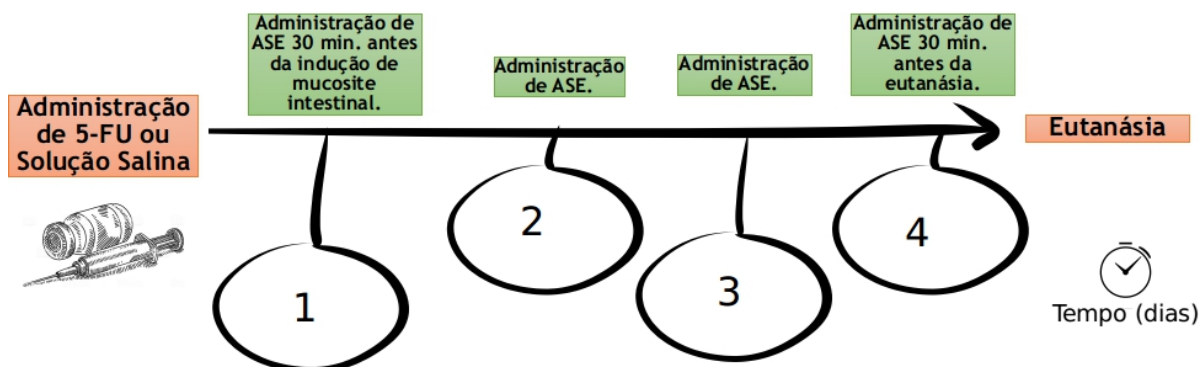
## 5.3 Indução da mucosite intestinal e tratamento com extrato hidroalcoólico do caroço do açaí

Como representado pelo Quadro 4 e pela Figura 11, os camundongos foram separados aleatoriamente em 5 grupos contendo de 6 a 8 animais. Um grupo recebeu a administração de solução salina em dose única (5mL/kg, i.p) – Grupo Salina – em outro grupo, os camundongos receberam o 5-FU em dose única (450 mg/kg, i.p.) – Grupo 5-FU. Os demais grupos foram pré-tratados com extrato hidroalcoólico do caroço de açaí nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o. O ASE liofilizado foi diluído em solução salina e administrado 30 min. antes da indução da mucosite por 5-FU, permanecendo nos dias subsequentes, com intervalo de 24 h, até o quarto dia, 30 min. antes da eutanásia. As doses do ASE foram determinadas de acordo com Sudo *et al.* (2015). No quarto dia após indução da mucosite, todos os animais foram levemente anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para coleta de sangue periférico diretamente do plexo retro-orbital para contagem total de leucócitos sanguíneos.

Posteriormente, foi realizada a eutanásia e os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram retirados e congelados no freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.



Figura 11 - Esquema da indução da mucosite intestinal por 5-fluorouracil e o tratamento com o ASE em camundongos.



Fonte: Elaboração própria

## 5.4 Avaliação dos parâmetros relacionados ao dano oxidativo

### 5.4.1 Análise da glutationa

A dosagem da GSH foi realizada segundo o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968) nas amostras do duodeno, jejuno e íleo dos grupos experimentais. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos, amostras de 50 a 100 mg do duodeno, jejuno e íleo dos animais foram homogeneizadas em 1 ml de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Adicionaram-se 320  $\mu\text{L}$  de água destilada e a 80  $\mu\text{L}$  de Ácido Tricloroacético (TCA), a 50%, em alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  do homogeneizado. Para a precipitação das proteínas, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 20 min a 4 °C. Posteriormente, foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20  $\mu\text{L}$  de DTNB 0,01 M (reagente de Ellman®) a 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro, contra um reagente branco (sem o homogenato). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido.

### 5.4.2 Análise do malondialdeído

Para a determinação dos níveis de malondialdeído, foi utilizado o método de Tbars adaptado por Lee *et al.* (2005). A dosagem foi determinada nos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo previamente coletados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras (100 mg de tecido) foram homogeneizadas em KCL 1,15 mM. Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  do homogenato foram adicionadas a

1,5mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1% e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). A mistura foi agitada e permaneceu em banho-maria por 45 min a 100 °C. Em seguida, a reação foi rapidamente resfriada e adicionaram-se 2 mL de n-butanol. A mistura foi agitada e centrifugada (1.200 rpm, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro e o resultado expressa a diferença de absorbâncias entre as faixas 535 nm e 525 nm, tendo como unidade nmol de MDA/g de tecido.

#### **5.4.3 Análise de nitrato e nitrito**

As concentrações de nitrato e nitrito foram determinadas pela reação de Griess conforme protocolo modificado por Misko *et al.* (1993). A quantificação foi determinada nos segmentos de duodeno, jejuno e íleo previamente coletados e congelados a -80°C. Para medir as concentrações, uma solução de 0,5 U/mL de nitrato redutase (Sigma, St Louis, MO) foi inicialmente preparada em um tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> contendo NADPH e água. Esta solução foi incubada com os homogenatos de tecidos em uma microplaca por 12 h para converter NO<sub>3</sub> em NO<sub>2</sub>. Dessa maneira, a solução de Griess (solução contendo 1% de sulfanilamida em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e outra solução de 0,1% de NEEDED em 2% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foram adicionadas a microplaca e realizada uma leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito usando uma curva padrão interna.

#### **5.5 Avaliação da perda da massa corporal e contagem sanguínea de leucócitos totais**

Avaliamos a massa corporal dos animais durante 4 dias após administração de 5-FU. Alteração média relativa do peso corporal (%) foi registrada diariamente e expressa como média ± Erro Padrão da Média (EPM) em relação ao controle (dia 0 = 100%).

Para investigação da leucopenia, o número total de leucócitos plasmáticos foi contado para verificar o efeito do 5-Fluorouracil. Os animais foram levemente anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para coleta do sangue do plexo retro-orbital. A determinação foi realizada após a diluição do sangue com solução de Turk (ácido acético 2%, violeta de Genciana 0,2%). A contagem de células foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer, um microscópio óptico (100X) e um contador automático de células (Coulter Ac.T). A avaliação das amostras foi realizada através de um estudo cego por um biomédico experiente (S.D.O.). Os resultados foram expressos como número de células contado nos quatro campos da câmara de Neubauer e multiplicado por 10<sup>3</sup>/µL. Essa avaliação foi realizada para averiguar

o efeito imunossupressor do 5-Fluorouracil conjuntamente ao tratamento com o ASE.

## 5.6 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

### 5.6.1 Avaliação histopatológica

Após coletados, os segmentos obtidos do duodeno, jejuno e íleo foram fixados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e desidratados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (MOTIC IMAGES PLUS 2.0), as lâminas foram analisadas por um histopatologista (P.M.G.S.) experiente, através de um estudo cego, e tiveram suas imagens capturadas para avaliação histopatológica. O grau e a severidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Macpherson e Pfeiffer (1978), utilizados, conforme Tabela 1.

Tabela 1- Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer.

<b>Escores</b>	<b>Achados Microscópicos</b>
0	Achados histológicos normais.
1	Mucosa: vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: normal.
2	Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: Normal.
3	Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrofílico.

Fonte: MACPHERSON E PFEIFFER (1978).

### 5.6.2 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos com mucosite intestinal por 5-Fluorouracil foi determinada pelo ensaio da

atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Uma amostra de cada segmento intestinal (previamente perfundido com salina) foi coletado e incubado em 200  $\mu$ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7); posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). A amostra homogeneizada foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1.000  $\mu$ l de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “pellet” foi ressuspensão em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, 50  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionados nos poços da placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionou-se 25  $\mu$ L de TMB (3, 3', 3, 3'- tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10<sup>5</sup> neutrófilos/poço/50  $\mu$ L). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

### ***5.6.3 Análise dos níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$***

As concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram determinadas nos segmentos intestinais que foram congelados a -80°C. Estes foram homogeneizados em solução tampão de PBS, e a amostra foi centrifugada por 10 min em 3.000 rpm. O sobrenadante foi imediatamente coletado para dosagem de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DA SILVA MONTEIRO *et al.*, 2019). As detecções das concentrações dessas citocinas foram realizadas por ELISA, conforme orientação do fabricante (R&D® *system*). Os resultados foram expressos em pg/ml a partir de uma curva padrão fornecida pelo fabricante.

## **5.7 Análise da expressão de marcadores inflamatório por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).**

### **5.7.1 Extração do RNA total**

As amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. Realizou-se um homogenato, quando cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sob agitação por 3 minutos. Foi feito um homogenato com trizol e, em seguida, a extração de RNA foi realizada com o sistema RNAase *Lipid Tissue Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração,  $1\mu\text{L}$  de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop® (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) com a finalidade de verificar qualidade das amostras e quantificar suas concentrações, para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

### **5.7.2 Síntese de cDNA**

O RNA total isolado, armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , seguiu para a síntese de cDNA através do *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, USA), de acordo com a instruções do fabricante. O protocolo da reação continha  $1\mu\text{L}$  da enzima transcriptase reversa,  $4\mu\text{L}$  do tampão *5x iScript Reaction Mix* (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para  $200\text{ ng}/\mu\text{L}$  e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar  $20\mu\text{L}$ . O protocolo padrão do termociclador *iCycler* (Bio-Rad Laboratories, USA) foi  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 min.,  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 min. e  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua posterior amplificação no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

### **5.7.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para os genes: TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65**

A transcrição relativa dos genes TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65 foi realizada através do equipamento *iQ5 Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). Como mostrado no Quadro 5, a sequência dos iniciadores de DNA (primers) dos genes investigados foi obtida no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology*

*Information* (NCBI), no qual o gene de referência utilizado foi a subunidade ribossomal 18S (18S).

Quadro 5 - Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados.

Gene	Sequência dos iniciadores	Nº NCBI	Condições de anelamento
TLR-4	F- ATGGCATGGCTTACACCACC R- GAGGCCAATTTGTCTCCACA	NM_021297.3	20'' - 60°C
MyD88	F- TCATGTTCTCCATAACCCTTGGT R- AAAGTGCAGTGGGGTCAG	NM_010851.3	20'' - 60°C
PI3K $\alpha$	F- CCACGACCATCTTCGGGTG R- ACGGAGGCATTCTAAAGTCACTA	NM_008839.3	20'' - 60°C
mTOR	F- ACCGGCACACATTTGAAGAAG R- CTCGTTGAGGATCAGCAAGG	NM_020009.2	20'' - 60°C
NF- $\kappa$ Bp65	F- TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC R- TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC	AF199371.2	20'' - 60°C
18S	F- CGGACAGGATTGACAGATTG R- CAAATCGCTCCACCAACTAA	NR_003278.3	20'' - 60°C

Fonte: Elaboração própria.

F- *Forward primer* sequência 5' - 3'; R- *Reverse primer* sequência 5' - 3'

Para a reação, foram utilizados 10  $\mu$ l da *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, Inglaterra), 2  $\mu$ L de cada iniciador (0,2  $\mu$ M) e 1  $\mu$ l de cDNA das amostras, completando com água livre de nucleases para um volume final de 20 $\mu$ L. Todos os iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão no Quadro 5. Todos os ciclos começaram com a etapa de desnaturação (20 segundos a 95°C) e finalizaram com etapa de extensão (45 segundos por 1 minuto a 72°C). Os dados foram obtidos com o *software* do sistema CFX96 (BioRad®, Califórnia, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de *melting*, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou CT) para os genes testados foram exportados para o *Microsoft Excel* (*Microsoft*®, Estados Unidos) e os níveis relativos de mRNA foram calculados de acordo com a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , na qual  $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$  como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

## **5.8 Análise da expressão proteica de TLR-4 e NF- $\kappa$ B**

Segmentos do íleo foram coletados e macerados em solução de lise. A proteína total das amostras foi quantificada usando o kit de teste de proteína BCA (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As proteínas extraídas (50  $\mu$ g/poço) foram misturadas com tampão de carregamento, fervidas a 95 °C por 5 min e separadas em gel de poliacrilamida a 10% (Bio-Rad). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad). A membrana foi bloqueada com albumina sérica bovina a 5% (BSA) por 1h e depois incubada com anti-NF- $\kappa$ B p105/p50 de coelho (1:200; Abcam *Cambridge*, Reino Unido) e TLR-4 (1:100; Invitrogen, *Carlsbad*, CA, EUA) durante a noite a 4 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho de cabra (1:2.500; Invitrogen, *Carlsbad*, CA, EUA) à temperatura ambiente por 1 h. A detecção foi avaliada por quimioluminescência (substrato *Clarity*™ *Western ECL*, Bio-Rad). As imagens foram coletadas usando o sistema Molecular *Imager ChemiDoc XRS +* (Bio-Rad). O normalizador P38 foi usado como referência interna. A análise densitométrica foi realizada no *software* ImageJ®.

## **5.9 Avaliação dos parâmetros funcionais da mucosite intestinal**

### ***5.9.1 Avaliação do esvaziamento gástrico e tempo de trânsito intestinal***

Para avaliação da motilidade do trato gastrointestinal (TGI), foi realizada a técnica do esvaziamento gástrico descrita por Reynell e Spray (1956) com adaptações. Os animais receberam tratamento com ASE 30 minutos antes do experimento de esvaziamento gástrico. Para a realização do experimento, os animais foram deixados em jejum alimentar, porém com água *ad libitum*, 8 h antes do início. Os camundongos receberam por gavagem 0,3 ml de uma solução contendo um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de vermelho de fenol, diluído em glicose a 5%). Decorridos 10 min, os animais foram sacrificados através de eutanásia e, então,

submetidos à laparotomia mediana para expor o estômago e os intestinos. Para tanto, foram realizadas ligaduras obstrutivas, ao nível das junções esôfago-gástrica, gastroduodenal e íleocecal. As amostras foram removidas e divididas em estômago e intestino proximal, medial e distal. O intestino foi dividido nas seguintes proporções: Proximal (40%), Medial (30%) e Distal (30%). As amostras foram cortadas e homogeneizadas em solução de 100 mL de NaOH 0,1N, por 30 segundos, utilizando um mixer elétrico (sector®). Após tal processo, o homogenato foi, então, mantido em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi coletado e centrifugado, por 10 minutos, a 2.800 rpm. Dessa primeira centrifugação, foram retirados 500 µl para que as proteínas contidas nesse volume fossem precipitadas em 0,5 ml de ácido tricloroacético 20% (TCA) e, posteriormente, centrifugadas por 20 minutos a 2.800 rpm. Finalmente, 150 mL desse sobrenadante foram adicionados a 200 mL de NaOH a 0,5N. A absorbância foi determinada a 540 nm usando um espectrofotômetro. A retenção percentual (%) da refeição teste (vermelho-fenol + glicose 5%) em cada segmento foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Retenção no segmento X} = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento X}}{\Sigma \text{ da quantidade de VF recuperado nos segmentos do TGI}}$$

Onde: VF = Vermelho de fenol.

X = Segmento em questão

O trânsito intestinal foi calculado para cada segmento intestinal, dividindo a quantidade de vermelho de fenol, recuperado de um determinado segmento, pela quantidade de vermelho de fenol recuperado de todos os três segmentos e expressa em porcentagem.

## ***5.9.2 Avaliação da integridade da barreira intestinal ex vivo***

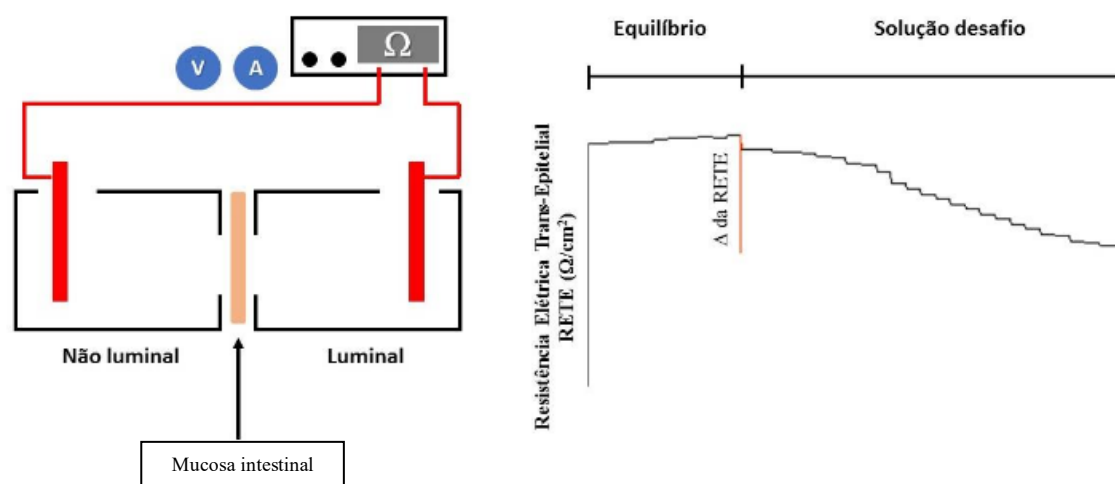
### ***5.9.2.1 Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET)***

Amostras de 1 cm do íleo foram utilizadas. A amostra foi dissecada e suas camadas musculares foram removidas com o auxílio de uma lupa estereoscópica, em uma placa contendo solução de Krebs (NaCl 145 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,6 mM, glicose 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, e CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM; pH 7.4). O lado luminal e não luminal foram montados nas câmaras de Üssing (*Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha*) com uma área de exposição de



0,017 cm<sup>2</sup>. A solução de Krebs foi mantida a 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>). O RET da linha de base foi calculado de acordo com a lei de Ohm, a partir de desvios de tensão induzidos por pulsos bipolares de 50 µA, com duração de 200 ms, a cada 6 s, aplicados por fios de platina. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de circuito aberto por 30 minutos e a RET foi continuamente medida, sendo representada como Ω/cm<sup>2</sup> (TOBEY *et al.*, 2004). Os resultados foram expressos como percentual de variação da resistência basal, sendo a resistência basal considerada como 100% (Figura 12).

Figura 12 - Desenho esquemático do estudo da RET em câmara de Üssing.



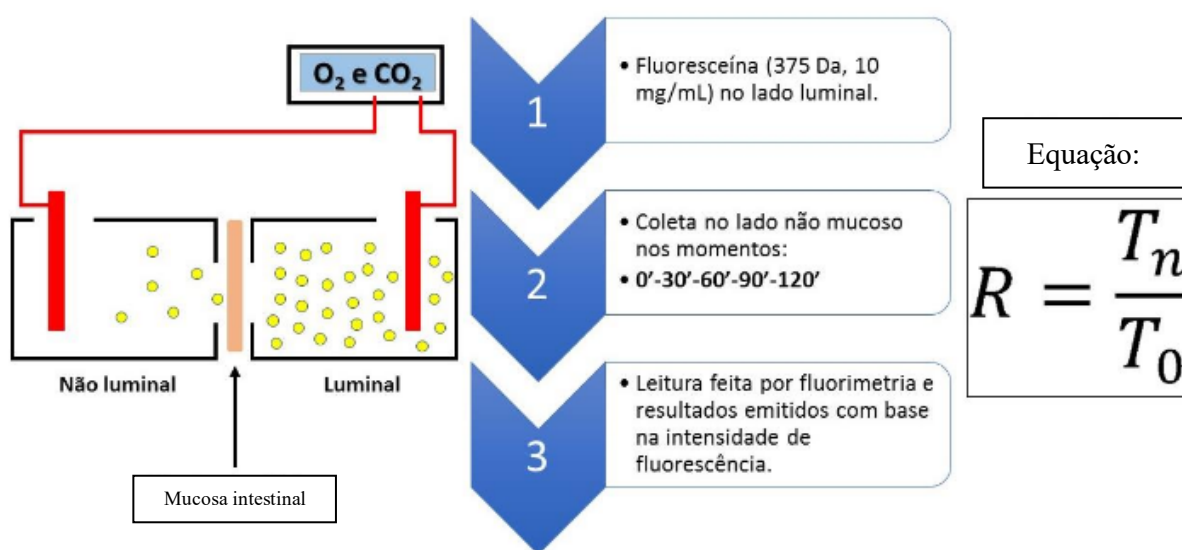
Fonte: adaptado de NICOLAU (2018).

### 5.9.2.2 Avaliação da Permeabilidade

A permeabilidade epitelial foi avaliada após a análise inicial do RET. Para este protocolo, a mucosa do íleo foi mantida nas câmaras de Üssing e a solução que fica em contato com o lado luminal da mucosa foi substituída por uma solução contendo fluoresceína (1mg/ml, 376 Da, diluída em KREBS; pH 7,4), um fluorescente permeável que passa através da camada mucosa (FARRÉ *et al.*, 2008). A permeabilidade foi avaliada em intervalos de 30 minutos por 90 minutos. Em seguida, 100 µl foram coletados do lado não luminal da câmara. A mesma quantidade de solução foi retirada a cada intervalo de tempo do lado luminal, a fim de manter equilibrado o volume nos dois lados da câmara (Figura 13). A permeabilidade do tecido à fluoresceína foi calculada a partir da medida de fluoresceína na amostra mediante uso de um fluorímetro (Fluostar Optima, BMG labtech. Ontemberg, Germany) e expressa na forma de razão de intensidade de fluorescência, dividindo-se a intensidade de fluorescência em cada

tempo pela intensidade de fluorescência no tempo inicial. Os valores do fluxo de fluorescência foram expressos como razão de intensidade de fluorescência  $T_n/T_0$  a partir de uma curva padrão feita para cada análise, onde  $T_0$  é o tempo inicial e  $T_n$  o tempo analisado (VANHEEL *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

Figura 13 - Desenho esquemático do experimento para medir permeabilidade transepitelial à fluoresceína.



Fonte: Adaptado de NICOLAU (2018).

## 5.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (Erro Padrão da Média), para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo), para as variáveis sem distribuição normal.

A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade, respectivamente, para dados paramétricos e não-paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os dados de qPCR foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (E.P.M) ou como valor mediano, máximo e mínimo, seguido do Intervalo de Confiança (CI). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ . Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o *Software* GraphPad Prism®, versão 5.0.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito de ASE no dano oxidativo induzido por 5-FU

#### 6.1.1 Análise da glutathiona

As concentrações de GSH no grupo 5-FU (duodeno:  $114,6 \pm 10,4$ ; jejuno:  $118,4 \pm 5,4$ ; e íleo:  $95,8 \pm 9,0$  mg/g de tecido) foram significativamente reduzidos comparados ao grupo salina (duodeno:  $244,1 \pm 39,9$ ; jejuno  $275,8 \pm 62,3$ ; e íleo:  $184,8 \pm 14,6$  mg/g de tecido). O tratamento com ASE 100 mg/kg (duodeno:  $211,1 \pm 22,1$ ; jejuno:  $230,2 \pm 26,6$ ; e íleo:  $202,5 \pm 24,3$  mg/g de tecido) restaurou significativamente o conteúdo de GSH ao nível do controle como visualizado na Figura 14. Entretanto, os tratamentos com ASE na dose de 30 mg/kg (duodeno:  $153,1 \pm 16,1$ ; jejuno:  $166,1 \pm 19,7$ ; e íleo:  $135,9 \pm 12,5$  mg/g de tecido) e na dose de 10 mg/Kg (duodeno:  $104,9 \pm 8,8$ ; jejuno:  $106,7 \pm 13,7$  e íleo:  $98,5 \pm 8,5$  mg/g de tecido) não foram capazes de restaurar os níveis de GSH, não existindo diferença estatística entre esses grupos e o grupo 5-FU.

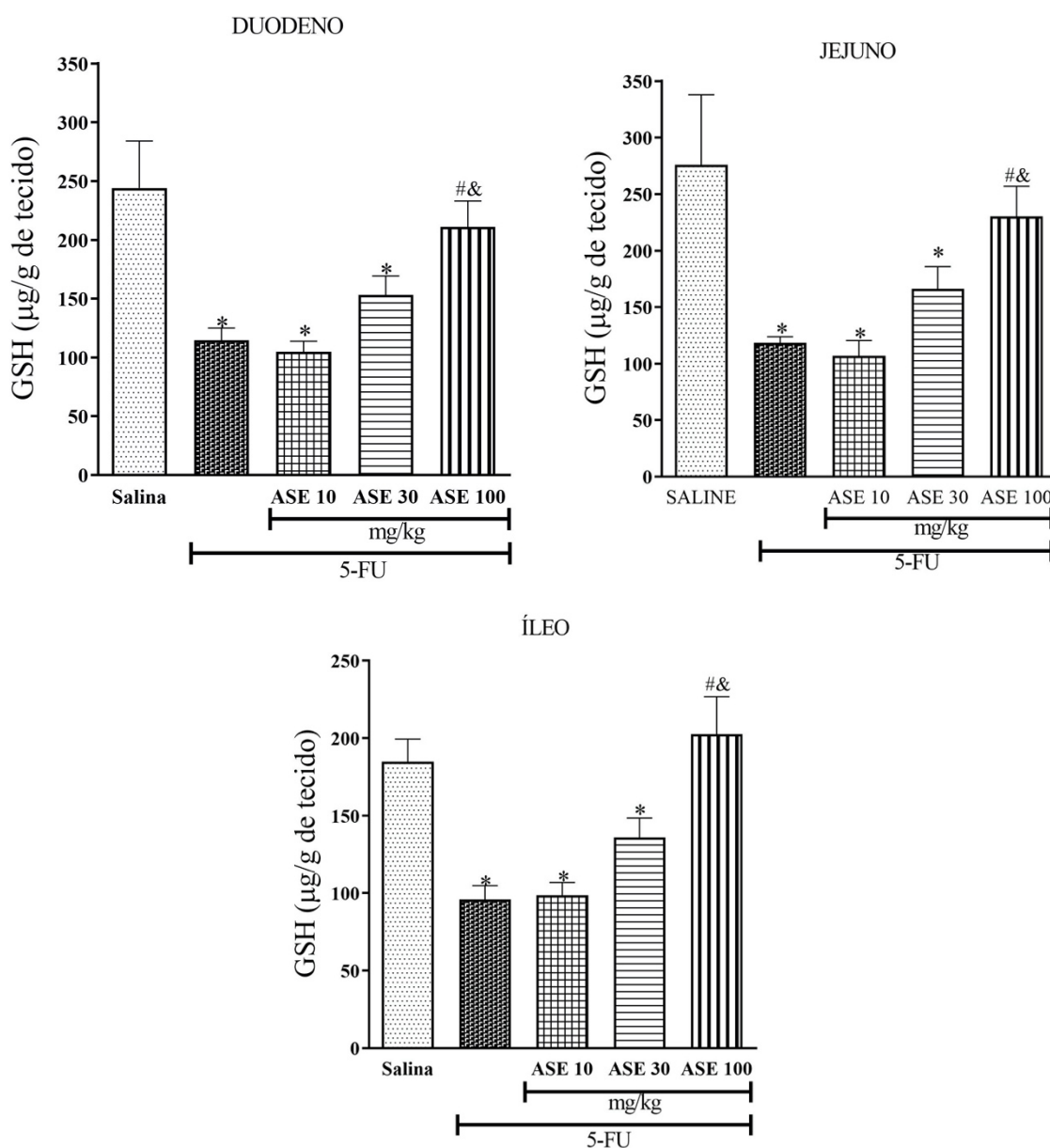


Figura 14 - Efeito do ASE nos níveis de glutatona em intestino de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o., ou 30 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do duodeno, do jejunum e do íleo para dosagem por leitor em microplacas. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU; &  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo ASE 10 mg/Kg e ASE 30 mg/Kg. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

### 6.1.2 Análise do malondialdeído

A Figura 15 demonstra que a administração de 5-FU causou o aumento na peroxidação lipídica nos segmentos intestinais (duodeno:  $92,8 \pm 17,1$ ; jejunum:  $63,2 \pm 7,6$ ; íleo:  $55,1 \pm 5,7$  nmol/g de tecido), comparado ao grupo salina (duodeno:  $24,9 \pm 4,4$ ; jejunum:  $13,6 \pm 2,5$ ; íleo:

15,7 ± 2,3 nmol/g de tecido). O tratamento com ASE na dose de 10 mg/g (duodeno: 46,5 ± 1,3; jejuno: 43,1 ± 2,5 e íleo: 40,0 ± 2,1 mg/g de tecido), 30 mg/kg (duodeno: 44,5 ± 3,4; jejuno: 47,2 ± 4,5 e íleo: 37,7 ± 2,2 mg/g de tecido) e ASE 100 kg/kg (duodeno: 26,0 ± 3,4; jejuno: 29,9 ± 4,2 e íleo: 24,0 ± 2,7 nmol/g de tecido) reduziu os níveis de MDA comparado ao grupo 5-FU. Entretanto a dose de 100 mg/Kg reduziu, em todos os segmentos, restabelecendo totalmente os níveis de MDA no duodeno. Essa ultima dose demonstrou estar estatisticamente menor que as demais.

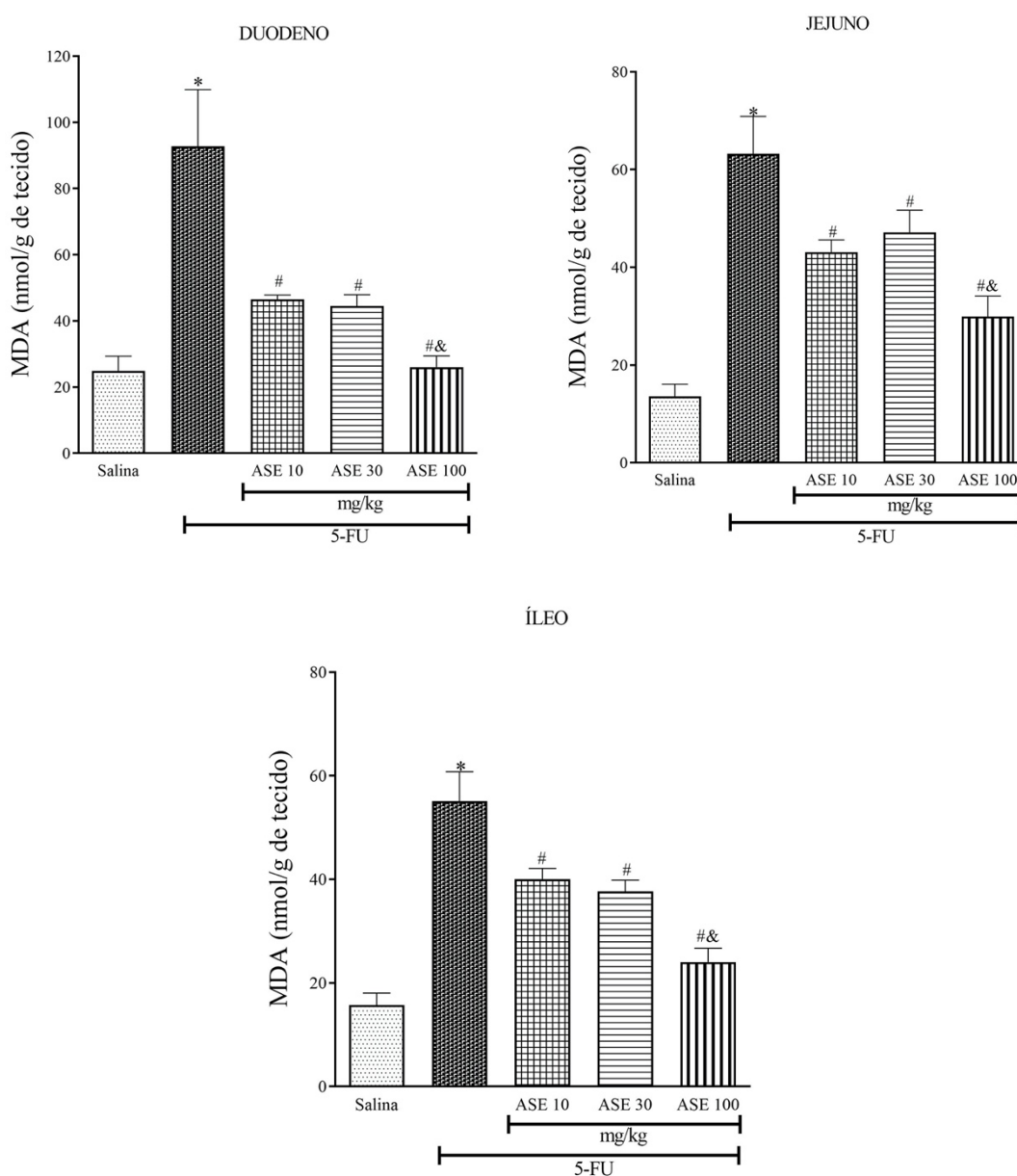


Figura 15 - Efeito do ASE nos níveis de MDA em intestino de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o., ou 30 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do duodeno, do jejuno e do íleo para dosagem por leitor em microplacas. Os valores representam a média ± E.P.M. Significância P < 0.05; \* P <0,05 quando

comparado ao grupo controle (salina); # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU; &P <0,05 quando comparado ao grupo ASE 10 mg/Kg e ASE 30 mg/Kg. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

### **6.1.3 Análise de nitrato**

Os níveis de nitrato no grupo 5-FU (duodeno:  $0,5 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ; jejuno:  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$  e íleo:  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) foram maiores que os encontrados no grupo salina (duodeno:  $0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ; jejuno:  $0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$  e íleo:  $0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ). O tratamento com ASE 10 mg/kg (duodeno:  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ; jejuno:  $0,4 \pm 0,0 \mu\text{M}$  e íleo:  $0,44 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ) não foi capaz de reduzir os níveis de nitrato em nenhum segmento analisado. Entretanto, como observado na Figura 16, as doses de ASE 30 mg/kg (duodeno:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ; jejuno:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$  e íleo:  $0,31 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ) e ASE 100 mg/kg (duodeno:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ; jejuno:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$  e íleo:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$ ) reduziram significativamente os níveis de nitrato.

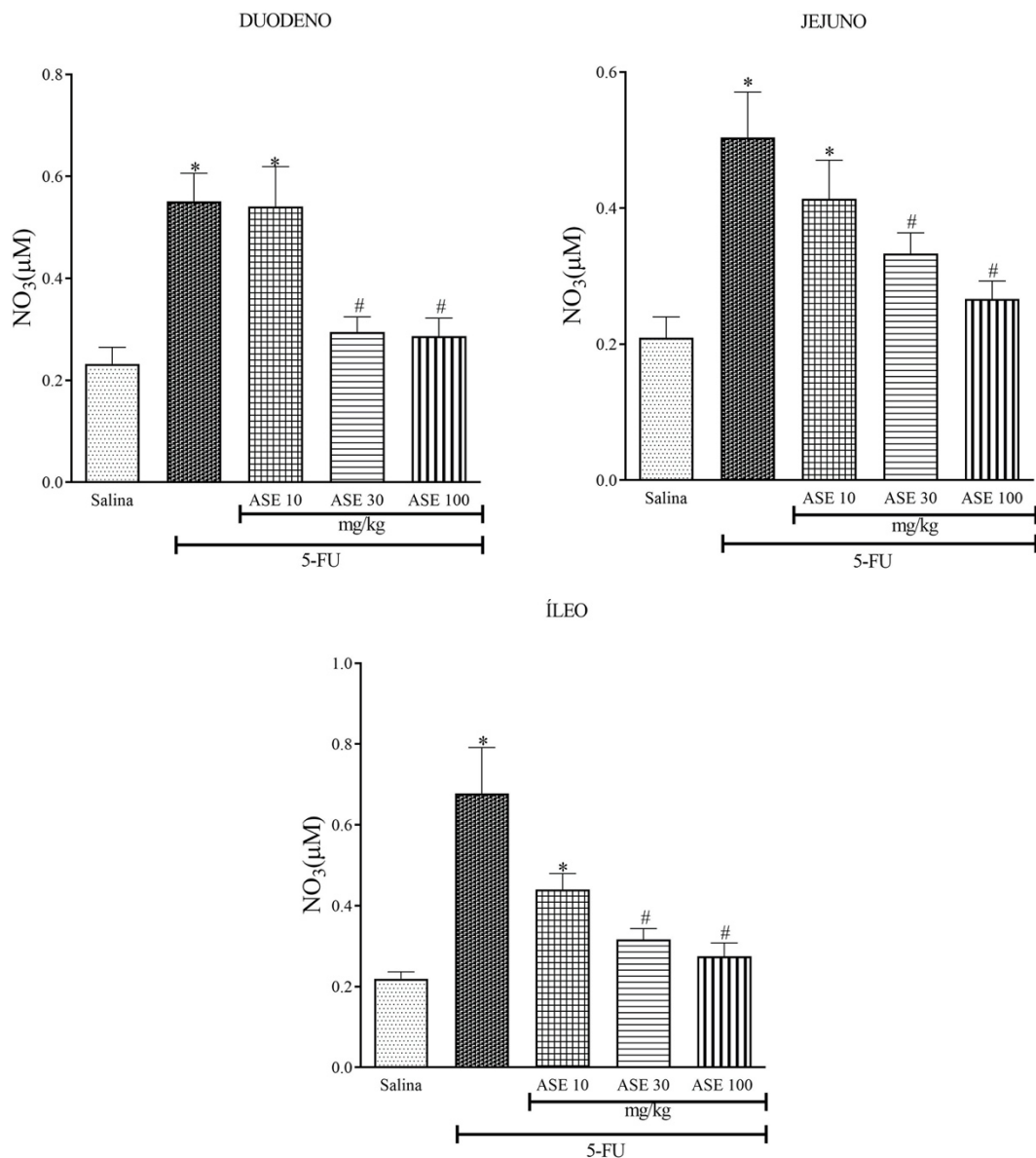


Figura 16 - Efeito do ASE nos níveis de nitrato em intestino de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o., ou 30 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do duodeno, do jejunum e do íleo para dosagem por leitor em microplacas. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU; &#  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo ASE 10 mg/Kg e ASE 30 mg/Kg. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

## 6.2. Efeito do ASE na perda de peso

Mortalidade não foi observada durante o período de estudo. Entretanto, a administração de 5-FU promoveu a perda de peso após 24 h, permanecendo 72 h após a indução (24h:  $94,4 \pm 2,0$ ; 48h:  $89,9 \pm 3,5$ ; 72h:  $85,2 \pm 3,0\%$ ), comparado ao grupo controle (24h:  $100,8 \pm 3,1$ ; 48h:  $104,8 \pm 2,5$ ; 72h:  $108,9 \pm 2,2\%$ ). O tratamento desses animais com ASE 10 mg/kg (24h:  $94,5 \pm$

2,2; 48h:  $92,2 \pm 3,1$ ; 72h:  $89,3 \pm 3,3$ ), ASE 30 mg/kg (24h:  $96,9 \pm 1,4$ ; 48h:  $94,7 \pm 2,3$ ; 72h:  $92,6 \pm 4,4$ ) e ASE 100 mg/kg (24h:  $96,1 \pm 0,11$ ; 48h:  $93,3 \pm 1,8$ ; 72h:  $92,2 \pm 0,2\%$ ) reduziu a perda de peso induzida pelo 5-FU, como observado na Figura 17. Todas as doses reduziram significativamente a perda ponderal no último dia. Entretanto, apenas as doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg reduziram significativamente a perda de peso no segundo dia. Não houve diferença estatística entre as doses testadas em nenhum dos dias.

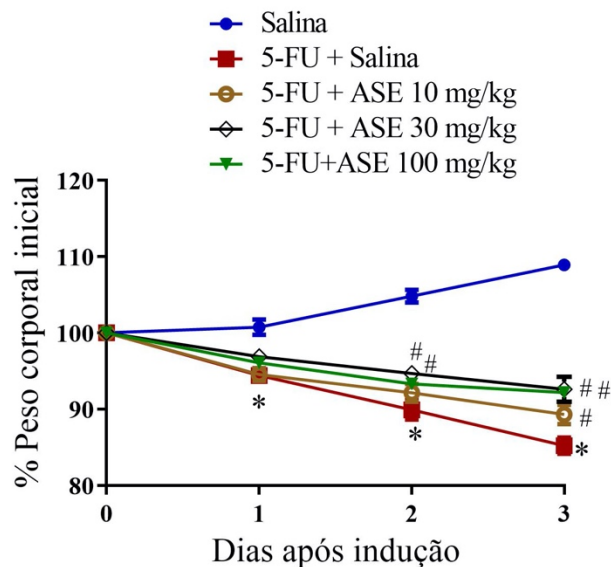


Figura 17 - Efeito do ASE na variação de peso corporal nos grupos experimentais. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p.) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o., 30 mg/Kg, v.o. ou 10 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Os animais foram pesados diariamente, durante todo o experimento. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle/salina (C), #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU + salina, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

A dose de 100 mg/kg demonstrou ser mais efetiva comparada as dose de 10 mg/kg e 30 mg/Kg em prevenir as alterações relacionadas ao estresse oxidativo (GSH, MDA e  $\text{NO}_3$ ) e às alterações ponderais. Portanto, selecionamos a dose de 100 mg/kg para os demais experimentos.

### 6.3 Efeito do ASE na leucopenia

Conforme demonstrado na Figura 18, o 5-FU ( $30,833 \pm 6,080$  células/ $\text{mm}^3$ ) reduziu significativamente o número de leucócitos totais circulantes em comparação ao grupo salina ( $113,200 \pm 7,977$  células/ $\text{mm}^3$ ). ASE na dose de 100 mg/Kg ( $25,571 \pm 5,802$  células/ $\text{mm}^3$ ) não alterou o número de leucócitos totais comparado com o grupo 5-FU.



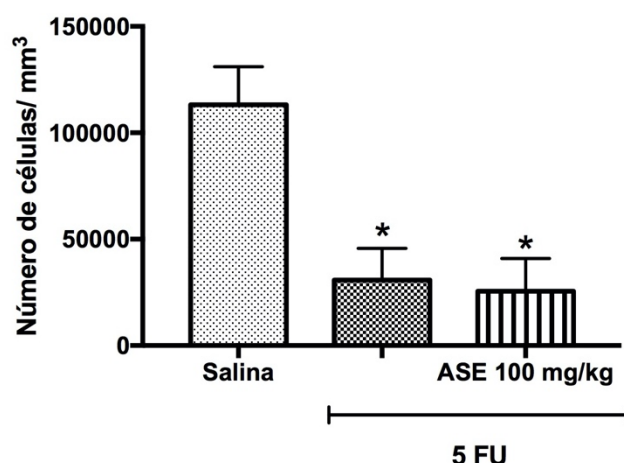


Figura 18 - Efeito do ASE na leucopenia induzida pelo 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos. Grupos contendo de 6 a 8 animais. No quarto dia, analisou-se a contagem sanguínea de leucócitos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina). ANOVA e teste de Bonferroni.

## 6.4 Efeito do ASE nos parâmetros inflamatórios

### 6.4.1 Efeitos do ASE nas alterações histopatológicas

A Figura 19 e a Tabela 2 demonstram que a administração de 5-FU causou alterações histopatológicas no duodeno, jejuno e íleo, incluindo encurtamento dos vilos, vacuolização celular e intensa infiltração de células inflamatórias. O tratamento com ASE 100 mg/kg reverteu as alterações histopatológicas induzida pelo 5-FU na mucosa intestinal.

Tabela 2 - Análise histológica do intestino de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com ASE.

Grupos experimentais	Escore		
	DUODENO	JEJUNO	ILEO
Controle (Salina)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)
5-FU + Salina	3 (2-3)*	3 (2-3)*	2 (2-3)*
5-FU + ASE (100 mg/Kg)	0 (0-1)#	1 (0-2)#	0 (0-2)#

Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno e íleo)

para processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina. Os escores foram atribuídos seguindo o seguinte padrão: escore 0 (Achados histológicos normais); 1 (Mucosa: vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: normal); 2 (Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: Normal) e 3 (Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrofílico). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Kruskal-Wallis.

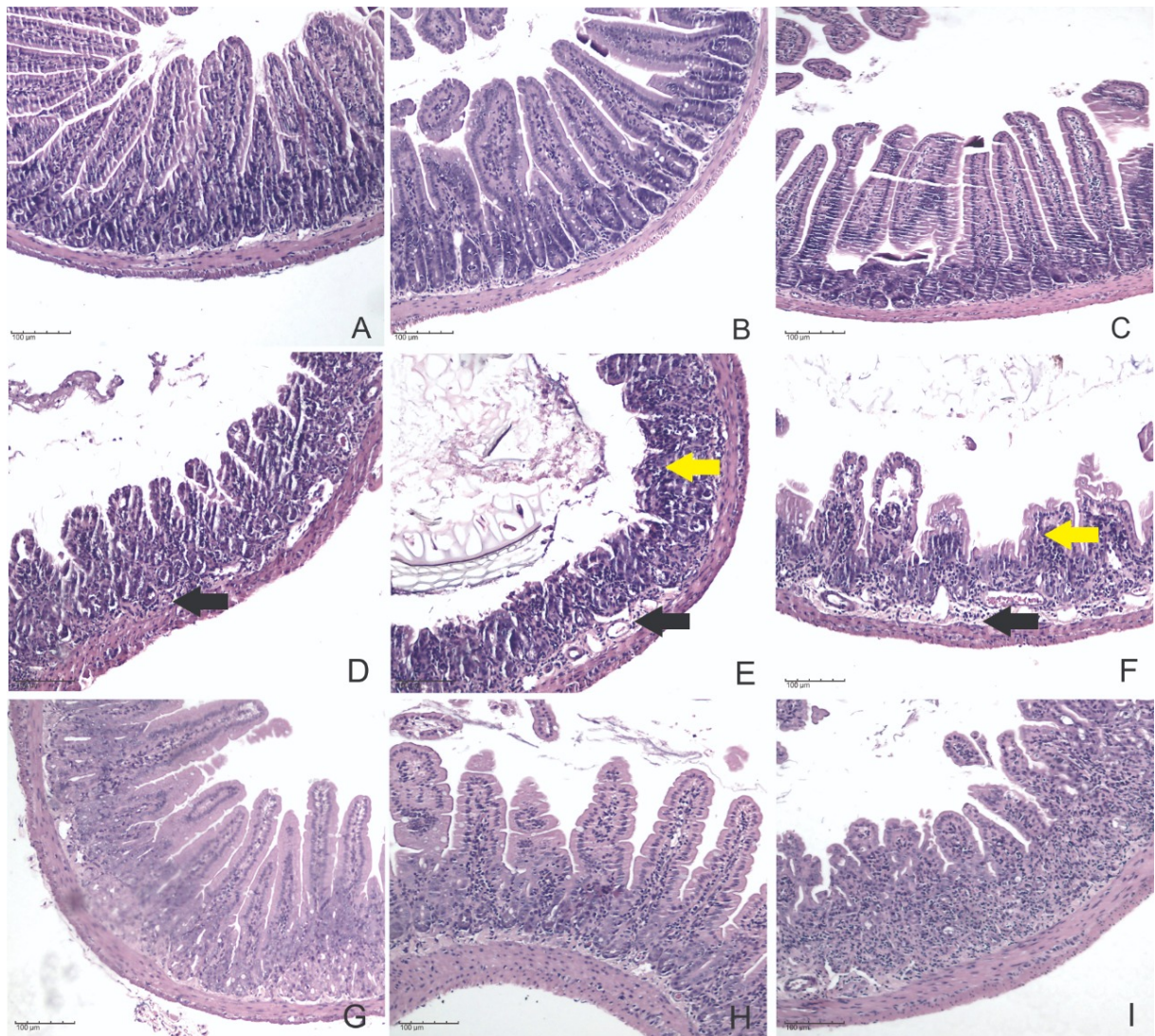


Figura 19 - Efeito do tratamento com o ASE nas alterações histopatológicas no duodeno, jejuno e íleo induzidas por 5-FU em camundongos. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm de cada segmento intestinal (duodeno, jejuno e íleo) para processamento histológico e coloração com hematoxilina e eosina. Fotomicrografias (400X) do duodeno de camundongos tratados com salina (A), 5-FU + salina (D), 5-FU + ASE (G); do jejuno de camundongos tratados com salina (B), 5-FU + salina (E), 5-FU + ASE (H) e do íleo de camundongos tratados com salina (C), 5-FU + salina (F), 5-FU + ASE (I) . Observa-se que os tratamentos com ASE (G, H e I) revertem a vacuolização (setas pretas) e infiltração neutrofílica (setas amarelas).

#### 6.4.2 Efeitos do ASE na atividade da MPO

Administração de 5-FU promoveu aumento na atividade de MPO no duodeno ( $2,4 \pm 0,3$  UMPO/mg de tecido), no jejuno ( $4,1 \pm 0,6$  UMPO/mg de tecido) e no íleo ( $5,2 \pm 1,0$  UMPO/mg de tecido), quando comparados com o grupo salina (duodeno:  $0,7 \pm 0,3$  UMPO/mg de tecido; jejuno:  $0,4 \pm 0,2$  UMPO/mg de tecido e íleo:  $1,3 \pm 0,5$  UMPO/mg de tecido). O tratamento com ASE 100mg/kg reverteu totalmente a infiltração neutrofílica no duodeno ( $1,0 \pm 0,3$  UMPO/mg de tecido), no jejuno ( $0,8 \pm 0,6$  UMPO/mg de tecido) e no íleo ( $1,3 \pm 0,4$  UMPO/mg de tecido) em comparação com o grupo 5-FU (Figura 20).

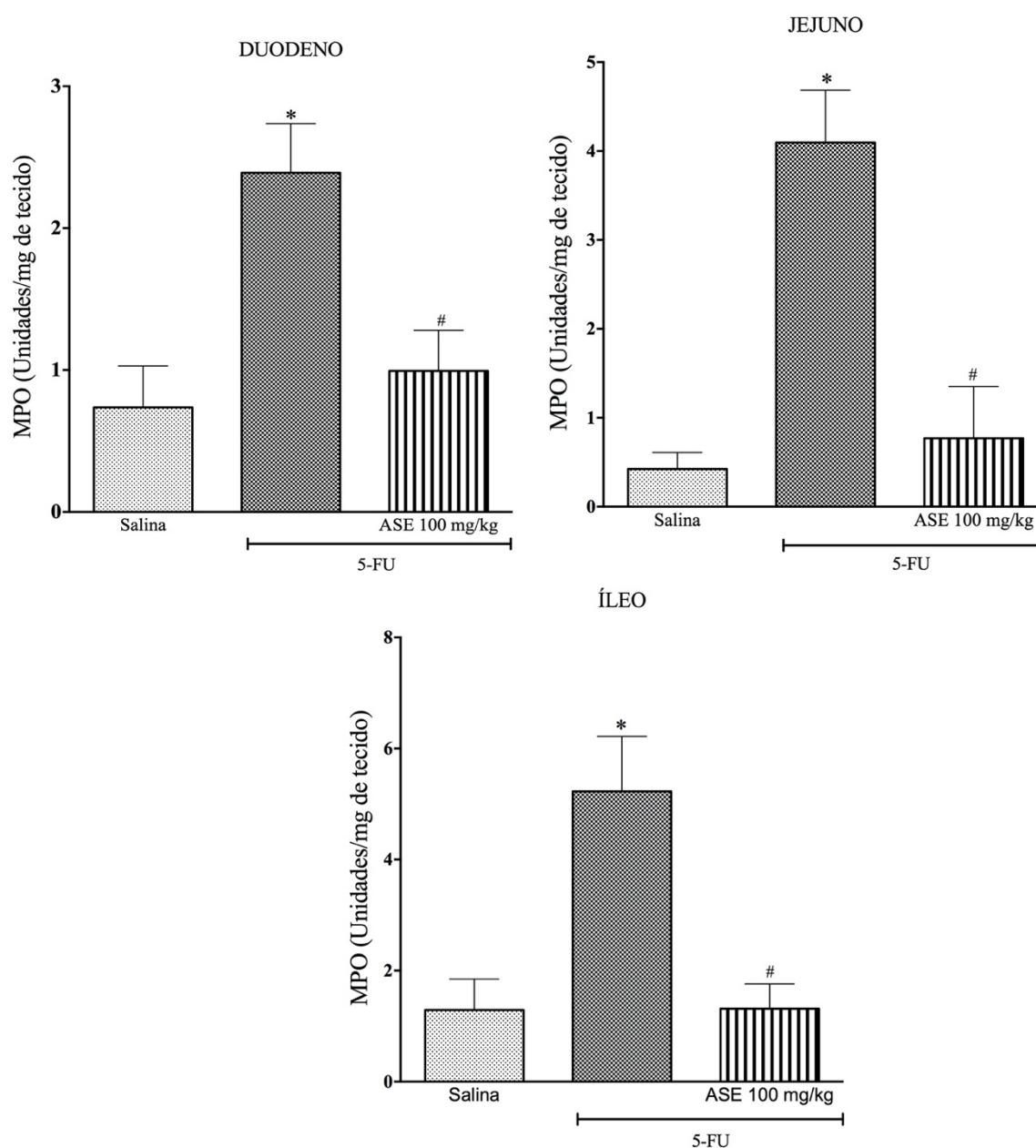


Figura 20 - Efeito do ASE na infiltração neutrofílica causada na mucosite intestinal induzida por 5-FU em

camundongos. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Segmentos de duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) foram obtidos para a realização do ensaio da atividade de MPO. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 8). Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni.

#### ***6.4.3 Efeitos do ASE nos níveis de citocinas pró inflamatórias (IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ )***

Os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo que recebeu 5-FU em todos os segmentos intestinais (duodeno:  $295,9 \pm 31,9$  pg/ml; jejuno:  $258,9 \pm 36,5$  pg/ml e íleo:  $314,5 \pm 56,6$  pg/ml) quando comparado com o grupo controle (duodeno:  $44,5 \pm 10,9$  pg/ml; jejuno:  $74,0 \pm 19,5$  pg/ml e íleo:  $62,0 \pm 9,2$  pg/ml). Observa-se na Figura 21, que o tratamento com o ASE 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de IL- 1 $\beta$  (duodeno:  $185,9 \pm 26,1$  pg/ml; jejuno:  $139,4 \pm 31,7$  pg/ml e íleo:  $151,6 \pm 26,1$  pg/ml), comparado com o grupo que recebeu o 5-FU.



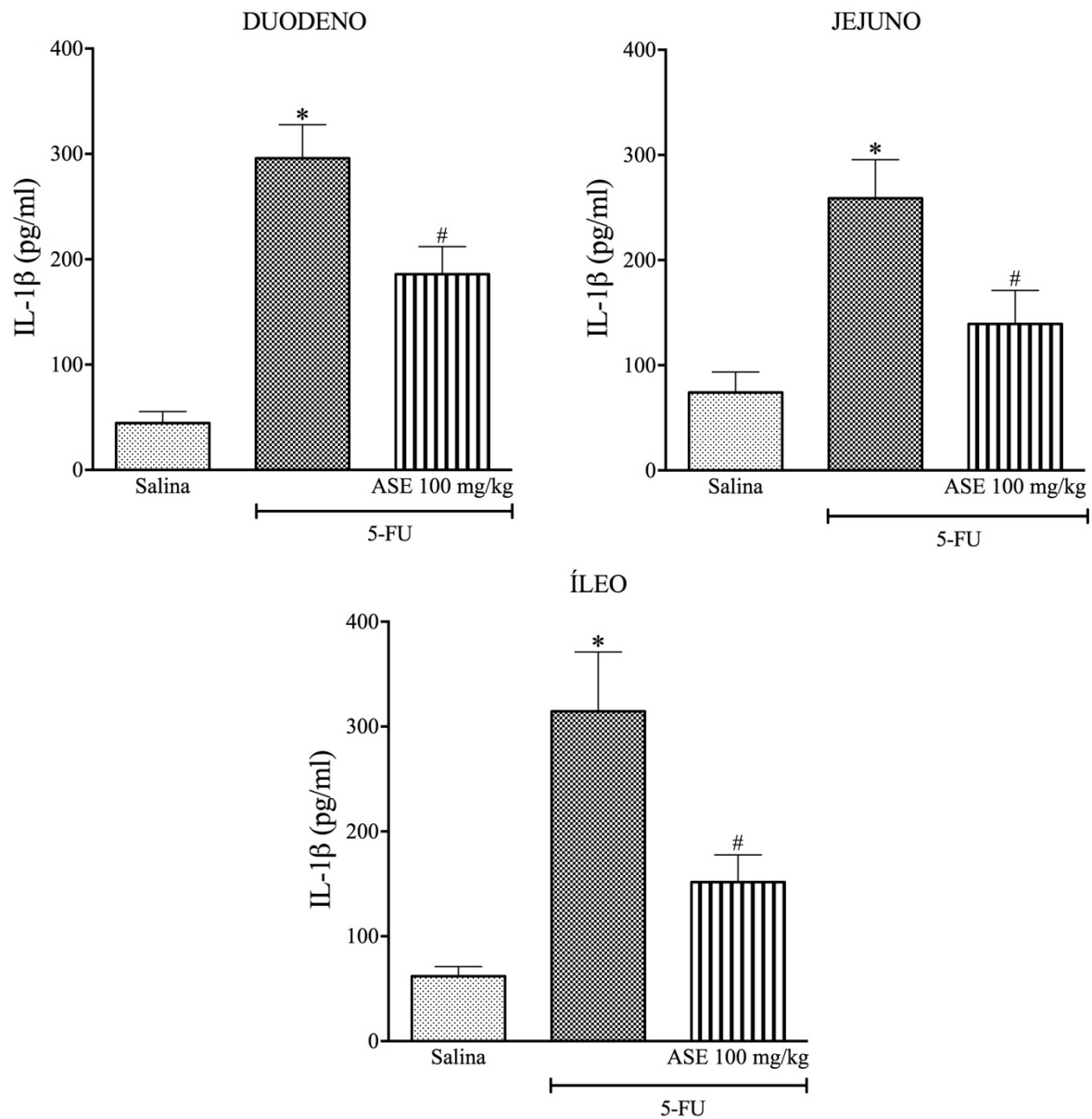


Figura 21 - Efeito do tratamento com o ASE nos níveis de IL-1 $\beta$  em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do duodeno, do jejuno e do íleo para dosagem por leitor de microplacas por absorbância. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

A Figura 22 demonstra que administração de 5-FU (duodeno:  $122,7 \pm 18,5$  pg/ml; jejuno:  $106,7 \pm 13,6$  pg/ml e íleo:  $109,2 \pm 16,3$  pg/ml) causou o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo controle (duodeno:  $48,3 \pm 12,9$  pg/ml; jejuno:  $57,8 \pm 9,7$  pg/ml e íleo:  $45,0 \pm 15,5$  pg/ml). O tratamento com ASE reduziu significativamente os níveis da citocina nos segmentos analisados (duodeno:  $63,3 \pm 10,4$  pg/ml; jejuno:  $55,0 \pm 15,2$  pg/ml e íleo:  $78,3 \pm 6,3$  pg/ml).

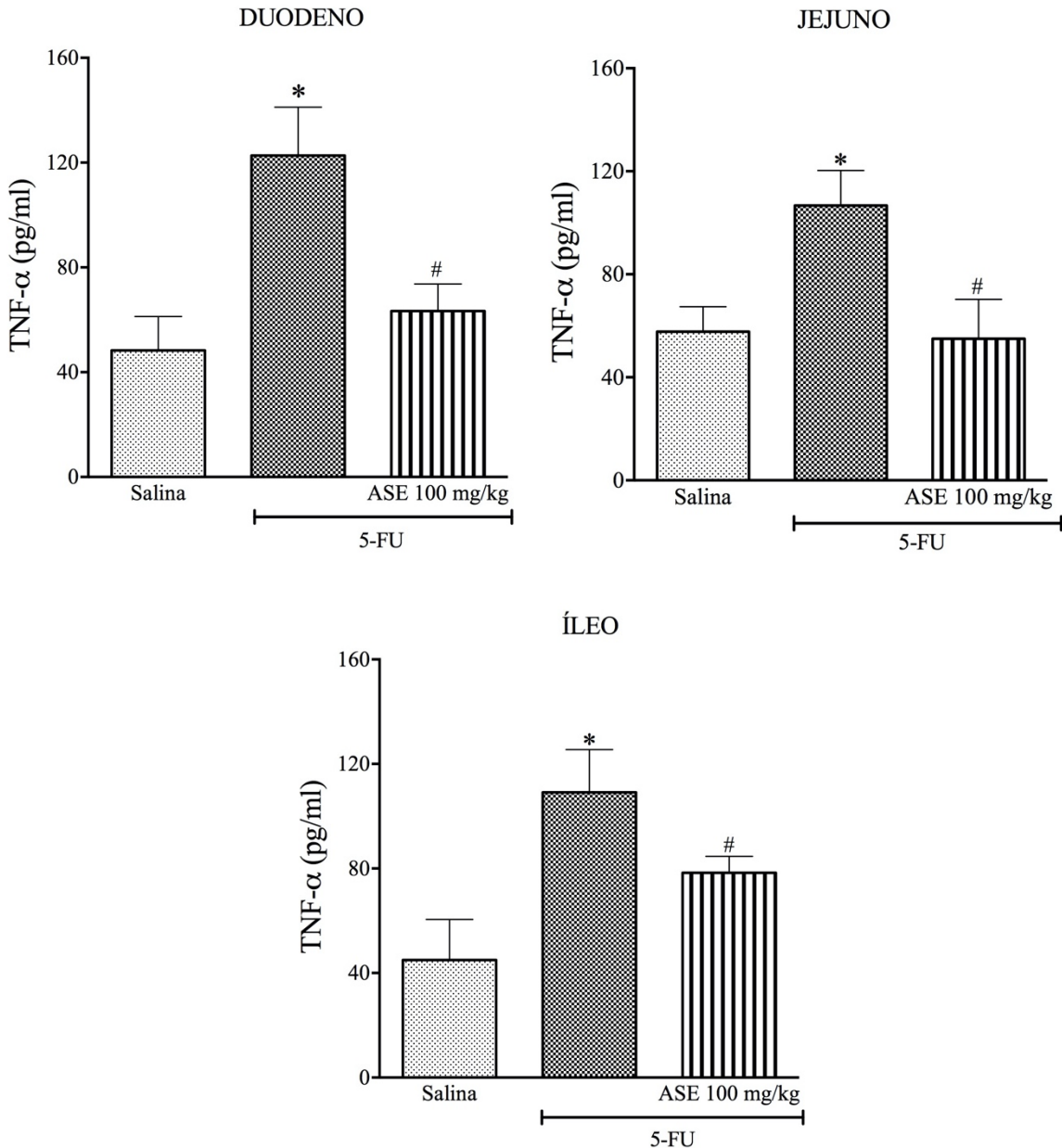


Figura 22 - Efeito do tratamento com o ASE nos níveis de TNF- $\alpha$  em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do duodeno, do jejuno e do íleo para dosagem por leitor de microplacas por absorbância. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

## 6.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios: TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF- $\kappa$ Bp65

### 6.5.1 Avaliação da transcrição gênica de TLR-4

A Figura 23 e o Quadro 6 representam a expressão relativa para TLR-4. Observa-se que os animais tratados com 5-FU tiveram um aumento de 8,37 vezes (min. 3,13; máx. 19,08; CI 95% 6,06-12,83), em relação ao grupo salina (min. 0,6; máx. 2,46; CI 95% 0,6-1,61) ( $p < 0,0001$ ). A administração de ASE 100 mg/kg reduziu significativamente a expressão de TLR-4 em 33,33 vezes (min. 0,021; máx. 0,047; CI 95% 0,02-0,04) em comparação com o grupo 5-FU (min. 0,37; máx. 2,27; CI 95% 0,72-1,53) ( $p < 0,0001$ ).

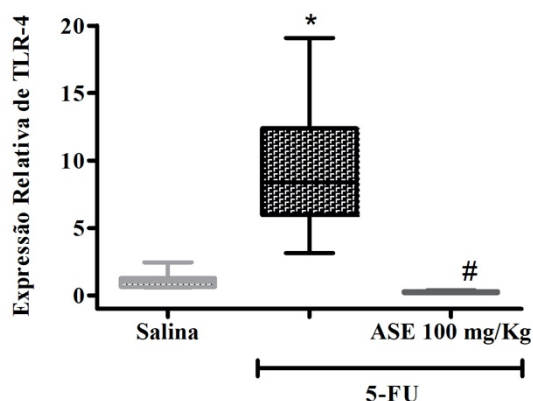


Figura 23 - Efeito do ASE nos níveis de mRNA para TLR-4 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da expressão de mRNA por PCR quantitativo. Expressão gênica de TLR-4 em relação ao controle salina. Significância  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Dados foram expressos como mediana, mínimo e máximo e análise estatística foi realizada por teste de Mann-Whitney.

### 6.5.2 Avaliação da transcrição gênica de MyD88

A Figura 24 e o Quadro 6 mostram que a administração de 5-FU induziu aumento de 2,35 vezes a expressão gênica de MyD88 (min. 1,89; máx. 5,44; CI 95% 2,0-3,78), comparado ao grupo controle (min. 0,45; máx. 2,57; CI 95% 0,49-1,84) ( $p < 0,0046$ ). O tratamento do grupo mucosite com ASE 100 mg/kg reduziu significativamente MyD88 em 5,29 vezes (min. 0,06; máx. 0,36; CI 95% 0,11-0,28) em comparação com o grupo 5-FU (min. 0,7; máx. 2,0; CI 95% 0,74-1,4) ( $p < 0,0001$ ).

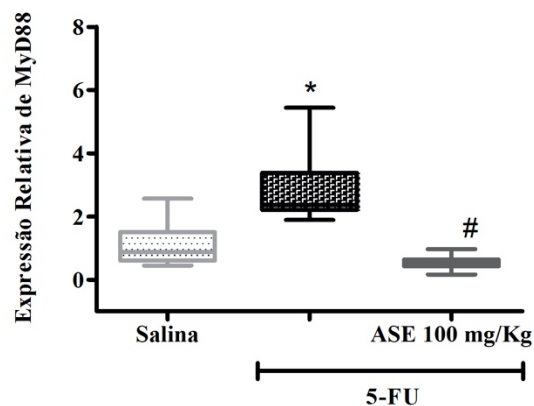


Figura 24 - Efeito do ASE nos níveis de mRNA para MyD88 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da expressão de mRNA por PCR quantitativo. Expressão gênica de MyD88 em relação ao controle salina. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Dados foram expressos como mediana, mínimo e máximo e análise estatística foi realizada por teste de Mann-Whitney.

### 6.5.3 Avaliação da transcrição gênica de $PI3K\alpha$

A Figura 25 e o Quadro 6 representam a expressão relativa para  $PI3K\alpha$ . Observa-se que os animais tratados com 5-FU tiveram um aumento de 4,89 vezes (min. 3,83; máx. 9,32; CI 95% 4,27-6,73) em relação ao grupo salina (min. 0,28; máx. 2,84; CI 95% 0,46-2,0) ( $p < 0,0001$ ). A administração de ASE 100 mg/kg reduziu significativamente a expressão de  $PI3K\alpha$  em 35,7 vezes (min. 0,01; máx. 0,04; CI 95% 0,02-0,03) em comparação com o grupo 5-FU (min. 0,72; máx. 1,76; CI 95% 0,8-1,27) ( $p < 0,0001$ ).

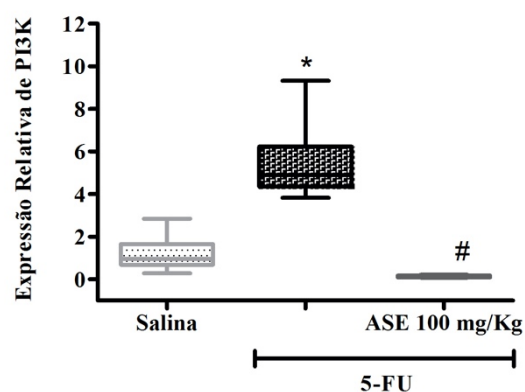


Figura 25 - Efeito do ASE nos níveis de mRNA para  $PI3K\alpha$  em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da expressão de mRNA por PCR quantitativo. Expressão gênica de  $PI3K\alpha$  em relação ao controle salina. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Dados foram expressos como mediana, mínimo e



máximo e análise estatística foi realizada por teste de Mann-Whittney.

#### 6.5.4 Avaliação da transcrição gênica de mTOR

A Figura 26 e o Quadro 6 representam a expressão relativa para mTOR. Observa-se que os animais tratados com 5-FU tiveram um aumento de 3,94 vezes (min. 2,54; máx. 8,12; CI 95% 3,41-6,11) em relação ao grupo salina (min. 0,46; máx. 2,49; CI 95% 0,6-1,65) ( $p < 0,0001$ ). A administração de ASE 100 mg/kg reduziu significativamente a expressão de mTOR em 22,22 vezes (min. 0,03; máx. 0,08; CI 95% 0,03-0,06) em comparação com o grupo 5-FU (min. 0,57; máx. 1,82; CI 95% 0,76-1,4) ( $p < 0,0001$ ).

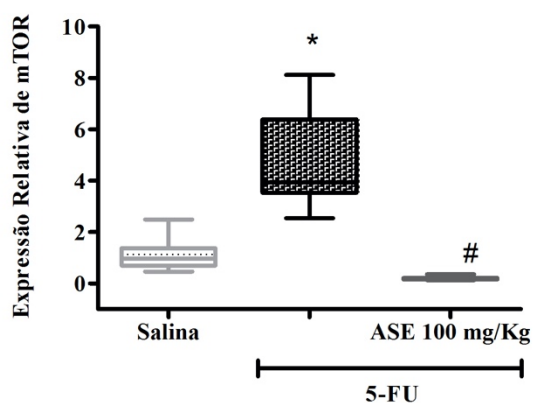


Figura 26 - Efeito do ASE nos níveis de mRNA para mTOR em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da expressão de mRNA por PCR quantitativo. Expressão gênica de mTOR em relação ao controle salina. Significância  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Dados foram expressos como mediana, mínimo e máximo e análise estatística foi realizada por teste de Mann-Whittney.

#### 6.5.5 Avaliação da transcrição gênica de NF- $\kappa$ Bp65

A Figura 27 e o Quadro 6 representam a expressão relativa para NF- $\kappa$ Bp65. Observa-se que os animais tratados com 5-FU tiveram um aumento de 5,61 vezes (min. 2,57; máx. 9,88; CI 95% 4,32-7,65) em relação ao grupo salina (min.0,29; máx. 3,16; CI 95% 0,38-2,17) ( $p < 0,0002$ ). A administração de ASE 100 mg/kg reduziu significativamente a expressão de NF- $\kappa$ Bp65 em 18,52 vezes (min. 0,03; máx. 0,10; CI 95% 0,04-0,09) em comparação com o grupo 5-FU (min. 0,046; máx. 1,78; CI 95% 0,77-1,37) ( $p < 0,0001$ ).

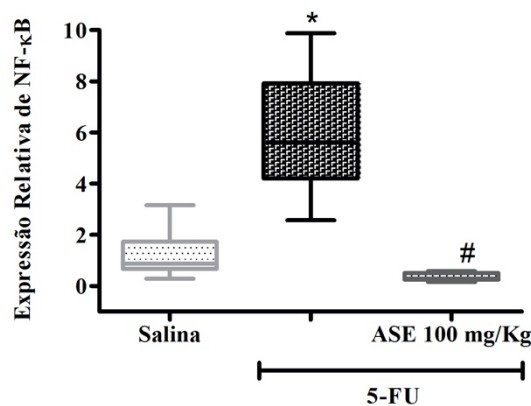


Figura 27 - Efeito do ASE nos níveis de mRNA para NF-κBp65 em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da expressão de mRNA por PCR quantitativo. Expressão gênica de NF-κBp65 em relação ao controle salina. Significância  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Dados foram expressos como mediana, mínimo e máximo e análise estatística foi realizada por teste de Mann-Whitney.

Quadro 6 – Valores das expressões relativas de TLR-4, MyD88, PI3K $\alpha$ , mTOR e NF-κBp65 e análise estatística

Gene	Expressão relativa do grupo 5-FU com o grupo salina	Nível de significância	Expressão relativa do grupo ASE com o grupo salina	Nível de significância	Expressão relativa do grupo ASE com o grupo 5-FU	Nível de significância
TLR-4	Aumenta 8,37 vezes*	$p < 0,0001$	Diminui 4 vezes*	$p < 0,0014$	Diminui 33,33 vezes#	$p < 0,0001$
MyD88	Aumenta 2,35 vezes*	$p < 0,0046$	Diminui 1,97 vezes	$p < 0,053$	Diminui 5,29 vezes#	$p < 0,0001$
PI3K $\alpha$	Aumenta 84,89 vezes*	$p < 0,0001$	Diminui 6,66 vezes*	$p < 0,021$	Diminui 35,7 vezes#	$p < 0,0001$
mTOR	Aumenta 3,94 vezes*	$p < 0,0004$	Diminui 5 vezes*	$p < 0,0014$	Diminui 22,22 vezes#	$p < 0,0001$
NF-κBp65	Aumenta 5,61 vezes*	$p < 0,0002$	Diminui 3,33 vezes*	$p < 0,013$	Diminui 18,52 vezes#	$p < 0,0001$

Efeito do tratamento com ASE em mucosa ileal de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.)

ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Foi retirado o íleo para análise de mRNA por PCR quantitativo. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado o teste de Mann-Whittney.

## 6.6 Efeito do ASE na expressão proteica de marcadores inflamatórios: TLR-4 e NF- $\kappa$ Bp65

Administração de 5-FU aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a expressão de TLR-4 (TLR4/p38:  $0,72 \pm 0,10$ ) no segmento ileal, quando comparado com o grupo salina (TLR4/p38:  $0,19 \pm 0,10$ ). O tratamento com o ASE 100 mg/kg reduziu a expressão do TLR-4 (TLR4/p38:  $0,24 \pm 0,04$ ), quando comparado com o grupo 5-FU (Figura 28).

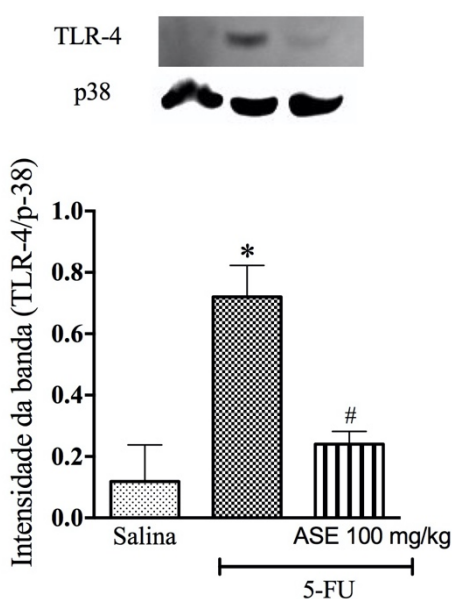


Figura 28 - Efeito do ASE na expressão proteica de TLR-4 em íleo de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para análise por Western blot. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

A Figura 29 demonstra que administração de 5-FU aumentou significativamente a expressão de NF- $\kappa$ Bp p65 (NF- $\kappa$ Bp 65/p38:  $1,55 \pm 0,12$ ) no íleo, quando comparado com o grupo salina (NF- $\kappa$ B p65/p8:  $0,37 \pm 0,17$ ). A administração de ASE 100 mg/kg (NF- $\kappa$ B p65/p38:  $0,30 \pm 0,07$ ) reverteu totalmente esse aumento quando comparado com o grupo 5-FU ( $p < 0,05$ ).

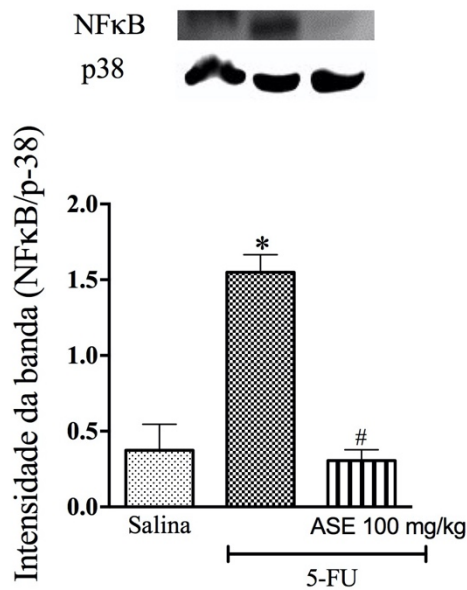


Figura 29 - Efeito do ASE na expressão proteica de NF-κBp65 em íleo de camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado um segmento de 1cm do íleo para análise por Western blot. Os valores representam a média ± E.P.M. Significância  $P < 0,05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

## 6.7 Efeito do ASE nos parâmetros funcionais da mucosite intestinal

### 6.7.1 Esvaziamento gastrointestinal

Administração de 5-FU promoveu um retardo significativo ( $P < 0,05$ ) da refeição teste no estômago dos animais ( $46,0 \pm 5,8\%$ ), comparados com grupo controle que recebeu salina ( $24,2 \pm 2,4\%$ ). O tratamento dos animais com ASE 100 mg/kg reduziu as alterações causadas pelo 5-FU ( $30,2 \pm 3,6\%$ ), como observado na Figura 30. A Figura 31 mostra que o 5-FU causou retardo do trânsito intestinal, nas porções proximal ( $31,0 \pm 2,7\%$ ) e distal ( $25,7 \pm 4,0\%$ ) do intestino, quando comparado com o grupo controle (proximal:  $21,0 \pm 1,8\%$  e distal:  $17,2 \pm 1,8\%$ ). O tratamento com ASE 100 mg/kg (proximal:  $16,5 \pm 2,1\%$  e distal:  $13,4 \pm 2,1\%$ ) reduziu o retardo do trânsito intestinal. A porção medial do intestino não apresentou variação entre os grupos para o ensaio de trânsito intestinal.

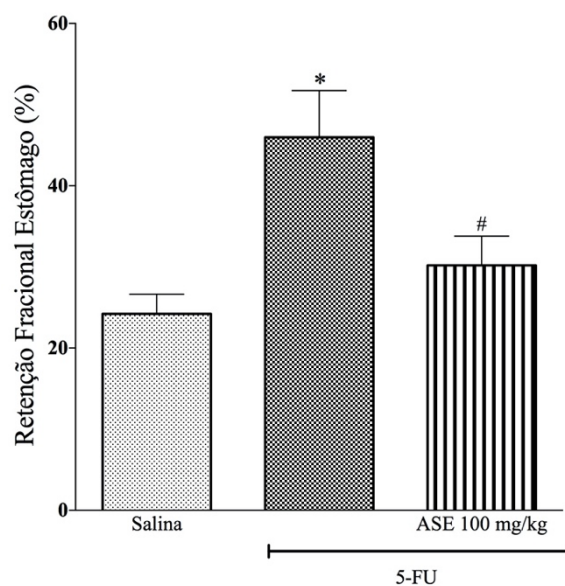
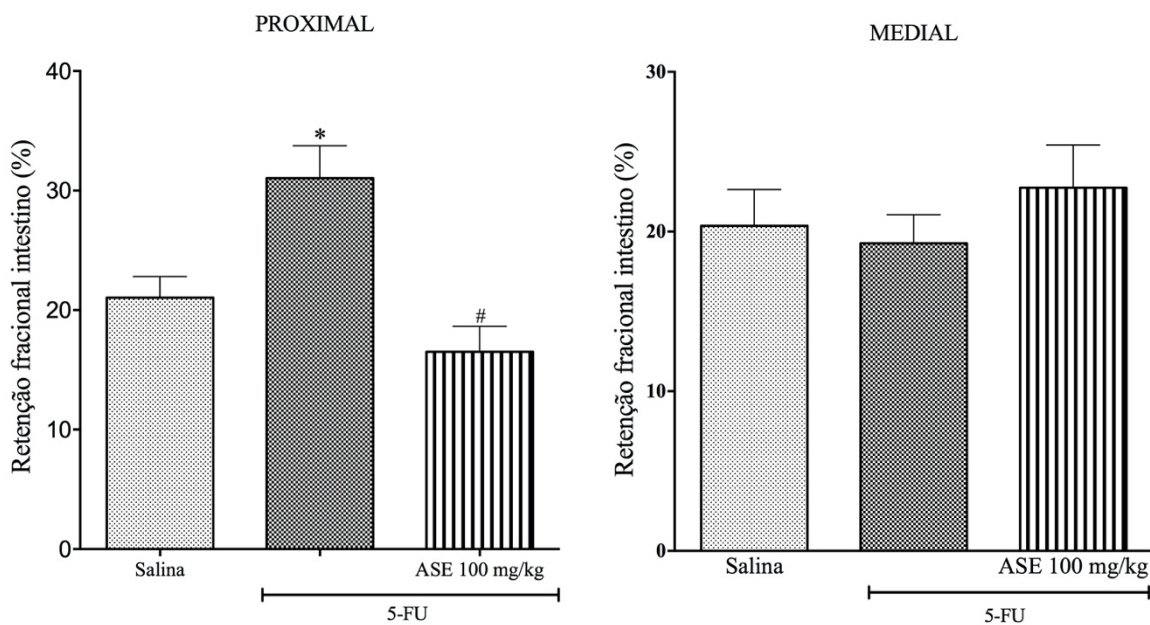


Figura 30 - Efeito do ASE no esvaziamento gástrico em camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o estômago e todo o intestino delgado para mensuração do vermelho de fenol, administrado por gavagem. O intestino delgado foi dividido em 3 porções (intestino proximal, medial e distal). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.



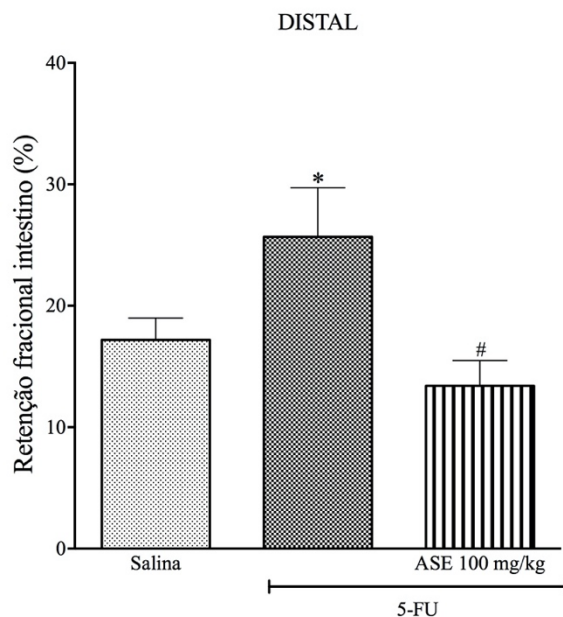


Figura 31 - Efeito do ASE no trânsito intestinal em camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o estômago e todo o intestino delgado para mensuração do vermelho de fenol, administrado por gavagem. O intestino delgado foi dividido em 3 porções (intestino proximal, medial e distal). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado ANOVA, seguido do Bonferroni.

### 6.7.2 Efeito do ASE na resistência elétrica transepitelial (RET)

Observa-se na Figura 32 que a resistência elétrica transepitelial do íleo de animais com mucosite intestinal foi reduzida ( $6,5 \pm 1,0 \text{ ohm.cm}^2$ ), quando comparado com o grupo controle ( $24,1 \pm 1,5 \text{ ohm.cm}^2$ ). O íleo dos animais com mucosite tratados com ASE 100 mg/kg aumentou significativamente a resistência elétrica transepitelial ( $12,6 \pm 1,1 \text{ ohm.cm}^2$ ) quando comparado com o grupo 5-FU.

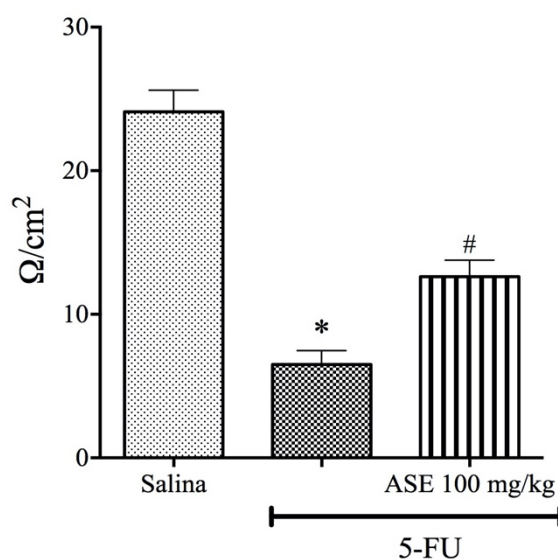


Figura 32 - Efeito do ASE na resistência elétrica transepitelial da mucosa intestinal em camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da resistência elétrica transepitelial (RET). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado o teste t de *student* não pareado.

### 6.7.3. Permeabilidade da mucosa intestinal

Os animais com mucosite intestinal tiveram um aumento da intensidade de fluoresceína no íleo em diferentes tempos (tempo 30 s:  $97,5 \pm 14,4$ , tempo 60 s:  $149,7 \pm 24,2$  e tempo 90 s:  $191,6 \pm 35,5$  intensidade de fluoresceína), quando comparado com o grupo salina (tempo 30 s:  $17,7 \pm 6,0$ , tempo 60 s:  $33,5 \pm 13,3$  e tempo 90 s:  $41,8 \pm 13,4$  intensidade de fluoresceína). O tratamento com ASE preveniu aumento na intensidade de fluoresceína (tempo 30 s:  $36,4 \pm 9,3$ , tempo 60 s:  $72,4 \pm 15,7$  e tempo 90 s:  $89,7 \pm 18,4$  intensidade de fluoresceína) no lado não luminal (Figura 33).

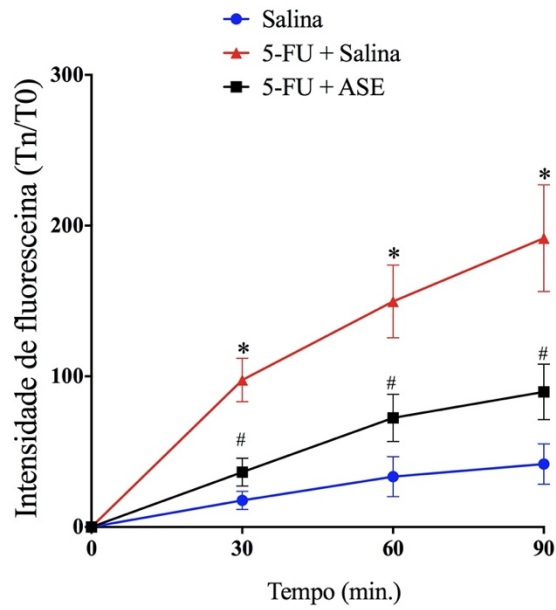


Figura 33 - Efeito do ASE na permeabilidade da mucosa intestinal em camundongos tratados com 5-FU. Os animais receberam salina (5mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com ASE (100 mg/Kg, v.o.) ou salina por quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados em seguida. Grupos contendo de 6 a 8 animais. Foi retirado o íleo para análise da permeabilidade intestinal. A permeabilidade foi avaliada pela concentração da intensidade de fluoresceína nos minutos 0, 30, 60 e 90. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Significância  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (salina); #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo 5-FU. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk seguido pelo teste t student não pareado.



## 7 DISCUSSÃO

A mucosite intestinal, caracterizada por inflamação intensa, é o principal efeito colateral associado ao tratamento com 5-FU (BOWEN; KEEFE, 2008). A inflamação intestinal, desencadeada pelo uso desse quimioterápico, ativa a via TLR-4/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK, resultando na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (JUSTINO *et al.*, 2019). É relatado que, durante o processo inflamatório intestinal, outra via, a PI3K/AKT/mTOR, também está ativa e contribui significativamente para a produção de mediadores inflamatórios (YI *et al.*, 2017). Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) nas vias inflamatórias no curso da mucosite intestinal por 5-FU.

A mucosite intestinal, induzida pelo 5-FU em camundongos, resultou na indução de uma lesão tecidual, apresentando um importante comprometimento da barreira epitelial funcional com a presença das seguintes alterações: encurtamento das vilosidades intestinais, vacuolização celular, intensa infiltração de células inflamatórias, com aumento na dosagem de MPO, leucopenia, diarreia, seguida de importante perda ponderal, redução da resistência elétrica transepitelial (RET), aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, aumento do retardo no esvaziamento gástrico e trânsito intestinal. Além disso, o 5-FU foi capaz de induzir alterações da expressão de TLR-4, MyD88, PI3K, mTOR, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e na produção de ROS, alterando as dosagens de NO<sub>3</sub>, MDA e GSH.

A pesquisa demonstrou que a utilização do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea Mart.* (Açaí) reduziu as alterações histopatológicas, as alterações inflamatórias e as alterações funcionais no intestino, induzidas pelo quimioterápico.

Inicialmente, observou-se que o tratamento com o ASE na dose de 100 mg/kg reduziu os danos relacionados ao estresse oxidativo e à perda de peso a parâmetros semelhantes ao controle salina, em contraste com as doses de 10 mg/Kg e 30 mg/kg. Portanto, optou-se pela dose de 100 mg/kg para a avaliação dos demais marcadores inflamatórios e funcionais avaliados. Sudo *et al.* (2015) demonstraram o efeito anti-inflamatório de ASE na dose de 100 mg/kg, em modelo de dor neuropática e dor aguda, em roedores, produzindo maiores efeitos, quando comparada com as doses de 30 mg/kg e 300 mg/Kg.

Um efeito colateral importante, resultado do uso do 5-FU, é a presença de leucopenia. Esse efeito é esperado e demonstra que o quimioterápico está exercendo seu efeito farmacológico adequadamente, fato já descrito por diversos autores deste grupo de pesquisas (SOARES *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013; JUSTINO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.* 2015;

QUARESMA *et al.*, 2019). O tratamento com ASE não alterou a ocorrência da leucopenia, demonstrando que o extrato não interfere na ação farmacológica do 5-FU, no quesito contagem de leucócitos.

Estudos recentes mostraram que o 5-FU causa danos diretos ao epitélio intestinal, resultando em aumento na produção de ROS e alteração no sistema de defesa antioxidante, levando a um estado de estresse oxidativo (SONIS, 2004; SOARES *et al.*, 2008; JUSTINO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015; QUARESMA *et al.*, 2019). O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a formação de agentes oxidantes e a atividade de sistemas antioxidantes, com uma maior concentração de espécies altamente reativas, causando graves danos às estruturas celulares, como lipídios de membranas, proteínas, DNA e RNA. Essa condição é resultado do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por diferentes vias metabólicas, ou da atividade deficiente do sistema de proteção antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2020). A interrupção desse equilíbrio antioxidante na mucosa intestinal contribui significativamente para a patogênese de muitas doenças no TGI (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Esta pesquisa constatou que o tratamento com ASE reduziu a peroxidação lipídica mitigada, induzida por 5-FU em todos os segmentos intestinais. Esses resultados estão de acordo com a literatura, a qual relata o efeito antioxidante desse extrato diminuindo os aumentos de MDA em plasma e em tecido adiposo visceral de ratos obesos com síndrome metabólica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2020); em artéria e no rim de ratos com hipertensão renovascular (DA COSTA *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2017); em fígado de camundongos obesos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015); em fígado e sangue de ratos diabéticos em associação com exercício físico (DE BEM *et al.*, 2018a); no plasma e no rim de ratos adultos, os quais foram submetidos a restrição proteica durante a gestação (DE BEM *et al.*, 2014); no plasma de animais submetidos a restrição no crescimento fetal por pré-eclampsia materna (DA SILVA *et al.*, 2020) e no cérebro de ratos submetidos a separação materna periódica (DE BEM *et al.*, 2020).

RODRIGUES *et al.* (2006) e MARTINEZ *et al.* (2018) demonstraram que o ASE possui potente efeito antioxidante, possuindo a capacidade de capturar radicais livres. Esses autores definem ainda que o extrato possui boa capacidade antioxidante contra os radicais peroxil, peroxinitrito e hidroxila. Essa atividade do ASE é atribuída à presença de diversos compostos fenólicos em sua composição, incluindo procianidinas, catequinas e epicatequinas (MELO *et al.*, 2016). De oliveira *et al.* (2015) esclarecem que o ASE é formado por 88% de proantocianidinas (PAs) poliméricas (dímeros até pentâmeros), heteropolímeros e, em menor

grau, de procianidinas galilizadas. De fato, Cheah *et al.* (2009) mostraram que as proantocianidinas dos extratos de sementes de uva (GSE) diminuíram os danos oxidativos induzidos por 5-FU em um modelo de rato com mucosite intestinal. Em adição, a rutina (RUT), um flavonoide, também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, diminuindo as concentrações de MDA na mucosite intestinal por 5-FU em camundongos (FIDELES *et al.*, 2020).

Outro marcador do estresse oxidativo alterado na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU é o GSH (QUARESMA *et al.*, 2019). A administração de ASE na mucosite intestinal restaurou os níveis de GSH, em todos os segmentos intestinais, ao mesmo patamar daquele encontrado nos animais controle. Vários trabalhos demonstram a eficiência desse extrato em restaurar os níveis de GSH em artéria e no rim de ratos com hipertensão renovascular (DA COSTA *et al.*, 2012; DA COSTA *et al.*, 2017); em fígado e sangue de ratos diabéticos em associação com exercício físico (DE BEM *et al.*, 2018a); no plasma e no rim de ratos adultos, os quais foram submetidos a restrição proteica durante a gestação (DE BEM *et al.*, 2014); no cérebro de ratos submetidos a separação materna periódica (DE BEM *et al.*, 2020) e no pulmão de camundongos com inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro (DE MOURA *et al.*, 2011). Esses autores atribuem os efeitos antioxidantes à composição do extrato, exatamente como Cheah *et al.* (2009) e FIDELES *et al.* (2020), que demonstraram a capacidade de polifenóis em restaurar os níveis de GSH; no primeiro, o efeito de proantocianidinas do GSE e, no segundo, da RUT em mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Outro composto que se apresenta alterado e é avaliado para a investigação do processo oxidativo é o NO. O tratamento com ASE, no nosso modelo de mucosite intestinal, também limitou os níveis de nitrato em todos os segmentos intestinais. Esses resultados corroboram com os achados anteriores na literatura que indicam redução de nitrato em ratos hipertensos com lesão renovascular (DA COSTA *et al.*, 2017); no plasma e no rim de ratos adultos, os quais foram submetidos a restrição proteica durante a gestação (DE BEM *et al.*, 2014); no cérebro de ratos submetidos a separação materna periódica (DE BEM *et al.*, 2020); e no pulmão de camundongos com inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro (DE MOURA *et al.*, 2011), tratados com o ASE. Matheus *et al.* (2006) afirmam que o ASE parece ser capaz de reduzir a produção de NO pela redução na atividade de iNOS, em processos inflamatórios. Zapata-Sudo *et al.*, (2014) discutem também que o ASE possui ação vasodilatadora, dependente da ativação da via NO-cGMP (guanilato ciclase solúvel) e também pode envolver a liberação de fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF). Esses trabalhos correlacionam os efeitos do ASE à presença dos compostos bioativos presentes, do mesmo modo que um estudo, conduzido em células epiteliais colônicas (IECs) inflamadas e tratadas com extrato de vinho

tinto (rico em compostos fenólicos), que apontou inibição tanto do aumento de óxido nítrico derivado da iNOS, quanto de nitração da proteína tirosina, um biomarcador do estresse nitrosativo que normalmente requer a reação do óxido nítrico com o radical superóxido (NUNES *et al.*, 2013). Esse resultado foi o mesmo encontrado por Pepe *et al.* (2020), no qual o extrato de suco de romã (*Punica granatum* L.), rico em polifenóis, inibiu a expressão de iNOS e formação de nitrotirosina em IECs tratadas com 5-FU.

Kamalian *et al.* (2020) afirmam que os flavonoides, um subgrupo dos polifenóis, regulam a produção de NO e a expressão da iNOS. Eles esclarecem ainda que o receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) é um fator de transcrição importante dos genes de oxidação e metabolismo lipídico em macrófagos e possui atividades anti-inflamatórias. Os flavonoides atuam ativando a expressão genética do fator PPAR $\gamma$ , reconhecido por ser um participante chave na regulação negativa da iNOS. (KAMALIAN *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo promove diminuição das atividades biológicas, ativação imunológica e inflamação (DIAZ DE BARBOZA *et al.*, 2017). Miyazono *et al.* (2004) e Chami *et al.* (2018) acrescentam que a produção de ROS está associada à inflamação; à regulação da resposta imune; à sinalização de quimiotaxia pró-inflamatória para o local lesionado, precedendo a infiltração de neutrófilos; a interação das células imunes e a ativação e a supressão imunológicas; demonstrando que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no dano do tecido intestinal.

De fato, a mucosite intestinal induzida por 5-FU é descrita pela literatura por importante repercussão inflamatória, com incidência de diarreia (JUSTINO, 2016), perda de peso (SOARES *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2017), aumento da apoptose de células epiteliais, atrofia das criptas e das vilosidades, diminuição da razão vilosidade/cripta (SOARES *et al.*, 2008; MENDES, 2019), células vacuoladas, necrose de cripta, infiltração celular inflamatória intensa, vacuolização e edema (JUSTINO *et al.*, 2014), levando à destruição da arquitetura intestinal. Essa destruição direta das células intestinais resulta em dano mucoso e estabelecimento de severo processo inflamatório, com liberação de citocinas (SONIS, 2004). A presença da inflamação intestinal leva ao aumento de células polimorfonucleares no epitélio, implicando na ocorrência de diarreias (MADARA *et al.*, 1993) e resultam em prejuízo na função da barreira intestinal, uma vez que as citocinas atuam sobre as *tight junctions* (TJs) promovendo aumento da permeabilidade, dificultando a absorção de nutrientes e influenciando na perda de peso (OSHIMA; MIWA, 2016).

Nesta pesquisa, o uso de ASE, nas doses de 30 mg/Kg e 100 mg/Kg, foi capaz de diminuir a perda de peso no dia 2 e no dia 3 após a indução; foi ainda capaz de reduzir os danos

histológicos no duodeno, jejuno e íleo, pela redução na vacuolização, na infiltração neutrofílica e na inflamação.

A literatura não estabelece paralelo entre o uso de ASE e a redução na perda ponderal. Entretanto, Chen *et al.* (2017) demonstraram que PAs das sementes de *Ficus virens* melhoraram a perda de peso e as lesões jejunais em ratos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Da mesma forma, GSE, rico em PAs, foi capaz de reduzir os escores histológicos qualitativos de dano no jejuno proximal, aumentar a altura das vilosidades no jejuno proximal e íleo distal e atenuar a redução da espessura da mucosa no jejuno e no íleo, em ratos com mucosite intestinal induzida por 5-FU (CHEAH *et al.*, 2009). O mecanismo envolvido na proteção do epitélio parece ter relação com o tamanho das PAs, seu peso molecular e a capacidade de absorção intestinal, fazendo com que elas cheguem ao cólon intactas, o que ofereceria a proteção observada por esses autores (DÉPREZ *et al.*, 2000; GONTHIER *et al.*, 2003; CHEAH *et al.*, 2009). Adicionalmente, Atiq *et al.* (2019) mostraram que a daidzeína, um composto fenólico, reverteu significativamente a perda de peso, aliviou a diarreia e melhorou as deformidades histopatológicas associadas à inflamação em camundongos com mucosite intestinal induzido por 5-FU; e Fideles *et al.* (2020) apontaram que o uso de RUT preveniu as alterações histológicas causadas na mucosite intestinal por 5-FU.

Outro marcador inflamatório avaliado foi a MPO, um indicador da infiltração neutrofílica e um dos principais efeitos colaterais em pacientes recebendo tratamento com 5-FU (BHATTACHARYYA, *et al.*, 2014; ARATANI, 2018). Nossos achados incluem diminuição de MPO em todos os segmentos intestinais após administração sistêmica de ASE. Esses resultados encontram fundamentação em outro estudo que aponta o uso de ASE como o responsável pela redução de MPO, macrófagos alveolares e número de neutrófilos no pulmão de camundongos com inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro (DE MOURA *et al.*, 2011) e no estudo de Cordeiro *et al.* (2018), no qual o ASE inibiu a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) em ratos diabéticos e espontaneamente hipertensos. Esses resultados são esperados, pois encontram paralelo com vários estudos que utilizaram outros polifenóis, como a RUT e PAs, que reduziram os níveis de MPO em modelos experimentais de mucosite intestinal por 5-FU (CHEAH *et al.*, 2009; FIDELES *et al.*, 2020) e como o resveratrol, que reduziu MPO em ratas submetidas a isquemia/lesão de reperfusão intestinal (OZKAN *et al.*, 2009).

Os neutrófilos ativados após dano tecidual, expressam um vasto e diversificado repertório de citocinas que são cruciais nas respostas imunes inatas e adaptativas e para a defesa do organismo (MANTOVANI *et al.*, 2011; MORTAZ *et al.*, 2018). Além do papel

desempenhado pelos neutrófilos, a lesão das camadas epiteliais e submucosas no intestino, causados pelo uso de quimioterápicos, provoca a liberação de DAMPs, CRAMPs e PAMPs (SONIS, 2004; SONIS, 2010; BASILE *et al.*, 2019). Essas moléculas ativam receptores como TLR-2 e TLR-4, que, por sua vez, ativam vias inflamatórias importantes, como a via MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK e a via PI3K/AKT/mTOR (YI *et al.*, 2017; JUSTINO *et al.*, 2019) que contribuem para o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 (SOARES *et al.*, 2008; JUSTINO, 2016; RTIBI *et al.*, 2018; MENDES, 2019).

Esses achados estão de acordo com estudo anterior que mostrou a expressão aumentada de TLR4 e NF- $\kappa$ B em tecidos intestinais de ratos após hipóxia aguda (LUO; GUO; ZHOU 2012). A via TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B tem sido implicada, em vários estudos, no dano epitelial de vários modelos experimentais de mucosite (WONG *et al.*, 2015; KHAN; WARDILL; BOWEN, 2018; CHANG *et al.*, 2020b), da mesma maneira que a via PI3K/AKT/mTOR (YI *et al.*, 2017). A implicação dessa última via já é relatada em diversos modelos de colite, estando envolvida na regulação e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (HUANG *et al.*, 2011; LONG *et al.*, 2013; TOKUHIRA *et al.*, 2015).

PAMPs e DAMPs também são responsáveis pela participação na formação de inflamassomas (CHAUHAN; VANDE WALLE; LAMKANFI, 2020). Esses, são complexos multiprotéicos que processam pro-citocinas em formas maduras de IL-1 $\beta$  e IL-18 e induzem a morte celular (OPIPARI; FRANCHI, 2015). Rathinam e Chan (2018) relatam, ainda, que o aumento de NLRP3, um tipo de inflamassoma, está relacionado com a complicação e a severidade de doenças inflamatórias intestinais.

O uso de ASE na mucosite intestinal resultou em restrição na produção de diversos marcadores inflamatórios, como na produção de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; na expressão proteica de TLR-4 e NF- $\kappa$ B e na expressão gênica de TLR-4, MyD88, PI3K, mTOR e NF- $\kappa$ B.

Trabalhos anteriores demonstraram que o ASE é eficiente em: abreviar a inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarros, reduzindo TNF- $\alpha$  em ratos (DE MOURA *et al.*, 2012); diminuir a inflamação no tecido adiposo branco, inibindo a elevação de IL-6 e TNF- $\alpha$  em ratos obesos (SANTOS *et al.*, 2020); reduzir o aumento da expressão de caspase-3, IL-6 e TNF- $\alpha$  em ratos diabéticos e espontaneamente hipertensos (CORDEIRO *et al.*, 2018) e diminuir TNF- $\alpha$  em ratos obesos e diabéticos, associado a administração de ASE e exercício físico (DE BEM *et al.*, 2018b). Sudo *et al.* (2015) sugerem, ainda, que a administração sistêmica de ASE é capaz de exercer seu papel anti-inflamatório através da inibição das COX 1 e COX 2. Esse papel anti-inflamatório encontra correspondência em trabalhos que utilizaram extratos ricos em polifenóis, como o conduzido por Zhuang *et al.* (2019), o qual sugere que o uso de um composto

rico em flavonoides foi capaz de reduzir IL-1 $\beta$  e outros marcadores inflamatórios em modelo de cultura de células epiteliais intestinais. David *et al.* (2019) demonstrou ainda o efeito anti-inflamatório de procianidinas com camundongos portadores de tumor de Ehrlich, reduzindo os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; Radwan e Karam (2020) relataram que o uso de resveratrol foi capaz de modular o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em ratos com inflamação intestinal e Zhao *et al.* (2019) relatam a atividade anti-inflamatória dos polifenóis do mel com menor produção de IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em ratos com colite ulcerativa.

Lauterbach *et al.* (2008) esclarecem que o TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrófica capaz de ativar células endoteliais e neutrófilos, portanto, De Moura *et al.* (2012) atribuem a redução na migração de células inflamatórias ao efeito do ASE em diminuir a expressão de TNF- $\alpha$  e consequentemente a expressão de moléculas de adesão. Estudos anteriores reforçam esses resultados, sugerindo que polifenóis e PAs são capazes de reduzir a produção de moléculas de adesão no processo inflamatório (DELL'AGLI; BUSCIALÀ; BOSISIO, 2004; GARBACKI *et al.*, 2005), contribuindo para a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Trabalhos recentes demonstraram ainda que o uso de procianidinas reduzem a inflamação através da diminuição na liberação de IL-1 $\beta$  e na ativação de NLRP3 em pâncreas diabético (YIN *et al.*, 2015), em macrófagos estimulados com LPS (MARTINEZ-MICAELO *et al.*, 2015), em modelo de inflamação pulmonar (JIANG; YANG; GUI, 2018) e em cultura de células epiteliais do intestino (ZHUANG *et al.*, 2019). Chang *et al.* (2020b) demonstraram também que o uso de um composto flavonoide reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e a ativação de NLRP3 em lesão ileal induzida por LPS em galinhas, reduzindo assim a inflamação e o dano mucoso

Os polifenóis, ou compostos fenólicos são capazes de modular a via de sinalização inflamatória por meio de um mecanismo baseado em atividades antioxidativas e de eliminação de radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo e inibindo a transdução de sinal para a produção de mediadores pró-inflamatórios. Eles podem regular as atividades celulares das células relacionadas à inflamação, como os mastócitos, os macrófagos, os linfócitos e os neutrófilos (KIM *et al.*, 2004; SINGH, *et al.*, 2020).

O tratamento com o 5-FU também é associado com alterações na composição da microbiota intestinal, levando-a ao desequilíbrio, com aumento na liberação de LPS (STRINGER *et al.*, 2013) que é reconhecido por TLR-4, presentes nas células intestinais e em monócitos, macrófagos e células dentríticas (DOYLE; O'NEILL, 2006; FRANK *et al.*, 2015;

FANG *et al.*, 2017). O TLR-4 se liga a uma proteína adaptadora, o MyD88; em seguida o receptor TRAF-6 é requerido para a associação ao TAK-1, TAB-1 e TAB-2. Posteriormente, o TAK-1, ativado, fosforila o complexo I $\kappa$ B quinase (IKKs), que induz a liberação de NF- $\kappa$ B para o núcleo (MILLER, ERNST, BADER, 2005; DOYLE; O'NEILL, 2006; O'NEILL; BOWIE, 2007; KOGUT *et al.*, 2012; JUSTINO *et al.*, 2019). Alguns autores apontam que o TRAF6, TAK-1, TAB-1 e 2 fosforilam PI3K (HYAM *et al.* 2013), que, por sua vez, ativa Akt (AHMAD *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2017). O Akt pode, em seguida, fosforilar IKK- $\alpha$  e assim ativar NF- $\kappa$ B (DAN *et al.*, 2008; BAI; UENO; VOGT, 2009; AHMAD *et al.*, 2013), ou ativar o mTOR, que também participa na sinalização a jusante do TLR-4 (FANG *et al.*, 2017). Mecanicamente, mTOR regula as respostas inflamatórias intestinais por meio de TLR-4 a montante, através da sinalização MyD88-MAPK e a via NF- $\kappa$ B a jusante (ZHOU *et al.*, 2018).

O papel do ASE em reduzir TLR-4, MyD88, PI3K, Akt e NF- $\kappa$ B, não foi descrito na literatura até o presente momento. No entanto, outros trabalhos utilizando compostos fenólicos demonstram a redução desses mediadores inflamatórios. Os polifenóis do açaí foram implicados na redução da expressão dos mediadores inflamatórios: TLR-4, TRAF-6, COX-2, NF- $\kappa$ B e ICAM-1 em cultura de células de miofibroblastos (CCD-18Co) (DIAS *et al.*, 2015). Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram a ação de quatro subclasses de flavonóides com estruturas semelhantes, incluindo duas antocianinas (delfinidina e cianidina), dois flavonóis (miricetina e quercetina), duas flavonas (luteolina e apigenina) e duas isoflavonas (genisteína e daidzeína) quanto aos seus efeitos capaz de inibir a ativação de NF- $\kappa$ B e a expressão de VCAM1 e ICAM-1 induzido por LDL oxidada (YI *et al.*, 2012).

Pérez-Cano *et al.* (2014) descrevem três mecanismos envolvidos na ação modulatória dos flavonóides nas vias de sinalização mediadas por TLR. O primeiro deles é a modulação da composição da microbiota intestinal, privilegiando cepas de bactérias benéficas em detrimento de cepas patogênicas. Essa ação é realizada pelos flavonóides naturais e por seus metabólitos. O segundo é a ativação de TLR, que requer processos adicionais que podem ser direcionados por flavonóides. Esses processos incluem o acúmulo de balsas lipídicas, que atuam como plataformas para moléculas à jusante e parecem ser um fator chave na ativação de células imunes, dimerização/oligomerização de TLR, sua glicosilação e a participação de proteínas adaptadoras. Os flavonóides atuam interagindo com essas balsas lipídicas, suprimindo a dimerização induzida por LPS de TLR-4. Por último, os flavonóides podem regular diferentes proteínas quinases que atuam em várias cascatas de sinalização intracelular, entre elas, a MAPK e o NF- $\kappa$ B (através da regulação de I $\kappa$ Bs). Confirmando essas proposições, Rossin *et al.* (2019)



demonstraram que os polifenóis do cacau foram eficazes em reduzir a expressão e a ativação de TLR-4, propondo que o mecanismo relacionado à essa ação é a interação desses polifenóis com balsas de lipídios, onde proteínas de membrana específicas necessárias para a ativação do receptor – incluindo TLRs e NADPH oxidase – estão localizadas. Radwan e Karam (2020) relataram ainda que o uso de resveratrol, foi capaz de modular a ativação de NF- $\kappa$ B. Esses autores sugerem que o mecanismo por trás desse efeito é a regulação na produção de ROS durante o processo inflamatório no intestino. Zhao *et al.* (2019) atribuem a atividade anti-inflamatória dos polifenóis do mel à sua capacidade de inibir NF- $\kappa$ B pela super regulação de I $\kappa$ B- $\alpha$  (um inibidor de NF- $\kappa$ B) e consequente menor produção de citocinas pró-inflamatórias. Em adição, Kamalian *et al.* (2020) esclarecem que os flavonoides regulam a inflamação por duas vias principais: as vias de sinalização NF- $\kappa$ B e JAK/STAT. Essas vias são ativadas, durante o processo inflamatório, em macrófagos presentes nos tecidos lesionados, após a sensibilização dos receptores TLR-4 e INF- $\gamma$ .

Outros achados incluem o trabalho de Jiang *et al.* (2019), que relatou o uso de procianidinas em camundongos com colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), reduzindo a inflamação por inibir a via de sinalização PI3K/Akt e de KIM *et al.* (2017a), no qual polifenóis da manga (*Mangifera Indica L.*) reduziram a resposta inflamatória associada à colite *in vitro* e *in vivo*, por meio da modulação da via mTOR e dos mecanismos pós-traducionais associados. Essa pesquisa indicou a diminuição do mRNA de PI3K, que reduz a ativação de Akt e consequentemente mTOR, resultando em menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a iNOS no nível de mRNA e proteína. Outro estudo com polifenóis, como elagitaninos e antocianinas em romã (*Punica granatum L.*), também relatou a inibição da fosforilação da expressão de PI3K, Akt e mTOR, relacionando tal fato ao efeito anti-inflamatório na inflamação colorretal (BANERJEE *et al.*, 2013).

Farkas *et al.* (2006) sugerem que a presença de mTOR está relacionado com a aderência e o extravasamento de leucócitos durante a indução da colite crônica; Zhou *et al.* (2018) complementam essa informação, demonstrando que o silenciamento do mTOR atenuou notavelmente a inflamação induzida por LPS e a lesão oxidativa. Assim, fica sugerido que o efeito antioxidante dos polifenóis resulta em menor produção de ROS nos tecidos lesados e consequente menor infiltração de leucócitos, com menor produção de citocinas e de mediadores inflamatórios (KIM *et al.*, 2004; MIYAZONO *et al.*, 2004; SINGH, *et al.*, 2020; KAMALIAN *et al.*, 2020).

Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstram que a inibição, ou a perda genética de PI3K causa redução no recrutamento e ativação de linfócitos, neutrófilos,

macrófagos e eosinófilos (TANG *et al.*, 2016). Xie *et al.* (2014) provaram que a inibição farmacológica do PI3K suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos e macrófagos, além de modular a motilidade de macrófagos e a neovascularização. Por essa razão, alguns autores relacionam a modulação da via PI3K/Akt/mTOR à secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sugerindo que esta sinalização está envolvida na secreção de citocinas inflamatórias (GHIGO *et al.*, 2010; RADWAN; KARAM; 2020).

A inflamação intestinal está associada à anormalidades no controle da motilidade gastrointestinal, não apenas no local da inflamação, mas também em locais distantes não inflamados (AKIHO *et al.*, 2005). Macrófagos residentes do intestino parecem ter relação com esse fato; eles produzem prostaglandinas e NO em condições inflamatórias, o que tem sido associado à dismotilidade gastrointestinal (TAJIMA *et al.*, 2012). Soares *et al.* (2008) acrescentam, ainda, que a alteração da motilidade gastrintestinal ocorre não somente na fase inflamatória, mas também na fase pós-inflamatória. Essas alterações possuem repercussão em todo o TGI, pois, mesmo frente a ausência de sinais histopatológicos inflamatórios, a função motora apresenta-se alterada (MENDES, 2019; AKIHO *et al.*, 2005). Essa inflamação induz alterações agudas e duradouras na contratilidade do músculo liso, envolvendo vários mediadores inflamatórios, que contribuem para a dismotilidade intestinal, levando à hipercontratilidade de músculos profundos do estômago e duodeno (SOARES *et al.*, 2008; SONNIER *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; JUSTINO *et al.*, 2015).

Adicionalmente, Costa *et al.* (2019) demonstram que a mucosite induzida por 5-FU ocasiona uma lesão inflamatória na mucosa intestinal, induzindo uma gliose reativa e redução de neurônios entéricos, confirmando a sugestão de Mendes (2019) de que essa inflamação repercute no remodelamento do sistema nervoso entérico, levando a uma hiperexcitabilidade neuronal de IPANs (neurônios aferentes primários intrínsecos), neurônios motores, interneurônios e alterações na produção e na liberação de neurotransmissores, resultando em hipercontratilidade do músculo liso intestinal de forma persistente, mesmo após a resolução da inflamação.

Esta pesquisa demonstrou que o ASE reduziu o retardo no esvaziamento gástrico e na retenção fracional do intestino nas porções proximal e distal. Esses resultados estão de acordo com trabalhos que utilizaram alguns compostos fenólicos e extratos contendo polifenóis, demonstrando melhora da motilidade gastrointestinal; é o caso do Fructus aurantii, um flavonóide derivado de *Citrus aurantium*, pesquisado em ratos portadores de dispepsia funcional. Ele foi responsável por aumentar a motilidade gastrointestinal e melhorar os níveis de hormônios associados à motilidade gastrointestinal (ZHU *et al.*, 2020).

Outro estudo conduzido com suco de uva integral, fonte de fitoquímicos, como polifenóis, resveratrol e proantocianidinas, relatou alguns efeitos benéficos na prevenção da dispepsia mediada pelo quimioterápico cisplatina (KO *et al.*, 2016). Esses autores discutem que a presença de flavonoides no suco de uva seria o responsável pelo aumento na expressão do mRNA da grelina no estômago, acelerando o esvaziamento gástrico. A grelina é um peptídeo que libera o hormônio do crescimento, expresso predominantemente no estômago, e que, dentre outras funções, participa da estimulação da motilidade gástrica (DATE *et al.*, 2000). Sua presença está associada ao maior esvaziamento gástrico em ratos após uso de cisplatina (KO *et al.*, 2016). Corroborando os efeitos dos flavonoides sobre a maior expressão de grelina, Takeda *et al.* (2008) relatam que o uso de Rikkunshito, um medicamento fitoterápico rico em flavonoides, melhorou a liberação de grelina em ratos tratados com cisplatina.

A motilidade do TGI é controlada por vários tipos celulares, entre eles, as células intersticiais de Cajal, que são caracterizadas pela capacidade de despolarização cíclica e espontânea e criação de ondas lentas no intestino, atuando como marca-passo no trato alimentar (PASTERNAK *et al.*, 2016; HWANG; KIM; KIM, 2020). Portanto, uma substância capaz de modular o funcionamento dessas células poderia regular a motilidade gastrointestinal. Essa proposição foi comprovada pelos estudos de Hwang, Kim e Kim (2020), no qual a hesperidina, um flavonóide cítrico, foi capaz de despolarizar o potencial do marca-passo das células intersticiais de Cajal no intestino de camundongos, acelerando o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal. Outro estudo conduzido em ratos com isquemia/reperfusão intestinal, demonstrou que o uso de PAs via oral melhorou os danos induzidos às células intersticiais de Cajal, restabelecendo a amplitude da contratilidade e a frequência de onda lenta do músculo liso, o que resultou em alívio no distúrbio da motilidade intestinal e diminuição da lesão intestinal (LUO *et al.*, 2016).

Outro mecanismo proposto para a regulação da motilidade do TGI é a ligação de polifenóis aos receptores de sabor do tipo 2 (T2Rs). Esses receptores encontram-se em diversos órgãos, mas principalmente ao longo do TGI. Entretanto, o intestino delgado é a região onde o T2R parece ser crucial para uma ampla gama de processos metabólicos. Observou-se que a ação de compostos bioativos no intestino inicia uma cascata de feedback que influencia o esvaziamento gástrico, a saciedade e a resposta glicêmica. Os mecanismos subjacentes a esse processo são complexos, mas recentemente foi demonstrado que a liberação de hormônio mediada por T2R é um dos meios pelos quais o intestino detecta o conteúdo intraluminal. Além disso, foi demonstrado que a estimulação de T2Rs em células enteroendócrinas induz a liberação de hormônios gastrointestinais envolvidos na modulação do metabolismo energético,

como a grelina, a colecistocinina e o GLP-1 (WU *et al.*, 2002; XIE *et al.*, 2018; TARRAGON; MORENO, 2020).

Todas as alterações inflamatórias induzidas pelo 5-FU ocasionam, ainda, o aumento da permeabilidade intestinal e redução de RET, com diminuição na produção de TJs e translocação bacteriana (PRISCIANDARO *et al.*, 2012; FORSGÅRD *et al.*, 2016; DE BARROS *et al.*, 2018; KUO *et al.*, 2019). A regulação da permeabilidade conferida pela estabilidade e pela estrutura de TJs podem ser reguladas por uma série de fatores, incluindo citocinas, fatores de crescimento, estresse celular, presença de patógenos, probióticos e peptídeos dietéticos (ODENWALD; TURNER, 2013; GALIPEAU; VERDU, 2016).

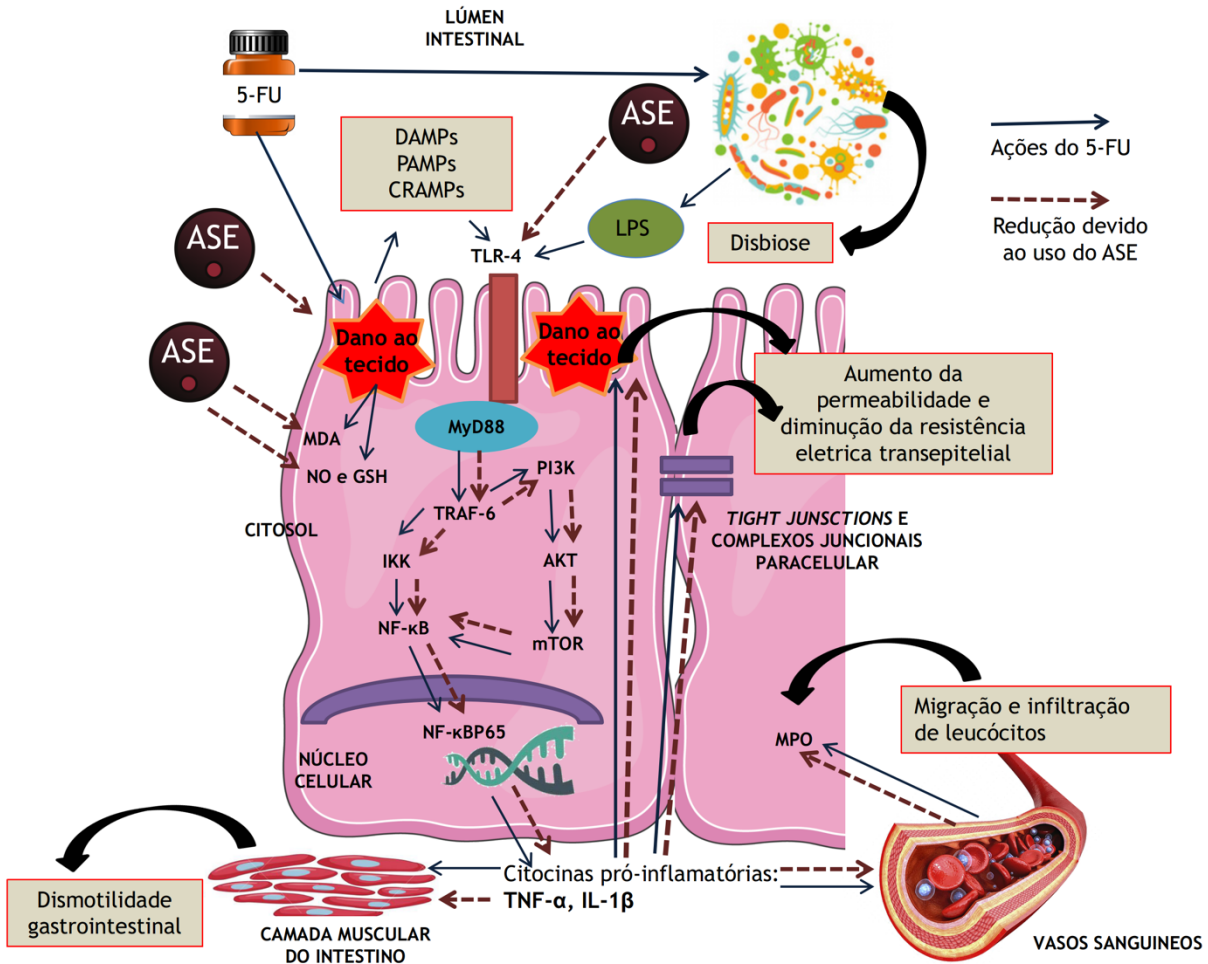
A ruptura das TJs epiteliais dá origem aos distúrbios da barreira paracelular e aumento da permeabilidade de mucosa, estando associadas às doenças inflamatórias intestinais (KUO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020b).

A literatura não possui dados sobre o efeito do ASE na permeabilidade intestinal induzida por 5-FU. Nesse sentido, a presente pesquisa é pioneira em demonstrar que o extrato do caroço do açaí foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal e a RET. Tais achados encontram paralelo na literatura ao avaliarmos os efeitos benéficos de diversos polifenóis sobre a permeabilidade intestinal.

Wu *et al.* (2020a), utilizando um modelo de inflamação intestinal em camundongos e uma dieta com milho enriquecido com flavan-4-ols, um tipo de flavonoide, revelaram melhora da inflamação do cólon ao restaurar a função de barreira intestinal. Sharma *et al.* (2020) demonstraram que o uso de flavonoides em cultura de células intestinais (Caco-2) reduziu a inflamação com melhora na expressão de ZO-1, ocludina e claudina, revertendo a diminuição da resistência elétrica transepitelial e o aumento da permeabilidade da membrana. Efeito semelhante foi observado ao utilizar o GSE, em células Caco 2, restaurando a integridade da barreira epitelial (NALLATHAMBI *et al.*, 2020). Os autores desse estudo propõem que o mecanismo para tal ação é o poder antioxidante dos polifenóis, que eliminam ROS intestinais, reduzindo assim o estresse oxidativo e diminuindo a inflamação intestinal. O uso de GSE reduziu a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , as quais estão relacionadas com o aumento na permeabilidade da parede intestinal, pela diminuição na expressão de TJs (NUNES *et al.*, 2019), e aumentou a expressão do fator transformador de crescimento beta (TGF-1), uma citocina multifuncional que pode normalizar a barreira epitelial ao regular positivamente a expressão de TJs (HOWE *et al.*, 2005). Em concordância com esse estudo, Sheng *et al.* (2020) evidenciaram que o uso do extrato de PAs de semente de uva, em modelo de inflamação intestinal em camundongos, foi capaz de aumentar o mRNA de ZO-1, claudina e ocludina, restabelecendo,

também, a barreira intestinal.

Figura 34 – Hipótese das vias que são moduladas pelo ASE



Com base na literatura consultada e nos dados que obtivemos, sugerimos o seguinte modelo hipotético: o 5-FU causa danos diretos ao epitélio intestinal, levando a alterações histopatológicas com necrose, vacuolização e infiltração de células inflamatórias, resultando na produção de DAMPs, PAMPs e CRAMPs; aumento na produção de ROS e estresse oxidativo, que causariam mais danos ao epitélio. Causa, ainda, a destruição da microbiota, levando à disbiose com aumento na liberação de LPS no lúmen intestinal. Em seguida, ocorre a ativação do receptor TLR-4 que, através do mediador MyD88, ativa TRAF-6. Os passos seguintes seriam a ativação de IKK que irá fosforilar NF-κB, ao mesmo tempo que ativa PI3K, que fosforila Akt e, por fim, ativa mTOR, que contribui para a fosforilação de NF-κB. Esse fator desloca para o núcleo, onde irá ativar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Essas citocinas atuam sobre as TJs e sobre o próprio epitélio intestinal, aumentando a

permeabilidade paracelular e diminuindo a resistência elétrica transepitelial; atuam sobre a musculatura lisa do intestino, resultando em alterações na motilidade gastrointestinal e sobre os vasos, aumentando a permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias para o intestino. Nossa hipótese propõe que os compostos fenólicos presentes no ASE são capazes de reduzir os danos causados diretamente ao epitélio intestinal; de atuar sobre a ativação de TLR-4 e de serem oxidados frente a processos de estresse oxidativo, preservando sistemas antioxidantes celulares e a peroxidação lipídica da membrana. Desse feito, o ASE atuaria como anti-inflamatório por, possivelmente, inibir a ativação da via TLR-4/MyD88/PI3K/Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B, abreviando a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a migração de neutrófilos (MPO), restaurando a função da barreira intestinal e reduzindo a dismotilidade gastrointestinal.

## 8 CONCLUSÃO

- ✓ A dose de 100 mg/Kg de ASE foi a mais efetiva em melhorar os parâmetros de estresse oxidativo em todos os segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal por 5-FU.
- ✓ O ASE atenua as alterações de perda de peso, infiltração de neutrófilos e alterações histopatológicas causadas no modelo de lesão intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ O ASE possui atividade anti-inflamatória no modelo de lesão intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ O ASE altera a via de sinalização celular, diminuindo a expressão gênica de TLR-4/MyD88/PI3K/mTOR/NF- $\kappa$ B em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.
- ✓ O ASE restringe as elevações das expressões proteicas de TLR-4 e NF- $\kappa$ B em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.
- ✓ O ASE reduz a alteração da permeabilidade intestinal em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.
- ✓ O ASE diminui a alteração da motilidade gastrointestinal, em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, Aamir; BIERSACK, Bernhard; LI, Yiwei; et al. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem.** v. 13, n. 7, p. 1002-13, 2013.
- AKIHO, Hirotada; DENG, Yikang; BLENNERHASSETT, Patricia; et al. Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. **Gastroenterology.** v.129, n. 1, p.131-141, 2005.
- AL-ASMARI, A.K.; AL-ZAHRANI, A.M.; KHAN, A.Q.; et al. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. **Hum Exp Toxicol.** v. 35, n. 1, p. 10-20, 2016a.
- AL-ASMARI, Abdulrahman Khazim; KHAN, Abdul Quaiyoom; AL-ASMARI, Sarah A; et al. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. **J Complement Integr Med.** v.13, n. 1, p. :377-385, 2016b.
- ALESSANDRA-PERINI, Jéssica; RODRIGUES-BAPTISTA, Karina Cristina, MACHADO, Daniel Escorsim; et al. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (açai): A systematic review. **PLoS One.** v. 13, n. 7, p. e0200101, 2018.
- ALMEIDA, Vera Lúcia de; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barrett; et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova.** v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANTUNES, Maísa Mota; LEOCÁDIO, Paola Caroline; TEIXEIRA, Lílian Gonçalves; et al. Pretreatment With L-Citrulline Positively Affects the Mucosal Architecture and Permeability of the Small Intestine in a Murine Mucositis Model. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.** v. 40, n. 2, p. 279-286, 2016.
- ARATANI, Yasuaki. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Arch Biochem Biophys.** v. 640, p. 47-52, 2018.
- ARAÚJO, C.V.; LAZZAROTTO, C.R.; AQUINO, C.C.; et al. Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 48, n. 6, p. 493-501, 2015.
- ATHMAN, Rafika; LOUVARD, Daniel; ROBINE, Sylvie. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells?. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 283, n. 3, p. G496-G502, 2002.
- ATIQ, Ayesha; SHAL, Bushra; NAVEED, Muhammad; et al. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. **Eur J Pharmacol.** v. 843, p.292-306, 2019.
- AZAB, Abdullatif ; NASSAR, Ahmad ; AZAB, Abed . Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules.** v. 21, p. 1310-1321, 2016.
- AZEVEDO, Liviane D. de; BASTOS, Mônica M.; OLIVEIRA, Andressa Paula de; et al. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase bcr-abl, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. **Química Nova.** v. 40, n. 7, p. 791-809, 2017.
- BAI, Dong; UENO, Lynn; VOGT, Peter K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the



essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **Int J Cancer**. v. 125, n. 12, p. 2863-70, 2009.

BAI, M.; JIANG, Z.; LIU, Y. [Glutamine dipeptide attenuate mucosal atrophic changes and preservation of gut barrier function following 5-FU intervention]. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**. v. 34, n. 6, p. 370-3, 1996.

BALMANT, Bianca D.; ARAÚJO, Eloisa O.N.; YABUKI, Denise; et al. Effects of L-Arginine Supplementation on Leukogram, Inflammatory Bowel Infiltrates and Immunoglobulins with 5-FU Use in Rats. **Nutr Cancer**. v. 70, n. 2, p. 249-256, 2018.

BANERJEE, Nivedita; KIM, Hyemee; TALCOTT, Stephen; et al. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. **Carcinogenesis**. v. 34, n. 12, p. 2814-2822, 2013.

BARRERA, Giuseppina. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **ISRN Oncol**. v. 2012, p. 137289, 2012.

BASILE, Debora; DI NARDO, Paola; CORVAJA, Carla, et al. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. **Cancers**. v. 11, n. 6, p. 857, 2019.

BATISTA, Viviane Lima; DA SILVA, Tales Fernando; DE JESUS, Luís Cláudio Lima; et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. **Front Microbiol**. v. 11, p. 544490, 2020.

BHATTACHARYYA, Asima; CHATTOPADHYAY, Ranajoy; MITRA, Sankar; et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**. v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.

BOEING, Thaise; DE SOUZA, Priscila; SPECA, Silvia; et al. Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties. **Br J Pharmacol**. v. 177, n. 10, p. 2393-2408, 2020.

BOWEN, Joanne M.; GIBSON, Rachel J.; CUMMINS, Adrian G., et al. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer**. v.14, p.713- 31, 2006.

BOWEN, Joanne M.; KEEFE, Dorothy M. K. New pathways for alimentary mucositis. **J Oncol**. v. 2008, n. 2008, p. 907892, 2008.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618-22, 1982.

CAMPOS, Maria Ines da Cruz; CAMPOS, Celso Neiva; AARESTRUP, Fernando Monteiro; et al. Oral mucositis in cancer treatment: Natural history, prevention and treatment. **Mol Clin Oncol**. n. 2, v. 3, p. 337–340, 2014.

CARDOZO, Ludmila F. M. F.; PEDRUZZI, Liliana M.; STENVINKEL, Peter. et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**. v. 95, n. 8, p. 1525–1533, 2013.

CARNEIRO-FILHO, Benedito A.; ORIÁ, Reinaldo B.; WOOD REA, Katie; et al. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**. v. 20, n. 10, p. 934-41, 2004.

CHAMI, Belal; MARTIN, Nathan J.J.; DENNIS, Joanne M.; et al. Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. **Arch Biochem Biophys**. v. 645, p. 61-71, 2018.

- CHANG, Ching-Wei; LEE, Hung-Chang; LI, Li-Hui; et al. Fecal Microbiota Transplantation Prevents Intestinal Injury, Upregulation of Toll-Like Receptors, and 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Toxicity in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci.** v. 21, n. 2, p. 386, 2020a.
- CHANG, Yicong; YUAN, Liang; LIU, Jiarui; et al. Dihydromyricetin attenuates Escherichia coli lipopolysaccharide-induced ileum injury in chickens by inhibiting NLRP3 inflammasome and TLR4/NF- $\kappa$ B signalling pathway. **Vet Res.** v. 51, n. 1, p. 72, 2020b.
- CHARTIER, Lauren C.; HOWARTH, Gordon S.; MASHTOUB, Suzanne. Chemotherapy-induced mucositis development in a murine model of colitis-associated colorectal cancer. **Scand J Gastroenterol.** v. 55, n. 1, p. 47-54, 2020.
- CHAUHAN, Dhruv; VANDE WALLE, Lieselotte; LAMKANFI, Mohamed. Therapeutic modulation of inflammasome pathways. **Immunol Rev.** v. 0, p. 1-16, 2020.
- CHEAH, Ker Y.; HOWARTH, Gordon S.; YAZBECK, Roger; et al. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. **Cancer Biol Ther.** v. 8, n. 4, p. 382-390, 2009.
- CHEN, Xiao-Xin; LAM, Kar Ho; CHEN, Qing-Xi; et al. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats. **Food Chem Toxicol.** v. 110, p. 49-61, 2017.
- CHEN, Yuling; ZHENG, Hong; ZHANG, Jingze; et al. Protective effect and potential mechanisms of Wei-Chang-An pill on high-dose 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **J. Ethnopharmacol.** v. 190, p. 200–211, 2016.
- CHOI, Won-Sik; LEE, Sung-Eun; LEE, Hoi-Seon; et al. [Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and oriental medicinal plants]. **Han'guk Nonghwa Hakhoechi.** v. 41, p. 556-559, 1998.
- CHOI, Yoon Jin; CHOI, Yoon Jeon; KIM, Nayoung; et al. AçaiBerries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Gut Liver.** v. 11, n. 2, p. 243-252, 2017.
- CHRISTOPHERSON, Karen S.; BREDT, David S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. **J Clin Invest.** v. 100, n. 10, p. 2424-2429, 1997.
- CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Semin Cell Dev Biol.** v. 23, n. 7, p. 729-737, 2012.
- CLAVIJO, Julio; GOMEZ-DE-SEGURA, Ignacio; GOMEZ-GARCÍA, Lourdes; et al. Growth hormone protects the intestines but not the tumour from 5-fluorouracil toxicity in the short term in the rat. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v.16, n. 1, p. 75-82, 2004.
- CORDEIRO, Viviane Silva Cristino; DE BEM, Grazielle Freitas; DA COSTA, Cristiane Aguiar; et al. *Euterpe oleracea* Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. **Eur J Nutr.** v. 57, n. 2, p. 817-832, 2018.
- COSTA, Deiziane V.S.; BON-FRAUCHES, Ana C.; SILVA, Angeline M.H.P.; et al. 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NF $\kappa$ B-Dependent Pathway. **SCI REP.** v. 9, p. 665, 2019.
- CUEVAS-GONZÁLEZ, P.F.; LICEAGA, A.M.; AGUILAR-TOALÁ, J.E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Res Int.** v. 136, p. 109502, 2020.

- CUSCHIERI, Joseph; MAIER Ronald V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Crit. Care Med.** v. 33, p. S417-S419, 2005.
- D'ARCHIVIO, Massimo; FILESI, Carmela; DI BENEDETTO, Roberta; et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanita.** v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.
- DA COSTA, Cristiane A.; DE OLIVEIRA, Paola Raquel; DE BEM, Grazielle F.; et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** v. 385, n. 12, p. 1199–1209, 2012.
- DA COSTA, Cristiane Aguiar; OGNIBENE, Dayane Teixeira; CORDEIRO, Viviane Silva Cristino; et al. Effect of *Euterpe oleracea Mart.* Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. **J Med Food.** v. 20, n. 10, p. 1002-1010, 2017.
- DA SILVA MONTEIRO, Carlos Eduardo; FRANCO, Álvaro Xavier, SOUSA, Johnatan Alisson O., et al. Gastroprotective effects of N-acylarylhydrazone derivatives on ethanol-induced gastric lesions in mice are dependent on the NO/cGMP/KATP pathway. **Biochem Pharmacol.** v.169, p. 113629, 2019.
- DA SILVA, Alexandre de Souza; NUNES, Douglas Val Quintas; CARVALHO, Lenize Costa dos Reis Martins de; et al. Açai (*Euterpe oleracea Mart*) seed extract protects against maternal vascular dysfunction, hypertension, and fetal growth restriction in experimental preeclampsia. **Hypertens Pregnancy.** v. 39, n. 2, p. 211-219, 2020.
- DAN, Han C.; COOPER, Matthew J.; COGSWELL, Patricia C.; et al. Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. **Genes Dev.** v. 22, n. 11, p. 1490-500, 2008.
- DATE, Y.; MURAKAMI, N.; KOJIMA, M.; et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 275, n. 2, p. 477-480, 2000.
- DAVID, Isabela Machado Barbosa; DE SOUZA FERNANDES, Flávia; DOS SANTOS SILVA FERREIRA, Juliana Barreto; et al. Dietary supplementation with procyanidin-rich *Pinus pinaster* extract is associated with attenuated Ehrlich tumor development in mice. **Nutr Res.** v. 62, p. 41-50, 2019.
- DE ÁVILA, Paulo Henrique Marcelino; DE ÁVILA, Renato Ivan; DOS SANTOS FILHO, Edvande Xavier; et al. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa L.* (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Toxicol Rep.** v. 2, p. 563-573, 2015.
- DE BARROS, Patricia Aparecida Vieira; RABELO ANDRADE, Maria Emília; DE VASCONCELOS GENEROSO, Simone; et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomed Pharmacother.** v. 103, p. 1567-1576, 2018.
- DE BEM, Grazielle Freitas; DA COSTA, Cristiane Aguiar, DE OLIVEIRA, Paola Raquel Braz; et al. Protective Effect of *Euterpe Oleracea Mart* (Açai) Extract on Programmed Changes in the Adult Rat Offspring Caused by Maternal Protein Restriction During Pregnancy. **J Pharm Pharmacol.** v. 66, n. 9, p. 1328-38, 2014.
- DE BEM, Grazielle Freitas; DA COSTA, Cristiane Aguiar; CORDEIRO, Viviane da Silva Cristino; et al. *Euterpe oleracea Mart.* (açai) seed extract associated with exercise training reduces hepatic steatosis in type 2 diabetic male rats. **J Nutr Biochem.** v. 52, p. 70-81, 2018b.
- DE BEM, Grazielle Freitas; DA COSTA, Cristiane Aguiar; SANTOS, Izabelle Barcellos; et al.

- Antidiabetic effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract and exercise training on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats: A positive interaction. **PLoS One**. v. 13, n. 6, p. e0199207, 2018a.
- DE BEM, Grazielle Freitas; OKINGA, Anicet; OGNIBENE, Dayane Teixeira; et al. Anxiolytic and antioxidant effects of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seed extract in the adult rat offspring submitted to periodic maternal separation [published online ahead of print, 2020 Jun 9]. **Appl Physiol Nutr Metab**. 2020.
- DE FREITAS CASTRO, Thalles; GOMES, Simone F.; DOS SANTOS SILVA, Fernanda C., et al. The effect of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) intake on the atherosclerosis inflammatory mediators (sCD40L e CCL5) in apparently healthy women. **Nutrition & Food Science**. v. 50, n. 1, p. 216-228, 2019.
- DE MIRANDA, João Antônio Leal; BARRETO, João Erivan Façanha; MARTINS, Dainesy Santos; et al. Protective Effect of Cashew Gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 12, n. 2, p. 51, 2019.
- DE MIRANDA, João Antônio Leal; MARTINS, Conceição da Silva; FIDELES, Lázaro de Sousa; et al. Troxerutin Prevents 5-Fluorouracil Induced Morphological Changes in the Intestinal Mucosa: Role of Cyclooxygenase-2 Pathway. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 13, n. 1, p.10, 2020.
- DE MOURA Roberto S.; PIRES, Karla M. P.; FERREIRA, Thiago S., et al. Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Chem Toxicol**. v. 49, n. 4, p. 855-863, 2011.
- DE MOURA, Roberto S de Moura; RESENDE, Ângela Castro. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açai, an Amazon Plant. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 68, n. 1, p. 19-26, 2016.
- DE MOURA, Roberto Soares; FERREIRA, Thiago Santos; LOPES, Alan Aguiar; et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**. v. 19, p. 262–269, 2012.
- DE OLIVEIRA, Paola Raquel B.; DA COSTA, Cristiane A.; DE BEM, Grazielle F., et al. *Euterpe oleracea* Mart. derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. **PLoS One**.v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.
- DE OLIVEIRA, Paola Raquel Braz; DA COSTA, Cristiane Aguiar; DE BEM, Grazielle Freitas; et al. Effects of an Extract Obtained From Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the Components of Metabolic Syndrome Induced in C57BL/6J Mice Fed a High-fat Diet. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.
- DEL POZO-INSFRAN, David; BRENES, Carmen H.; TALCOTT, Stephen T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem**. v. 52, n. 6. P. 1539-1545, 2004.
- DELL'AGLI, Mario; BUSCIALÀ, Alessandra; BOSISIO, Enrica. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovasc Res**. v. 63, n. 4, p. 593-602, 2004.
- DENG, G.; JIANG, Z.; LIU, Y.; et al. [Dietary fiber protects intestinal structure and barrier function]. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**. v. 36, n. 12, p. 759-62, 1998.
- DÉPREZ, S.; BREZILLON, C.; RABOT, S.; et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. **J Nutr**. v. 130, n. 11, p. 2733-2738, 2000.

- DIAS, Manoela Maciel; MARTINO, Hércia Stampini; NORATTO, Giuliana; et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. **Food Funct.** v. 6, n. 10, p. 3249-3256, 2015.
- DIASIO, Robert B.; HARRIS, Barry E. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. **Clin Pharmacokinet.** v.16, n. 4, p. 215-237, 1989.
- DIAZ DE BARBOZA, Gabriela; GUIZZARDI, Solange; MOINE, Luciana; et al. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. **World J Gastroenterol.** v. 23, n. 16, p. 2841-2853, 2017.
- DOYLE, Sarah L.; O'NEILL, Luke A.J. Toll-like receptors: From the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem Pharmacol.** v. 72, n. 9, p. 1102–1113, 2006.
- DU, Bing; JIANG, Qiu-Li; CLEVELAND, Joseph; et al. Targeting Toll-like receptors against cancer. **J Cancer Metastasis Treat.** v. 2, p. 463-470, 2016.
- EDENS, Heather A.; LEVI, Boaz P.; JAYE, David L.; et al. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. **J Immunol.** v. 169, n. 1, p. 476-486, 2002.
- EMAMI, Hamid; NIKOOBIN, Farzaneh; ROAYAEI, Mahnaz; et al. Double-blinded, randomized, placebo-controlled study to evaluate the effectiveness of green tea in preventing acute gastrointestinal complications due to radiotherapy. **J. Res. Med. Sci.** v. 19, p. 445–450, 2014.
- FANG, Weishan; BI Decheng; ZHENG Ruijin; et al. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, p. 1663, 2017.
- FARKAS, Stefan; HORNING, Matthias; SATTLER, Christine Sattler; et al. Rapamycin decreases leukocyte migration in vivo and effectively reduces experimentally induced chronic colitis. **Int J Colorectal Dis.** v. 21, n. 8, p. 747-753, 2006.
- FARRÉ, Ricard; VAN MALENSTEIN, Hannah; DE VOS, R., et al. Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. **Gut.** v. 57, p. 1366–1374, 2008.
- FENG, Xinchu; LI, Yang; BROBBEY OPPONG, Mahmood; et al. Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. **Drug Metab Rev.** v. 50, n. 3, p. 343-356, 2018.
- FERREIRA, Talita Mayra; LEONEL, Alda Jusceline; MELO, Marco Antônio; et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. **Lipids.** v. 47, n. 7, p. 669-678, 2012.
- FERREIRO, J.; GARCÍA, J.L.; BARCELÓ, R., et al. Quimioterapia: efectos secundarios Adverse effects of treatment chemotherapy. **Gac Med Bilbao.** v. 100, p. 69-74, 2003.
- FIDELES, Lázaro de Sousa; DE MIRANDA, João Antônio Leal; MARTINS, Conceição da Silva; et al. Role of Rutin in 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: Prevention of Histological Damage and Reduction of Inflammation and Oxidative Stress. **Molecules.** v. 25, n. 12, p. 2786, 2020.
- FOLMER, Florence; BASAVARAJU, Umesh; JASPARS, Marcel et al. Anticancer effects of bioactive berry compounds. **Phytochem Rev.** v. 13, p. 295–322, 2014.

- FORD, Peter C.; MIRANDA, Katrina M. The Solution Chemistry of Nitric Oxide and Other Reactive Nitrogen Species. **Nitric Oxide**. v. 1, n. 103, p. 31-46, 2020.
- FORSGÅRD, Richar A.; KORPELA, Riitta; HOLMA, Reetta; et al. Intestinal permeability to iohexol as an in vivo marker of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in Sprague-Dawley rats. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 78, n. 4, p. 863-874, 2016.
- FRAGOSO, Mariana F.; PRADO, Monize G.; BARBOSA, Luciano; et al. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae Martius*) intake. **Plant Foods Hum Nutr**. v. 67, n. 3, p. 235-241, 2012.
- FRAGOSO, Mariana F.; ROMUALDO, Guilherme R.; RIBEIRO, Daniel A.; et al. Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**. v. 58, p. 68-76, 2013.
- FRANK, Magdalena; HENNENBERG, Eva Maria; EYKING, Annette; et al. TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine. **J Immunol**. v. 194, n. 4, p. 1983–1995, 2015.
- FREITAS, Danieli Melo de. **Extração de polissacarídeos do caroço de açai (*Euterpe oleracea*)**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- FREITAS, Dayanne da S; MORGADO-DÍAZ, José A.; GEHREN, Adriana S.; et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea Mart.* seed in the MCF-7 cell line. **J Pharm Pharmacol**. v. 69, n. 6, p. 714-721, 2017.
- FUKATSU, Kazuhiko; NAGAYOSHI, Nagayoshi; MAESHIMA, Yoshinori; et al. Fish oil infusion reverses 5-fluorouracil-induced impairments in mucosal immunity in mice. **Clin Nutr**. v. 27, n. 2, p. 269-275, 2008.
- FUKUDOME, Ian; KOBAYASHI, Michiya; DABANAKA, Ken; et al. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. **Med Mol Morphol**. v. 47, n. 2, p. 100-107, 2014.
- GALIPEAU, H.J.; VERDU, E.F. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. **Neurogastroenterol Motil**. v. 28, n. 7, p. 957-965, 2016.
- GARBACKI, N.; KINET, M.; NUSGENS, B.; et al. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. **J Inflamm (Lond)**. v. 2, p.9, 2005.
- GAUTAM, Raju; SINGH, Manjari; GAUTAM, Swetlana; et al. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **BMC Complement. Altern. Med**. v. 16, p. 99, 2016.
- GENEROSO, Simone de Vasconcelos; RODRIGUES, Núbia Moraes; TRINDADE, Luísa Martins; et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids Health Dis**. v. 14, p. 54, 2015.
- GHIGO, Alessandra; DAMILANO, Frederico; BRACCINI, Laura; et al. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. **Bioessays**. v. 32, n. 3, p. 185-196, 2010.
- GIFONI, Markus Andret Cavalcante. **Mucosite e alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de câncer colorretal metastático tratados com 5-Fluorouracil**

**(5-FU) E IRINOTECANO (CPT-11)**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado Interinstitucional (Dinter) Curso de Pós-Graduação em Ciências) -Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia – ECO. Fortaleza, 2012.

GOIRAND, Françoise; LEMAITRE, Florian; LAUNAY, Manon; et al. How Can We Best Monitor 5-FU Administration to Maximize Benefit to Risk Ratio? **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. v. 14, n. 12, p. 1303-1313, 2018.

GONTHIER, Marie-Paule; DONOVAN, Jennifer L.; TEXIER, Odile, Felgines; et al. Metabolism of dietary procyanidins in rats. **Free Radic Biol Med**. v. 35, n. 8, p. 837-844, 2003.

GORDON, Phillip V.; PAXTON, Jessica B.; HERMAN, Andrew C.; et al. Igf-I accelerates ileal epithelial cell migration in culture and newborn mice and may be a mediator of steroid-induced maturation. **Pediatr Res**. v. 55, n. 1, p. 34-41, 2004.

GUO, Bao-Jian; BIAN, Zhao-Xiang; QIU, Hong-Cong, et al. Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. **Ann N Y Acad Sci**. v.1401, n. 1, p. 37–48, 2017.

HAWKINS, P.T.; STEPHENS, L.R. PI3K signalling in inflammation. **Biochim Biophys Acta**. v. 1851, n. 6, p. 882-897, 2015.

HORIE, T.; AWAZU, S.; ITAKURA, Y.; et al. Alleviation by garlic of antitumor drug-induced damage to the intestine. **J Nutr**. v. 131, n. 3s, p. 1071S-4S, 2001.

HOWE, Kathryn L.; REARDON, Colin; WANG, Aarthur; et al. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability. **Am J Pathol**. v. 167, n. 6, p. 1587-1597, 2005.

HUANG, Tien-Yu; CHU, Heng-Cheng; LIN, Yi-Ling; et al. Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 389, n. 4, p. 634-639., 2009

HUANG, Xioai Li; XU, Jin; ZHANG, Xiao Hui, et al. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Inflamm Res**. v. 60, n. 8, p. 727-734, 2011.

HUSSAIN, Tarique; TAN, Bie; YIN, Yulong; et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2016, p. 7432797, 2016.

HWANG, Minwoo; KIM, Jeong Nam; KIM, Byung Joo. Hesperidin depolarizes the pacemaker potentials through 5-HT4 receptor in murine small intestinal interstitial cells of Cajal. **Anim Cells Syst (Seoul)**. v. 24, n. 2, p. 84-90, 2020.

HYAM, Supriya R.; LEE, In-Ah; GU, Wan, et al. Arctigenin ameliorates inflammation in vitro and in vivo by inhibiting the PI3K/AKT pathway and polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages. **Eur J Pharmacol**. v. 708, n. 1-3, p. 21-29, 2013.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa 2020. Modificado em 10/12/2019. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/ceara-fortaleza>>, acessado em 23 de março de 2020.

JIANG, Congqiao; ZHU, Pingsheng; SHI, Yi; et al. [Protective effect of procyanidin B2 on intestinal barrier and against enteritis in a mouse model of trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis]. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. v. 39, n. 7, p. 778-783, 2019.

JIANG, Yinling; YANG, Wanchun; GUI, Shuyu. Procyanidin B2 protects rats from paraquat-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **Immunobiology**. v.

223, n. 10, p. 555-561, 2018.

JUSTINO, Priscila F.; MELO, Luis F.; NOGUEIRA, André F.; et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Nutr.** v. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.

JUSTINO, Priscilla F.; MELO, Luiz F.; NOGUEIRA, André F.; et al. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.75, n. 3, p. 559-567, 2015.

JUSTINO, Priscilla Fernanda Campos; FRANCO, Alvaro Xavier; PONTIER-BRESB, Rodolphe; et al. Modulation of 5 fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. **Cytokine.** v. 125, p.154791, 2019.

JUSTINO, Priscilla Fernanda Campos. ***Saccharomyces boulardii* interfere nas vias de sinalização celular nf-kb, mapk e tlr/myd88 alteradas pelo 5-fluorouracil.** 2016. 182f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

JUSTINO, Priscilla Fernanda Campos. ***Saccharomyces boulardii* reverte a resposta inflamatória e funcional presente na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

KAMALIAN, Aida; SOHRABI ASL, Masoud; DOLATSHAHI, Mahsa; et al. Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways. **World J Gastroenterol.** v. 26, n. 24, p. 3365-3400, 2020.

KATIYAR, Santosh. K.; PAL, Harish. C.; PRASAD, Ram. Dietary proanthocyanidins prevent ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer through enhanced repair of damaged DNA-dependent activation of immune sensitivity. **Semin. Cancer Biol.** v. 46, p. 138–145, 2017.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res Ther.** v. 7, n. 1, p. 12-9, 2004.

KAWAI, Taro.; ADACHI, Osamu; OGAWA, Tomohiko; et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity.** v. 11, n. 1, p. 115-22, 1999.

KHAN, S.; WARDILL, Hannah R.; BOWEN, J.M. Role of toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated interleukin-6 (IL-6) production in chemotherapy-induced mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 82, n. 1, p. 31-37, 2018.

KIM, Hyemee; BANERJEE, Nivedita; BARNES, Ryan C.; et al. Mango polyphenolics reduce inflammation in intestinal colitis-involvement of the miR-126/PI3K/AKT/mTOR axis in vitro and in vivo. **Mol Carcinog.** v. 56, n. 1, p. 197-207, 2017a.

KIM, Hyun Jin; KIM, Jin Hyun; MOON, Won; et al. Rebamipide attenuates 5-Fluorouracil-induced small intestinal mucositis in a mouse model. **Biol Pharm Bull.** v. 38, n. 2, p. 179-183, 2015.

KIM, Hyun Pyo; SON, Kun Ho; CHANG, Hyeun Wook; et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci.** v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KIM, Joong Sun; HAN, Na-kyung; KIM, Sung-Ho; et al. Silibinin attenuates radiation-



- induced intestinal fibrosis and reverses epithelial-to-mesenchymal transition. **Oncotarget**. v.8, n. 41, p. 69386-69397, 2017b.
- KIM, Yeon-A; CHUNG, Hyun. C.; CHOI, Hye. J.; et al. Intermediate dose 5-fluorouracil-induced encephalopathy. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 36, n. 1, p. 55–59, 2006.
- KO, J-L; TSAI, C-H; Liu, T-C; et al. Differential effects of grape juice on gastric emptying and renal function from cisplatin-induced acute adverse toxicity. **Hum Exp Toxicol**. v. 35, n. 8, p. 808-817, 2016.
- KO, Kwang-Pil. Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 15, n. 17, p. 7001-7010, 2014.
- KOENIG, H.; PATEL, A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. **Archive of neurology**. v. 23, p. 155-160, 1970.
- KOGUT, Michael H.; CHIANG, Hsin-I; SWAGGERTY, Christina L.; et al. Gene expression analysis of Toll-like receptor pathways in heterophils from genetic chicken lines that differ in their susceptibility to Salmonella enteritidis. **Front Genet**. v. 3, p. 121, 2012.
- KONMUN, J.; DANWILAI, K.; NGAMPHAIBOON, N.; et al. A phase II randomized double-blind placebo-controlled study of 6-gingerol as an anti-emetic in solid tumor patients receiving moderately to highly emetogenic chemotherapy. **Med Oncol**. v. 34, n. 4, p. 69, 2017.
- KOZŁOWSKA, Aleksandra; SZOSTAK-WEGIEREK, Dorota. Flavonoids--food sources and health benefits. **Rocz Panstw Zakl Hig**. v. 65, n. 2, p. 79-85, 2014.
- KUO, Wei-Ting; SHEN, Le; ZUO, Li; et al. Inflammation-induced Occludin Downregulation Limits Epithelial Apoptosis by Suppressing Caspase-3 Expression. **Gastroenterology**. v. 157, n. 5, p.1323-1337, 2019.
- KURUTAS, Ergul Belge. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**. v. 15, n. 1, p. 71, 2016.
- LAUTERBACH, Michael; O'DONNELL, Peter; ASANO, Kenichi; et al. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. **J Leukoc Biol**. v. 83, n. 6, p. 1423-1430, 2008.
- LEE, Yunjong.; LEE, Chang-Hun.; OH, Uhtaek. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**. v. 20, n. 3, p. 315-24, 2005.
- LEITÃO, R.F.C., RIBEIRO, R.A., BELLAGUARDA, E.A.L. et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 59, n. 5, p. 603-12, 2007a.
- LEITÃO, Renata F.; BRITO, Gerly A.; ORIÁ, Reinaldo B.; et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterol**. v. 11, p. 90, 2011.
- LEITÃO, Renata Ferreira de Carvalho. **Estudo do papel do óxido nítrico nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato e efeito da glutamina e alanil-glutamina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**. 2007. 142 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007b.
- LEOCÁDIO, Paola C.; ANTUNES, Maísa M.; TEIXEIRA, Lilian G.; et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. **Nutr Cancer**. v. 67, n. 3, p. 486-493, 2015.

- LI, Hong-Li; LU, Lang; WANG, Xiao-Shuang; et al. Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 7, p. 455, 2017.
- LI, Xinyan; JIANG, Song; TAPPING, Richard I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. **Cytokine.** n. 49, v. 1, p.1-9. 2010.
- LIMA, Francisco Ronaldo Farias. **Bacillus clausii atenua a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos.** 2018. 104f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- LIMA, Vilma de. **Evidências da participação de TNF- $\alpha$  e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais.** 2004. 212f. Tese (Doutorado em Farmacologia) Pró-Reitoria de pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- LIVAK, Kenneth. J., SCHMITTGEN, Thomas. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOGAN, Richard M.; GIBSON, Rachel J.; SONIS, Stephen T. et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncol.** v.43, n. 4, p. 395-401, 2007.
- LONG, Shun Hua; HE, Yao; CHEN, Min Hu; et al. Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway triggered by PTEN downregulation in the pathogenesis of Crohn's disease. **J Dig Dis.** v. 14, n. 12, p. 662-669, 2013.
- LONGLEY, Daneil B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer.** v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.
- LU, Yue; LI, Xinrui; LIU, Shanshan; et al. Toll-like Receptors and inflammatory Bowel Disease. **Front. Immunol.** v. 9, p. 72, 2018.
- LUO, Han; GUO, Ping; ZHOU, Qiquan. Role of TLR4/NF- $\kappa$ B in damage to intestinal mucosa barrier function and bacterial translocation in rats exposed to hypoxia. **PLoS One.** v. 7, n. 10, p. e46291, 2012.
- LUO, Lan; LI, Yu-Cheng; DAI, Xiao-Zhen; et al. Effects of Proanthocyanidins on Intestinal Motility Disturbance Following Intestinal Ischemia/Reperfusion. **J Invest Surg.** v. 29, n. 6, p. 335-342, 2016.
- LUU, Maik, VISEKRUNA, Alexander. Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. **Eur J Immunol.** v. 49, n. 6, p. 842-848, 2019.
- MACPHERSON, B.R.; PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion.** v. 17, n. 2, p. 135-50, 1978.
- MADARA, J. L.; PATAPOFF, T. W.; GILLECE-CASTRO, B. et al. 5'-AMP is the neutrophil derived paracrine factor that ilicits chloride secretion from T84 epithelial monolayers. **J Clin Inves.** v. 91, n. 5, p. 2320–2325, 1993.
- MANACH, Claudine; SCALBERT, Augustin; MORAND, Christine; et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MANTOVANI, Alberto; CASSATELLA, Marco A.; COSTANTINI, Claudio; et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

- MARTINEZ-MICAELO, Neus; GONZÁLEZ-ABUÍN, Noemi; PINENT, Montserrat; et al. Procyanidin B2 inhibits inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Mol Nutr Food Res.** v. 59, n. 2, p. 262-269, 2015.
- MARTINEZ, Raquel Martins; GUIMARÃES, Deborah de Almeida Bauer; BERNIZ, Camila Ramos et al. Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. **Foods.** v. 7, n. 11, p. 178, 2018.
- MASHTOUB, Suzanne; TRAN, Cuong D.; HOWARTH, Gordon S. Emu oil expedites small intestinal repair following 5-fluorouracil-induced mucositis in rats. **Exp Biol Med** (Maywood). v. 238, n. 11, p. 1305-17, 2013.
- MATHEUS, Maria Eline; FERNANDES, Sidnei Bessa de Oliveira; SILVEIRA, Cristiane Silva; et al. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea Mart.* on nitric oxide production and iNOS expression. **J Ethnopharmacol.** v.107, n. 2, p. 291–296, 2006.
- MCCARTHY, G.M.; AWDE, J.D.; GHANDI, H.; et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. **Oral Oncol.** v.34, n.6, p.484-90, 1998.
- MELO, Priscilla Siqueira; ARRIVETTI, Leandro de Oliveira Rodrigues; ALENCAR, Severino Matias de; et al. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with  $\alpha$ -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry.** v. 213, p. 440–449, 2016.
- MENDES, Tiago Santos. **Via colinérgica anti-inflamatória: um alvo terapêutico no curso da mucosite intestinal induzida experimentalmente por 5-fluorouracil.** 2019. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- MILLER, Samuel I.; ERNST, Robert K.; BADER, Martin W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nat Rev Microbiol.** v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005.
- MISKO, T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. **Anal Biochem.** v. 214, n. 1, p. 11-16, 1993.
- MITCHELL, Richard N.; KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; et al. Robbins Cotran - Fundamentos de patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. **Scand J Gastroenterol.** v. 39, n. 11, p. 1119-1127, 2004.
- MONGE-FUENTES, Victoria; MUEHLMANN, Luis Alexandre; LONGO, João Paulo Figueiró; et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea Martius*) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **J Photochem Photobiol B.** v. 166, p. 301-310, 2017.
- MORTAZ, Esmail; ALIPOOR, Shamila D.; ADCOCK, Ian M. et al; Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Front Immunol.** v. 9, p. 2171, 2018.
- MUÑIZ-MIRET, Nuria; VAMOS, Robert; HIRAOKA, Mario; et al. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea Mart.*) in the floodplains of the Amazon estuary, Pará, Brazil. **Forest Ecology and Management.** v. 87, n. 1–3, p. 163-173, 1996.
- NABAVI, Seyed Fazel; RUSSO, Gian Luigi; DAGLIA, Maria; et al. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat! **Food Chem.** v. 15, n. , p. 179:305-10, 2015.
- NAKATA, Akinobu; NADATANI, Yuji; WATANABE, Toshio; et al. NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome Activation Exacerbates 5-Fluorouracil-

- Induced Small Intestinal Mucositis via Interleukin-1 $\beta$  Activation. **Digestion**. v. 1, p. 15, 2019.
- NALLATHAMBI, Rameshprabu; POULEV, Alexander; ZUK, Joshua b.; et al. Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells. **Nutrients**. v. 12, n. 6, p. 1623, 2020.
- NASCIMENTO, Vitor Hugo Nunes do; LIMA, Carla dos Santos; PAIXÃO, Jorge Tadeu Campos; et al. Antioxidant effects of açai seed ( *Euterpe oleracea* ) in anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumor. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 31, n. 9, p. 597-601, 2016.
- NEWTON, Phillip T.; VUPPALAPATI, Karuna K.; BOUDERLIQUE, Thibault; et al. Pharmacological inhibition of lysosomes activates the MTORC1 signaling pathway in chondrocytes in an autophagy-independent manner. **Autophagy**. v. 11, n. 9, p. 1594-1607, 2015.
- NICOLAU, Lucas Antônio Duarte. **Efeito esofagoprotetor de um biopolímero, a goma do cajueiro, na doença do refluxo não-erosiva em murinos e em biópsias esofágicas humanas: perfil antiinflamatório e efeito tópico**. 2018. 117f. Tese (Doutorado em Farmacologia) Pró-Reitoria de pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- NIE, Li; CAI, Shi-Yu; SHAO, Jiang-Zhong; et al. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. **Front Immunol**. v. 9, p. 1523, 2018.
- NOORDHUIS, P.; HOLWERA, U.; VAN DER WILT, C.L.; et al. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to Thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann Oncol**. v. 15, n. 7, p. 1025-1032, 2004.
- NUNES, Carla; FERREIRA, Elisabet; FREITAS, Víctor; et al. Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells. **Food Funct**. v. 4, n.3, p. 373-383, 2013.
- NUNES, Carla; FREITAS, Víctor; ALMEIDA, Leonor; et al. Red wine extract preserves tight junctions in intestinal epithelial cells under inflammatory conditions: implications for intestinal inflammation. **Food Funct**. v. 10, n. 3, p. 1364-1374, 2019.
- O'NEILL, Luke A.; BOWIE, Andrew G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**. v. 7, n. 5, p. 353-364, 2007.
- ODENWALD, Matthew A.; TURNER, Jerrold R. Intestinal permeability defects: is it time to treat? **Clin Gastroenterol Hepatol**. v. 11, n. 9, p. 1075-1083, 2013.
- OPIPARI, Anthony; FRANCHI, Luigi. Role of inflammasomes in intestinal inflammation and Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**. v. 21, n. 1, p. 173-181, 2015.
- OSHIMA, Tadayuki; MIWA, Hiroto. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. **J Gastroenterol**. v. 51, n. 8, p. 768-778, 2016.
- OZKAN, Orhan Veli; YUZBASIOGLU, Mehmet Fatih; CIRALIK, Harun; et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. **Tohoku J Exp Med**. v. 218, n. 3, p. 251-258, 2009.
- PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.
- PARRILLI, G.; IAFFAIOLI, R. V.; MARTORANO, M.; et al. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. **Cancer Res**. v. 49, n. 13, p.

3689-3691, 1989.

PASTERNAK, A.; SZURA, M.; GIL, K.; et al. Interstitial cells of Cajal - systematic review. **Folia Morphol** (Warsz). v. 75, n. 3, p. 281-286, 2016.

PATIL, Kalpesh R.; MAHAJAN, Umesh B.; UNGER, Banappa S.; et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International journal of molecular sciences**. v. 20, n. 18, p. 4367, 2019.

PEDROSO, Silvia H.; VIEIRA, Angélica T.; BASTOS, Rafael W.; et al. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**. v. 161, n. 10, p. 1950-1960, 2015.

PEPE, Giacomo; RAPA, Shara Francesca; SALVIATI, Emanuela; et al. Bioactive Polyphenols from Pomegranate Juice Reduce 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Intestinal Epithelial Cells. **Antioxidants** (Basel). v. 9, n. 8, p. E699, 2020.

PEREIRA, Venúcia B. M.; MELO, Anielle T.; ASSIS-JÚNIOR, Eudmar M.; et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 77, n. 2, p. 323-332, 2016.

PÉREZ-CANO, Francisco J.; MASSOT-CLADERA, Malen; RODRÍGUEZ-LAGUNAS, Maria J.; et al. Flavonoids Affect Host-Microbiota Crosstalk through TLR Modulation. **Antioxidants** (Basel). v. 3, n. 4, p. 649-670, 2014.

PICO, J.L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. **Oncologist**. v.3, n.6, p. 446-451, 1998.

PINEDO, H. M.; PETERS, G. F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J Clin Oncol**. v.6, n. 10, p.1653-1664, 1988.

PRISCIANDARO, Luca D.; GEIER, Mark S.; CHUA, Ann E.; et al. Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced epithelial cell damage. **Support Care Cancer**. v. 20, n. 12, p. 3205-3210, 2012.

QUARESMA, Marielle; DAMASCENO, Samara; Monteiro, CARLOS; et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Nutr Cancer**. v. 1, p. 11, 2019.

RADWAN, Rasha R.; KARAM, Heba M. Resveratrol attenuates intestinal injury in irradiated rats via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Environ Toxicol**. v. 35, n. 2, p. 223-230, 2020.

RANG, H.P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed . Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Pag 718-734.

RASHID, Summya; NAFEES, Sana; SIDDIQI, Aisha; et al. Partial protection by 18 $\beta$  Glycrrheticinic acid against Cisplatin induced oxidative intestinal damage in wistar rats: Possible role of NF $\kappa$ B and caspases. **Pharmacol. Rep**. v. 69, p. 1007–1013, 2017.

RATHINAM, Vijay A.K.; CHAN, Francis Ka-Ming. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. **Trends Mol Med**. v. 24, n. 3, p. 304-318, 2018.

REYNELL, R. S.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **J Physiol**. v. 131, n. 2, p. 452-462, 1956.

ROCHA, A.P.M.; CARVALHO, L.C.R.M.; SOUSA, M.A.V.; et al. Endothelium-dependent

vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vasc. Pharmacol.** v. 46, p. 97–104, 2007.

RODRIGUES, Roberta B.; LICHTENTHA, Ramona; ZIMMERMANN, Benno F.; et al. Total Oxidant Scavenging Capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) Seeds and Identification of Their Polyphenolic Compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 4162–416, 2006.

ROSSIN, Daniela; BARBOSA-PEREIRA, Letricia; IAIA, Noemi; et al. A Dietary Mixture of Oxysterols Induces In Vitro Intestinal Inflammation through TLR2/4 Activation: The Protective Effect of Cocoa Bean Shells. **Antioxidants** (Basel). v. 8, n. 6, p. 151, 2019.

RTIBI, Kaïs; SELMI, Slimen; GRAMI, Dhekra; et al. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. **Toxicol Mech Methods.** v. 28, n. 4, p. 262-267, 2018.

SALEEM, Muhammad; NAZIR, Mamona; HUSSAIN, Hidayat; et al. Natural Phenolics as Inhibitors of the Human Neutrophil Elastase (HNE) Release: An Overview of Natural Anti-inflammatory Discoveries during Recent Years. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.** v. 17, n. 2, p. 70-94, 2018.

SANGILD, Per T.; SHEN, René Liang; PONTOPPIDAN, Peter; et al. Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 314, n. 2, p. G231-G246, 2018.

SANTOS, Izabelle Barcelos; DE BEM, Grazielle Freitas; DA COSTA, Cristiane Aguiar; et al. Açaí seed extract prevents the renin-angiotensin system activation, oxidative stress and inflammation in white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. **Nutr Res.** v. 79, p. 35-49, 2020.

SCHAEFFER, Valérie; ARBABI Saman; GARCIA Iris A.; et al. Role of the mTOR pathway in LPS-activated monocytes: influence of hypertonic saline. **J Surg Res.** v. 171, n. 2, p. 769-76, 2011.

SCHAUSS, Alexander G.; CLEWELL, Amy; BALOGH, Lajos; et al. Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active®). **Toxicology.** v. 278, n. 1, p. 46-54, 2010.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. **Cell.** v. 47, p. 921-928, 1986.

SERAFINI, Mauro; PELUSO, Ilaria; RAGUZZINI, Anna. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proc Nutr Soc.** v. 69, n. 3, p. 273-278, 2010.

SHARMA, Sapna; TRIPATHI, Prabhanshu; SHARMA, Jeetesh; et al. Flavonoids modulate tight junction barrier functions in hyperglycemic human intestinal Caco-2 cells. **Nutrition.** v. 78, p. 110792, 2020.

SHENG, Kangliang; ZHANG, Guanghui; SUN, Ming; et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis through intestinal barrier improvement, oxidative stress reduction, and inflammatory cytokines and gut microbiota modulation. **Food Funct.** v. 10, p. 1039, 2020.

SHI, Cheng-jin; WEN, Xue-sen; GAO, Hui-feng; et al. Steamed root of *Rehmannia glutinosa* Libosch (Plantaginaceae) alleviates methotrexate-induced intestinal mucositis in rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 183, p.143-150, 2016.

SHIGA, Taro; HIRAIDE, Maroko. Cardiotoxicities of 5-Fluorouracil and Other Fluoropyrimidines. **Curr Treat Options Oncol.** v. 21, n. 4, p. 27, 2020.

- SHIOTA, Asuka; HADA, Takahiko; BABA, Tomoko; et al. Protective effects of glyceryl glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. **J Med Invest.** v. 57, n. 3-4, p. 314-320, 2010.
- SILVA, Dulcelena Ferreira; VIDAL, Flávia Castello; SANTOS, Debora; et al. Cytotoxic effects of Euterpe oleracea Mart. in malignant cell lines. **BMC Complement Altern Med.** v.14, p. 175, 2014.
- SILVA, Renan O.; OLIVEIRA, Francisco Fábio B.; BINGANA, Rudy D.; et al. A novel murine model of esophageal nonerosive reflux disease: from inflammation to impairment in mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 312, v. 6, p. 658-665, 2017.
- SINGH, Amritpal; YAU, Yu Fung; LEUNG, Kin Sum; et al. Interaction of Polyphenols as Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds in Brain-Liver-Gut Axis. **Antioxidants** (Basel). v. 9, n. 8, p. E669, 2020.
- SOARES, Pedro Marcos; MOTA, José Maurício; GOMES, Antoniella S. Gomes; et al. Gastrointestinal dysmotility in 5- fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.63, p.91-98, 2008.
- SOARES, Pedro Marcos; MOTA, José Maurício; SOUZA, Emmanuel P.; et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5- fluorouracil requires IL-4. **Cytokine.** v. 61, n. 1, p. 46–49, 2013.
- SONIS, Stephen T. New thoughts on the initiation of mucositis. **Oral Dis.** v. 16, n. 7, p. 597-600, 2010.
- SONIS, Stephen T. The Pathobiology of Mucositis. **Nat Rev Cancer.** v. 4, n. 4, p. 277-284, 2004.
- SONNIER, Dennis I.; BAILEY, Stephanie R.; SCHUSTER, Rebecca M.; et al. Proinflammatory chemokines in the intestinal lumen contribute to intestinal dysfunction during endotoxemia. **Shock.** v. 37, n. 1, p. 63-69, 2012.
- SOTTERO, Barbara; ROSSIN, Daniela; POLI, Giuseppe; et al. Lipid Oxidation Products in the Pathogenesis of Inflammation-related Gut Diseases. **Curr Med Chem.** v. 25, n. 11, p. 1311-1326, 2018.
- SOUSA, Cleyton Marcos de M.; SILVA, Hilris Rocha e, VIEIRA-JR., Gerardo Magela; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova.** v.30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STONER, Gary D.; WANG, Li-Shu; SEGUIN, Claire; et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. **Pharm Res.** v. 27, n. 6, p. 1138–45, 2010.
- STRINGER, Andrea M.; AL-DASOOQI, Noor; BOWEN, Joanne M.; et al. Biomarkers of chemotherapy-induced diarrhoea: a clinical study of intestinal microbiome alterations, inflammation and circulating matrix metalloproteinases. **Support Care Cancer.** v. 21, n. 7, p. 1843-52, 2013.
- STRINGER, Andrea M.; GIBSON, Rachel J.; LOGAN, Richard M.; et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Exp Biol Med (Maywood).** v. 234, n. 4, p.430-441, 2009.
- SUBRAMANIAM, S.; SUBRAMANIAM, S.; SHYAMALA DEVI, C.S. Vitamin E protects intestinal basolateral membrane from CMF-induced damages in rat. **Indian J Physiol Pharmacol.** v. 39, n. 3, p. 263-6, 1995.

- SUDO, Roberto T.; NETO, Miguel L.; MONTEIRO, Carlos E.S.; et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) in a rodent model of acute and neuropathic pain. **BMC Complement Altern Med.** v. 15, p. 208, 2015.
- TAJIMA, Tsuyoshi; MURATA, Takahisa; ARITAKE, Kosuke; et al. EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 302, n. 5, p. G524-G534, 2012.
- TAKEDA, Hiroshi; SADAKANE, Chiharu; HATTORI, Tomohisa; et al. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonism. **Gastroenterology.** v. 134, n. 7, p. 2004-2013, 2008.
- TANG, Yang; LIU, Bo; LI, Jing; et al. Genetic variants in PI3K/AKT pathway are associated with severe radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with radiation therapy. **Cancer Med.** v. 5, n. 1, p. 24-32, 2016.
- TANIGAWA, Shunsuke; FUJII, Makoto; HOU, De-Xing. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. **Free Radic Biol Med.** v. 42, n. 11, p. 1690–1703, 2007.
- TARRAGON, Ernesto; MORENO, Juan José. Polyphenols and taste 2 receptors. Physiological, pathophysiological and pharmacological implications. **Biochem Pharmacol.** v. 178, p. 114086, 2020.
- TOBEY, N.A.; HOSSEINI, S.S.; ARGOTE, C.M.; et al. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol.** v. 99, n. 1, p. 13–22, 2004.
- TOKUHIRA, Nana; KITAGISHI, Yasuko; SUZUKI, Miho; et al. PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review). **Int J Mol Med.** v. 35, n. 1, p. 10-16, 2015.
- TRINDADE, Patricia Leticia; SOARES, Elaine dos Ramos; MONTEIRO, Elisa Bernardes; et al. Antiadipogenic effects of açai seed extract on high fat diet-fed mice and 3T3- T L1 adipocytes: A potential mechanism of action. **Life Sciences.** v. 228, p. 316-322, 2019.
- TSIKAS, Dimitrios. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Anal Biochem.** v. 524, p. 13-30, 2017.
- VAN SEBILLE, Ysabella Z. A. ; STANSBOROUGH, Romany; WARDILL, Hannah R. ; et al. Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. **Curr Oncol Rep.** v. 17, n. 11, p. 50, 2015.
- VANHEEL, Hanne; VICARIO, Maria; VANUYTSEL, Tim; et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. **Gut.** v. 63, n. 2, p. 262-271, 2014.
- VERDE, Sara Maria Moreira Lima. **Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida.** 2007. 138f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- VIZZOTO, Marcia; KROLOW, Ana Cristina; WEBER, Gisele Eva Bruch. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** 16f. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
- VLIET, Michel J. Van; HARMSSEN, Hermie. J. M.; BONT, Eveline. S. J. M. de; et al. The



role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy induced mucositis. **PLOS Pathogens**. v.6, n.5, p. e.1000879, 2010.

WAETZIG, G.H.; SCHREIBER, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. **Aliment. Pharmacol. Ther**. v. 18, p. 17-32, 2003.

WANG, Hao; WANG, Liye; XIE, Zuoxu; et al. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. **Cancers (Basel)**. v. 12, n. 7, p. E1881, 2020.

WATANABE, Hiromitsu; KASHIMOTO, Naoki; USHIJIMA, Mitsuyasu; et al. Effects of a water-soluble extract of Ganoderma lucidum mycelia on aberrant crypt foci induced by azoxymethane and small-intestinal injury by 5-FU in F344 rats. **Med Mol Morphol**. v. 46, n. 2, p. 97-103, 2013.

WOHLHUETER, R. M.; MCIVOR, R. S.; PLAGEMANN, P. G. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. **J. Cell Physiol**. v. 104, n. 3, p. 309–319, 1980.

WONG, Deysi V.; LIMA-JÚNIOR, Roberto C.; CARVALHO, Cibele B.; et al. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One**. v. 10, n. 10, p. e0139985, 2015.

World Health Organization. Cancer. 12 setembro 2018. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>, acesso em 23 de março de 2020.

WU, Binning; BHATNAGAR, Rohil; INDIKURI, Vijaya V.; et al. Intestinal Mucosal Barrier Function Restoration in Mice by Maize Diet Containing Enriched Flavan-4-Ols. **Nutrients**. v. 12, n. 4, p. 896, 2020a.

WU, Meizhu; SHEN, Aling; CHEN, Youqin; et al. Xinhuang Tablets Improve Intestinal Barrier Function Via Regulating Epithelial Tight Junctions in Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis Mice. **J Med Food**. v. 10, p. 1089, 2020b.

WU, S. Vincent; ROZENGURT, Nora; YANG, Moon; et al. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 99, n. 4, p. 2392-2397, 2002.

XIE, Chenghui; KANG, Jie; LI, Zhimin; et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. **J Nutr Biochem**. v.23, n. 9, p. 1184-1191, 2012.

XIE, Cong; WANG, Xuyi; YOUNG, Richard L.; et al. Role of Intestinal Bitter Sensing in Enteroendocrine Hormone Secretion and Metabolic Control. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 9, p. 576, 2018.

XIE, Songbo; CHEN, Miao; YAN, Bing; et al. Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells. **PLoS One**. v. 9, n. 4, p. e94496, 2014.

YAHFOUFI, Nour; ALSADI, Nawal; JAMBI, Majed; et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**. v. 10, p. 1618, 2018.

YAMAGUCHI, Klenicy Kazumy de Lima; PEREIRA, Luiz Felipe Ravazi; LAMARÃO, Carlos Vitor; et al. Amazon Acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chem**. v. 179, p. 137-151, 2015.

YANG, XiaoHong; LIU, Tao; CHEN, Bo; et al. Grape seed proanthocyanidins prevent

- irradiation-induced differentiation of human lung fibroblasts by ameliorating mitochondrial dysfunction. **Sci. Rep.** v. 7, p. 62, 2017.
- YAZBECK, Roger; HOWARTH, Gordon S. Complementary medicines: emerging therapies for intestinal mucositis. **Cancer Biol Ther.** v. 8, n. 17, p. 1629-1631, 2009.
- YI, Dan; HOU, Yongqing; XIAO Hang; et al. N-Acetylcysteine improves intestinal function in lipopolysaccharides-challenged piglets through multiple signaling pathways. **Amino Acids.** v. 49, n. 12, p. 1915-1929, 2017.
- YI, Long; CHEN, Chun-Ye; JIN, Xin; et al. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. **Biochimie.** v. 94, n. 9, p. 2035-2044, 2012.
- YIN, Wenbin; LI, Baoying; LI, Xiaoli; et al. Anti-inflammatory effects of grape seed procyanidin B2 on a diabetic pancreas. **Food Funct.** v. 6, n. 9, p. 3065-3071, 2015.
- ZAPATA-SUDO, Gisele; DA SILVA, Jaqueline S.; PEREIRA, Sharlene L. et al. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **BMC Complement Altern Med.** v.14, p. 227, 2014.
- ZHANG, Qing-Yu; WANG, Fei-Xuan; JIA, Ke-Ke; et al. Natural Product Interventions for Chemotherapy and Radiotherapy-Induced Side Effects. **Front. Pharmacol.** v. 9, p. 1253, 2018.
- ZHAO, Haoan; CHENG, Ni; ZHOU, Wenqi; et al. Honey Polyphenols Ameliorate DSS-Induced Ulcerative Colitis via Modulating Gut Microbiota in Rats. **Mol Nutr Food Res.** v. 63, n. 23, p. e1900638, 2019.
- ZHAO, Jingsong; HUANG, Lingyan; BELMAR, Nicole; et al. Oral RDP58 allows CPT-11 dose intensification for enhanced tumor response by decreasing gastrointestinal toxicity. **Clin Cancer Res.** v. 10, n. 8, p. 2851-9, 2004.
- ZHOU, Mingxia; XU, Weimin; WANG, Jiazheng; et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- $\kappa$ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. **EBioMedicine.** v. 35, p. 345-360, 2018.
- ZHU, Jing; TONG, Hengli; YE, Xide; et al. The Effects of Low-Dose and High-Dose Decoctions of *Fructus aurantii* in a Rat Model of Functional Dyspepsia. **Med Sci Monit.** v. 26, p. e919815, 2020.
- ZHUANG, Shen; ZHONG, Jia; ZHOU, Qilv; et al. Rhein protects against barrier disruption and inhibits inflammation in intestinal epithelial cells. **Int Immunopharmacol.** v. 71, p. 321-327, 2019.
- ZINGARELLI, Basilia; SHEEHAN, Maeve; WONG, Hector .R. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. **Crit. Care Med.** v. 31, p. S105-S111, 2003.
- ZINGARELLI, Basilia. Nuclear factor- $\kappa$ B. **Crit Care Med.** v. 33, n. 12, p. s414-s416, 2005.
- ZLOTNIK, Y.; PATYA, M.; VANICHKIN, A.; et al. Tyrphostins reduce chemotherapy-induced intestinal injury in mice: assessment by a biochemical assay. **Br J Cancer.** v. 92, n. 2, p. 294-7, 2005.

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos aspectos farmacológicos do extrato hidro-alcóolico da Euterpe Oleracea Mart. em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.", protocolada sob o CEUA nº 5133091118 (ID 000775), sob a responsabilidade de **Pedro Marcos Gomes Soares** - 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 15/02/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of pharmacological aspects of the hydro-alcohol extract of Euterpe Oleracea Mart. in experimental model of intestinal mucositis induced by 5-Fluorouracil.", utilizing 180 Heterogenics mice (180 males), protocol number CEUA 5133091118 (ID 000775), under the responsibility of **Pedro Marcos Gomes Soares** - 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 02/15/2019.

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

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [12/2020](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Setorial da FAMED](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [180](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal da UFC. O laboratório possui toda estrutura necessária para realização dos experimentos.

Fortaleza, 19 de fevereiro de 2019

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

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