

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

RAFAELA MIRANDA PESSOA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DO EXTRATO DE
Fridericia chica (Bonpl.) L.G.Lohmann NA MUCOSITE INDUZIDA
PELA ASSOCIAÇÃO DE 5-FLUOROURACIL E IRINOTECANO**

BELO HORIZONTE

2019

RAFAELA MIRANDA PESSOA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DO EXTRATO DE
Fridericia chica (Bonpl.) L.G.Lohmann NA MUCOSITE INDUZIDA
PELA ASSOCIAÇÃO DE 5-FLUOROURACIL E IRINOTECANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Odília Antunes
Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Belo Horizonte - MG

2019

P475a Pessoa, Rafaela Miranda.
Avaliação do efeito enteroprotetor do extrato de *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann na mucosite induzida pela associação de 5-fluorouracil e irinotecano / Rafaela Miranda Pessoa – 2019.
108 f. : il.

Orientadora: Simone Odília Antunes Fernandes.
Coorientador: Valbert Nascimento Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Sistema gastrointestinal – Teses. 2. Mucosite intestinal – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Câncer – Quimioterapia - Teses. I. Fernandes, Simone Odília Antunes. II. Cardoso, Valbert Nascimento. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DO EXTRATO DE Fridericia chica (Bonpl.) L. G. Lohmann NA MUCOSITE INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DE 5-FLUOROURACIL E IRINOTECANO

RAFAELA MIRANDA PESSOA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Simone Antunes

Profa. Simone Odília Antunes Fernandes - Orientadora
UFMG

Váber Nascimento

Prof. Váber Nascimento Cardoso
UFMG

Djenane Ramalho

Profa. Djenane Ramalho de Oliveira
UFMG

Ana Maria Caetano

Profa. Ana Maria Caetano de Faria
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

COLABORADORES

- Mestra Isabella Kuniko Tavares Magalhães Takenaka - Laboratório de Genômica Médica - Centro Internacional de Pesquisa e Ensino A.C. Camargo Cancer Center
- Mestra Juliana Mendes Amorim - Laboratório de Farmacognosia - Faculdade de Farmácia/UFMG
- Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Laboratório de Farmacognosia - Faculdade de Farmácia/UFMG
- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - Laboratório de Agentes Bioterapêuticos - Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG
- Mestranda Vivian Correia Miranda - Laboratório de Agentes Bioterapêuticos - Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG
- Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal - Laboratório de Patologia Molecular - Faculdade de Medicina/UFMG
- Mestre Stanley de Almeida Araújo – Instituto de Nefropatologia (INP)/Laboratório de Patologia Molecular - Faculdade de Medicina/UFMG
- Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite - Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional - Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG
- Doutora Paola Caroline Lacerda Leocádio - Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional - Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/UFMG

Dedico esta dissertação à Deus, por me manter forte durante essa jornada.

À minha família, por todo o apoio e por sonharem junto comigo.

Ao Gabriel, pelo amor, amizade e companheirismo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus, por me dar saúde, força e sabedoria, para que fosse possível trilhar mais essa caminhada em busca dos meus sonhos.

À minha família, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas, mesmo sem entender exatamente o significado de tudo isso, mais apoiando e vibrando comigo a minha paixão pela pesquisa. Pai e mãe, obrigada por todos os ensinamentos diários e por me permitirem ter o privilégio de trabalhar com o que se ama! Ao Gu, obrigada por ser um irmão prestativo e carinhoso em todos os momentos que preciso.

Ao Gabriel, por estar há tantos anos caminhando ao meu lado e comemorando cada passo de sucesso comigo. Obrigada por todo o apoio nos momentos de desespero e por me mostrar, a cada dia, minha melhor versão. Sou muito grata por ter você em minha vida!

Aos meus orientadores, professora Simone e Valbert, meus sinceros agradecimentos por terem me acolhido no laboratório de Radioisótopos e confiado na minha capacidade, além de terem me ensinado esse mundo fascinante da Medicina Nuclear, que fizeram e fazem meus olhos brilharem.

À professora Paula Vidigal e Fernanda, obrigada por toda ajuda com a histologia e por cederem o laboratório para que eu pudesse realizar uma parte tão importante desse trabalho com tanto carinho e acolhimento.

À Isabella Kuniko, por ter me apresentado e dividido comigo a *F. chica* e a mucosite. Sem você esse projeto não teria sido possível! Obrigada por todos os ensinamentos, carinho, paciência, conselhos e trocas de conhecimento. Serei eternamente grata por ter cruzado com uma pessoa como você no meu caminho.

À Patrícia Andrade, por ser a melhor aluna de iniciação científica que eu poderia ter. Pat, obrigada por toda sua dedicação e empenho durante todos os experimentos; obrigada por ter sido meu braço direito e esquerdo em todos os momentos que eu precisei. Mais do que isso, obrigada por amar esse projeto tanto quanto eu, espero ter acrescentado pelo menos um pouquinho na sua carreira, que eu tenho certeza que será de muito sucesso.

Aos meus colegas do laboratório de Radioisótopos (em especial Paula, Luísa, Sued, Janaína, Nara, Tiago e Maria Emília), que estiveram comigo nessa caminhada e contribuíram, de alguma forma, para que esse trabalho fosse realizado. À Lívia, que me acolheu no laboratório e me ensinou muito. Obrigada por todas as trocas e ensinamentos constantes! Aos meus queridos Kátia e William, que chegaram na reta final dessa jornada para somar! Muito obrigada por todas as discussões engrandecedoras e momentos de descontração.

A todos os meus colaboradores, em especial à Juliana Amorim, por todo apoio e ensinamentos do laboratório de Farmacognosia. Obrigada pela disponibilidade, cuidado e carinho Ju! Ao Stanley, Paola e Vivian, obrigada pela paciência e por disponibilizarem tempo, conhecimento e energia para somar em meu trabalho.

À professora Gisele, por toda disponibilidade, ajuda e ensinamentos com as análises estatísticas deste trabalho. Muito obrigada Gisele!!

À Adelaide e ao Batista, por toda a ajuda com os animais, alegria, disponibilidade e cuidado com o Biotério da Faculdade de Farmácia.

Aos meus queridos amigos, obrigada por entenderem os momentos de ausência e por serem minhas fontes inesgotáveis de alegria, apoio e carinho! Muito obrigada por toda a torcida!

Só posso dizer que a caminhada foi longa, muitas vezes dura, mas acima de tudo gratificante. Gratificante por saber que tenho tantas pessoas maravilhosas caminhando ao meu lado e por ter a certeza de que eu saio do mestrado uma pessoa e uma profissional muito melhor. Muito obrigada!

“Os únicos limites que você tem, são aqueles que você acredita.”

Autor desconhecido

RESUMO

Mucosite é a inflamação da mucosa do trato gastrointestinal originada como um efeito adverso do tratamento quimioterápico, podendo afetar de 40-100% dos pacientes sob tratamento de câncer. Essa condição leva a lesões dolorosas, restrição alimentar, pausas ou até mesmo suspensão do tratamento, impactando diretamente no controle tumoral e na qualidade de vida do paciente. Atualmente não existem tratamentos profiláticos ou curativos em uso na prática clínica, o que torna extremamente relevante o desenvolvimento de modelos animais para estudo da mucosite. Na medicina tradicional, é relatado o uso da espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann, que já possui comprovada atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, para o tratamento de cólicas intestinais e diarreia sanguinolenta, sintomas também da mucosite. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar os possíveis efeitos benéficos do extrato hidroetanólico das folhas de *F. chica*, no epitélio intestinal de animais com mucosite, induzida pela associação dos quimioterápicos 5-fluorouracil (5-FU) e irinotecano. O modelo de mucosite foi desenvolvido em camundongos BALB/c machos, 8 semanas, que receberam 34 mg/kg de 5-FU e 41 mg/kg de irinotecano por via intraperitoneal, durante os quatro primeiros dias do protocolo experimental. Adicionalmente, os animais receberam uma dose de 30 mg/kg do extrato de *F. chica*, por gavagem, concomitantemente com os quimioterápicos, prolongando-se até o último dia do protocolo (7^o dia). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas para a evolução ponderal, consumo alimentar, níveis de permeabilidade intestinal e translocação bacteriana entre os grupos MUC e *F. chica* + MUC (exceto NLM) ($p > 0,05$). Além disso, parâmetros como produção de citocinas, infiltrado inflamatório (MPO e EPO), não apresentaram alterações significativas entre os grupos estudados. O extrato foi capaz de exercer um efeito parcial enteroprotetor sobre o epitélio dos animais, reduzindo os escores de diarreia, a expressão de ZO-1, a TB para os NLM e a imunoglobulina sIgA ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que o extrato de *Fridericia chica* poderia contribuir como medida alternativa para atenuar os efeitos indesejáveis da mucosite, abrindo perspectivas para a realização de novos experimentos, visando o desenvolvimento futuro de um fitoterápico.

Palavras-chaves: Mucosite gastrointestinal. Inflamação. Quimioterapia. Câncer

ABSTRACT

Mucositis is an inflammation of the gastrointestinal tract originated as an adverse effect of chemotherapy treatment and may affect 40-100% of patients under treatment of cancer. This condition leads to painful lesions, food intake restriction, breaks or even treatment suspension, impacting directly on the tumor control and patient's quality of life. There are currently no prophylactic or curative treatments in use in clinical practice, which makes it extremely relevant the development of animal models to study the mucositis. In traditional medicine, is reported the use of the species *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann, which already has proven anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*, for the treatment of intestinal cramps and bloody diarrhea, also symptoms of mucositis. In this context, the objective of this work was to investigate the possible beneficial effects of *F. chica* extract in the intestinal epithelium of animals with mucositis induced by 5-FU and irinotecan association. The model was developed in BALB/c mice, male, 8 weeks old, who received 34 mg/kg of 5-FU and 41 mg/kg intraperitoneal irinotecan, during the first four days of the experimental protocol. Additionally, the animals were given a dose of 30 mg/kg of *F. chica* extract orally along with the chemotherapy, extending until day 7 of the protocol. The results showed no difference in weight variation and food consumption, intestinal permeability levels and bacterial translocation (except for mesenteric lymphonodes) for MUC and *F. chica* + MUC groups ($p > 0,05$). In addition, parameters such as production of cytokines, inflammatory infiltrate (MPO and EPO), showed no significant difference between the study groups. The extract was able to exert a partial protective effect on the epithelium of animals, reducing scores of diarrhea, the expression of ZO-1, bacterial translocation for MLN and levels of sIgA ($p \leq 0.05$). These results suggest that the *F. chica* extract could contribute as an alternative for de undesirable effects of mucositis, opening perspectives for further experimentation aiming at the future development of an herbal medicines.

Key-words: Gastrointestinal mucositis. Inflammation. Chemotherapy. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de câncer em homens e mulheres no Brasil (2018).....	23
Figura 2 - Etiologia do câncer.....	24
Figura 3 - Estrutura química do 5-FU	26
Figura 4 - Mecanismo de citotoxicidade e metabolismo do 5-FU.....	27
Figura 5 - Estrutura química do irinotecano	29
Figura 6 - Metabolismo e mecanismo de citotoxicidade do irinotecano	30
Figura 7 - Diagrama das cinco fases da mucosite intestinal	34
Figura 8 - Fases de iniciação, geração e amplificação de sinais da mucosite intestinal	35
Figura 9 - Fases de ulceração e cicatrização da mucosite intestinal.....	36
Figura 10 - Desenho esquemático da mucosa do trato gastrointestinal.....	40
Figura 11 - Efeitos ocasionados pela alteração na permeabilidade do epitélio.....	44
Figura 12 - Fotografia <i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G.Lohmann - acervo de plantas tropicais do Missouri Botanical Garden.....	47
Figura 13 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> sobre a variação do peso dos animais antes e após a indução da mucosite nos dias 1, 4 e 7.....	66
Figura 14 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> sobre a variação do peso e consumo de ração dos animais após a indução da mucosite.	67
Figura 15 - Análise histológica do íleo.....	69
Figura 16 - Análise morfométrica do íleo.....	70
Figura 17 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> no escore histológico do íleo.	70
Figura 18 - Análise de microscopia eletrônica (ME) do íleo.	72
Figura 19 - Comparação entre os cortes de HE, semi-fino e ultrafino (ME) do íleo de um animal com mucosite, sem tratamento com extrato de <i>F. chica</i>	73

Figura 20 - Distribuição do DTPA-99mTc nos intestinos delgado e grosso após administração por gavagem.	73
Figura 21 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de DTPA-99mTc no sangue de animais.	74
Figura 22 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> sobre expressão gênica de Zonula occludens-1 e ocludina no íleo.	75
Figura 23 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> no infiltrado celular intestinal do íleo.....	76
Figura 24 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> na produção de citocinas no íleo	77
Figura 25 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> sobre a concentração da Imunoglobulina A secretora (sIgA) no lúmen intestinal	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Divisão e esquema de tratamento dos diferentes grupos experimentais .	54
Tabela 2 - Escores de avaliação de intensidade de diarreia em camundongos.....	56
Tabela 3 - Sequência dos nucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real	62
Tabela 4 - Escore de análise histopatológica para intestino delgado.....	63
Tabela 5 - Avaliação diária da intensidade da diarreia nos camundongos por meio da classificação em escore.	68
Tabela 6 - Efeito do extrato de <i>F. chica</i> sobre a biodistribuição de <i>E. coli</i> -99mTc no sétimo dia do protocolo experimental.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU - 5-Fluorouracil

CPT-11 - Irinotecano

Tc-99m - Radioisótopo tecnécio metaestável

CLAs - Ácido linoleico conjugado sintético

COX-2 - Enzima cicloxigenase-2

Da - Daltons

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dTMP - Desoxitimidina monofosfato

DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético

dTTP - 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato

dUMP - Desoxiuridina monofosfato

dUTP - 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPO - Enzima peroxidase eosinofílica

ERO's - Espécies reativas de oxigênio

FdUMP - 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato

FdUTP - Fluorodeoxiuridina trifosfato

FUTP - Fluorotrifosfato

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-10 - Interleucina 10

iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzida

IP - Intraperitoneal

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MBq - Megabequerel

mg% - miligramas por cento

mg/kg - miligramas por kilograma

MPO - Enzima mieloperoxidase

NCI - *National Cancer Institute*

nm - Nanômetros

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NLM - Nódulos linfáticos mesentéricos

OH[·] - Radical hidroxila

PI - Permeabilidade intestinal

RNA - Ácido ribonucleico

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUS - Sistema Único de Saúde

TB - Translocação bacteriana

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF-α - Fator de necrose alfa

TS - Timidilato sintase

UFC - Unidades formadoras de colônia

UFC/mL - Unidades formadoras de colônia/mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Câncer.....	23
2.2	Tratamento.....	24
2.3	5-Fluorouracil	25
2.4	Irinotecano	28
2.5	Associação de 5-fluorouracil e irinotecano.....	31
2.6	Mucosite.....	32
2.7	Fisiopatologia da mucosite.....	33
2.8	Manifestações clínicas da mucosite.....	36
2.9	Tratamento da mucosite.....	37
2.10	Barreira intestinal	40
2.11	Permeabilidade intestinal.....	42
2.12	Translocação bacteriana.....	43
2.13	Uso de plantas medicinais para tratamento de doenças	45
2.14	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G.Lohmann.....	46
2.15	Composição Química.....	48
2.16	Atividade biológica da <i>F. chica</i>	48
2.17	Atividade anti-inflamatória de extratos de planta da mucosite	49
3	JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	52
4.1	Objetivo geral:	52
4.2	Objetivos específicos:	52
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
5.1	Identificação do material vegetal.....	53
5.2	Obtenção do extrato de <i>F. chica</i> (Bonpl.) L.G.Lohmann	53
5.3	Composição do extrato de <i>F. chica</i> (Bonpl.) L.G.Lohmann.....	53
5.4	Animais	54
5.5	Delineamento Experimental	54
5.6	Modelo experimental de mucosite intestinal.....	54
5.7	Análises.....	55
5.7.1	Consumo alimentar e variação ponderal	55
5.7.2	Escore de diarreia.....	55

5.7.3	Avaliação da Permeabilidade Intestinal	56
5.7.4	Avaliação da Translocação Bacteriana.....	56
5.7.5	Dosagem da imunoglobulina A secretora (sIgA)	57
5.7.6	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no íleo	58
5.7.7	Avaliação da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no íleo	59
5.7.8	Dosagem de citocinas no íleo.....	60
5.7.9	Análise da amplificação de mRNA de proteínas da junção firme	60
5.7.10	Extração do RNA.....	61
5.7.11	Síntese cDNA.....	61
5.7.12	Amplificação do cDNA por PCR em tempo real	62
5.7.13	Análise histológica.....	62
5.7.14	Escore histológico:	63
5.7.15	Análise morfométrica:.....	63
5.7.16	Análises estatísticas:.....	64
6	RESULTADOS	65
6.1	Padronização do modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de 5-FU e irinotecano	65
6.2	Peso e consumo de ração antes da indução da mucosite	65
6.3	Variação ponderal e consumo alimentar após a indução da mucosite	66
6.4	Escores de diarreia durante o protocolo experimental	67
6.5	Análise histopatológica e morfométrica do íleo	68
6.6	Microscopia eletrônica.....	71
6.7	Distribuição do DTPA-99mTc e permeabilidade intestinal (PI).....	73
6.8	Análise da expressão gênica de Zonula occludens-1 e ocludina	74
6.9	Translocação bacteriana.....	75
6.10	Avaliação da atividade das enzimas MPO e EPO	76
6.11	Dosagem de citocinas no íleo	76
6.12	Determinação da imunoglobulina A (sIgA) no intestino delgado.....	77
7	DISCUSSÃO	78
8	CONCLUSÃO.....	87
9	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo utilizado para definir/descrever um conjunto de doenças que possuem uma característica em comum: o crescimento desordenado de células. Tais células podem, ainda, espalhar-se para outras regiões do corpo, ocasionando a chamada metástase. O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, levando 9,6 milhões de indivíduos a morte em 2018 (WHO, 2018). As causas podem ser internas ou externas ao organismo, sendo as principais a hereditariedade e fatores relacionados aos danos ao DNA (BRASIL, 2018).

Para os anos de 2018 e 2019 estima-se, para o Brasil, um total de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, que somam cerca de 170 mil novos casos, serão 420 mil novos casos de câncer no país, dividindo-se, principalmente, entre próstata, pulmão, mama, cólon e reto (BRASIL, 2018).

As opções de tratamento para o câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea, entre outros, sendo que a grande maioria dos casos requer a combinação de mais de uma modalidade. Dentre essas combinações, destacam-se a quimioterapia e a radioterapia.

A quimioterapia é a modalidade de tratamento que faz uso de agentes antineoplásicos, responsáveis por atuarem em mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam a divisão celular. A ação desses agentes é mais efetiva, no entanto, quando utilizados em associação a outros fármacos. À exemplo dessa associação, destaca-se o protocolo FOLFIRI, uma associação entre os fármacos 5-fluorouracil, irinotecano e leucovorina utilizada atualmente na prática clínica, para o tratamento de câncer colorretal, neoplasia de alta incidência mundial (HOFF et al.; 2013; RANG E DALE, 2008 em PEREIRA, 2015; MUNKER et al., 2018).

Apesar dos grandes avanços na área da oncologia, a ação dos quimioterápicos não se limita apenas às células tumorais, atingindo também outras células que apresentam alto índice de divisão celular. A exemplo dessas células, destacam-se as do epitélio gastrointestinal, o que resulta em uma condição conhecida como mucosite (SONG, et al., 2013; CHANG et al., 2012). A mucosite chega a afetar cerca de 60-100% dos pacientes submetidos a regimes com elevadas ou combinadas doses de

quimioterápicos e 40% dos pacientes em uso de doses padrão (CINAUSERO et al., 2017).

A mucosite gera lesões ulcerativas dolorosas, restringe a ingestão de alimentos e torna o paciente mais suscetível a infecções sistêmicas. Isso pode levar à interrupções no tratamento ou alterações na dose de quimioterápico utilizada, o que influencia diretamente em sua sobrevivência. Além disso, prolonga-se o tempo de internação e, conseqüentemente, os gastos por paciente (SONIS, 2004; SONG et al., 2013).

Na prática clínica, atualmente, são utilizados apenas tratamentos paliativos para o controle da mucosite, como o uso de agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e protetores de mucosa (SONIS, 2004; LALLA et al., 2014). Em adição às terapias tradicionais pouco efetivas, tem sido reportado o uso de tratamentos alternativos pautados no emprego de plantas com fins medicinais. Um exemplo, é o uso de folhas da espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann, pertencente à família Bignoniaceae. Relatos na literatura demonstraram propriedades dessa planta no tratamento de cólicas intestinais e diarreia sanguinolenta, sintomas esses característicos da mucosite (BARBOSA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012; MICHEL et al., 2015; TAKENAKA, 2017).

No Brasil, essa espécie se distribui desde a região amazônica até o Rio Grande do Sul, incluindo regiões de cerrado e mata atlântica (BEHRENS et al., 2012). Além disso, *Fridericia chica* consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema único de Saúde (RENISUS), o que indica sua capacidade de avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse para o Sistema único de Saúde (SUS) e, conseqüentemente, para a população (BRASIL, 2015).

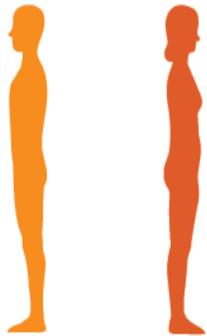
Os efeitos anti-inflamatórios e antitumorais por extratos de *Fridericia chica* já foram demonstrados por diversos modelos *in vivo* e *in vitro* (ZORN et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, ainda não há relatos na literatura do uso de extratos de *F. chica* em modelos de mucosite animal induzida pela associação dos quimioterápicos 5-fluoruracil e irinotecano, protocolo padrão para tratamento de tumores colorretais. Com base nessas evidências, torna-se importante investigar o papel desses extratos na redução da severidade da mucosite. Portanto, esse estudo avaliou o efeito de extrato hidroetanólico das folhas de *F. chica* na integridade da

mucosa intestinal em modelo murino de mucosite induzido pela associação de 5-fluorouracil e irinotecano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é, atualmente, a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Calcula-se, ainda, que esse número suba para 26,3 milhões até 2030, de acordo com o *National Cancer Institute* (NCI, 2018). Dentre os tipos mais frequentes estão: pulmão, mama, colorretal, próstata, pele não-melanoma e estômago. Dentre estes, os que apresentam maior taxa de mortalidade são: pulmão e colorretal (WHO, 2018). O impacto econômico do câncer é extremamente significativo e foi estimado, em 2010, em aproximadamente 1,16 trilhões de dólares no mundo (WHO, 2014). No Brasil, a incidência dos diferentes tipos de câncer pode ser observada na Figura 1, que lista as projeções para o ano de 2018, por sexo e localização do tumor (BRASIL, 2018).

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 - Incidência de câncer em homens e mulheres no Brasil (2018)

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2018)

Câncer é o termo utilizado para caracterizar um conjunto de enfermidades que possuem crescimento anormal e desorganizado de células, que podem resultar em uma invasão local e produzir metástases. O surgimento do câncer está relacionado ao fenômeno de transformação celular de células normais em células tumorais. Essa transformação envolve vários estágios, que resultam desde uma lesão pré-cancerosa

até uma lesão maligna (Figura 2). Tudo isso está relacionado à fatores internos e externos ao organismo, que irão promover alterações genéticas. O meio ambiente e os hábitos sociais e culturais destacam-se como fatores externos. As causas internas, estão relacionadas à fatores genéticos inerentes de cada indivíduo. Vale ressaltar que existe uma inter-relação entre esses fatores internos e externos, o que aumenta a probabilidade da transformação celular maligna (BRASIL, 2015).

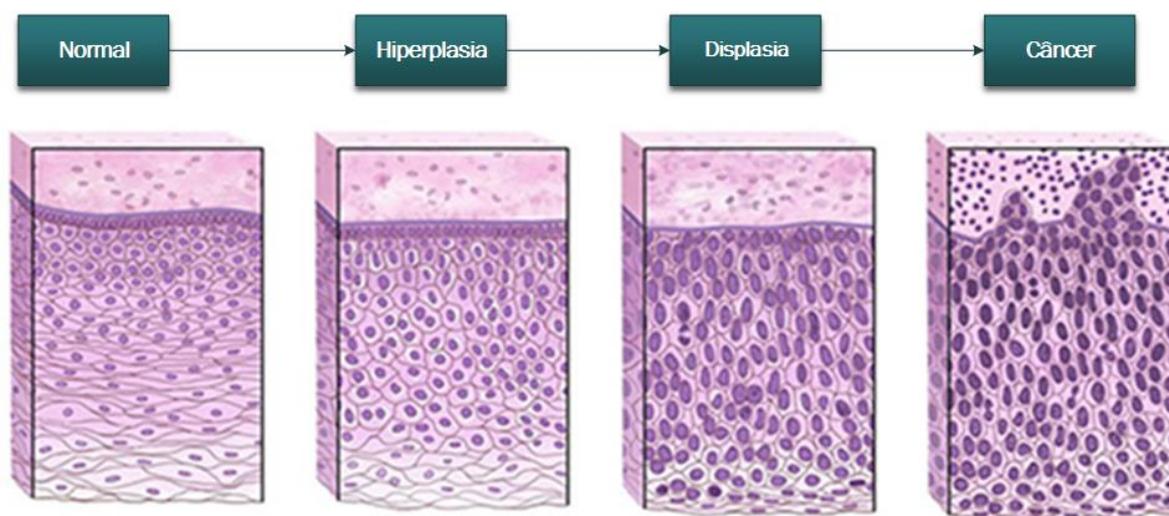


Figura 2 - Etiologia do câncer

Fonte: Adaptado de Cancer National Institute, 2015

2.2 Tratamento

O tratamento do câncer pode ser realizado por diferentes modalidades, sendo elas: cirurgia, transplante de medula óssea, terapias alvo, terapias hormonais, imunoterapias, radioterapia e quimioterapia (BRASIL, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Como cada tipo de câncer requer um tratamento específico, isso pode incluir a combinação de mais de uma modalidade (INCA, 2015; WHO, 2017).

Dentre todas as terapias para o câncer, a quimioterapia é a mais utilizada, seja como tratamento paliativo ou como adjuvante do tratamento cirúrgico (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011). Nesse método, são administradas por via endovenosa, substâncias citotóxicas que irão interromper ou inviabilizar etapas do ciclo de reprodução celular, levando a célula à morte. Entretanto, a ação dos agentes quimioterápicos ocorre também em células de tecidos funcionais, devido à combinação de baixa seletividade e elevada toxicidade (SAWADA et al., 2009).

Os quimioterápicos antineoplásicos são divididos em três grupos: agentes alquilantes, agentes antimetabólicos e agentes de produtos naturais (ALMEIDA, et al., 2005). A classe dos alquilantes é extremamente tóxica para aqueles tecidos que possuem alta taxa de proliferação, pois formam ligações covalentes com o DNA, impedindo sua replicação e podendo levar à efeitos adversos como leucopenia, anemia e plaquetopenia (FERDINANDI e FERREIRA, 2009). A classe dos antimetabólicos, têm sua ação sobre as reações enzimáticas, retardando o processo de divisão celular. Essa classe é muito utilizada para o tratamento de neoplasias colorretais, sendo o 5-fluorouracil um dos representantes mais bem-sucedidos para esse tipo de tratamento (CALABRESI e CHABNER, 2012 revisto por PEREIRA, 2015). Na grande maioria dos casos, o 5-fluorouracil é utilizado em combinação com outros fármacos, como o irinotecano, oxaliplatina e leucovorina (PERA et al., 2012).

2.3 5-Fluorouracil

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga muito utilizada em tratamentos oncológicos, principalmente em tumores gastrointestinais, de mama e que acometem as regiões de cabeça e pescoço (CHENG et al., 2012). Na grande maioria dos casos, o 5-FU é utilizado em combinação com outros fármacos, como irinotecano, leucovorina e oxaliplatina, visto que as taxas de resposta benéfica do 5-FU usado isoladamente não ultrapassam os 20% (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; PERA et al., 2012; PEREIRA, 2015).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do 5-FU variam de paciente para paciente, sendo os mais comumente relatados: mielossupressão, diarreia, mucosite e dermatite. A mucosite é o efeito adverso mais relatados por pacientes em uso do 5-FU, chegando a atingir cerca de 80% deles (SONIS, 2004).

A droga é um análogo da pirimidina, que se difere da uracila pela substituição de um átomo de hidrogênio no carbono 5 por um átomo de flúor (Figura 3) e por isso é considerado um antimetabólico da classe das fluopirimidinas. Seu desenvolvimento ocorreu nos anos 50 (KOENIG e PATEL, 1970), a partir da observação de células cancerosas de fígado de ratos, que utilizavam a uracila mais rapidamente que as células não cancerosas (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; LI et al., 2009).

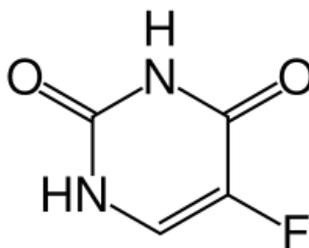


Figura 3 - Estrutura química do 5-FU

A conversão do 5-FU ocorre de maneira intracelular, resultando em 3 principais metabólitos ativos: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluoridina-trifosfato (FUTP). Apesar do principal mecanismo de ação ser a inibição da enzima timidilato sintase, esses metabólitos também causam danos diretos ao DNA e RNA (GREEM, 2000; LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; GIBSON e KEEFE, 2006). A FUTP é incorporada ao RNA e a FdUTP é incorporada ao DNA genômico, inibindo a enzima timidilato sintase, responsável pelo fornecimento de grupos timidilato para a síntese e reparo do DNA (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; LIU et al., 2009) (Figura 4).

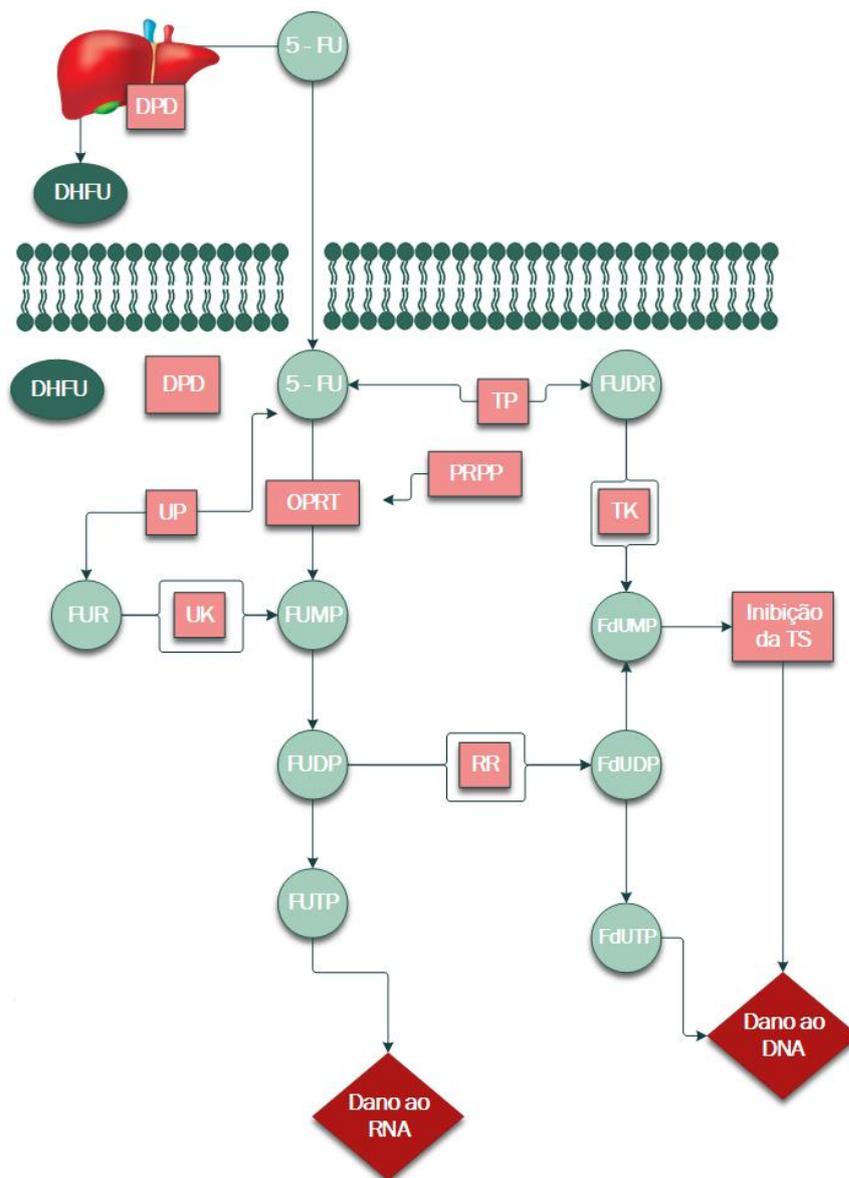


Figura 4 - Mecanismo de citotoxicidade e metabolismo do 5-FU

Fonte: Adaptado de Longley, Harkin e Johnston, 2003.

O 5-FU é convertido em 3 metabólitos principais: 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorotrifosfato (FUTP). O principal mecanismo de ativação do 5-FU é a conversão da FUTP. Posteriormente a fluoridina monofosfato (FUMP) é fosforilada em fluoridina difosfato (FUDP), que pode ser tanto metabolizada pelo metabólito ativo FUTP, como também pode ser convertida em fluordesoxiuridina difosfato (FdUDP). Em troca, a FdUDP pode ser fosforilada ou desfosforilada, gerando, respectivamente, os metabólitos ativos FdUTP e FdUMP. A via alternativa envolve a conversão do 5-FU em fluordesoxiuridina (FUDR). Posteriormente, a FUDR é fosforilada e transformada em FdUMP. Já a conversão do 5-FU em dihidrofluorouracil (DHFU), é mediada pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD) e é a etapa do catabolismo do 5-FU nas células saudáveis e tumorais. Até 80% do 5-FU administrado é quebrado pela DPD no fígado.

2.4 Irinotecano

O cloridrato de irinotecano (CPT-11) (Figura 5) é um composto derivado da camptotecina, um tipo de alcaloide isolado da planta *Camptotheca acuminata*, nativa da China e do Tibet (ALIMONT et al., 2004). Os primeiros estudos clínicos com a formulação comercializada, foram realizados no Japão, em 1994, para tratamento de pacientes com câncer de pulmão, cervical e ovariano. Nos Estados Unidos, o composto foi aprovado em 1996, para uso em pacientes com câncer colorretal refratário, no qual o irinotecano associado ao 5-fluorouracil é considerado a primeira linha de tratamento (CHABNER e LONGO, 2002).

Esse quimioterápico é utilizado principalmente no tratamento de tumores colorretais, o terceiro tipo mais comum de câncer no mundo (SHIKE et al., 1990 em DEAN, 2018). Além disso, é frequentemente utilizado em combinação com outras drogas, como o protocolo FOLFIRI (ácido fólico, 5-fluorouracil e irinotecano). Essa associação é adotada quando os pacientes apresentam recidiva do câncer, progressão do tumor após tratamento inicial ou também em casos de tumores colorretais avançados ou metastáticos (DEAN, 2018).

Assim como a camptotecina, o irinotecano é inibidor da enzima topoisomerase I, enzima responsável por catalisar vários processos nucleares como a helicoidização, replicação, recombinação e reparo do DNA. Durante o processo de transcrição, a topoisomerase I permite quebras na cadeia de DNA e conservação da energia do rompimento das ligações fosfodiéster, sendo essa utilizada posteriormente para restauração das mesmas ligações (DIAS et al., 2012).

O irinotecano é uma pró-droga e seu metabolismo é realizado pela enzima carboxilesterase, responsável por convertê-lo em seu metabólito ativo, SN-38. Esse metabólito impede a religação das fitas de DNA, causando danos irreversíveis à essa molécula. Durante seu processo de metabolização, o metabólito ativo SN-38, sofre desglucuronidação, se transformando no metabólito inativo SN-38G, excretado pela via biliar (BASTOS et al., 2016; GIBSON e KEEFE, 2006).

Além de ser um substrato da enzima carboxilesterase, o irinotecano é também metabolizado pelo complexo enzimático do citocromo P450, gerando os metabólitos (7-etil10-[4-N-(5-ácido aminopentoico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) (APC) e

[7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)- carboniloxicamptotecina] (NPC), de menor atividade antitumoral (CHESTER et al., 2003). Nesta via, a enzima carboxilesterase (CE) também é a responsável por metabolizar o NPC completamente em SN-38, (MATHIJSEN et al., 2004) que também é eliminado por meio da conjugação com a enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT), formando o SN-38 glucuronídeo (SN-38G), metabólito inativo (CHABNER e LONGO, 2002; CHESTER et al., 2003; MATHIJSEN et al., 2004).

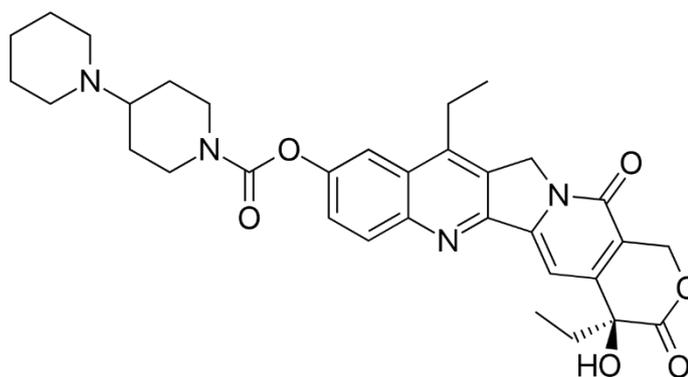


Figura 5 - Estrutura química do irinotecano

Em relação à eliminação, esta pode ocorrer através das fezes, excreção urinária, biliar e metabolismo hepático (CHABNER e LONGO, 2001; ALIMONT et al., 2004). Aproximadamente 16% da dose injetada de irinotecano são excretadas na urina sem ser metabolizada. Já os conjugados e não conjugados, SN-38G e SN-38, são excretados através da bile. Uma vez no intestino, parte do fármaco é reativada em SN-38 por bactérias intestinais produtoras de β -glucuronidase, como a *Escherichia coli*, completando o ciclo entero-hepático do fármaco (TAKASUNA et al., 1998) (Figura 6).

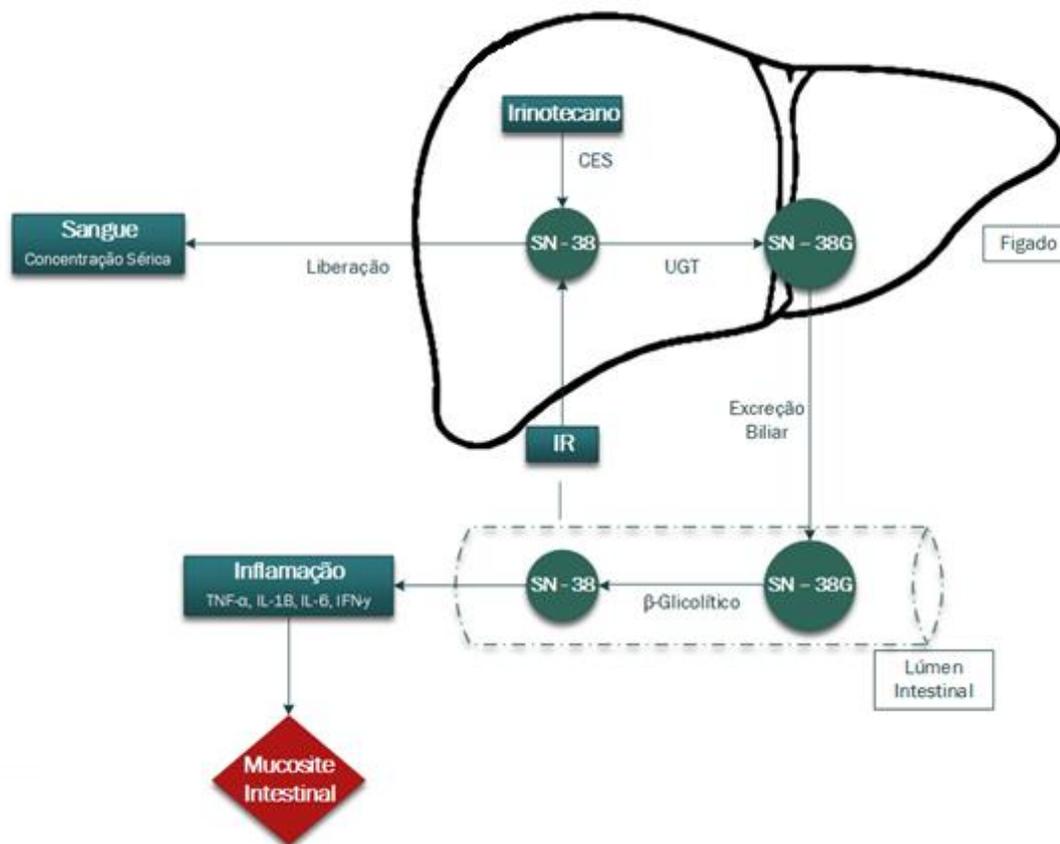


Figura 6 - Metabolismo e mecanismo de citotoxicidade do irinotecano

Fonte: Adaptado de Pessoa et al., 2018

O metabolismo do irinotecano é realizado no fígado, onde ele é convertido pela enzima carboxilesterase (CES) em seu metabólito ativo SN-38. Durante seu processo de metabolização, o metabólito ativo SN-38, sofre desglucuronidação e se transforma no metabólito inativo SN-38G, através da enzima glucuronosiltransferase (UGT), que é excretado pela via biliar. No intestino, uma parte do fármaco pode ser reativada em SN-38 através das bactérias produtoras de β -glucuronidase, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ), gerando, como consequência, a mucosite intestinal.

No contexto do câncer, o irinotecano tem sido utilizado para tratamento de uma grande variedade de tumores, destacando-se os de origem pancreática, pulmonar e colorretais, seja como agente único ou combinado com outros fármacos (ROSATI et al., 2002; CHESTER et al., 2003; de MAN et al., 2018). Além de ser muito utilizado como tratamento de primeira e segunda linha para o câncer colorretal, o fármaco já teve os seus efeitos demonstrados na terapia do linfoma de Hodgkin's (RIBRAG et al., 2003) e nos tumores de pulmão (LANGER, 2004; ROCHA-LIMA et al., 2007),

pâncreas (ROCHA-LIMA et al., 2001), mama (PEREZ et al., 2004), estômago (AJANI, 2005), colo de útero (IRVIN et al., 1998) e ovário (FUJI et al., 2002).

Os principais fatores limitantes para determinar a dose de irinotecano a ser administrada são os seus efeitos adversos, dos quais se destacam diarreia severa e leucopenia. Aproximadamente 60-80% dos pacientes sofrem com a diarreia, que pode se apresentar de duas formas: a aguda, que pode ser aliviada com o uso de atropina, e a tardia, que pode ser aliviada com hidratação intensa e reposição de eletrólitos. Além disso, ocorrerem alterações histológicas do trato gastrointestinal em decorrência da administração de irinotecano, ocasionando desbalanço na secreção e absorção no intestino delgado (STEIN; VOIGT e JORDAN, 2010).

2.5 Associação de 5-fluourouracil e irinotecano

O 5-FU foi por muito tempo a única terapia considerada eficaz para o tratamento de diversas neoplasias, especialmente as colorretais. Entretanto, o surgimento de respostas limitadas à essa terapia, levou à necessidade de conjugação da mesma com outras já existentes. Sendo assim, começou-se a estudar o uso do irinotecano com o 5-FU (GRIVICICH, 1999).

O irinotecano possui um mecanismo de ação exclusivo, o que permite sua associação com outras drogas quimioterápicas sem ocasionar nenhum tipo de reação cruzada (POZZO et al., 2004). Sendo assim, a associação com o 5-FU têm se demonstrado uma estratégia promissora e na clínica, a utilização desses agentes em combinação ou em determinada sequência tem apresentado bons resultados (SEZER, USTA e CICIN, 2009).

Em estudos clínicos de fase I para tratamento de câncer de cólon, por exemplo, pacientes tratados com irinotecano previamente ao 5-FU, demonstraram um acúmulo intracelular de irinotecano, sem sinais de toxicidade severa (GRIVICICH, 1999). Em um estudo clínico de fase II, também para neoplasia de cólon, foi realizada a administração de 5-FU seguida pela administração de irinotecano, e não foram observadas reações cruzadas entre as duas drogas. Foi observado certo nível de toxicidade, porém, controlada (GRIVICICH, 1999).

A utilização de fármacos em associação foi uma alternativa encontrada para a resistência que muitos tumores apresentam, o que gera um impacto negativo para o

tratamento. Entretanto, apesar de mais efetiva, a associação gera efeitos adversos devido à toxicidade, destacando-se a diarreia, mielossupressão e a mucosite (AZRAK et al., 2004).

2.6 Mucosite

Mucosite, é o termo utilizado para descrever as alterações na mucosa de pacientes em tratamento quimio e radioterápico. Tais alterações podem acometer o trato gastrointestinal de maneira geral ou localizada. No caso do acometimento da mucosa intestinal, há o desenvolvimento da mucosite gastrointestinal (VILLA e SONIS, 2015). A mucosite não é apenas um efeito adverso ao tratamento antineoplásico, mas também afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Isso porque limita a sua tolerabilidade ao tratamento, gera lesões no epitélio, restringe a ingestão de alimentos, altera componentes da microbiota intestinal e ainda pode ser sítio secundário para infecções, ocasionando a interrupção do tratamento, bem como gerando maior tempo de internação e custos para o sistema de saúde (SONIS, 2010; VILLA e SONIS, 2015).

Essa patologia, afeta cerca de 40% dos pacientes sob regime quimioterápico com utilização de doses padrão e, para pacientes em tratamento com doses mais elevadas, esse número pode chegar a 100% (KWON, 2016). As drogas antineoplásicas mais associadas ao desenvolvimento da mucosite são as classes dos antimetabólicos, antraciclinas e taxanos (PICO et al., 1998). Como resultado de sua baixa seletividade e do alto índice de divisão celular das células do epitélio intestinal, essas drogas acabam interferindo, de maneira negativa, nos mecanismos de divisão celular e renovação epitelial, levando à perda de estrutura e função do intestino (DUNCAN e GRANT, 2003; SONIS, 2004).

Os danos causados a mucosa são dolorosos e causam muito desconforto, sendo extremamente indesejados como efeito colateral à terapia antitumoral. Além disso, a mucosite pode alterar o curso do tratamento antitumoral, pois cerca de 60% dos pacientes que apresentam mucosite, por exemplo, irão requerer redução das doses de quimioterápico aplicadas (KEEFE et al., 2007; ARAÚJO et al., 2015). Devido à desestruturação do epitélio, os pacientes podem desenvolver infecções sistêmicas, que tendem a evoluir para sepse, podendo levar também à morte (ARAÚJO et al.,

2015). Infecções por cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-negativos e *Candida* spp. podem ocorrer em ciclos de quimioterapia complicados pela mucosite (SAMPSOM, NANJAPPA e GREENE, 2017).

Muito do que se conhece hoje sobre a mucosite intestinal foi inferido a partir de estudos prévios realizados na mucosa oral, pois a mesma é mais acessível para a mensuração e caracterização dos danos. Contudo, apesar de serem bem estudadas, as alterações que envolvem a mucosa oral são diferentes daquelas que envolvem outras partes do epitélio intestinal (GIFONI, 2012).

2.7 Fisiopatologia da mucosite

O desenvolvimento da mucosite é um processo complexo e multifatorial, envolvendo não só diretamente o epitélio, mas as células e os tecidos adjacentes (VILLA e SONIS, 2015). O dano à mucosa é descrito em cinco fases distintas, para melhor compreensão, mas deve-se considerar que a mucosite ocorre molecularmente de maneira rápida, dinâmica e simultânea em todos os tecidos (Figura 7). Essas fases são: iniciação, resposta ao dano primário ou geração de sinais, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (SONIS, 2004; HARRIS, 2006; TOUCHEFU et al., 2014).

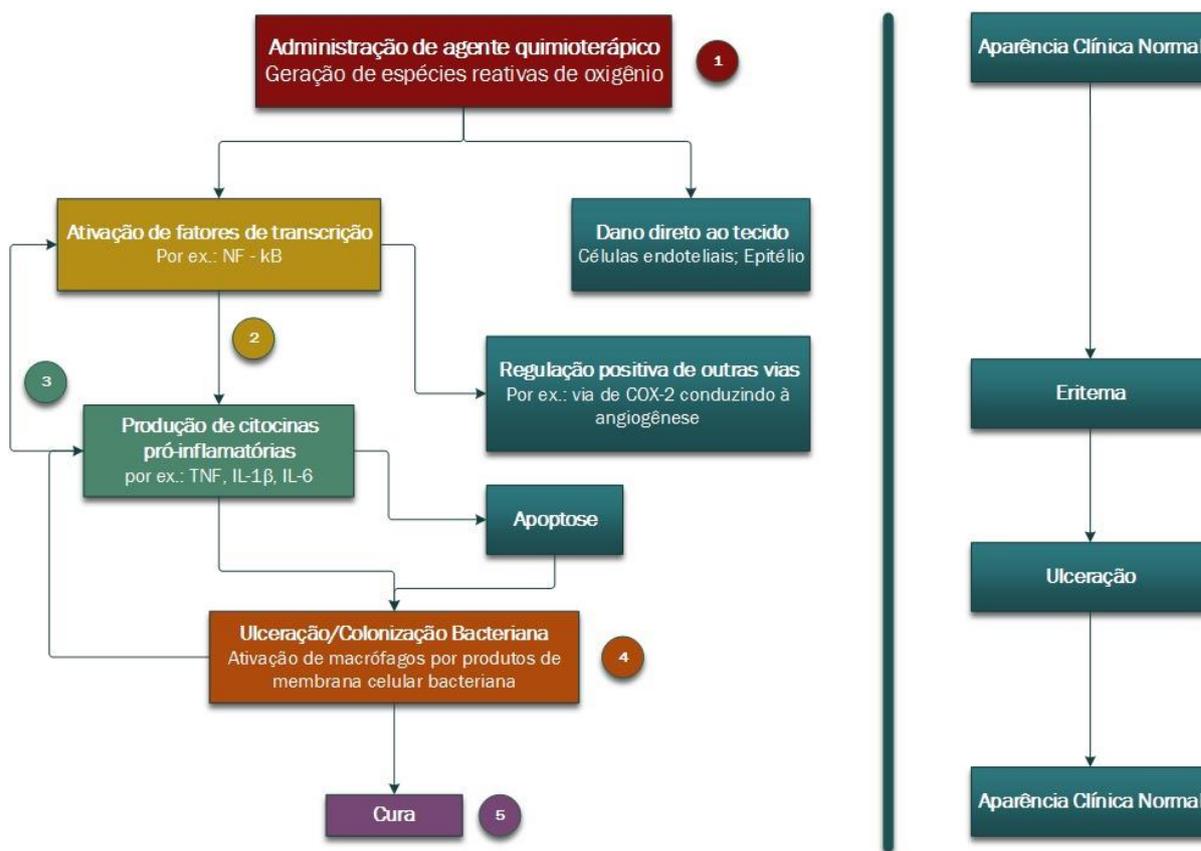


Figura 7 - Diagrama das cinco fases da mucosite intestinal

Fonte: Adaptado de Logan e colaboradores, 2007

A primeira fase (Figura 8), iniciação, é caracterizada pelo dano ao DNA em decorrência da administração das substâncias citotóxicas, rapidamente após a sua administração. Essa fase é caracterizada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse oxidativo e ativação da resposta imune inata (CINAUSERO e al., 2017). O estresse oxidativo leva a danos nas células e tecidos, liberação de macrófagos e desencadeia a cascata de vias inflamatórias, o que inclui o fator nuclear *kappa* B (NF-κB) (SULTANI et al., 2012). A toxicidade das ERO's é atribuída ao radical hidroxila (OH[•]), que leva a desestabilização da molécula de DNA e inativação de enzimas importantes no transporte de membranas (SCULLY, EPSTEIN e SONIS, 2004).

A ativação do NF-κB é um dos elementos chave na gênese da mucosite por modular a expressão gênica, gerando sinais (segunda fase da mucosite) responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), as interleucinas 1β e 6 (IL-1β e IL-6) e enzimas inflamatórias como a cicloxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Além disso, todo

esse processo leva à produção de moléculas de adesão e angiogênese (SONIS, 2001; SONIS, 2004; FERREIRA et al., 2012). A presença dessas citocinas e enzimas inflamatórias, parecem desencadear um dano precoce à mucosa, reduzindo a oxigenação do epitélio e, conseqüentemente, causando dano as células basais e epiteliais (SONIS, 2004) (Figura 8).

A fase de amplificação de sinais, terceira fase da mucosite, é marcada pelo *feedback* positivo produzido pelas citocinas pró-inflamatórias, que influenciam a síntese de outras citocinas, bem como mais ativação de NF- κ B e do COX-2 (HARRIS, 2006; SCULLY, EPSTEIN e SONIS, 2004) (Figura 8). Além disso, componentes envolvidos na apoptose, como caspase 3, e os fatores de transcrição p53 e p21, também são ativados durante essa fase de amplificação (KEEFE, GIBSON e HAUER-JENSEN, 2004).

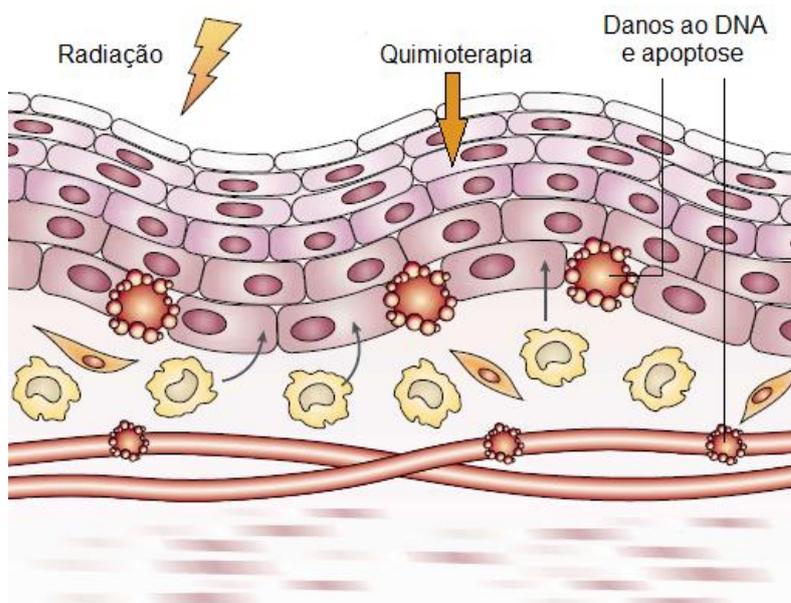


Figura 8 - Fases de iniciação, geração e amplificação de sinais da mucosite intestinal

Fonte: Adaptado de Sonis, 2004

A quarta fase da mucosite, a ulceração, é caracterizada pela desestruturação da mucosa, com conseqüente rompimento da integridade do epitélio gastrointestinal e formação de úlceras (Figura 9). No local da ulceração, há maior risco de colonização bacteriana, o que aumenta o infiltrado de células mononucleares e, conseqüentemente, geração de citocinas pró-inflamatórias adicionais (SONIS, 2004; HARRIS, 2006; SULTANI et al., 2012). Além disso, a colonização por microrganismos

patogênicos, pode ocasionar bacteremia e sepse naqueles pacientes que se encontram neutropênicos (SONIS, 2004; BOWEN et al., 2006). Essa fase é clinicamente a mais evidente e pode impactar diretamente no bem-estar do paciente, bem como no curso do tratamento (SONIS, 1998).

Na quinta e última fase da mucosite, a cicatrização, ocorre a proliferação celular e regeneração da mucosa, caracterizada pela restauração das criptas, vilosidades e das superfícies absorptivas do intestino (DUNCAN e GRANT, 2003) (Figura 9). A proliferação e a regeneração da mucosa ocorrem devido à sinais liberados pelo mesênquima da camada submucosa e pela matriz extracelular (SONIS, 2004). Esse processo de cicatrização é agudo e ocorre logo após a interrupção do tratamento quimioterápico. Juntamente com a renovação do epitélio intestinal é observado o reestabelecimento da microbiota (LIU et al., 2009).

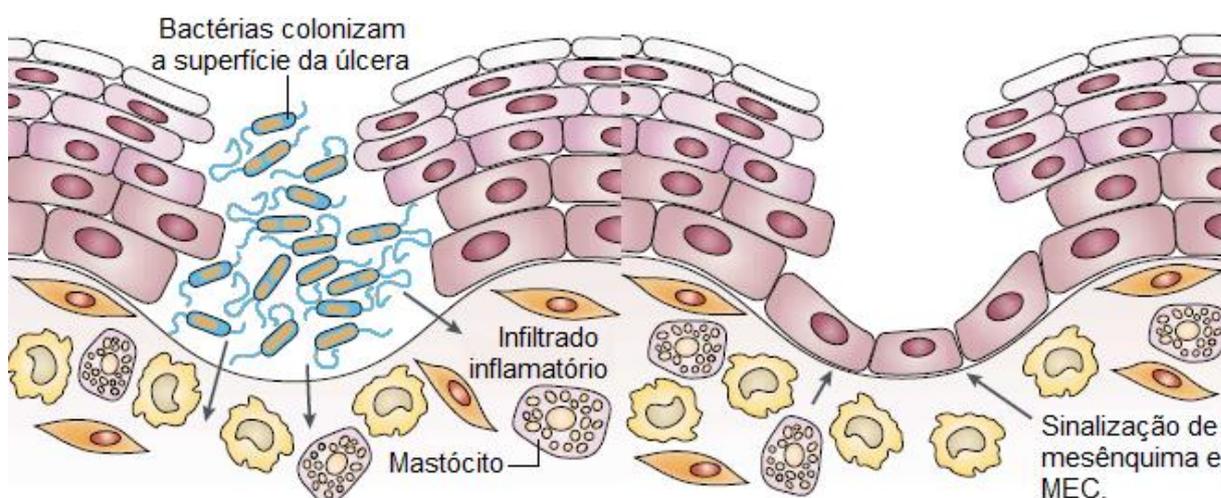


Figura 9 - Fases de ulceração e cicatrização da mucosite intestinal

Fonte: Adaptado de Sonis, 2004

2.8 Manifestações clínicas da mucosite

As principais complicações da mucosite são náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. A mucosite também pode se apresentar de uma forma mais severa, na qual o paciente desenvolve ulcerações que penetram até a camada submucosa, causando dor intensa (ARAÚJO et al., 2015). Tais sintomas comprometem a qualidade de vida do paciente e acabam prejudicando o tratamento antineoplásico. Entretanto, a manifestação e a severidade da mucosite irão depender de fatores

como: dose do quimioterápico, associação ou não de agentes antineoplásicos, combinação de tratamentos quimio e radioterápicos, tempo de tratamento, gênero, idade e massa corporal (KEEFE et al., 2007; BLIJLEVENS e SONIS, 2007).

Além de todo o desconforto que a mucosite causa, o impacto econômico também deve ser considerado. Isso porque muitos pacientes acometidos pela inflamação necessitam ser hospitalizados para controle da dor e hidratação, já que a inflamação e diarreia causam grande perda de peso. Além disso, pacientes com leucopenia em decorrência do tratamento quimioterápico, estão sujeitos a inflamações secundárias e a processos de bacteremia, fungemia e sepse (SONIS, 2004; CHANSKY, BENEDETTI e MACDONALD, 2005). Pacientes que realizam transplante de células hematopoiéticas e desenvolvem mucosite, necessitam permanecer internados por mais tempo, o que gera um maior custo (CHANSKY, BENEDETTI e MACDONALD, 2005). Em um estudo recente realizado nos Estados Unidos, foi estimada uma elevação de U\$\$ 20.892 a cada ciclo de quimioterapia (custo médio de U\$\$ 3.500 para cada paciente), para os casos em que o paciente desenvolve mucosite (MCCULLOUGH et al., 2017).

2.9 Tratamento da mucosite

Ainda não existem tratamentos curativos ou profiláticos para a mucosite intestinal (LALLA, 2017). Por ser um processo com mecanismos fisiopatológicos complexos e ainda pouco elucidados, um melhor entendimento e definição dos eventos celulares e moleculares que levam à lesão da mucosa podem permitir o desenvolvimento de intervenções potencialmente terapêuticas (LALLA, 2017).

O manejo clínico atual da mucosite baseia-se na terapia de suporte, ou seja, é focado nos sintomas e suas complicações, nas quais podem ser utilizadas intervenções farmacológicas ou não (VAN SEBILLE, 2015). As medidas não farmacológicas incluem, sobretudo, a hidratação com fluidos contendo sal e glicose. Também é incluída uma dieta equilibrada, com o intuito de evitar a ingestão de alimentos que possam contribuir para o quadro de diarreia (KRISHNAMURTHI, 2017).

Dentre as medidas farmacológicas, são utilizados fármacos como a loperamida, responsável por agir no plexo mioentérico e diminuir a motilidade intestinal propulsiva, atenuando os sintomas da diarreia (REGNARD, et al., 2011).

Entretanto, estudos demonstraram que pacientes com mucosite induzida pelo uso do irinotecano e tratados com loperamida apresentaram melhora no quadro de diarreia, mas não tiveram nenhuma evolução no quadro de mucosite intestinal, o que confirma o tratamento apenas dos sintomas e não da causa da mucosite (LIMA-JÚNIOR et al., 2012).

Outro fármaco também utilizado, é o octreotida, que também possui ação antidiarreica. A octreotida é um análogo da somatostatina e atua diminuindo a motilidade intestinal e a secreção de fluidos intestinais, atenuando a diarreia. Contudo, esse fármaco é contraindicado para pacientes que já fizeram tratamento prévio com a loperamida e tiveram reincidência da diarreia (BARBOUNIS et al., 2011).

Os antibióticos também são outra opção terapêutica para os efeitos colaterais da mucosite. Estudos utilizando a combinação dos antibióticos bacitracina e neomicina demonstraram efeitos protetivos para a mucosite causada pela combinação de irinotecano e 5-fluorouracil (SCHMITTEL et al., 2004; STRINGER et al., 2007). Contudo, essa última conduta é questionável, pois apesar de ser de conhecimento que tanto o irinotecano quanto o 5-FU são capazes de provocar alterações na microbiota, os antibióticos também contribuem para o desequilíbrio bacteriano, o que poderia promover infecções bacterianas por patógenos específicos e quadros de diarreia ainda mais severa (PÉREZ-COBAS et al., 2012; SWAMI, GOEL e MANI, 2013; COSTA et al., 2014).

Diante desse contexto, os modelos animais para estudo da mucosite são extremamente importantes para a busca por novos agentes terapêuticos que atuem diretamente na causa da mucosite e não apenas nos sinais e sintomas, sendo efetivos para o manejo e tratamento dessa condição (dos SANTOS FILHO et al., 2016; SANGILD et al., 2018). Dentre os estudos experimentais que avaliam substâncias para manejo da mucosite intestinal, destacam-se a utilização de ácidos graxos (GENEROSO et al., 2015), aminoácidos (BEUTHEU et al., 2014), fitoterápicos (ALENCAR et al., 2017), antagonistas do receptor de 5-hidroxitriptamina 3 (5HT₃) (YASUDA et al., 2013) e probióticos (TRINDADE et al., 2018).

Atualmente, o uso de probióticos tem sido proposto para aliviar a diarreia provocada pelos tratamentos quimioterápico e antibioticoterapia (MANI, BOELSTERLI e REDINBO, 2014). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que

podem ser administrados na forma de alimentos ou formulações, e que conferem benefícios para a manutenção do balanço microbiano no trato gastrointestinal (FULLER, revisto por MEGO et al., 2015). Por possuírem a capacidade de competir com bactérias patogênicas, modulam a integridade da barreira epitelial e as células do sistema imune, produzem agentes antimicrobianos e ativam citocinas anti-inflamatórias, sendo potencialmente eficazes no tratamento da mucosite (TOUCHEFEU et al., 2014).

Embora alguns estudos pré-clínicos tenham demonstrado efeitos benéficos do uso de probióticos para a redução dos efeitos decorrentes da mucosite intestinal (TRINDADE et al., 2018; DE JESUS et al., 2019), o uso de microrganismos vivos em pacientes imunossuprimidos, bem como em pacientes oncológicos é ainda muito questionável, pois não há um consenso sobre sua segurança, uma vez que a chance de translocação e o risco de desenvolvimento de infecções é muito elevado nesses pacientes (THOMSEN, CLARKE e VIETTA, 2018).

O uso de imunonutrientes, como ácidos graxos e vitaminas, também é uma alternativa que tem demonstrado resultados promissores no tratamento ou atenuação dos efeitos causados pela mucosite (BODIGA e al., 2012; GENEROSO et al., 2015; JUSTINO et al., 2015; BARROS et al., 2016). Contudo, tais alternativas terapêuticas ainda não são utilizadas na prática clínica (LALLA, 2014), principalmente porque os estudos realizados ainda possuem defasagens e não há um consenso sobre os resultados obtidos (SOUZA e GALLON, 2017).

Ainda como alternativa, a medicina tradicional faz o uso de plantas na busca de alívio e cura de doenças como a mucosite. Compostos naturais como *Aloe vera* (Babosa), *Matricaria chamomilla* (Camomila) e derivados da curcumina, já estão em fase clínica II de avaliação em indivíduos com mucosite, devido seu sucesso terapêutico em ensaios pré-clínicos (CINAUSERO et al., 2017). No Brasil, o uso de folhas da espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann é relatado pela população e registros na literatura demonstraram propriedades dessa planta no tratamento de cólicas intestinais e diarreia sanguinolenta, sintomas característicos da mucosite (BEHRENS, TELLIS e CHAGAS, 2012; RIBEIRO et al., 2012; TAKENAKA, 2017). Além disso, esse extrato já foi avaliado em modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU, apresentando grande efetividade (TAKENAKA, 2017).

Estudos como esses evidenciam que os compostos naturais podem ser uma fonte de novas substâncias que atuem não apenas nos sintomas da mucosite, mas também nas causas, reforçando ainda mais a importância de se estudar seus mecanismos e seus efeitos. Somado a isso, tem-se o uso popular comprovado há anos pela humanidade e o baixo custo associado ao produto final (BASTOS et al., 2016).

2.10 Barreira intestinal

A superfície do trato gastrointestinal é revestida por um epitélio colunar simples e composta por células epiteliais altamente especializadas, cobrem toda a superfície dos órgãos que compõem o trato gastrointestinal. Essas células, formam uma camada física composta, majoritariamente, por enterócitos, que regulam a absorção de nutrientes por meio de canais, transportadores e receptores específicos (ULLUWISHEWA et al., 2011) (Figura 10 - Desenho esquemático da mucosa do trato gastrointestinal).

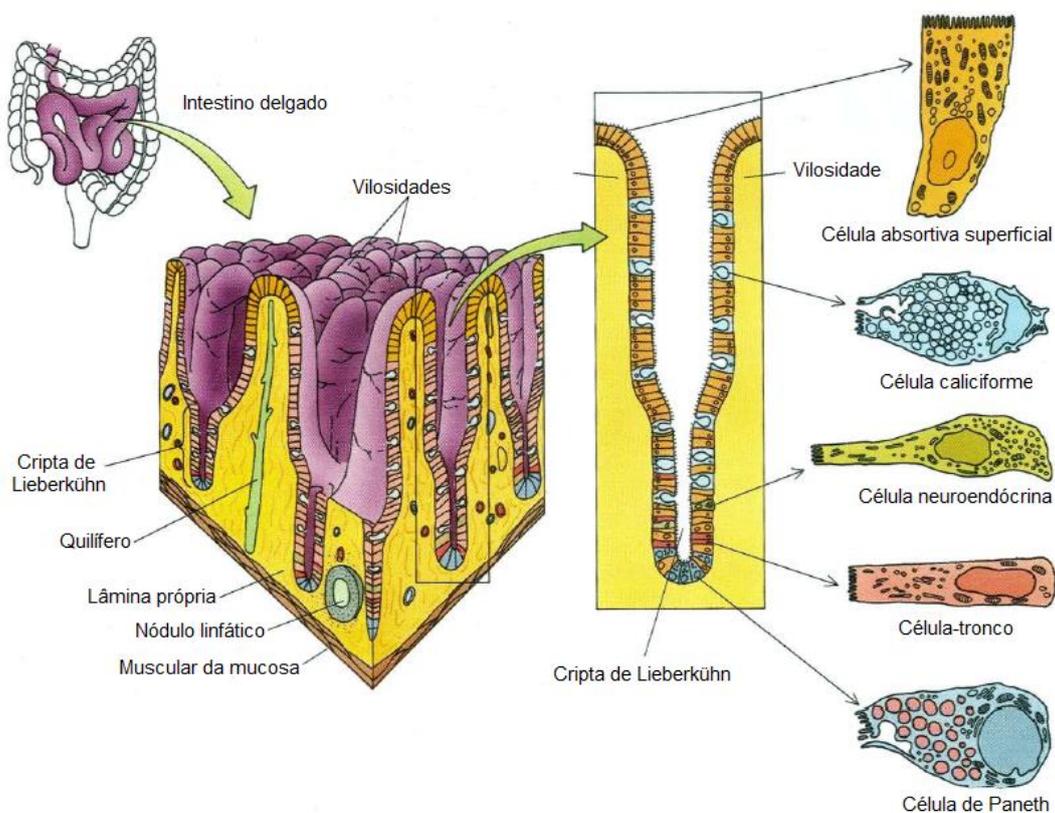


Figura 10 - Desenho esquemático da mucosa do trato gastrointestinal

Fonte: Adaptado de GARTNER e HIATT, 2003

A camada de muco, um desses elementos, é formada pelas mucinas produzidas pelas células caliciformes, além de peptídeos antimicrobianos e defensinas (AYABE, et al., 2000). Por último, os elementos imunológicos caracterizam-se pelas células M e pelas células apresentadoras de antígeno (APC), localizadas na lâmina própria. As células M constantemente apresentam antígenos luminais para as células APC, induzindo a produção de fatores imunossupressores, como IL-10 e TGF- β . Já os antígenos nocivos, são também reconhecidos pelas células APC e ativam a cascata inflamatória através da ativação de células T (PABST e MOWAT, 2012).

A barreira intestinal é a maior interface entre o meio externo e o meio interno, e é seletiva, permitindo a absorção de nutrientes e água, bem como limitando o contato com patógenos e antígenos e garantindo a homeostase (AYABE, et al., 2000). Para desempenhar tal função, ela conta com diversos elementos imunes, bioquímicos e físicos (AYABE, et al., 2000).

O transporte de moléculas, íons, solutos e substâncias através da barreira epitelial intestinal pode ocorrer por duas vias: transcelular e paracelular. A via transcelular é a principal via de absorção de nutrientes, principalmente quando as substâncias são hidrofóbicas, sendo regulada por canais e transportadores tamanho e íon-dependentes (SUZUKI, 2013; ANDRADE, 2016). Por essa via, também ocorre a passagem de antígenos luminais, seletivamente e em pequenas quantidades, para ativação do sistema imunológico (ANDRADE, 2016). A via paracelular, ocorre através dos espaços presentes entre os enterócitos, sendo regulada pelas junções firmes, que reagem de acordo com estímulos, como agentes patogênicos, produtos bacterianos e citocinas (SUZUKI, 2013; ANDRADE, 2016).

Como mencionado anteriormente, a estrutura da barreira intestinal não é estática e as junções firmes se abrem e fecham continuamente diante de uma variedade de estímulos (ANDRADE et al., 2015). Estímulos como estado nutricional, estresse, presença de patógenos virais e bacterianos e desafios imunológicos, podem atuar de maneira negativa sobre essa barreira e levar ao fenômeno conhecido como perda da integridade da barreira. Como consequência, pode-se gerar um desequilíbrio da resposta imunológica, que, por sua vez, pode levar a lesões epiteliais e surgimento de doenças (ANDRADE, 2016).

2.11 Permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal (PI) é definida como a passagem de diferentes substâncias do lúmen intestinal para o interior do organismo, por meio de um processo de difusão não-mediado (BARROS, 2016; KEITA e SODERHOLM, 2018) e ocorre pelas vias para e transcelular. Em condições fisiológicas normais, a via paracelular é impermeável a moléculas do tamanho de proteínas, por exemplo, constituindo-se uma barreira eficaz contra moléculas antigênicas (KEITA e SODERHOLM, 2018). Entretanto, situações que levem a perda da homeostase dessa barreira intestinal, como patologias, medicamentos ou dietas, culminam na passagem de antígenos que podem iniciar ou manter um quadro inflamatório que, por consequência, leva ao aparecimento de doenças (TAKENAKA, 2017; KEITA e SODERHOLM, 2018).

O aumento da permeabilidade intestinal pode ocorrer como consequência da administração de medicamentos quimioterápicos, visto que os mesmos podem levar à necrose das criptas, atrofia das vilosidades e aumento do infiltrado inflamatório (TAKENAKA, 2017). Dessa forma, observa-se perda da estrutura do epitélio e consequente translocação de moléculas e microrganismos para a corrente sanguínea. Esse tipo de alteração é relatado na literatura e também por trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa com o uso do agente antineoplásico 5-FU (FERREIRA, et al., 2012; MAIOLI, et al., 2014; GENEROSO, et al., 2015; BARROS, et al., 2016; TAKENAKA, 2017; GALDINO, et al., 2018; TRINDADE, 2018).

Considerando o contexto apresentado, o aumento da permeabilidade intestinal é um importante indicador de dano epitelial nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, uma vez que antecede o surgimento de lesões e sintomas, sendo de grande interesse clínico o desenvolvimento de métodos de detecção sensíveis, eficientes e não invasivos que possam detectar aumento de PI (ARRIETA, et al., 2006; TOUCHEFEU, et al., 2014; BARROS, 2016; TAKENAKA, 2017).

Os testes de permeabilidade intestinal consistem em métodos não invasivos, que permitem avaliar a permeabilidade e conduzem para uma terapia mais efetiva. A maioria desses testes utilizam substâncias não metabolizáveis com diferentes pesos moleculares, como a lactulose, manitol e fármacos. Essas substâncias, ao serem absorvidas, passam do epitélio intestinal para o plasma e, em seguida, são eliminadas pela via urinária, sendo consequentemente dosadas na urina (ANDRADE, 2016).

Em nosso grupo de pesquisa é utilizado o método de radiomarcção do fármaco dietilenotriaminopentacético com o radioisótopo metaestável tecnécio (DTPA-99mTc). Esse radiofármaco é amplamente utilizado na medicina nuclear para estudo dinâmico dos rins. O DTPA é uma molécula hidrossolúvel, de peso molecular de cerca de 500 Da, características ideais para avaliação da PI, uma vez que a membrana dos enterócitos é hidrofóbica. O tecnécio-99 metaestável, é um isótopo radioativo artificial obtido através da desintegração do molibidênio-99, proveniente da fissão do urânio. A escolha pelo uso do tecnécio-99m, tanto para a clínica quanto para a pesquisa, se dá pelo seu baixo custo, alta disponibilidade, tempo de meia-vida curto de 6 horas e emissão de radiação gama de baixa energia (140 keV) (DINIZ, et al., 2005; ANDRADE, 2016).

2.12 Translocação bacteriana

Os termos “integridade intestinal” e “permeabilidade intestinal” são termos que possuem uma conexão e que muitas vezes são utilizados como sinônimos, uma vez que estão fortemente interligados. A integridade intestinal é definida como uma barreira intestinal intacta, ao passo de que a permeabilidade intestinal, como já mencionado anteriormente, refere-se à passagem de substâncias e moléculas através das células epiteliais (NAGPAL e YADAV, 2017).

Alterações na integridade desse epitélio podem, então, levar ao aumento de permeabilidade, o que pode culminar como consequência, na passagem de bactérias do lúmen do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea (NAGPAL e YADAV, 2017). Podem interferir na integridade do epitélio, por exemplo, eventos inflamatórios, que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias e de fatores de transcrição que, por sua vez, alteram a estrutura das células epiteliais (NAGPAL e YADAV, 2017). Como exemplos desses eventos destacam-se a mucosite e as doenças inflamatórias intestinais, como a colite e doença de Crohn (ANDRADE et al., 2015; TAKENAKA, 2017).

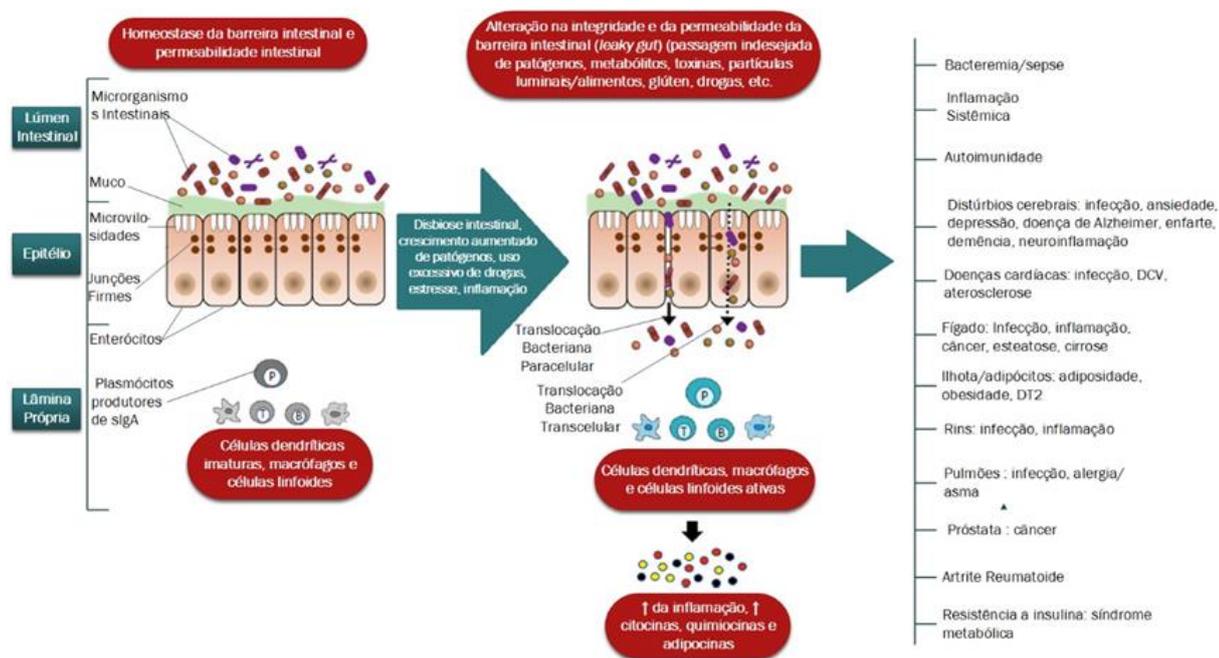


Figura 11 - Efeitos ocasionados pela alteração na permeabilidade do epitélio

Fonte: Adaptado de NAGPAL e YADAV, 2017

A translocação bacteriana pode ser definida como a passagem de bactérias antes contidas no trato gastrointestinal através da barreira mucosa, o que permite o alcance de órgãos estéreis, eventualmente gerando algum tipo de doença ou até mesmo levando ao processo de septicemia (NAGPAL e YADAV, 2017). Essas bactérias atingem, primeiramente, os linfonodos mesentéricos e, a partir daí, caem na corrente sanguínea e, conseqüentemente, nos órgãos (ANDRADE, 2016). Vale ressaltar que o termo translocação bacteriana não se refere apenas à passagem de bactérias vivas intactas, mas também às suas toxinas e subprodutos (NAGPAL e YADAV, 2017). Baixos níveis de translocação acontecem normalmente em indivíduos saudáveis, processo fisiológico natural necessário para a geração de células para o sistema imune (LICHTMAN, 2001; ANDRADE et al., 2015).

Dependendo da espécie de bactéria, seus subprodutos e compostos, além do estado fisiológico do hospedeiro, essa translocação pode ocorrer por duas vias: paracelular e transcelular (NAGPAL e YADAV, 2017) (Figura 11).

Em condições fisiológicas, as bactérias que translocam podem ser fagocitadas antes de alcançarem a circulação linfática e atingirem os linfonodos mesentéricos ou a circulação sistêmica. Entretanto, se o indivíduo estiver com o sistema imunológico comprometido, ocorre falha nesses mecanismos de defesa, o que permite a

sobrevivência dessas bactérias em sítios extra intestinais, iniciando ou agravando um quadro de septicemia (MACFIE, 2004; ANDRADE, 2016; BARROS, 2016).

O método tradicional para identificar a translocação bacteriana, baseia-se na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos linfonodos mesentéricos e órgãos. Entretanto, essa técnica não permite a detecção de bactérias não viáveis e nem fragmentos de bactéria, subestimando os níveis de translocação bacteriana, uma vez que esses fragmentos também são responsáveis por desencadear a resposta imunológica (WIEST e RATH, 2003; GENEROSO, 2010; ANDRADE, 2016). Além disso, vale ressaltar que esse é um método laborioso e que exige condições assépticas.

Nesse contexto, desenvolveu-se em nosso laboratório a técnica de marcação da bactéria *Escherichia coli* com tecnécio-99m (*E. coli*-99mTc), que não necessita de ambiente estéril durante todo o processo, além de permitir que fragmentos e produtos bacterianos sejam detectados, aumentando significativamente a sensibilidade da técnica (DINIZ et al., 1999).

Pesquisas realizadas em nosso grupo mostraram a eficácia da *E. coli*-99mTc para a determinação dos níveis de translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal de ratos e camundongos (QUIRINO, CORREIA e CARDOSO, 2007; DOS SANTOS et al., 2009; VIANA et al, 2010; BATISTA et al., 2012; GENEROSO et al., 2011), bem como na mucosite e na colite intestinal (ANDRADE et al, 2015; GENEROSO et al., 2015; ANDRADE, 2016; BARROS, 2016; TAKENAKA, 2017).

2.13 Uso de plantas medicinais para tratamento de doenças

A utilização de plantas medicinais na busca para o manejo de doenças é uma prática muito antiga e que, muitas vezes, representa o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos (TYLER, 1996; KO, 1999). A evolução ao longo dos anos de medicamentos e descobrimento de novas substâncias se deve ao profundo conhecimento da natureza pelos povos primitivos, bem como de seu potencial químico (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006; DA ROCHA et al., 2015).

As observações populares acerca do uso e eficácia de plantas medicinais, são de extrema importância para o conhecimento das atividades terapêuticas dessas espécies, constituindo uma excelente perspectiva para a realização de estudos

científicos para comprovação de seus mecanismos de ação e constituintes químicos (MACIEL, PINTO e VEIGA JÚNIOR, 2002; CASTILHO e BRAGA, 2011; MUKHERJEF et al., 2017). O Brasil apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais, estimada de 15 a 25% do número total de espécies no mundo, colocando o Brasil em uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos produtos (BRASIL, 2006; MUKHERJEE et al. 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece, desde a década de 70, o valor das práticas alternativas e complementares como recurso terapêutico, o que estimula países em desenvolvimento a terem um melhor aproveitamento de seus recursos naturais (BRANDÃO et al., 2010). Além disso, a OMS também reconhece que, apesar de todos os avanços na produção de medicamentos nos últimos tempos, cerca de 80% da população de países em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para seus cuidados básicos em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em 2006, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de estabelecer diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, assim como o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006). Além disso, no Brasil, a indústria farmacêutica teve 25% de seu faturamento originado de medicamentos derivados de plantas, de acordo com um levantamento realizado por Guerra e colaboradores (2001). Também em 2001, foi registrado um aumento de 10% nas vendas do setor, reforçando seu crescimento.

A espécie estudada nesse trabalho, *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann, consta, na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que atribui a ela a possibilidade de avançar na cadeia produtiva e gerar produtos de interesse à população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

2.14 *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann

A *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann é uma planta encontrada, no Brasil, desde a região Amazônica até o Rio Grande do Sul, incluindo regiões de Cerrado e de Mata Atlântica. Saindo do Brasil, a *F. chica* pode ser também encontrada no continente Africano (VON POSER et al., 2000) e nas Américas Central (México,

Belize, Guianas, Porto Rico e Trinidad e Tobago) e do Sul (Peru) (BEHRENS, TELLIS e CHAGAS, 2012). A espécie pode apresentar-se como uma liana arbustiva ou trepadeira de pequeno porte, com folhas bi ou tri-folheadas e flores róseo-lilacinas (Figura 12).



Figura 12 - Fotografia Fridericia chica (Bonpl.) L.G.Lohmann - acervo de plantas tropicais do Missouri Botanical Garden

Fonte: Behrens, Tellis e Chagas, 2012

Pela medicina tradicional e popular, o chá das folhas de *F. chica* é amplamente utilizado para tratamento de distúrbios anti-inflamatórios, anemia, cólicas intestinais, diarreia a até para a cicatrização (BORRÁS, 2003; RIBEIRO, 2012). Além disso, as comunidades nativas do Brasil utilizavam o extrato da *F. chica* para pintura corporal e também para proteção solar. Isso porque a planta possui flores em um tom rosa e violeta e produz um corante vermelho a partir da fermentação de suas folhas (RIBEIRO, 2012; MICHEL et al., 2015).

F. chica é popularmente conhecida como "pariri" ou "crajiru" e pertence à família Bignoniaceae. Essa família compreende aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies, sendo quimicamente caracterizada pela presença de terpenoides, quininas e flavonoides. (WARASHINA et al., 2006). Apesar de pariri e crajiru serem os nomes populares mais conhecidos, a *F. chica* também pode ser chamada de carajiru, carajuru, cajuru, crejeru, chica, cipó-cruz, paripari e crejer, em decorrência de sua vasta distribuição geográfica (BEHRENS, TELLIS e CHAGAS, 2012).

2.15 Composição Química

O primeiro estudo para avaliação química da *F. chica*, foi realizado por Chapman e colaboradores (1927), que isolou uma 3-desoxiantocianidina, denominada carajurina (ZORN et al., 2001). Nas folhas de *F. chica*, a carajurina é responsável pela coloração vermelha do extrato (PAULA et al., 2013; 2014).

Os flavonoides são conhecidos como substâncias que promovem benefícios para a saúde, o que inclui prevenção e tratamento de doenças (KIM et al., 2004; GROTEWOLD, 2006). Suas principais atividades biológicas já descritas são: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antitrombótica e imunomoduladora (HARBONE; WILLIAMS, 2000; KIM et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

As antocianidinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo responsáveis pelas cores azul, violeta e tonalidades de vermelho presentes em diversas flores e frutos (WANG e STONER, 2008). Ding e colaboradores (2006) caracterizaram as antocianidinas como antioxidantes naturais e como protetores da integridade do DNA genômico. Além disso, estudos indicam que o consumo de antocianidinas, em decorrência de sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, reduz o risco de diabetes, artrite, câncer e doenças cardiovasculares (WANG e STONER, 2008).

2.16 Atividade biológica da *F. chica*

Os efeitos anti-inflamatórios e antitumorais pelo extrato de *F. chica* já foram demonstrados por diversos modelos (TAKEMURA et al., 1995; ZORN et al., 2001; BARBOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; RIBEIRO, 2012; TAKENAKA, 2017). Além disso, as atividades antianêmica e anti-hipertensiva também já foram avaliadas cientificamente (OLIVEIRA et al., 1995; CARTÁGENES, 2009).

In vitro, os efeitos anti-inflamatórios do extrato lipofílico da planta e da carajurina, foram evidenciados pela inibição do fator nuclear NF- κ B, responsável por regular a transcrição de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Essa inibição pode, portanto, modular o processo inflamatório (ZORN et al., 2001; RIBEIRO, 2012).

O extrato etanólico da planta apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória (JORGE et al., 2008; MICHEL, 2015). Já o extrato aquoso, apresentou comprovada atividade anti-inflamatória pelo estudo de Oliveira et al. (2009). Por último, o extrato metanólico bruto (contendo carajurina e carajurona), no estudo de Jorge e colaboradores (2008), apresentou atividade cicatrizante *in vivo* e *in vitro*.

Recentemente, um estudo realizado por Miranda e colaboradores (2017), utilizou o extrato hidroetanólico bruto de *F. chica* e isolou o composto feoforbide, capaz de inibir o crescimento do *Trypanossoma cruzi in vitro*.

2.17 Atividade anti-inflamatória de extratos de planta na mucosite

Na literatura, são relatados diversos estudos de modelos animais que utilizaram substâncias flavonoídicas para tratamento da inflamação, principalmente em relação à mucosite oral. Um estudo recente demonstrou a eficácia do extrato de *Oryza sativa* na redução das feridas na mucosa oral de ratos com mucosite induzida por 5-FU (TANCHAROEN, 2018). Estudos anteriores, como o de Samy e colaboradores (2012) verificou que proteínas solúveis obtidas do látex de *Calotropis procera* possuem a capacidade de supressão da via de sinalização do NF- κ B. Também utilizando tais proteínas, o estudo de Freitas e colaboradores (2012) sugeriu que o mecanismo de proteção da mucosa envolveu a inibição da expressão de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-1 β . Por último, um estudo de Chaudhary e colaboradores (2015) demonstrou a atividade antioxidante dessas proteínas como potenciais para melhora da inflamação.

Na mucosite intestinal, poucos estudos avaliaram o efeito de extratos de planta sobre a inflamação. O estudo de Liu e colaboradores (2013) demonstrou a redução da atividade inflamatória sobre o epitélio intestinal de camundongos BALB/c tratados com extrato aquoso de *Chimonanthus nitens*, uma espécie da China. O extrato foi administrado por um período de 11 dias e demonstrou efeitos benéficos sobre a perda de peso, diarreia e diarreia sanguinolenta, além da preservação da arquitetura tecidual.

Um outro estudo conduzido por Ávila e colaboradores (2015) utilizou uma formulação mucoadesiva de *Bidens pilosa* em camundongos Swiss por um período de 6 dias, em um modelo de mucosite induzido por 5-FU. Essa espécie já tem atividade conhecida como hepatoprotetora, antimalárica, antioxidante e anti-

inflamatória. Para o modelo de mucosite intestinal, a formulação diminuiu a perda de peso dos animais e preservou parcialmente a arquitetura do epitélio intestinal.

Um estudo conduzido em 2016 por Gou e colaboradores utilizou uma formulação tradicional da medicina Chinesa, que contém extratos de 8 diferentes espécies de planta. Essa formulação é conhecida como *Bu-Zhong-Yi-Qi* (BZYQD) e é usada popularmente para falência renal crônica, alívio de distúrbios epigástricos, doença pulmonar obstrutiva crônica e rinite alérgica. Ratos que receberam a formulação por 10 dias, apresentaram redução na perda de peso, diarreia, necrose e apoptose no epitélio intestinal.

Em nosso grupo de pesquisa, o extrato hidroetanólico de *F. chica* foi utilizado para avaliação de sua atividade anti-inflamatória em modelo de mucosite murina induzida por 5-FU. Os resultados demonstraram efeito positivo sobre a permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, variação ponderal e consumo alimentar. Além disso, os achados histológicos evidenciam a redução dos danos epiteliais causadas pelo agente quimioterápico, o que reforça a ação anti-inflamatória do extrato (TAKENAKA, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal ainda é um efeito adverso pouco compreendido na área da oncologia. O tratamento oferecido ao paciente atualmente, se restringe ao uso de analgésicos, antimicrobianos, protetores de mucosa e antidiarreicos, o que pode ser explicado pela lacuna de estudos envolvendo bons modelos pré-clínicos para o estudo dessa patologia. Tais modelos são de extrema importância para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na mucosite intestinal, visto que se aproximam com o que acontece com os pacientes na prática clínica. A partir desses modelos, é possível se estudar a toxicidade dos agentes quimioterápicos e testar possíveis modulações farmacológicas.

Como hoje em dia ainda não existem tratamentos profiláticos ou curativos para o controle da mucosite intestinal sendo utilizados na prática clínica, nosso laboratório vem se dedicando ao estudo de modelos experimentais utilizando os quimioterápicos 5-FU e irinotecano, bem como diferentes propostas de manejo, como o uso do ácido linoleico conjugado (CLA), extrato da espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann e probióticos.

Dentre os modelos experimentais encontrados na literatura, existe apenas um estudo de mucosite intestinal utilizando a associação entre 5-FU e irinotecano. Esse dado é de grande relevância, pois se assemelha ao protocolo chamado FOLFIRI, presente na prática clínica. Tal protocolo é utilizado para o tratamento do câncer colorretal, um dos tipos de câncer com maior taxa de letalidade atualmente. A reprodução de um modelo como esse, pode trazer informações mais fidedignas e relevantes quanto à patologia causada por esses fármacos, bem como propor um tratamento ou manejo mais eficientes que as disponíveis na clínica e, se possível, identificar ainda um meio para prevenção do desenvolvimento da mucosite intestinal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Investigar possíveis efeitos benéficos da *F. chica* em modelo experimental de mucosite induzida pelos quimioterápicos 5-FU e irinotecano.

4.2 Objetivos específicos:

- Investigar a severidade da mucosite e os efeitos do extrato de *F. chica* mediante a avaliação do consumo alimentar e evolução ponderal;
- Avaliar aspectos relacionados com a integridade da mucosa intestinal por meio da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, histologia/morfometria, microscopia eletrônica e expressão de proteínas de junções firme;
- Avaliar alguns fatores envolvidos na atividade inflamatória como infiltrado inflamatório e severidade da diarreia;
- Avaliar alguns aspectos relacionados com a resposta imunológica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Identificação do material vegetal

As folhas de *F. chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann utilizadas no preparo do extrato utilizado no trabalho foram coletadas no município de Betim, região metropolitana de Belo Horizonte – MG, no mês de março/2015. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. João Renato Stehmann e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, sob o número BHCB 98229.

5.2 Obtenção do extrato de *F. chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann

O extrato foi preparado por maceração com auxílio do ultrassom conforme previamente descrito por Takenaka (2017). Em resumo, utilizou-se 5 g do pó das folhas de *F. chica* pulverizadas em 50 ml de solvente (mistura de água ultrapura e etanol 99,5% na proporção de 3:7, respectivamente). Após vinte minutos de banho ultrassônico, aguardou-se a decantação de material vegetal e filtrou-se o sobrenadante em papel filtro, originando o extrato bruto. Repetiu-se essa extração por duas vezes, juntando-se as soluções filtradas em balão de fundo redondo de 250 ml. Após a extração, a eliminação dos solventes orgânicos se deu evaporador rotatório, até resíduo, com temperatura máxima do banho de 40°C, e da água por liofilização. Os extratos obtidos foram estocados a -20°C até a utilização.

5.3 Composição do extrato de *F. chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann

A composição do extrato utilizado nesse trabalho foi previamente determinada por Takenaka (2017) por meio da técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectroscopia de massas (CLUE-ESI-MS), que permitiu a identificação das seguintes substâncias no extrato: 6-hidroxiluteolinidina-*O*-ácido glicurônico, isoescutelareina ou escutelareina-*O*-ácido glicurônico, hispidulina, isoescutelareina ou escutelareina, apigenina, 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavílio, 6,7,3'-trihidroxi-4',5-dimetoxiflavílio e carajurina.

5.4 Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c, pesando em média 25 gramas, com 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, em gaiolas plásticas individuais, com controle de iluminação 12/12 (ciclo de luz claro/escuro) e ventilação. Água potável *ad libitum* e ração (Presence) foram fornecidos aos animais. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG, Protocolo 355/2017).

5.5 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com a Tabela 1:

GRUPOS	TRATAMENTOS
Controle (CTL) (n=9)	Administração oral de solução salina/Injeção intraperitoneal de salina
<i>F. chica</i> (n=9)	Administração oral do extrato de <i>F. chica</i> (30 mg/kg)/ Injeção intraperitoneal de salina
Mucosite (MUC) (n=9)	Administração oral de solução salina/Injeção intraperitoneal de 5-FU (34 mg/kg) e irinotecano (41 mg/kg) para indução da mucosite.
Tratamento (<i>F. chica</i> + MUC) (n=9)	Administração oral do extrato de <i>F. chica</i> (30 mg/kg)/ Injeção intraperitoneal 5-FU (34 mg/kg) e irinotecano (41 mg/kg) para indução da mucosite.

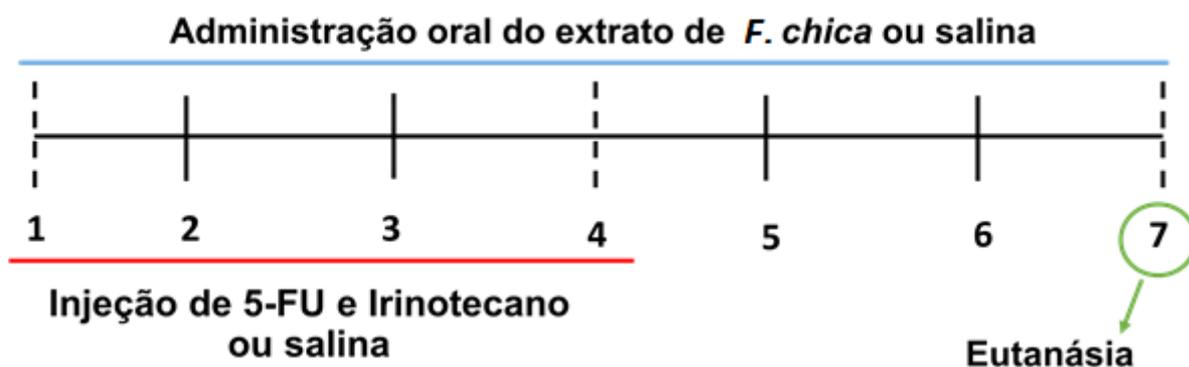
Tabela 1- Divisão e esquema de tratamento dos diferentes grupos experimentais

5.6 Modelo experimental de mucosite intestinal

O modelo experimental foi desenvolvido em um período de sete dias. Os animais dos grupos MUC e *F. chica* + MUC receberam injeção intraperitoneal com doses seriadas de 5-FU (34 mg/kg/dia) e irinotecano (41 mg/kg/dia), durante os quatro primeiros dias do protocolo experimental, para indução da mucosite, enquanto os grupos CTL e *F. chica* receberam injeção intraperitoneal de salina, também durante o mesmo período. Já a administração oral do extrato de *F. chica*, foi realizada durante os sete dias do protocolo experimental, para os grupos *F. chica* e *F. chica* + MUC,

enquanto os grupos CTL e MUC receberam solução salina. Nos dias 1, 4 e 7, os animais foram monitorados quanto à variação ponderal e consumo de ração. O modelo de mucosite intestinal foi baseado em modelo previamente descrito por Pereira e colaboradores (2015) e, 72 horas após a última dose de indução, os animais foram eutanasiados para a coleta de material e realização das análises.

5.7 Análises



5.7.1 Consumo alimentar e variação ponderal

O controle da ingestão alimentar e variação do peso corporal foram realizados em três diferentes momentos durante o ciclo experimental: no dia 1, antes da primeira injeção de 5-FU e irinotecano para indução da mucosite; no dia 4, último dia de indução da mucosite e no dia 7, último dia do protocolo experimental. Para a obtenção desses dados, foi considerada a diferença das pesagens entre os dias 1 e 7. Todos os valores foram obtidos com o uso de balança semi-analítica (Filizola-MF, São Paulo, Brasil).

5.7.2 Escore de diarreia

A avaliação dos níveis de diarreia foi realizada diariamente, dos dias 1 a 7. A classificação da gravidade da diarreia foi feita através de um sistema de escore, proposto por Kurita e colaboradores (2000), que classifica a consistência das fezes em escores de 0 a 3 (Tabela 2).

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

Tabela 2 - Escores de avaliação de intensidade de diarreia em camundongos

5.7.3 Avaliação da Permeabilidade Intestinal

Após 72 horas da última dose de indução da mucosite, alíquotas contendo 18,5 MBq de DTPA-99mTc em 0,1 mL de solução foram administradas, por gavagem, a todos os animais. Após 4 horas, os camundongos foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg). Em seguida, 300 µL de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade em um contador gama automático (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3 – Turku, Finlândia) (BARROS, 2016; TAKENAKA, 2017). Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de DTPA-99mTc e calculados em percentual de dose de DTPA-99mTc por grama de sangue de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose de DTPA-99mTc no sangue} = (\text{cpm no sangue} / \text{cpm da dose administrada}) \times 100$$

cpm = contagens por minuto

5.7.4 Avaliação da Translocação Bacteriana

Para avaliação da translocação bacteriana, utilizou-se o procedimento descrito por Diniz e colaboradores (1999), no qual a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli* – ATCC-10536), foi radiomarcada com Tc-99m (*E. coli*-99mTc). A partir de uma cultura mãe de *E. coli*, foi realizado o repique em ágar tripticaseína (Merck, Darmstadt, Alemanha)

e incubação a 37 °C por um período de 18 horas. Após esse período, a bactéria foi transferida para um tubo contendo salina estéril e sua concentração foi ajustada a 580 nm (espectrofotômetro GENESYS), em 31% de transmitância, o correspondente a 10⁸ UFC/mL. Em seguida, uma alíquota de 2 mL dessa suspensão bacteriana foi incubada em tubos contendo 1 mL de solução de cloreto estansoso (pH 7,0) (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 37 °C por 10 minutos. Após a incubação, 74 MBq de Tc-99m, obtidos por eluição do gerador Mo-99/Tc-99m estéril (IPEN/brasil) foram adicionados à alíquota da suspensão bacteriana e a preparação foi mantida a 37 °C por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 3000 g durante 25 minutos e o sobrenadante foi retirado para a contagem de radioatividade. O precipitado foi ressuspendido em 3 mL de salina estéril e foi contada sua radioatividade. Esse procedimento de centrifugação e lavagem com salina foi repetido três vezes. A porcentagem de marcação foi determinada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = (\text{cpm do precipitado} / \text{cpm do precipitado} + \text{sobrenadante}) \times 100$$

cpm = contagens por minuto

O estudo da translocação bacteriana foi realizado em todos os grupos experimentais, 72 horas após a última dose de indução da mucosite. Cada grupo foi constituído por 9 animais que receberam, por gavagem, 0,1 mL de suspensão bacteriana marcada com Tc-99m, contendo, aproximadamente, 10⁷ UFC de *E. coli*-99mTc. Transcorridas 4 horas da gavagem, os animais foram anestesiados intraperitonealmente, com solução de cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e, em seguida, tiveram o sangue coletado do plexo axial. O sangue foi colocado em tubos para determinação da radiação gama, previamente pesados. Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço, pulmão, coração e rins coletados e pesados para determinação da radioatividade em contador gama automático (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3 – Turku, Finlândia).

5.7.5 Dosagem da imunoglobulina A secretora (sIgA)

O intestino delgado dos animais foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. Todo o conteúdo luminal foi retirado, pesado e diluído com salina fosfatada pH 7,2 [suplementada com inibidor de protease (1 µM de aprotinina;

25 μM de leupeptina; 1 μM de pepstatina e 1 mM de PMSF)], na proporção de 2 mL de PBS para cada 500 mg de conteúdo. Em seguida, o preparado foi centrifugado (5000 rpm, por 30 min, a 4 °C), e o sobrenadante recolhido congelado a -80°C para posterior dosagem da imunoglobulina.

A dosagem do sIgA total foi realizada pelo método de ELISA de captura. Foram utilizados anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabras (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), para revestimento das placas. Para detecção da imunoglobulina, utilizou-se anticorpos anti-IgA conjugados a peroxidase (A-4789, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). A determinação da concentração de sIgA foi realizada utilizando-se um padrão de IgA purificado (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). A leitura foi feita, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.Sunnyvale, USA). A concentração de sIgA foi representada em $\mu\text{g/mL}$ de conteúdo intestinal (MARTINS et al., 2009). A dosagem foi realizada no Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

5.7.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no íleo

A avaliação da atividade da enzima MPO, foi utilizada como índice indireto do recrutamento de neutrófilos no tecido. Para a dosagem dessa enzima, fragmentos do íleo foram retirados dos animais, lavados com PBS, pesados e congelados a -80°C, em tubos previamente pesados, até o dia da dosagem. Utilizou-se o método descrito por Souza e colaboradores (2000), com algumas modificações. Os fragmentos do íleo foram descongelados e 100 mg de tecido homogeneizados em 1,9 mL de tampão fosfato pH 4,7 (0,1 M de NaCl, 0,02 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 0,015 M de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$), com uso de equipamento específico (Ultra-turrax IKA T10 basic). O homogenato do tecido foi centrifugado (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) a 10.000 g, por 10 min, a 4 °C e o precipitado submetido à lise hipotônica das hemácias (500 μL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após). Uma nova centrifugação foi feita e o precipitado ressuspendido em tampão NaH_2PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e, em seguida, re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio

líquido. Após descongeladas essas amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g, por 10 min, a 4°C e o sobrenadante recolhido. O precipitado foi ressuspensionado e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados foram expressos como unidades relativas. A dosagem foi realizada no Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

5.7.7 Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) no íleo

A avaliação da atividade da enzima EPO foi utilizada como índice relativo de eosinófilos no tecido. Fragmentos do íleo foram retirados dos animais, lavados com PBS, pesados e congelados a -80°C, em tubos previamente pesados, até o dia da dosagem. A avaliação da enzima foi realizada por meio de teste enzimático, como descrito por Strath e colaboradores (1985). Para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1.900 µl de PBS 5x (pH 7,2). Em seguida o tecido foi homogeneizado (Ultra-Turrax IKA T10 basic) e centrifugado a 10.000 g, por 10 min, a 4°C (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi submetido a lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. O material foi novamente centrifugado, sob as mesmas condições citadas anteriormente, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB (Brometo de hexadecil trimetil amônio; Sigma) 0,5%, para cada 100 mg de amostra. As amostras foram rapidamente homogeneizadas e, dessa solução, foi recolhida uma alíquota de 1 mL que foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após descongeladas essas amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g, por 10 min, a 4°C e apenas o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, sendo que em cada poço foram colocados 75 µL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%), incubada com 75 µL de substrato [1,5 mM de ofenilenodiamina, OPD (Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura ocorreu

em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) em comprimento de 492 nm. A dosagem foi realizada no Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

5.7.8 Dosagem de citocinas no íleo

A avaliação do conteúdo de citocinas e quimiocinas foi realizada em todos os grupos experimentais, constituídos por 5 animais cada, conforme descrito por Martins et al. (2011). Fragmentos do íleo de aproximadamente 100 mg foram coletados no último dia do modelo experimental, lavados com PBS, pesados e congelados a -80°C , em tubos previamente pesados, até o dia da dosagem.

No dia da dosagem, os fragmentos de 100 mg, foram descongelados e ressuspensos em 1mL de solução de extração de citocinas, (PBS adicionado de inibidores de protease: PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10mM e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Os tecidos foram homogeneizados (Ultra-Turrax IKA T10 basic) e centrifugados a 10.000 rpm, por 10 min, a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para dosagem das seguintes citocinas: IL-10 e IL-1 β . O método utilizado foi o ELISA sanduíche, com kits obtidos da R & D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas.

5.7.9 Análise da expressão gênica de proteínas da junção firme

A avaliação da expressão das proteínas da junção firme ocludina e Zonula occludens-1 (ZO-1), foi realizada em amostras de íleo de 5 animais de cada grupo experimental. Amostras de íleo foram coletadas no último dia do protocolo experimental e acondicionadas em microtubos livre de RNase. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a três etapas: 1) Extração do RNA; 2) Síntese do cDNA; 3) Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), conforme descrito por Ferreira et al. (2012). As análises foram realizadas no laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

5.7.10 Extração do RNA

Para a extração do RNA utilizou-se aproximadamente 50 mg de íleo previamente homogeneizado com 0,5 mL de trizol (Trizol Reagent, Invitrogen #15596). A esses tubos, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os mesmos foram agitados, vigorosamente, por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 min, e centrifugados a 13.000 rpm, a 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi então transferido para um outro tubo contendo 250 µL de isopropanol e homogeneizados por inversão durante 1 min. Em seguida, os tubos foram incubados a -80°C por 60 min, para precipitação do RNA. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a 4°C, por 20 min. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 0,5 mL de etanol (75%). As amostras foram novamente centrifugadas, sob as mesmas condições citadas anteriormente, por um período de 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação, repetidos. O novo sobrenadante formado foi descartado e o pellet deixado secando em temperatura ambiente por 15 min. Após secagem, o pellet foi ressuscitado em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10min. Utilizou-se espectrofotômetro para a determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA, por meio da razão 260/280 (Spectrophotometer ND- 1000). Os materiais utilizados, incluindo microtubos, ponteiras e água, eram livres de RNase e DNase, conforme descrito por Ferreira et al. (2012).

5.7.11 Síntese cDNA

O RNA extraído de cada amostra na etapa anterior, foi transcrito em cDNA por meio da enzima transcriptase reversa (MMLV RT). Um micrograma do RNA foi diluído em 5 µL de água livre de RNase e DNase. Em seguida, adicionou-se 0,5 µL (5µM) de Oligo (dT) primer (Promega #C1101) e 1,25 µL de água. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e os tubos colocados em um termociclador a 72 °C por 5 min. (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Em seguida, 3,25 µL da solução mix: 0,5 µL de M-MLV RT (Promega #M1705), 2 µL de tampão M-MLV 5x, 0,5 µL de dNTP mix (Promega #U1515), 0,1 µL de RNAsin (Ribonuclease inhibitor, Promega #N2511); e 0,25 µL de água, foram adicionados. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42 °C, por três horas e, em seguida, a 72 °C por 15 min.

As amostras foram então armazenadas a -20 °C para posterior amplificação pela técnica de PCR em tempo real, conforme descrito por Ferreira et al. (2012).

5.7.12 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real

O cDNA sintetizado na etapa anterior, foi amplificado pela técnica de PCR em tempo real, utilizando primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5 µL dessa solução foram adicionados à 7,5 µL da solução mix em placa de 96 poços específica para PCR em tempo real. A solução mix foi composta de 0,75 µL de primer forward, 0,75 µL de primer reverse, 1 µL de água e 5 µL de power SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems #4367659). A análise foi realizada em equipamento específico (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e processados no programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação. A tabela 3 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado, conforme descrito por Ferreira et. al (2012).

Gene	NM	Sequência Foward	Sequência Reverse
ZO1	009386	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTC	TCCTCTCTTGCCAACCTTTTCTC
Ocludina	008756.2	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
GAPDH	008084.3	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTCCACACCGA

Tabela 3 - Sequência dos nucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real

5.7.13 Análise histológica

Após anestesia e eutanásia, amostras do íleo de nove animais (09) de cada grupo foram coletadas para análise histológica. O íleo foi cortado longitudinalmente, estendido com a serosa em contato com o papel de filtro e aberto pela borda anti-mesentérica, removendo todo o seu conteúdo sem danos à mucosa, de acordo com o método descrito por Arantes e colaboradores (2004). Essa porção do íleo foi transferida para um recipiente contendo solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 15 min para pré-fixação.

Em seguida, os íleos pré-fixados foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral, da porção distal para proximal, com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles). Os rolos foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas.

O material foi processado para inclusão em parafina e secções de 4 µm de cada amostra foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas microscópicas foram examinadas por patologista (microscópio Leica DMLB) e lesões das camadas mucosa e muscular foram avaliadas usando um sistema de classificação histopatológica descrito por Lima-Júnior e colaboradores (2012). As imagens fotográficas foram obtidas através do software Case Viwer (aumento de 10x), depois de escaneadas pelo escâner Panoramic MIDI (3DHISTECH, Budapest, Hungria).

5.7.14 Escore histológico:

Após a confecção das lâminas de HE, foram selecionadas oito (08) lâminas de animais de cada grupo experimental, para avaliação do escore histológico. Para avaliar a associação da mucosite com as alterações histológicas da mucosa do íleo, utilizou-se o escore proposto por Woo e colaboradores (2000), conforme apresentado na tabela a seguir (Tabela 4).

<i>Escores</i>	Achados microscópicos
0	Achados histológicos normais; nenhuma lesão.
1	Menos do que 10% das criptas apresentam células necróticas
2	Mais do que 10% das criptas apresentam células necróticas, mas a arquitetura das criptas encontra-se intacta.
3	Mais do que 10% das criptas apresentam células necróticas, com perda pontual da arquitetura das criptas de até 20%, encurtamento das vilosidades e presença de hipertrofia e hiperbasofilia aparente nas células da cripta.
4	Mesmas características do que o escore 3 porém, com maior extensão da perda de arquitetura das criptas e encurtamento das vilosidades.

Tabela 4 - Escore de análise histopatológica para intestino delgado

5.7.15 Análise morfométrica:

A análise morfométrica foi avaliada conforme descrito por Lima-Júnior e colaboradores (2012). Para fins de morfometria, a altura das vilosidades e a

profundidade das criptas de Lieberkühn foram calibradas no software *ImageJ* (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível online no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), e a razão vilosidade/cripta foi determinada. As áreas foram calculadas em 10 campos histológicos por lâmina. Um total de 8 lâminas por grupo foi avaliada.

5.7.16 Análises estatísticas:

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 7.0. Os resultados foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e, se normais, foram analisados por ANOVA one ou two-way, seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados que não apresentaram normalidade de dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kurskall-Wallis e pós-teste de Dunns. Os dados com distribuição normal foram representados por média e desvio padrão, já os dados com distribuição não-normal foram representados por mediana e intervalo interquartil. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como diferença estatística significativa.

6 RESULTADOS

6.1 Padronização do modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de 5-FU e irinotecano

O modelo utilizado nesse estudo, foi adaptado do modelo proposto por Pereira de colaboradores (2015). Inicialmente foram realizados estudos piloto com o objetivo de escolher a melhor dose que fosse capaz de induzir o dano significativo na mucosa intestinal e que, ao mesmo tempo, produzisse o mínimo de letalidade (Apêndice A).

A linhagem usada nesse modelo experimental foram camundongos BALB/c, machos. Essa escolha se deve ao fato de que esses animais já haviam sido utilizados em outro estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa e permitiriam comparações diretas dos resultados obtidos (TAKENAKA, 2017).

6.2 Peso e consumo de ração antes da indução da mucosite

No dia anterior ao início do protocolo experimental, os animais foram pesados e tiveram também sua ração pesada, para que fosse possível monitorar os sinais clínicos desses durante o processo de indução da mucosite e verificar o impacto do tratamento proposto sobre esses parâmetros. Não foram observadas diferenças estatísticas no peso dos animais dos quatro grupos experimentais antes da indução da mucosite.

A Figura 13 mostra a variação do peso dos animais durante os principais dias do protocolo experimental. O dia 1 representa o peso dos animais no momento que antecede as injeções de quimioterápico ou solução salina, de acordo com o grupo. Observa-se que o peso desses animais é homogêneo e não se diferem significativamente ($p > 0,05$). Entre os dias 1 e 4 pode-se observar queda progressiva e significativa ($p < 0,05$) do peso dos animais dos grupos MUC e *F. chica* + MUC quando comparados aos grupos CTL e *F. chica*. Entre os dias 4 e 7, os animais receberam apenas o tratamento com o extrato de *F. chica* e/ou solução salina, de acordo com o respectivo grupo. Apesar de não haver mais indução da mucosite pela administração dos quimioterápicos, esse foi o período em que os animais

apresentaram maior perda de peso ($p < 0,05$). Já em relação do sétimo dia, não houve diferença significativa entre a variação de peso dos grupos MUC e *F. chicao* + MUC.

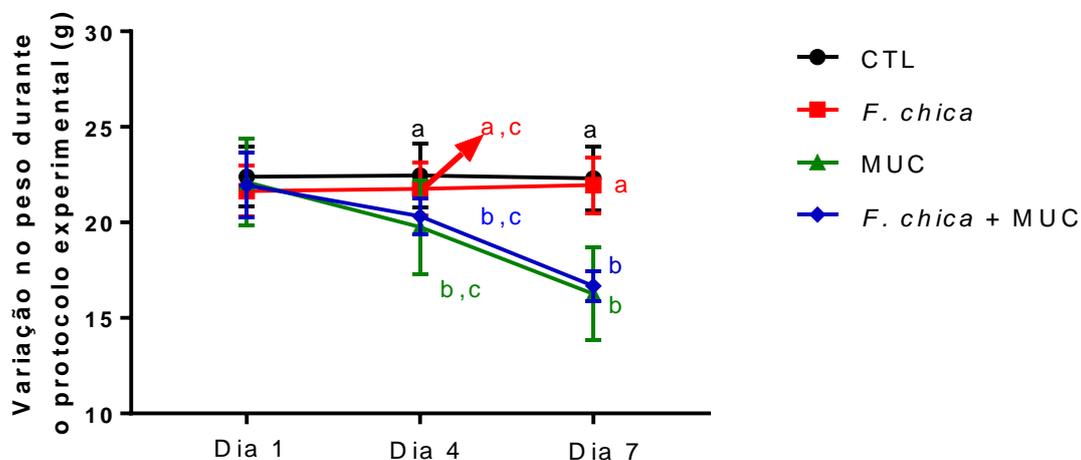


Figura 13 - Efeito do extrato de *F. chicao* sobre a variação do peso dos animais antes e após a indução da mucosite nos dias 1, 4 e 7. Variação do peso dos animais antes (dia 1) e após a indução da mucosite (dias 4 e 7). Os dados foram analisados por ANOVA two-way e representados como média \pm desvio padrão ($n=10$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.3 Variação ponderal e consumo alimentar após a indução da mucosite

Os animais foram monitorados quanto ao peso e consumo de ração no primeiro e último dia do protocolo experimental. Em relação a ambas variáveis, não houve diferença significativa entre os grupos MUC e o grupo *F. chicao* + MUC (Figura 14). Durante a indução da doença, ambos os grupos perderam peso de maneira significativa em relação aos grupos CTL e *F. chicao* e tiveram a ingestão alimentar reduzida.

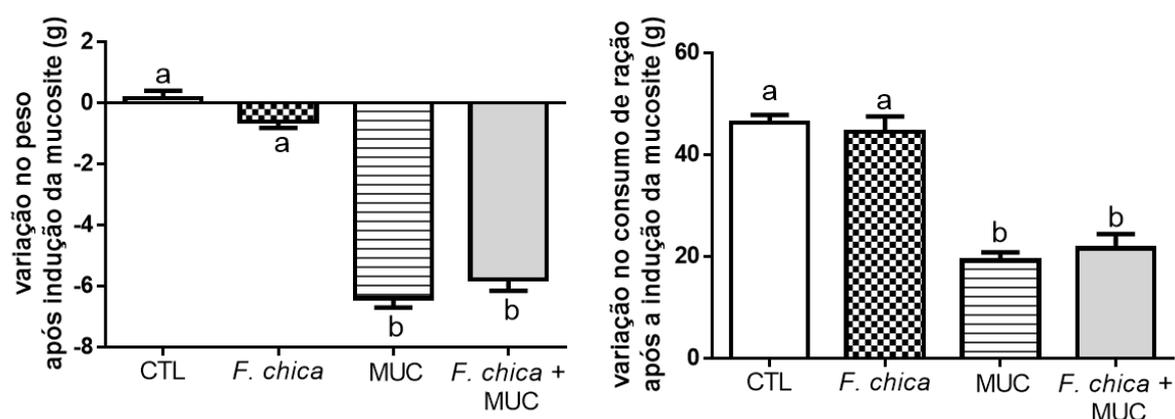


Figura 14 - Efeito do extrato de *F. chica* sobre a variação do peso e consumo de ração dos animais após a indução da mucosite. Variação de peso e consumo de ração dos animais após a indução da mucosite no sétimo dia. Os dados foram analisados por ANOVA one way seguido do pós-teste de Tukey, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=10). Letras diferentes, indicam diferença estatisticamente significativa.

6.4 Escores de diarreia durante o protocolo experimental

Os animais foram observados quanto aos níveis de diarreia diariamente, no mesmo horário. Observa-se que a diarreia nos grupos que receberam quimioterápicos teve início no terceiro dia e prolongou-se até o sétimo dia (Tabela 5). Entretanto, o grupo MUC teve maiores escores de diarreia nos dias cinco, seis e sete, sendo o maior pico de diarreia no sétimo dia, ou seja, 72 horas após o último estímulo de indução da mucosite. No grupo *F. chica* + MUC, os maiores picos de diarreia foram observados nos dias 6 e 7 do protocolo experimental. O grupo que recebeu apenas o extrato apresentou fezes levemente umedecidas entre os dias 3 e 6, ao passo de que o grupo CTL não apresentou nenhuma alteração na consistência das fezes.

Tempo (Dias)	CTL	<i>F. chica</i>	MUC	<i>F. chica</i> + MUC
1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
2	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
3	0 (0-0) ^a	0 (0-1) ^a	1 (0-1) ^b	0 (0-1) ^{ab}
4	0 (0-0) ^a	0 (0-1) ^a	1 (0-1) ^b	0 (0-1) ^{ab}

5	0 (0-0) ^a	0 (0-1) ^a	1 (0-2) ^{ab}	0 (0-1) ^{ab}
6	0 (0-0) ^a	0 (0-1) ^a	2 (1-3) ^b	1 (0-3) ^{ab}
7	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	2 (1-4) ^b	0 (0-3) ^a

Tabela 5 - Avaliação diária da intensidade da diarreia nos camundongos por meio da classificação em escore. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (n=9) (p<0,05).

6.5 Análise histopatológica e morfométrica do íleo

A Figura 15 mostra as alterações histopatológicas observadas no íleo dos animais submetidos ou não à mucosite pela associação de irinotecano e 5-fluorouracil e tratados ou não com o extrato de *F. chica*. Nas fotomicrografias A e B observam-se as estruturas intestinais normais, com vilosidades e criptas íntegras, epitélio cilíndrico recobrendo as vilosidades e com as células de Paneth preservadas. Entretanto, na fotomicrografia representada por C (grupo MUC), pode-se observar encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose das criptas e presença de intenso infiltrado inflamatório na mucosa e camada muscular. Em D estão representados os animais que receberam tratamento com extrato de *F. chica*. Nesse epitélio, observa-se menor dano tecidual, representado pela preservação das vilosidades intestinais, necrose parcial das criptas e diminuição do infiltrado inflamatório. Além disso, a camada muscular da mucosa também se encontra parcialmente danificada.

A Figura 16 mostra os dados morfométricos das vilosidades e criptas do íleo. Os resultados demonstram que a associação de quimioterápicos provocou redução significativa das vilosidades no grupo MUC. Essa alteração não foi observada no grupo *F. chica* + MUC, que manteve a altura das vilosidades nos mesmos níveis que o grupo controle. Em relação a profundidade das criptas, observa-se que a associação foi capaz de induzir modificações relevantes tanto no grupo MUC quanto no grupo *F. chica* + MUC. Por último, a razão vilosidade/cripta não apresentou alteração significativa em nenhum dos grupos apresentados.

As alterações histológicas foram confirmadas através do sistema de escore, variando de 0 a 4. Os escores 0 e 1 foram atribuídos aos grupos controle (CTL e *F. chica*), indicando ausência de lesão ou presença de células necróticas em menos de

10% das criptas. O escore 2 foi atribuído aos grupos *F. chica* e *F. chica* + MUC, caracterizando arquitetura tecidual intacta e mais de 10% de criptas com presença de células necróticas. O escore 3 foi atribuído aos grupos MUC e *F. chica* + MUC, indicando presença de células necróticas nas criptas, perda da arquitetura das criptas em menos de 20% e vilosidades encurtadas. Por último, o escore 4 foi atribuído apenas ao grupo MUC, caracterizando lesão tecidual mais extensa do que o escore 3. Em relação aos escores histológicos (Figura 17), observa-se que elevação significativa do dano histopatológico no grupo MUC, quando comparado com os grupos CTL, *F. chica* e *F. chica* + MUC.

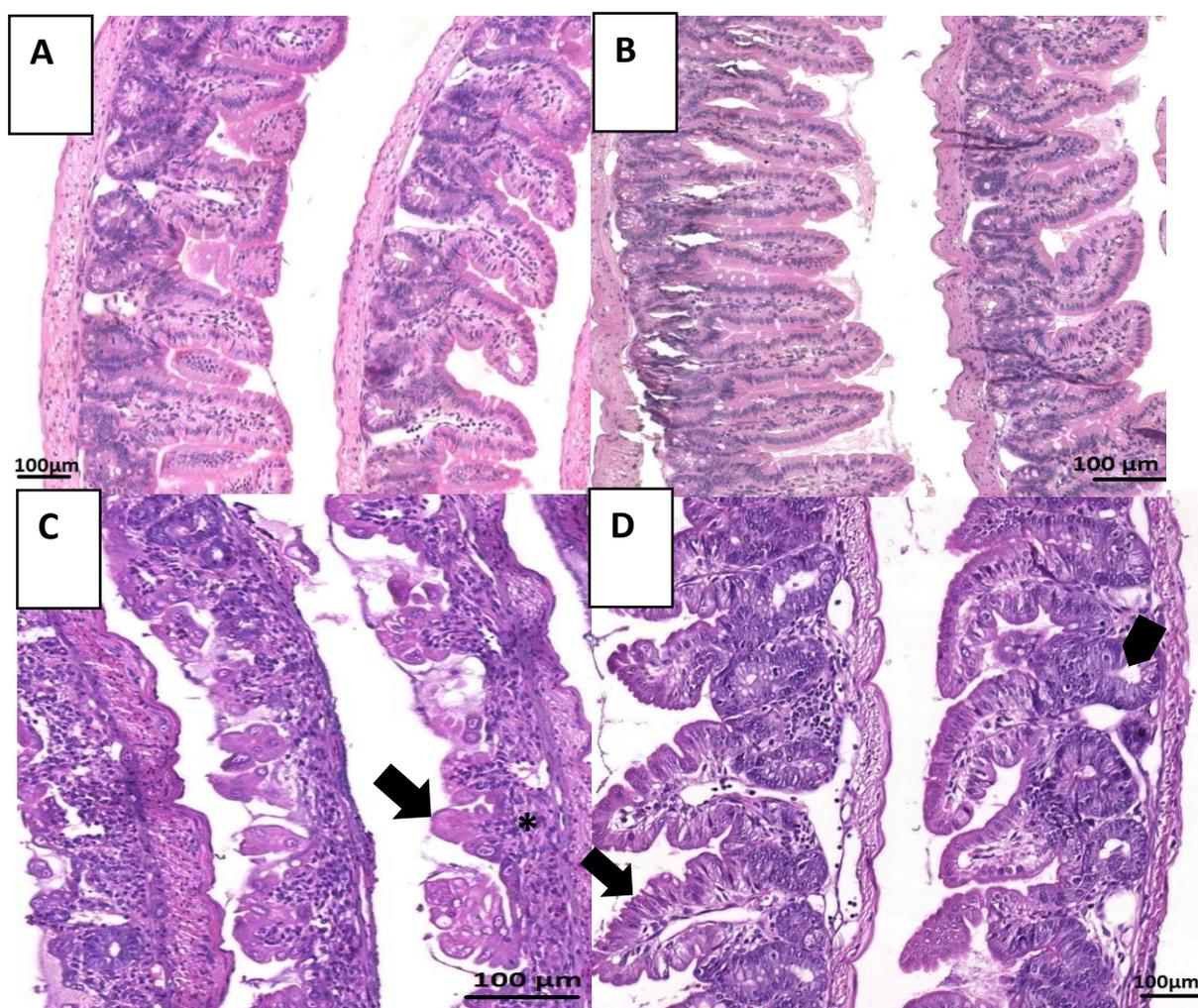


Figura 15 - Análise histológica do íleo. Grupo - CTL (A); *F. chica* (B); MUC (C); *F. chica* + MUC (D). (A e B) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (C) Encurtamento das vilosidades (seta) e intenso infiltrado inflamatório. (D) Preservação das vilosidades (seta), com preservação parcial da arquitetura tecidual e menor achatamento das criptas (cabeça da seta). Barra 100 µm (Objetiva de 10X). Coloração HE (n=6).

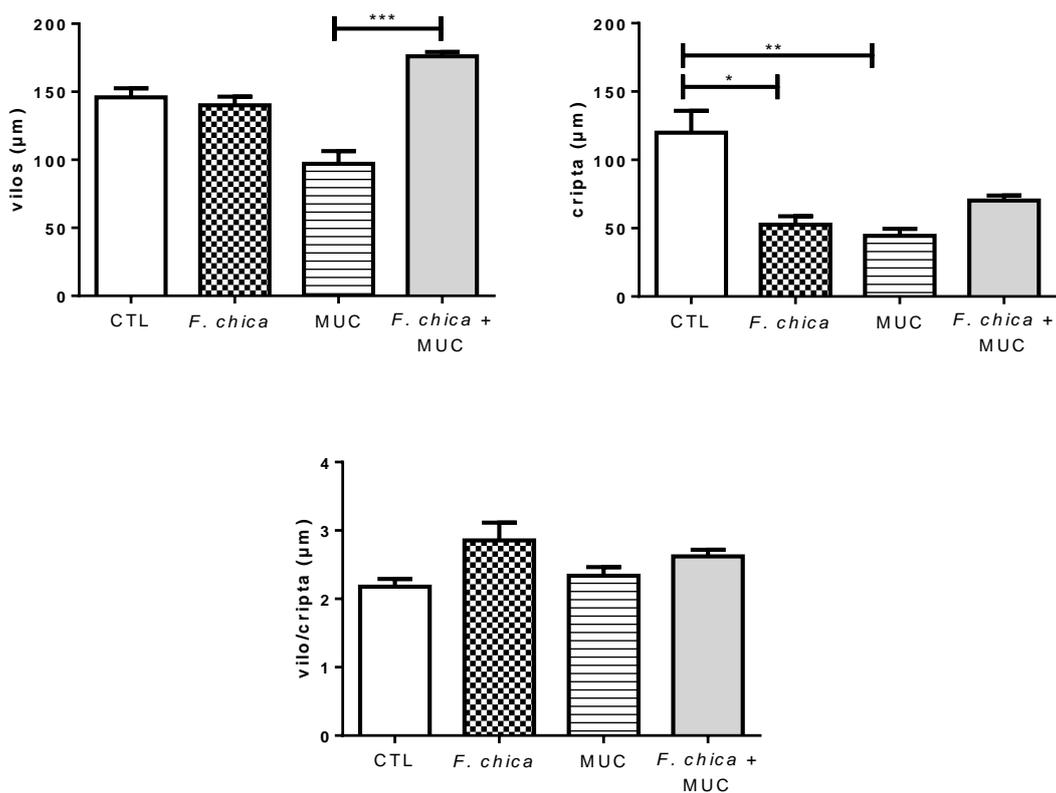


Figura 16 - Análise morfométrica do íleo. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey e os dados expressos como média \pm desvio padrão (n=8). As barras representam diferença estatisticamente significativa entre grupos específicos.

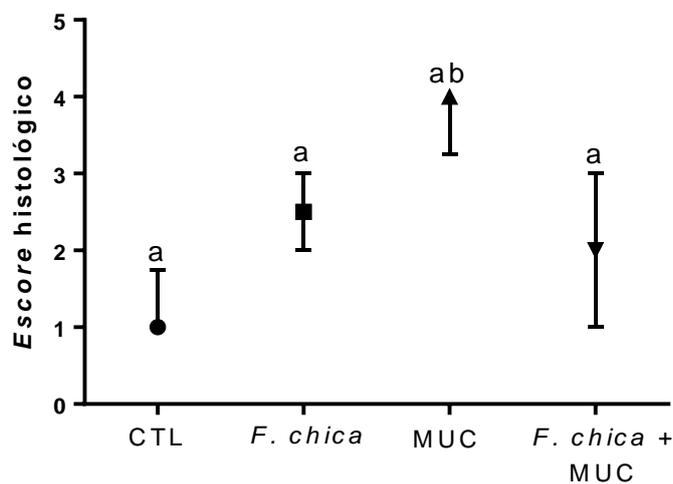


Figura 17 - Efeito do extrato de F. chica no escore histológico do íleo. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns (n=8). Os valores foram expressos como mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.6 Microscopia eletrônica

Os resultados obtidos através das análises histopatológicas e de permeabilidade intestinal foram confirmados pela microscopia eletrônica (ME) (Figura 18). As imagens mostraram aumento dos espaços intercelulares em ambos os grupos que foram submetidos à mucosite (C e D). Entretanto, o grupo MUC apresentou maior fragilidade em relação às junções intercelulares, o que é caracterizado pelo aumento maior desse espaço quando comparado com o grupo *F. chica* + MUC. Em relação às microvilosidades intestinais, observa-se no grupo CTL (A) sua preservação. No grupo MUC, as microvilosidades apresentam-se muito encurtadas e parcialmente destruídas, contribuindo com os achados histopatológicos. O grupo que recebeu o extrato de *F. chica* (D), apresentou microvilosidades preservadas em tamanho e arquitetura tecidual.

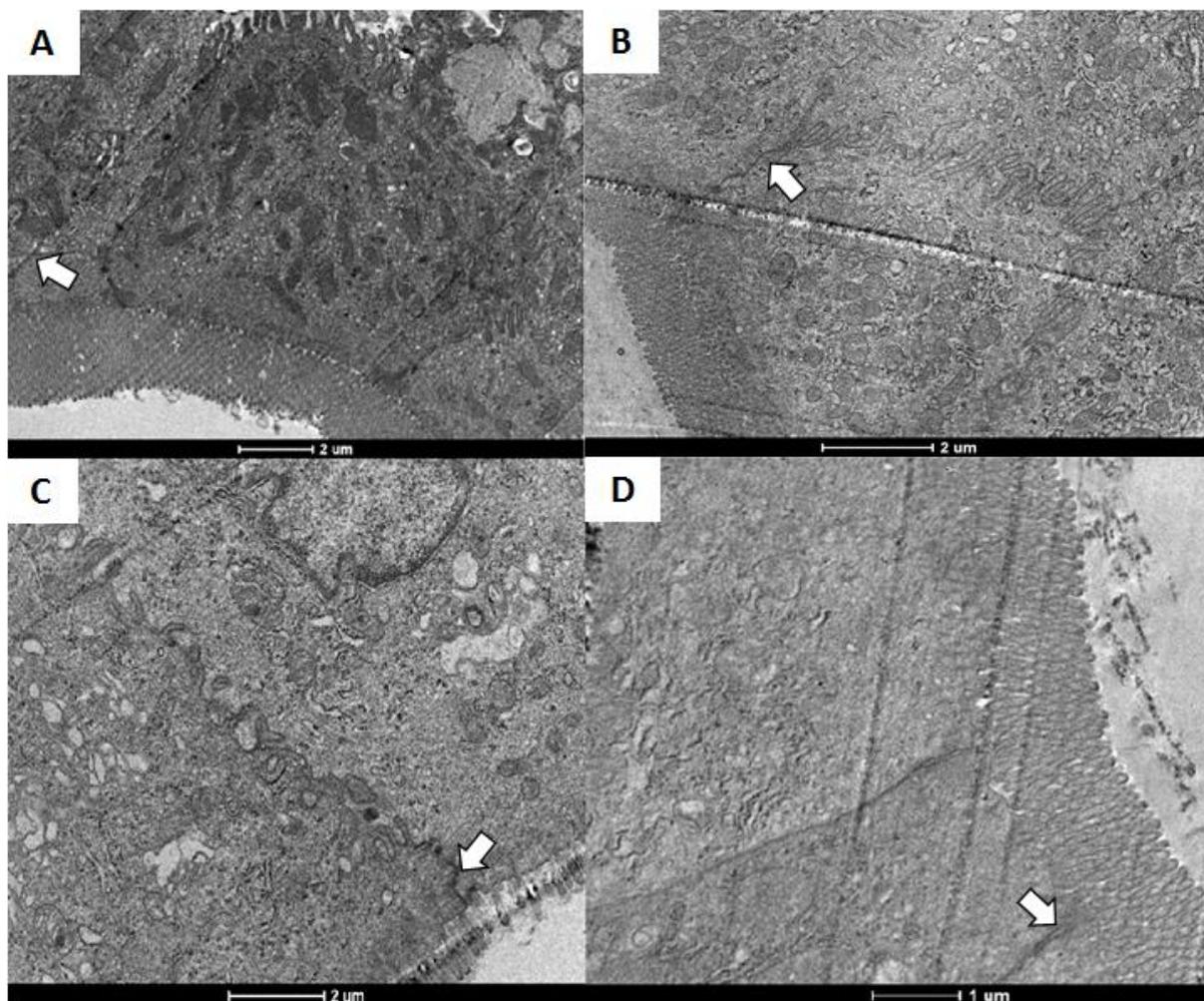


Figura 18 - Análise de microscopia eletrônica (ME) do íleo. Grupo - CTL (A); *F. chica* (B); MUC (C); *F. chica* + MUC (D). Observa-se menor espaçamento intercelular (seta) em A e B, quando comparado com C e D, indicando lesão nas proteínas de junção firme. Em relação as microvilosidades, observa-se melhora significativa na estrutura das mesmas comparando-se C e D.

Os resultados obtidos através da comparação entre os cortes de HE, semi-fino e microscopia eletrônica (ultrafino) para o grupo MUC demonstram a intensidade e a extensão dos danos provocados pelo modelo de associação dos quimioterápicos. As vilosidades encontram-se extremamente achatadas (Figura 19), não é possível delimitar a profundidade das criptas com clareza (Figura 19) e, através da microscopia eletrônica, é possível notar sinais de sofrimento celular, pois há intensa vacuolização, além de não ser possível ver a luz do epitélio (Figura 19).

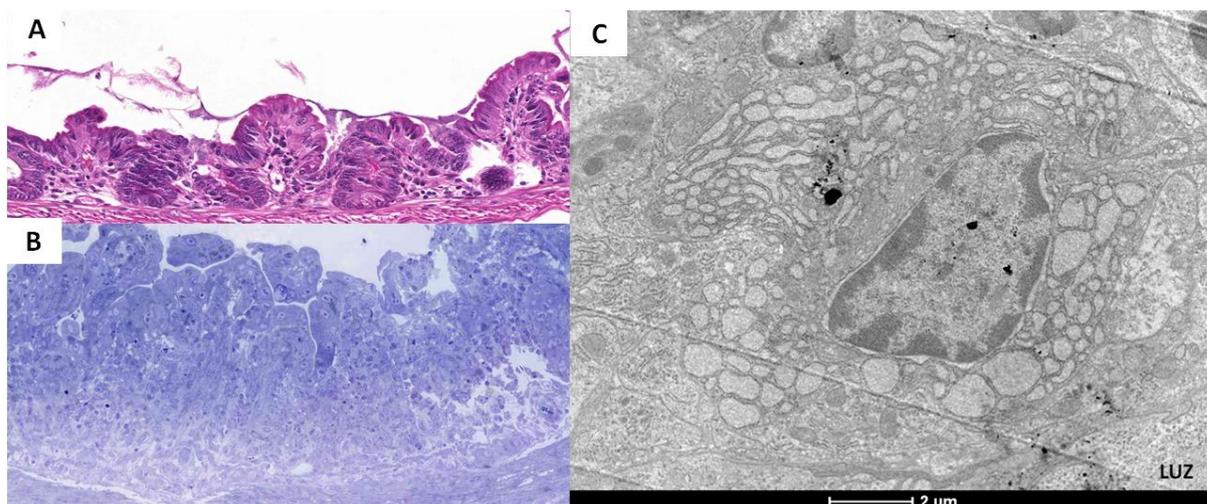


Figura 19 - Comparação entre os cortes de HE, semi-fino e ultrafino (ME) do íleo de um animal com mucosite, sem tratamento com extrato de *F. chica*. A figura acima caracteriza os achados obtidos através dos cortes do íleo sob a perspectiva da coloração por HE (A), corte semi-fino (B) e corte ultrafino para ME (C), de um animal do grupo MUC no sétimo dia do protocolo experimental. Observa-se grande achatamento das vilosidades e criptas (A), perda da arquitetura tecidual (B e C) e intensa vacuolização celular (C), característicos da extensão do dano ocasionado pela administração dos quimioterápicos irinotecano e 5-FU.

6.7 Distribuição do DTPA-99mTc e avaliação da permeabilidade intestinal (PI)

Após 4 horas da gavagem, imagens cintilográficas foram realizadas e observou-se acúmulo de radioatividade na região do íleo e intestino grosso, o que sugere captação do radiofármaco na região de interesse (Figura 20).

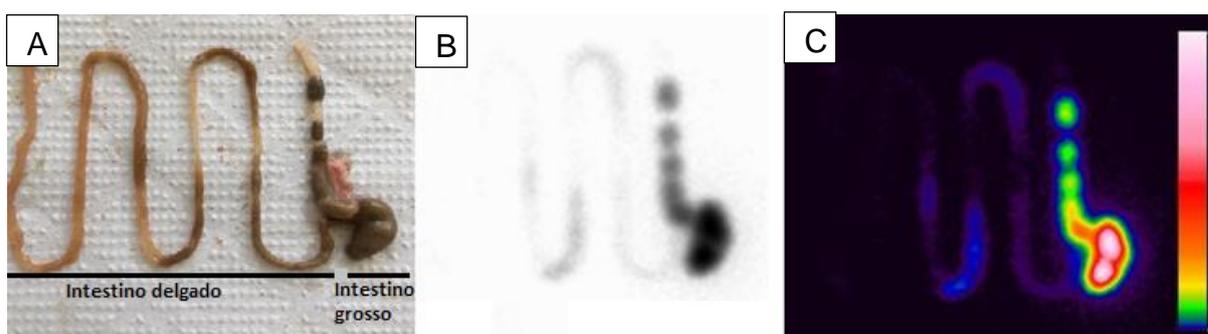


Figura 20 - Distribuição do DTPA-99mTc nos intestinos delgado e grosso após administração por gavagem. Na figura A está representado o intestino e seus segmentos. Já as figuras B e C representam as imagens cintilográficas demonstrando acúmulo de radioatividade no íleo e intestino grosso decorridas 4 horas da administração do DTPA-99mTc por gavagem.

Os resultados da PI dos animais dos grupos CTL e *F. chica* mostraram níveis fisiológicos de DTPA-99mTc no sangue (Figura 21). Após a indução da mucosite, os

resultados mostraram aumento da PI no grupo MUC, quando comparados aos grupos CTL e *F. chica* ($p < 0,05$). Em relação ao grupo *F. chica* + MUC, também se verificou aumento de PI em comparação aos grupos CTL e *F. chica* ($p < 0,05$).

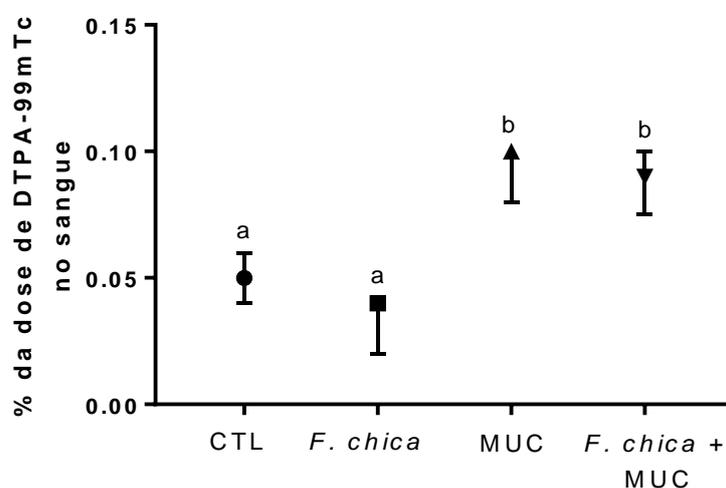


Figura 21 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de DTPA-99mTc no sangue de animais. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns. Os dados foram representados como intervalo interquartil (p25-p75) (n=9). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.8 Análise da expressão gênica de Zonula occludens-1 (ZO-1) e ocludina

Observa-se na Figura 22 aumento significativo da expressão de ZO-1 no grupo MUC quando comparado aos grupos CTL e *F. chica* ($p < 0,05$). Verifica-se também, que a administração do extrato de *F. chica* (*F. chica* + MUC), reduziu a expressão da referida proteína a níveis intermediários. Em relação aos resultados da Figura 22, a administração do extrato de *F. chica* promoveu aumento estatisticamente significativo na expressão de ocludina em relação aos grupos CTL e *F. chica* ($p < 0,05$). Por outro lado, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos MUC e *F. chica* + MUC ($p > 0,05$).

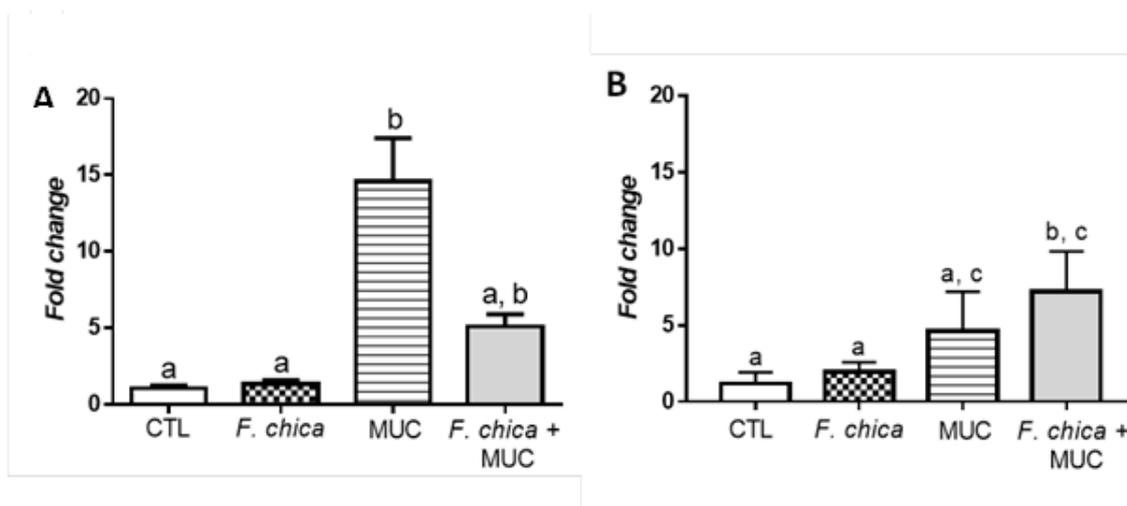


Figura 22 - Efeito do extrato de *F. chica* sobre expressão gênica de Zonula occludens-1 (A) e ocludina (B) no íleo. (A) Expressão gênica de ZO-1 (B) Expressão gênica de Ocludina. Dados analisados pelo teste de ANOVA one-way e pós-teste de Tukey (n=5). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.9 Translocação bacteriana

Os dados apresentados na Tabela 6 mostram níveis fisiológicos de TB nos grupos CTL e *F. chica* todos os órgãos e sangue analisados ($p > 0,05$). O grupo MUC apresentou altas taxas de TB para o sangue, fígado, baço, coração, pulmão e nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) em relação aos grupos CTL e *F. chica*. Os animais do grupo *F. chica* + MUC apresentaram níveis intermediários de TB apenas para os NLM, quando em comparação ao grupo CTL ($p > 0,05$).

Sangue/Órgãos	CTL (cpm/g)	<i>F. chica</i> (cpm/g)	MUC (cpm/g)	<i>F. chica</i> + MUC (cpm/g)
Sangue	213,9 ^a	203,6 ^a	2664,0 ^b	3414,0 ^b
Fígado	736,8 ^a	682,0 ^a	7304,0 ^b	10063,0 ^b
Baço	229,1 ^{a,c}	79,7 ^a	5101,0 ^b	1978,0 ^{b,c}
Coração	221,6 ^{a,c}	130,6 ^a	1169,0 ^b	1342,0 ^{b,c}
NLM	5097,0 ^a	1195,0 ^a	89509,0 ^b	43469,0 ^{a,b}
Pulmão	244,8 ^{a,c}	137,5 ^a	1884,0 ^{b,c}	2437,0 ^b
Rins	924,8 ^{a,c}	243,3 ^a	13022,0 ^b	11889,0 ^{b,c}

Tabela 6 - Efeito do extrato de *F. chica* sobre a biodistribuição de *E. coli*-99mTc no sétimo dia do protocolo experimental. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns. Os valores foram expressos como mediana (n=9). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.10 Avaliação da atividade das enzimas MPO e EPO

As enzimas MPO e EPO foram avaliadas no íleo, para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente. A Figura 23 mostra o resultado referente ao MPO e ao EPO, que não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$).

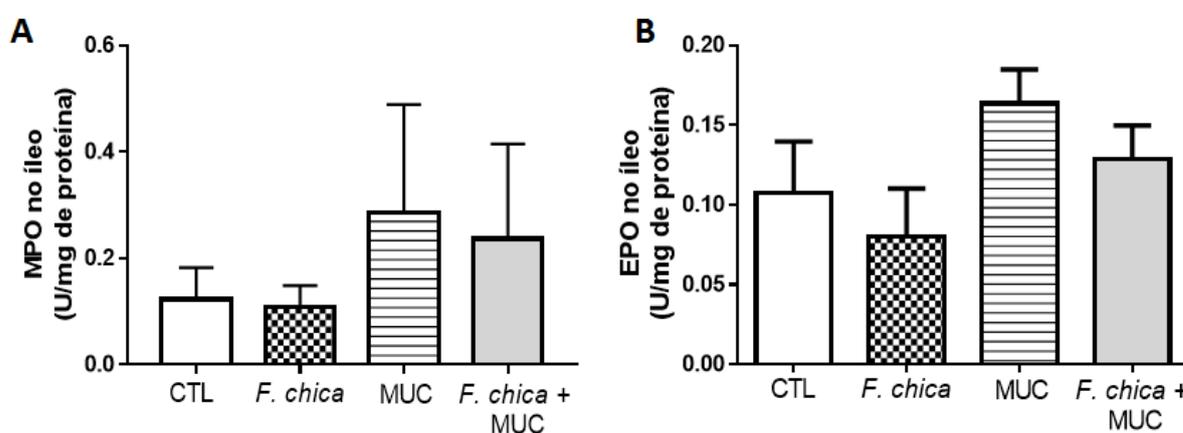


Figura 23 - Efeito do extrato de *F. chica* no infiltrado celular intestinal do íleo, mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO). (A) Mieloperoxidase (MPO) (B) Peroxidase eosinofílica (EPO). Os dados foram analisados por ANOVA-one way e pós-teste de Tukey. Dados expressos como média \pm desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

6.11 Dosagem de citocinas no íleo

Ao analisar a citocina IL-10, de perfil anti-inflamatório na mucosite, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Figura 24). Ao analisar a citocina IL-1 β , conhecida por seu perfil pró-inflamatório na mucosite, também não se observa diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 24).

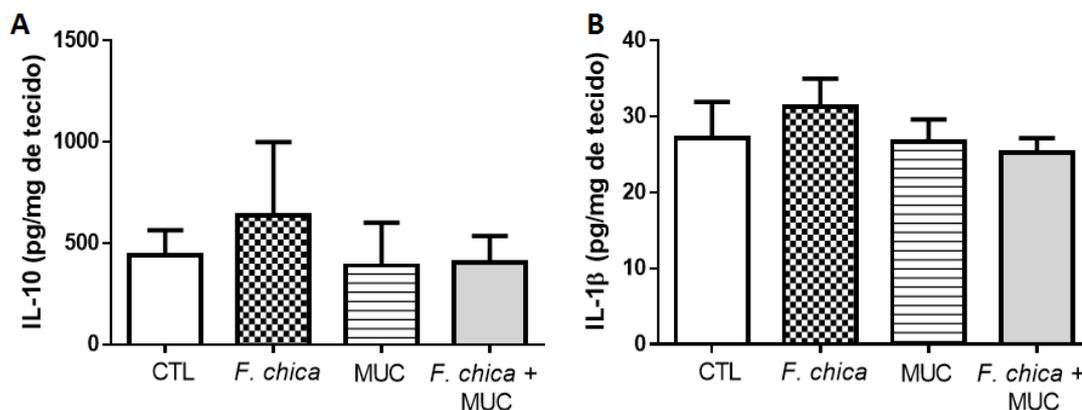


Figura 24 - Efeito do extrato de *F. chica* na produção de citocinas no íleo. (A) IL-10 (B) IL-1β. Dados analisados pelo teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. Em (A) e (B) não foram observadas diferença estatística significativa ($p > 0,05$). (n=8 – grupo CTL; n=7 – grupo *F. chica*; n=9 – grupo MUC; n= 8- grupo *F. chica* + MUC).

6.12 Determinação da imunoglobulina A secretora (sIgA) no intestino delgado

Ao analisar os níveis de sIgA, observou-se aumento significativo no grupo MUC, quando comparado aos grupos CTL e *F. chica* ($p < 0,05$). No grupo *F. chica* + MUC observa-se níveis intermediários em relação aos demais grupos investigados (Figura 25).

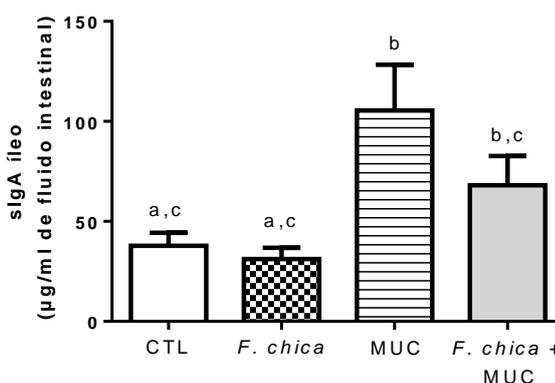


Figura 25 - Efeito do extrato de *F. chica* sobre a concentração da Imunoglobulina A secretora (sIgA) no lúmen intestinal. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns e expressos como mediana e intervalo interquartil (n=10). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

A utilização de um modelo de associação de drogas antineoplásicas como o adotado nesse estudo é de extrema relevância, tendo em vista que os quimioterápicos raramente são utilizados isoladamente na prática clínica. Em uma *guideline* publicada em 2007 por Keefe e colaboradores, o protocolo FOLFIRI destacou-se por sua probabilidade de desenvolver diarreia graus 3 e 4 (mais grave) associada a mucosite, o que chama atenção para a gravidade do problema, tendo em vista que não há tratamentos profiláticos nem curativos para a mucosite. Além disso, na prática clínica, os protocolos de tratamento são administrados, majoritariamente, em ciclos, e não em dose única. Sendo assim, o modelo adotado nesse trabalho visou reproduzir de maneira mais fidedigna a prática clínica, uma vez que o mesmo causa alterações fisiopatológicas significativas sem, no entanto, causar elevada mortalidade.

Tendo sido estabelecida a dose ideal dos quimioterápicos 5-FU e irinotecano, prosseguiu-se com a avaliação do efeito enteroprotetor do extrato de *F. chica* em modelo experimental de mucosite entérica. Os resultados desse trabalho demonstraram que a associação entre 5-FU e irinotecano foi capaz de causar lesões significativas na mucosa intestinal, com evidente alteração da arquitetura do epitélio como destruição das vilosidades, necrose das criptas, aumento do infiltrado inflamatório e alterações de permeabilidade intestinal. Os animais tratados com o extrato de *F. chica* foram parcialmente protegidos dos efeitos enterotóxicos mostrados com o 5-FU e irinotecano.

Existe apenas um estudo na literatura que utilizou a associação de 5-FU e irinotecano em modelo animal de mucosite intestinal (PEREIRA et al., 2015). Contudo, este estudo teve como objetivo apenas a padronização do modelo de associação dos quimioterápicos, não tendo abordado qualquer forma de tratamento ou manejo para a mucosite. Investigações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa avaliaram os efeitos do extrato hidroetanólico de *F. chica* sobre a mucosite intestinal. Entretanto, o modelo utilizou apenas o quimioterápico 5-FU em regime de dose única e uma concentração do extrato de 300 mg/kg (TAKENAKA, 2017). Takenaka (2017) também utilizou a dose de 30 mg/kg para avaliação dos parâmetros de histologia e permeabilidade intestinal.

No presente trabalho os animais dos grupos MUC e *F. chica* + MUC apresentaram perda de peso e redução do consumo alimentar de maneira significativa. Observa-se também que a administração do extrato não foi capaz de reverter este quadro. A perda de peso e a redução do consumo alimentar podem ser explicados devido ao processo inflamatório ativo, que induzem o desenvolvimento de lesões e ulcerações na mucosa levando a diminuição da atividade enzimática no epitélio intestinal e liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que dificulta diretamente a ingestão de alimentos e absorção de nutrientes (MELO et al., 2007; THORPE, STRINGER e BUTLER, 2013; MAIOLI et al., 2014; BARROS, 2016; TAKENAKA, 2017).

No trabalho de Takenaka (2017) houve melhora significativa em relação aos parâmetros consumo alimentar e variação ponderal dos animais após a indução da mucosite e administração do extrato. Entretanto, a dose utilizada do extrato foi maior do que a utilizada nesse trabalho, o que pode explicar as diferenças encontradas. Além disso, dados ainda não publicados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a dose de 30 mg/kg do extrato de *F. chica* não melhorou, significativamente, a perda de peso dos animais em modelo de mucosite com dose única, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Os relatos da literatura sobre modelos de mucosite em que houve emprego de plantas medicinais como proposta de tratamento mostram dois estudos que avaliaram a atividade anti-inflamatória de formulações ou derivados contendo plantas que também estão na lista da RENISUS. Ambos utilizaram modelos de mucosite induzidos por 5-FU. No estudo de Ávila e colaboradores (2015) o 5-FU foi administrado em doses seriadas nos dias 4, 5 e 6 do protocolo experimental e o tratamento com a formulação mucoadesiva contendo *Bidens pilosa* (Asteraceae) em diferentes concentrações foi administrada diariamente por 6 dias. As concentrações de 100 e 125 mg/kg foram capazes de levar ao ganho de peso significativo dos animais que tiveram a mucosite induzida e que receberam o tratamento. Santos Filho e colaboradores (2016) também empregaram doses seriadas do 5-FU durante os três últimos dias do protocolo experimental. Empregaram como tratamento a formulação mucoadesiva contendo curcominóides do extrato de *Curcuma longa* L. em diferentes concentrações (3,75; 7,5 e 15 mg/kg), durante os 6 dias do protocolo experimental.

Ao final, todas as doses foram capazes de atenuar a perda de peso dos animais quando comparados ao grupo mucosite.

Outro parâmetro importante da mucosite intestinal é a diarreia, sinal clínico de grande relevância, uma vez que pode ser uma complicação fatal no tratamento do câncer (KEEFE, GIBSON e HAUER-JENSEN 2004; BENSON et al., 2014). O irinotecano é responsável por gerar diarreia dividida em duas fases: precoce e tardia, parâmetros observados tanto em roedores, quanto em humanos (SALTZ et al., 2000; TRIFAN et al., 2012). Os resultados mostram início de diarreia com 24 horas de administração dos quimioterápicos, sendo que os episódios de diarreia mais severos ocorreram nos dias 6 e 7. Corroborando com esses achados, Pereira e colaboradores (2015) também observaram diarreia severa no sétimo dia de indução em um modelo de associação entre 5-FU e irinotecano.

Em relação à atividade antidiarreica do extrato de *F. chica*, não há ainda estudo na literatura realizado em modelo animal que comprove essa atividade. Entretanto, no uso popular a planta é empregada para a diminuição de cólicas intestinais e diarreia (BEHRENS, TELLIS e CHAGAS, 2012). Nesse trabalho, o extrato de *F. chica* demonstrou redução da severidade da diarreia nos animais que foram tratados. Entretanto, outros testes como o de contratilidade intestinal, devem ser realizados para entendimento do mecanismo pelo qual o extrato de *F. chica* atua na atenuação da diarreia.

Sabe-se pela literatura que a mucosite induzida por quimioterápicos promove alterações histopatológicas significativas no intestino delgado, resultando em hipoproliferação de células das criptas e encurtamento das vilosidades (GENEROSO et al., 2015; BARROS et al., 2018). No presente estudo, a associação de 5-FU e irinotecano promoveu importantes alterações morfométricas e histopatológicas, causando diminuição significativa do tamanho das vilosidades, necrose das criptas e presença de infiltrado inflamatório, semelhante ao descrito por Pereira e colaboradores (2015) também em um modelo de associação utilizando 5-FU e irinotecano.

O tratamento com o extrato de *F. chica* (grupo *F. chica* + MUC) atuou positivamente sobre as vilosidades, preservando sua estrutura. Além disso, o extrato também foi capaz de impedir a destruição das criptas intestinais e reduzir o infiltrado

inflamatório. Resultados semelhantes foram descritos por Takenaka (2017) utilizando o mesmo extrato, tanto na dose de 300 mg/kg quanto na dose de 30 mg/kg. Os resultados obtidos pelas análises histológicas foram confirmados pelo sistema de escore histológico do íleo, que mostrou escores duas vezes menores nos grupos que receberam o extrato. Além disso, detalhes desses aspectos histológicos foram melhores identificados pela microscopia eletrônica de transmissão, que mostrou menor sinal de dano celular e preservação da estrutura das microvilosidades no grupo *F. chica* + MUC.

Interessantemente, o extrato de *F. chica* parece ter uma atuação direta sobre as criptas intestinais, hipótese essa que foi evidenciada pelas análises morfométricas. Quando foi realizada a medida da profundidade dessas criptas, o grupo *F. chica* apresentou uma profundidade de criptas significativamente inferior ao grupo CTL, sugestivo de algum mecanismo de ação específico sobre as criptas. Entretanto, outras análises serão necessárias para confirmação e melhor entendimento desse processo.

A análise microscópica do íleo corrobora com a hipótese de uma atividade anti-inflamatória parcial do extrato sobre o epitélio intestinal. Os achados com a dose de 30 mg/kg obtidos por Takenaka (2017) foram semelhantes aos obtidos nesse trabalho, visto que também não houve uma melhora total do epitélio intestinal. Um possível mecanismo de atuação da *F. chica* pode ser a diminuição da migração de células inflamatórias para o tecido, através de atuação direta sobre receptores vasculares, como a *P*-selectina e a *E*-caderina.

Todos esses danos descritos na mucosa levam ao conseqüente aumento da permeabilidade intestinal (LI e SLAYTON, 2013; NAGPAL e YADAV, 2017). Para a análise da permeabilidade intestinal utilizou-se o radiotraçador DTPA-99mTc, administrado por gavagem, com o objetivo de verificar sua passagem do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Em um epitélio intestinal normal, a molécula de DTPA devido ao seu caráter hidrofílico atravessa a barreira intestinal, pelos espaços paracelulares, atingindo níveis fisiológicos, o que faz deste radiofármaco uma boa alternativa para avaliar possíveis alterações nesse epitélio (ANDRADE et al., 2015; TAKENAKA, 2017). Além disso, esse método é mais sensível e rápido e confiável, quando comparado ao teste de excreção de lactulose e manitol, teste também utilizado para avaliar a permeabilidade intestinal.

Diversos estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa, em modelos de mucosite, utilizando o 5-FU demonstraram aumento significativo dos níveis de DTPA-99mTc na corrente sanguínea (FERREIRA et al., 2012; MAIOLI et al., 2014; GENEROSO et al., 2015; BARROS et al., 2018). Os resultados obtidos para o grupo MUC desse estudo também mostraram aumento significativo dos níveis de DTPA-99mTc no sangue. Similarmente, o grupo *F. chica* + MUC também apresentou aumento de permeabilidade, indicando que nessa concentração o extrato não reduziu a alta permeabilidade intestinal associada aos efeitos enterotóxicos do 5-FU e irinotecano.

Como mencionado anteriormente, o uso de agentes antineoplásicos provoca danos diretos sobre o epitélio intestinal por meio da destruição de vilosidades e criptas. Danos indiretos também são descritos devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias, o que conseqüentemente, resulta em aumento da permeabilidade (NAGPAL e YADAV, 2017). O mecanismo pelo qual essa destruição ocorre é dependente do agente quimioterápico utilizado. O 5-FU já foi descrito por Pritchard e colaboradores (1998), como indutor da proteína p53, responsável por levar a perda da arquitetura tecidual, com início 24 horas após a administração do quimioterápico. O estudo de Lima-Júnior e colaboradores (2012), mostra que as iNOS, ativadas pelo irinotecano, são responsáveis pelo encurtamento das vilosidades intestinais. O aumento da permeabilidade poderia ser explicado então, por esses mecanismos.

Takenaka (2017) mostrou diminuição significativa, para níveis fisiológicos, da permeabilidade intestinal dos animais tratados com extrato de *F. chica* nas doses de 300 e 30 mg/kg, diferentemente do resultado encontrado para o grupo *F. chica* + MUC desse trabalho. Não foram encontrados outros estudos na literatura que utilizem extrato de plantas para o tratamento da mucosite intestinal, que avaliem também a permeabilidade intestinal. O resultado encontrado nesse trabalho pode ser explicado pela severidade do modelo, principalmente no que se refere à utilização do irinotecano, principal diferença do modelo de Takenaka (2017). Como o irinotecano sofre biotransformação no fígado, sua forma ativa, que é mais tóxica, apresenta maior concentração plasmática que o 5-FU que, por sua vez, só é transformado em seu metabólito ativo no interior das células tumorais (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; BASTOS et al., 2016).

O aumento da permeabilidade intestinal também está relacionado com a alteração na expressão das proteínas de junção firme (WARDILL et al., 2013). No presente trabalho foram avaliadas a expressão da ZO-1 e da ocludina. A ZO-1 possui o papel de ancorar as outras proteínas que participam do complexo juncional (SHIN e MARGOLIS, 2006; GONZÁLES-MARISCAL et al., 2008), ao passo de que a ocludina é essencial para a manutenção da integridade da mucosa intestinal (SAITOU et al., 2000). Não existem relatos na literatura avaliando a expressão dessas proteínas em um modelo de associação entre 5-FU e irinotecano. Os resultados obtidos mostraram aumento na expressão de ocludina em ambos os grupos que desenvolveram a mucosite, o que indica que a gravidade da lesão estimulou o epitélio a tentar buscar a homeostase (FERREIRA et al., 2012). Esses resultados são concordantes com os resultados de permeabilidade intestinal, uma vez que a molécula do DTPA-99mTc, hidrofílica, atravessa pelo espaço paracelular, local onde se encontra a proteína de junção ocludina. Por outro lado, os resultados de expressão da ZO-1, mostraram aumento significativo no grupo MUC, enquanto que se observaram níveis intermediários no grupo de *F. chica* + MUC, o que corrobora com a hipótese de que o extrato está agindo para atenuar a lesão tecidual nesses animais, visto que a ZO-1 é uma proteína citoplasmática.

As alterações de permeabilidade intestinal fazem com que endotoxinas e microrganismos patogênicos, antes contidas no lúmen, atravessem o epitélio e ganhem acesso a corrente sanguínea, entrando em contato com órgãos extra-intestinais, resultando no aumento da translocação bacteriana (WIEST; RATH, 2003). Nesse trabalho avaliou-se a translocação bacteriana (TB) pelo método da bactéria *E. coli* radiomarcada com Tc-99m.

Para os animais tratados com o extrato de *F. chica* e que tiveram indução da mucosite foram observados valores de TB 2,0 vezes menores para os nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) e 2,5 vezes menores para o baço, quando comparados aos grupos CTL e MUC. Enquanto que no fígado e no sangue não foi observada atenuação significativa da TB, resultados que são concordantes com os achados de permeabilidade intestinal e expressão de proteínas de junção firme. Por outro lado, Takenaka (2017), observou redução significativa da TB em todos os órgãos, com exceção do sangue, quando tratados com o extrato de *F. chica* na dose de 300 mg/kg, resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho que se utilizou a associação

de quimioterápicos e dose de 30 mg/Kg do extrato. Uma possível explicação para o resultado obtido é a agressividade do modelo utilizado para induzir a mucosite, bem como a menor dose utilizada para o tratamento. Apesar disso, observa-se uma atenuação, parcial, do processo de TB, resultado satisfatório e muito relevante considerando o extenso dano causado ao epitélio.

Todas as alterações provocadas na arquitetura tecidual têm relação direta com a modulação da resposta imune, uma vez que o aumento do infiltrado inflamatório tecidual está envolvido no processo de fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios, aumentando a vascularização tecidual e a concentração de leucócitos no local da lesão (ABBAS e LICHTMAN, 2011). Dentre esses leucócitos estão os neutrófilos e eosinófilos, responsáveis pela liberação do conteúdo tóxico de seus grânulos intracelulares, afim de eliminar agentes invasores (MEDZHITOV, 2008; WRIGHT et al., 2009). No conteúdo desses grânulos estão as enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO), liberadas quando é desencadeada uma resposta inflamatória. Sendo assim, a ocorrência de um processo inflamatório no íleo pode ser medida indiretamente por meio da dosagem dessas enzimas (WRIGHT et al., 2009; BASTOS et al., 2016; DOS SANTOS FILHO et al., 2016; TAKENAKA, 2017; BARROS et al., 2018; TRINDADE, 2018).

Supreendentemente em comparação aos relatos disponíveis na literatura, que também utilizaram modelo de mucosite (PEREIRA et al., 2015; BARROS et al., 2018; ÁVILA et al., 2015), as dosagens de MPO e EPO nesse estudo, não apresentaram diferença significativa entre nenhum dos grupos estudados. Estudos adicionais serão necessários para explicar tais achados.

Além da resposta decorrente da migração dos leucócitos para o sítio da inflamação, há a liberação de citocinas pró-inflamatórias como resposta ao dano causado no epitélio. Em um trabalho de revisão descrito por Al-Dasooqi e colaboradores (2013) sobre a fisiopatologia da mucosite, destacaram-se dois estudos de Logan (2007 e 2009) correlacionando a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 como associadas à toxicidade provocada na mucosa intestinal. Em relação às citocinas com perfil anti-inflamatório na mucosite, destaca-se a IL-10 (AL-DASOOQI, WARDILL e GIBSON, 2013). Um estudo de Koning e colaboradores (2006) utilizando animais knockout para IL-10 mostrou perda de peso e lesão severa na mucosa intestinal, com a utilização de metotrexato, indicando a importância da mesma para a atenuação dos

danos causados pelos quimioterápicos. No presente trabalho não se observou diferenças estatisticamente significativas para as citocinas IL-1 β e IL-10 entre os grupos investigados. Barros e colaboradores (2016) mostraram aumento apenas da IL-1 β 24 horas após a indução da mucosite por 5-FU em camundongos BALB/c, não evidenciando qualquer alteração referente à TNF- α e IL-10. Em outro trabalho publicado por Barros e colaboradores (2018) 72 horas após a indução da mucosite por 5-FU, os resultados mostram aumento significativo de TNF- α /IL-1 β e redução de IL-10 no grupo mucosite.

Por outro lado, Alencar e colaboradores (2016), utilizando modelo de mucosite por 7 dias, induzida por irinotecano em camundongos Swiss, mostraram níveis elevados de TNF- α e IL-1 β no duodeno dos animais do grupo mucosite. Quando se administrou o extrato de *Calotropis procera* (Apocynaceae) esses pesquisadores observaram redução significativa dos níveis dessas citocinas. Gou e colaboradores (2016) utilizando formulação herbal contendo 8 plantas empregadas na medicina tradicional chinesa, em modelo de mucosite induzido por 5-FU com duração de 10 dias, também mostraram níveis elevados de TNF- α e IL-1 β e de forma similar ao trabalho descrito por Alencar e colaboradores (2016) o tratamento também reduziu os níveis de citocinas. A explicação para os achados referentes às citocinas, no presente trabalho, provavelmente esteja relacionada com o modelo de associação de quimioterápicos que poderia promover alterações na cinética dessas citocinas, de modo que 72 horas talvez não tenha sido o tempo adequado para a determinação das mesmas.

Um outro componente igualmente importante no sistema de defesa do intestino, é a presença de imunoglobulina secretora A (sIgA). No lúmen intestinal, esta imunoglobulina promove a manutenção da homeostase impedindo que antígenos intestinais ganhem a circulação sanguínea restringindo a penetração de bactérias (PABST, 2012). Os resultados obtidos nesse trabalho mostram aumento na secreção de sIgA nos animais do grupo MUC e diminuição, a níveis intermediários, no grupo *F. chica* + MUC. Observa-se altos níveis de TB para NLM no grupo MUC, o que possivelmente contribuiu para maior ativação e transformação dos linfócitos B em plasmócitos que são responsáveis pela produção de IgA que é lançada no lúmen intestinal (PABST, 2012). A administração do extrato de *F. chica*, (*F. chica* + MUC) atenuou a TB para os NLM em função da redução do dano epitelial, o que resultou em

menor ativação dos linfócitos B e conseqüente redução para níveis intermediários de sIgA (PABST, 2012).

8 CONCLUSÃO

- 1- Os animais do grupo mucosite intestinal induzida pela administração dos quimioterápicos 5-FU e irinotecano mostraram redução de peso corporal e ingestão alimentar; aumento significativo dos escores de diarreia, aumento do escores histológico, aumento de permeabilidade intestinal e de translocação bacteriana.
- 2- A administração do extrato *F. chica* (30 mg/kg) atenuou parcialmente os danos do epitélio intestinal, escores de diarreia, expressão de ZO-1, translocação bacteriana para o NLM e os níveis de secreção de sIgA.

9 PERSPECTIVAS

- Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato de *F. chica* em um modelo de pré-tratamento e também em um modelo de tratamento total;
- Investigar as alterações de microbiota intestinal envolvendo a associação dos quimioterápicos e a administração do extrato de *F. chica*;
- Avaliar o estresse oxidativo mediante TBARS, determinação da concentração de hidroperóxidos, determinação as atividades das enzimas superóxido dismutase e da catalase;
- Padronizar o extrato hidroetanólico de *F. chica*;
- Avaliar a expressão de moléculas de adesão *E*-caderina e *P*-selectina;
- Avaliação do extrato em um modelo de tumor implantado, afim d a fim de avaliar se o extrato interfere, de alguma forma, na eficácia e segurança da quimioterapia em curso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- *American Cancer Society. The cancer atlas, 2016. 2nd Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2016*
- BRASIL – Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer – INCA <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cao-causa-cancer>. Acesso em 08 de dezembro de 2018.
- BRASIL – Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer – INCA <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 08 de dezembro de 2018.
- BRASIL - Ministério da Saúde - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde – RENISUS http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. – Biblioteca Virtual do Ministério da Saúde – Acesso em 08 de dezembro de 2018.
- BRASIL – Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer – INCA <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em 29 de outubro de 2015.
- Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 60 p.
- *U.S. National Cancer Institute. Chemotherapy and You – Support for people with cancer. June, 2011.*
- *U.S. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. Acesso em 15 de novembro de 2018.*
- World Health Organization – WHO / Organização Mundial da Saúde – OMS .*World Cancer Report, 2014.*
- World Health Organization – WHO / Organização Mundial da Saúde – OMS <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 20 de Abril de 2017.
- World Health Organization – WHO / Organização Mundial da Saúde – OMS <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 08 de dezembro de 2018.

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, 2011.

AJANI, J. A. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. *Oncologist*. v. 10, p. 49 – 58, 2005.

AL-DASOOQI, N. Matrix metalloproteinases and gut toxicity following cytotoxic cancer therapy. *Supportive and palliative care*. v. 8, n.2, 2014.

ALENCAR, N. M. N. et al. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 2, p. 312-320, 2017.

ALIMONTI, A. et al. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. *Cancer Treatment Reviews*, v. 30, n. 6, p. 555-562, 2004.

ANDRADE, M.E.R.– Ação da arginina na proteção da colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano. Tese de Doutorado – Ciência de Alimentos – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2016.

ARAÚJO, C. V. et al. Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 6, p. 493-501, 2015.

ARRIETA, M.C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J.B. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55:1512–1520. DOI: 10.1136/gut.2005.085373.

ÁVILA, P. H. M. et al. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Toxicology Reports*, v. 2, p. 563-573, 2015.

AYABE, T. et al. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature*. v. 1, n. 2, p. 113–118, 2000.

AZRAK, R. G. et al. Therapeutic Synergy Between Irinotecan and 5-Fluorouracil against Human Tumor Xenografts. *Clinical Cancer Research*. v. 10, p. 1121 -1129, 2004. DOI: 10.1007/s12032-008-9128-1

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, n.4, p.544-548, 2008.

BARROS, P. V. A. et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V. 103, p. 1567 – 1576. 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.133

BARROS, P.A.V. Efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) proveniente de fonte natural e sintético sobre a mucosite intestinal, induzida por 5-fluorouracil, em modelo experimental. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2016.

BARROS, P. A. V.; GENEROSO, S. V.; ANDRADE, M. E. R.; DA GAMA, M. A. S.; LOPES, F. C. F.; DE SALES E SOUZA, E. L.; MARTINS, F. S.; MIRANDA, S. E. M.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. Effect of conjugated linoleic acid-enriched butter after 24 hours of intestinal mucositis induction. *Nutrition and Cancer*. 2016. DOI: 10.1080/01635581.2016.1225100

BARBOUNIS, Y. et al. Control of irinotecan-induced diarrhea by octreotide after loperamide failure. *Support Care Cancer*. V. 9, P. 258 – 260, 2011. DOI: 10.1007/s005200000220

BASTOS, R. W. et al. Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Beneficial Microbes*, v. 7, n. 4, p. 549-557, 2016.

BASTOS, C.C.C. et al. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. *Toxicology Reports*. Vol. 3, p.279-287, 2016.

BATISTA, M. A. et al. Pretreatment with citrulline improves gut barrier after intestinal obstruction in mice. *JPEN J Parenteral Enteral Nutrition*. v. 36, p. 69– 76, 2012

BEHRENS, M.D.; TELLIS, C.J.M.; CHAGAS, M.S.; Monografia *Arrabidaea chica* (Hum. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). *Revista Fitos*, vol.7, número 4, outubro/dezembro 2012.

BENSON III, A. B. et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 14, 2918-2926, 2004.

BEUTHEU, S. et al. Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. *Clinical Nutrition*, v. 33, n. 4, p. 694-701, 2014.

BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. T. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of Oncology*. v. 18, p. 817 – 826, 2007. doi:10.1093/annonc/mdl332

BORRÁS, M.R.L. *Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*. Manaus: Ed. Valer, 2003.

BRANDÃO, M. G. L., et al. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. 2010.

CARTÁGENES, M.S.S. - Investigação dos efeitos tóxicos e hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Big- noniaceae). Tese de Doutorado - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa, PB, 2009.

CASTILHO, R. O.; BRAGA, F. C. *Farmacognosia: coletânea científica*. Em: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Ouro Preto: Editora UFOP, p.295-318, 2011.

CHABNER, B. A., LONGO, D. L. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice. *Annals of Oncology*. v. 13 (8), 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf237>

CHANG C. T, et al. 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and in Vivo Bioluminescence Imaging. *PLoS One* 7(3): e31808. DOI: 10.1371/journal.pone.0031808; 2012.

CHANSKY, K., BENEDETTI, J., MACDONALD, J. S. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer*. v. 15, p. 1165 – 1171, 2005.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A.G.; ROBINSON, E. The coloring matters of carajuruna. *Journal of the Chemical Society*, p. 3015-3040, 1927.

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

CHESTER, J. D. et al. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 15, p. 1125 – 1132, 2003.

CINAUSERO, M. et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. *Frontiers in pharmacology*. v. 8, p. 1 – 16, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00354

COSTA, C. B. M. C. et al. Community-acquired diarrhea associated with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*. v. 26, p. 138 – 139, 2014.

DA ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. *Holos*. v. 1, p. 49 – 61, 2015.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, nº 1; 118-129, 2005.

DE MAN, F. M., GOEY, A. K. L., VAN SCHAİK, R. H. N., MATHIJSSSEN, R. H. J., BINS, S. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clinical Pharmacokinetics*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0644-7>.

DEAN, L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. *Medical Genetics Summaries*, 2018.

DIAS, M. M.; MCKINNON, R. A.; SORICH, M. J. Impact of the UGT1A1*28 allele on response to irinotecan: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics*. v. 13, p. 889-899, 2012.

DINIZ, S. O. F.; RESENDE, B. M.; NUNAN, E. A.; SIMAL, C. J. R.; CARDOSO, V. N. 99mTechnetium labelled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.* v. 51, p. 33-36, 1999.

DINIZ, S.O.F. et al. Assessment of bacterial translocation in obstructive Jaundice using 99m-Tc-*Escherichia coli*. *Braz. Arch. Bio. Techn.* v. 48, n1; p.45-49, 2005.

DOS SANTOS FILHO, E. X. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. *Toxicology Reports*, v. 3, p. 55-62, 2016.

DOS SANTOS, R. V. T. et al. Effect of exercise on glutamine synthesis and transport in skeletal muscle from rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 36, p. 770 – 775, 2009. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2009.05146.x

DUNCAN, M.; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment. Pharmacol. Ther.* v.18, p.853-868, 2003.

DING, M., FENG, R., WANG, S.Y., BOWMAN, L., LU, Y., QIAN, Y., CASTRANOVA, V., JIANG, B.H., SHI, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J BIOL CHEM*. 2006.

FERDINANDI, D.M.; FERREIRA, A.A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. *AC & T Científica*. v. 1, n. 1, p. 1-12, 2009.

FERREIRA, T.M.; LEONEL, A.J.; MELO, M.A.; SANTOS, R.R.G.; CARA, D.C.; CARDOSO, V.N.; CORREIA, M.I.T.D.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration. *Lipids*, v. 47, p. 669-678, 2012.

FREITAS, A. P. F. et al. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory

mediators. Naunyn-Schmiedeberg's. *Archives of Pharmacology*, v. 385, n. 10, p. 981-990, 2012.

FUJI, H. KOSHIYAMA, M., KONISHI, M., YOSHIDA, M., TAUCHI, K. Intermittent repetitive administrations of irinotecan reduces side-effects. *Cancer Detect Prev.* v 26, p. 210 – 212, 2002.

GALDINO, F. M. P.; ANDRADE, M. E. R.; BARROS, P. A. V.; GENEROSO, S. V.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; PELUZIO, M. C. G.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. *Journal of Functional Foods.* v 49, p. 485 - 492, 2018.

GENEROSO, S. V. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids in Health and Disease*, v. 14, n. 54, p. 1-10, 2015.

GENEROSO, S.V. Leveduras probióticas no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2010.

GIBSON, R. J. e KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Supportive Care in Cancer*, v.19, n. 9, p. 890-900, 2006.

GIFONI, M. A. Mucosite e alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de Câncer Colorretal Metastático tratados com 5-fluorouracil (5-FU) e Irinotecano (CPT-11) – Tese de doutorado – Oncologia- Fundação Antônio Prudente, 2012.

GINZÁLES-MARISCAL, L., TARPIA, R., CHAMORRO, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2008. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018

GOU, H., GU, L. Y., SHANG, B. Z., XIONG, Y. WANG, C. Protective effect of Bu-Zhong-Yi-Qi decoction, the water extract of Chinese traditional herbal medicine, on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Human and Experimental Toxicology.* p. 1 – 9, 2016. DOI: 10.1177/0960327115627686

GREM, J. L. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational New Drugs*, v. 18, n. 4, p. 299-313, 2000.

GRIVICICH, I. A importância na sequência de administração do irinotecano e 5-fluorouracil na inibição da proliferação do carcinoma de cólon humano in vitro. Dissertação de mestrado – Ciência Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS, 1999.

GROTEWOLD, E. The Science of Flavonoids. Springer: New York, NY, 2006.

HARBONE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* v. 55, p. 481–504, 2000.

HARRIS, D.J. Cancer treatment-induced mucositis pain: strategies for assessment and management. *Therapeutics and clinical risk management*, v.3, p.251-258, 2006.

HOFF, P.M.G. *Tratado de Oncologia*. 1ª Edição. São Paulo. Atheneu. 2012

IRVIN, W. P., PRICE, F. V., BAILEY, H., GELDER, M., ROSENBLUTH, R., DURIVAGE, H. J., POTKUL, R. K. A phase II study of irinotecan in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer.* v 15, p. 328-333, 1998.

JORGE, M.P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot extract. *J. Ethnopharmacol* 118: 361-366, 2008

JUSTINO, P. F. C. et al. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation

and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 75, n. 3, p. 559-567, 2015.

JUSTINO, P. F. C. et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *British Journal of Nutrition*, v. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.

KEEFE, D. M. et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*, v. 109, n. 5, p. 820-831, 2007.

KEEFE, D. M.; GIBSON, R. J.; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 20, n. 1, p. 38-47, 2004.

KEITA, A. V.; SODERHOLM, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility*. V. 22, p. 728 – 733. 2018 doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* v. 96, p.229-245, 2004.

KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, v. 37, n. 6, p. 697-708, 1999.

KOENIG, H., PATEL. A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of krebs cycle inhibition by fluoroacetate. *Arch neurol.* v. 23 (2), p. 155 – 160, 1970.

KONING, B. A. E., DIEREN, J. M. V., LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J., SLUIS, M. V. D., MATSUMOTO, T., YAMAGUCHI, K., EINERHAND, A. W., SAMSOM, J. N., PIETERS, R., NIEUWENHUIS, E. S. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. *International Immunology*. v. 187, P. 941 – 949. doi:10.1093/intimm/dxl030

KOWN, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. *OncoTargets and Therapy*. v. 9, p. 2007 – 2016, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S96899>

KURITA, A., KADO, S., KANEDA, N., ONOUE, M., HASHIMOTO, S., YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2000.

LALLA, R. V. et al., *MASCC/ISOO Clinical Practice Guidelines for the Management of Mucositis Secondary to Cancer Therapy*. 2017. DOI: 10.1002/cncr.28592

LALLA, R.V. et al. The mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO Clinical Practice Guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*; May, 2014, p.1453-1461.

LANGER, C. J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. *Oncology*. 2004.

LI, L. S. et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 158, 679–692, 2009.

LI, X.; SLAYTON, W. B. Molecular mechanisms of platelet and stem cell rebound after 5-fluorouracil treatment. *Exp Hematol*, v. 41, n. 7, p. 635–645, 2013.

LICHTMAN, S. M. Bacterial translocation in humans. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2001. DOI: 10.1159/000479918

LIMA-JÚNIOR, R. C. et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LIU, S. X. et al. Platelet-activating factor induces the processing of nuclear factor kappa B p105 into p50, which mediates acute bowel injury in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 297, n. 1, p. 76-81, 2009.

LIU, Y. et al. Fish Oil Enhances Intestinal Integrity and Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge. *The Journal of Nutrition*, v. 142, n. 11, p. 217-224, 2012.

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

LOGAN, R. M. et al. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 63, n. 2, p. 239-251, 2009.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNDTON, P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, v.3, p.330-338, 2003.

MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *British Medical Bulletin*, v. 71, p. 1–11, 2004.

MACFIE, J. Enteral versus parenteral nutrition: The significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition*, v. 16, n. 7-8, p. 606–611, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAIOLI, T. U. et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *J Negat Results Biomed*, v. 13, p. 6, 2014.

MANI, S.; BOELSTERLI, U. A.; REDINBO, M. R. Understanding and Modulating Mammalian-Microbial Communication for Improved Human Health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. v. 54, p. 559 – 580. 2014. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-140007.

MARTINS, F.S. et al. Comparative study of *Bifidobacterium* animals, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives of Microbiology*, v.191, p.623-630, 2009.

MATHIJSSSEN, R.H.J. et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome p450 3A4 phenotyping probes. *J. Natl. Cancer Inst.* v. 6, p. 1585 -1592, 2004.

MCCULLOUGH, R.W. US oncology-wide incidence, duration, costs and deaths from chemoradiation mucositis and antimucositis therapy benefits. *Future Oncology*, v. 13, n. 30, p. 2823-2852, 2017.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, vol. 454, 2008.

MEGO, M. et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study. *Complementary Therapies in Medicine*, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2015.03.008>.

MELO, M.L. et al. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.61, p.775-784, 2007.

MICHEL, A.F.R.M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 163 (2015), 29-38.

MIRANDA, N. et al. Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of *Arrabidaea chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.05.004

MUKHERJEE, P. K. et al. Paradigm shift in natural product research: traditional medicine inspired approaches. *Phytochemistry Reviews*, 21 jan. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11101-016-9489-6>>. Acesso em 15 de Novembro de 2018.

MUNKER, S. et al. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. *BMC Cancer*. v.18, p. 1- 9, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4380-z>

NAGPAL, R., YADAV, H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Annals of Nutrition and Metabolism*. v. 71, p. 11–16, 2017.

OLIVEIRA, D.P.C. et al. Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Rev Bras Farmacogn* 19: 643-649. 2008.

OLIVEIRA, D.P.C.; MATSUURA, M.M.; BORRÁS, M.R.L. 1995 - Estudo da atividade biológica da *Arrabidaea chica* Verl. Crajiru. Relatório de Pesquisa, curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1995.

PABST, O., MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology*. v. 5, p. 232 – 239, 2012.

PAULA, J.T. et al. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *J. of Supercritical Fluids*. v. 86, p. 100-107, 2014.

PERA, M. et al., Phase II trial of preoperative chemoradiotherapy with oxaliplatin, cisplatin, and 5-FU in locally advanced esophageal and gastric cancer. *Annals of Oncology*. 23: 664–670, 2012. doi:10.1093/annonc/mdr291

PEREIRA, V. B. M. et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 77, n. 2, p. 323-332, 2015.

PEREIRA, V.B.M.– Novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-fluorouracil em camundongos C57BL-6. Dissertação de mestrado – Farmacologia – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2013.

PEREZ, E. A. et al. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. *Journal of Clinical Oncology*. 22(14):2849-55. 2004.

PÉREZ-COBAS, A. E. et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut Microbiota*. V. 62, p. 1591 – 1601. 2013. doi:10.1136/gutjnl-2012-303184

PESSOA, R. M.; LIMA, W. G.; VITAL, K. D.; CARDOSO, V. N; FERNANDES, S. O. A. Repurposing the Thalidomide to the Treatment of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis: An Old Drug to a New Use. *Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 6, 2018.

POZZO, C. et al. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*. v. 15, p. 933 – 939, 2004. DOI: 10.1093/annonc/mdh217

PRITCHARD, D. M.; POTTEN, C. S.; HICKMAN, J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil- induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res*, v. 58, n. 23, p. 5453–5465, 1998.

QUIRINO, I. E. P., CORREIA, M. I. T. D., CARDOSO, V. N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clinical nutrition*. v. 26, p. 335 – 340, 2007. doi:10.1016/j.clnu.2006.12.007

REGNARD, C., ROBERT, R., MIHALVO, M., WILCOCK, A. Loperamide. *Journal of Pain and Symptom Management*. v. 42, p. 319 – 323. 2011.

RIBEIRO, A.F.C.– Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. Tese de doutorado – Ciência Animal – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2012.

RIBRAG, V. et al. Phase II trial of irinotecan in relapsed or refractory non-Hodkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. v. 44, p. 1529 – 1533, 2003.

ROCHA-LIMA C. M. et al. Cancer and Leukemia Group B. Phase II trial of irinotecan/gemcitabine as second-line therapy for relapsed and refractory small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 39902. *Annals of Oncology*. v. 18, p. 331-337, 2007.

ROCHA-LIMA, C. M. et al. Irinotecan/gemcitabine combination chemotherapy in pancreatic cancer. *Oncology*. v. 15, p. 45 -51, 2001.

ROSATI, G. et al. A phase II study of irinotecan alternated with a weekly schedule of high-dose leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil infusion in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology*. 62(3):209-15, 2002.

SAITOU, M. et al. Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Molecular Biology of the Cell*. V. 11, p. 4131 – 4142, 2000.

SALTZ, L. B. et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan study group. *N Engl J Med*. v. 28, p. 905 – 914, 2000.

SAMPSON, M.M.; NANJAPPA, S.; GREENE, J.N. Mucositis and oral infections secondary to gram negative rods in patients with prolonged neutropenia. *IDCases*.v. 9, p. 101 – 103, 2017. doi:10.1016/j.idcr.2017.06.014

SANGILD, P. T. et al. Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 314, n. 2, p. 231-246, 2018.

SAWADA, N. O. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes submetidos à quimioterapia. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 43(3):581-7, 2009.

SCHMITTEL, A. et al. Neomycin as secondary prophylaxis for irinotecan-induced diarrhea. *Annals of Oncology*. v. 15, 2004.

SCULLY, C.; EPSTEINS, J.; SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. part 2: diagnosis and management of mucositis. *Willey InterScience*, 2003. DOI: 10.1002/hed.10326

SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. *Medical Oncology*. v. 26, p. 350- 357. 2009. DOI: 10.1007/s12032-008-9128-1

SHIN, K.; MARGOLIS, B. Zoning out Tight Junctions. *Cell*. 2006. DOI:10.1016/j.cell.2006.08.005

SONG, M.; PARK, M.; SUNG, M. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/C mice. *Journal of Cancer Prevention*; v.18, p. 322-329, 2013

SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncology*. v. 34, p. 39 - 43 , 1998.

SONIS, S. T. Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, p. 2201 -2205, 2001.

SONIS, S. T. Regimen-related gastrointestinal toxicities in cancer patients. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 4, p. 26-30, 2010.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews* v.4, 277-284, 2004

SOUZA, D. G. et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*, v. 131, n. 8, p. 1800–1808, 2000.

STEIN, S.; WIELAND, V.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. v. 2, p. 51 – 63, 2010. DOI: 10.1177/1758834009355164

STRINGER, A. M. et al. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. *Experimental Biology and Medicine*, v. 232, n. 1, p. 96-106, 2007.

SULTANI, M. et al. Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Chemotherapy Research and Practice*. 2012. DOI:10.1155/2012/490804

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 70, p. 631 – 659. 2013. DOI 10.1007/s00018-012-1070-x

SWAMI, U.; GOEL, S.; MANI, S. Therapeutic Targeting of CPT-11 Induced Diarrhea: A Case for Prophylaxis. *Curr Drug Targets*. V. 14, p. 777 – 797, 2013.

TAKASUNA, K. et al. Study on the mechanisms of diarrhea induced by a new anticancer camptothecin derivative, irinotecan hydrochloride (CPT-11), in rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1995

TAKEMURA, O. S. et al. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry*, vol. 38, nº 5, pp. 1299-1300, 1995.

TAKENAKA, I. K. T. M. - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot EM MUCOSITE MURINA E SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA. Dissertação de mestrado – Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2017.

TANCHAROEN, S. et al. Anthocyanins Extracted from *Oryza sativa* L. Prevent Fluorouracil-Induced Nuclear Factor- B Activation in Oral Mucositis: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018

TEIXEIRA, S. et al. Structure property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radical Biology & Medicine*. n.39, p.1099-1108, 2005.

THOMSEN, M; CLARKE, S; VITETTA, L. The role of adjuvant probiotics to attenuate intestinal inflammatory responses due to cancer treatments. *Beneficial Microbes*. p. 1–18, 2018. DOI: 10.3920/BM2017.0172

THORPE, D.; STRINGER, A.; BUTLER, R. Chemotherapy-induced mucositis: the role of mucin secretion and regulation, and the enteric nervous system. *Neurotoxicology*, 38, p. 101-105, 2013.

TOUCHEFEU, Y. et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis – current evidence and potential clinical applications. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 40, n. 5, p. 409-421, 2014.

TRIFAN, O. C. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res*. V. 15, p. 5778- 5784, 2002.

TRINDADE, L. M. EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DO *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 EM EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL. Dissertação de mestrado- Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. 2018.

TRINDADE, L. M. et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Beneficial Microbes*, v. 9, n. 3, p. 477–486, 2018.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. E., eds. Medicinal resources of the tropical forest biodiversity and its importance to human health. *New York: Columbia University Press*, 1996, p 3-10.

ULLUWISHEWA, D., ANDERSON, R. C., MCNABB, W. C., MOUGHAN, P. J., WELLS, J. M., ROY, N. C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition*. V. 141, p. 769 – 776, 2011. doi: 10.3945/jn.110.135657.

VAN SEBILLE, Y. Z. A. et al. Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. *Curr Oncol Rep*. 2015. DOI 10.1007/s11912-015-0474-9

VIANA, M. L. et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition*. v.26, p.218-23, 2010.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLA, A.; SONIS, S.T. Mucositis: pathobiology and management. *Curr. Opin. Oncol*. 2015, 27:159-164

VON-POSER, G. L, SCHRIPSEMA, J., HENRIQUES, A.T., JENSEN, S.R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Bioch. Syst. Ecol*. v. 28, p. 351 – 366, 2000.

WANG, L. S., STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*. V. 2, p. 281 – 290. 2008. doi:10.1016/j.canlet.2008.05.020

WARASHINA T, NAGATANI Y, NORO T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Chem Pharm Bull*. 2006.

WARDILL, H. R. et al. Irinotecan disrupts tight junction proteins within the gut. *Cancer Biology & Therapy*. 2013.

WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, n.3; p. 397-425, 2003

WOO, P. C. Y. et al. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. *Pharmacol. Res.* v. 41, p. 526 – 532, 2000.

WRIGHT, T.H. et al. The herbal extract, Iberogast®, improves jejunal integrity in rats with 5-Fluorouracil (5-FU)-induced mucositis. *Cancer Biology & Therapy*, 8:10, p. 923-929; 2009.

YASUDA, M. et al. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 168, n. 6, p. 1388-1400, 2013.

ZORN, B. et al. 3 Desoxyanthonyanidins from *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot *Phytochemistry*, v.56, p. 831-835, 2001.

APÊNDICE A – Padronização do protocolo experimental

O modelo utilizado no estudo, foi adaptado do modelo proposto por Pereira de colaboradores (2015). Inicialmente foram realizados estudos piloto com o objetivo de escolher a melhor dose que fosse capaz de induzir o dano significativo na mucosa intestinal e que, ao mesmo tempo, produzisse o mínimo de letalidade. Para atingir esse objetivo, foram investigados 5 protocolos experimentais de associação entre os fármacos 5-FU e irinotecano, nos quais foram analisadas a variação ponderal e a histologia dos animais. O animal utilizado para esse modelo experimental foram camundongos BALB/c, machos. Essa escolha se deve ao fato de que esses animais já haviam sido utilizados em outro estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa e permitiriam comparações diretas dos resultados obtidos (TAKENAKA, 2017).

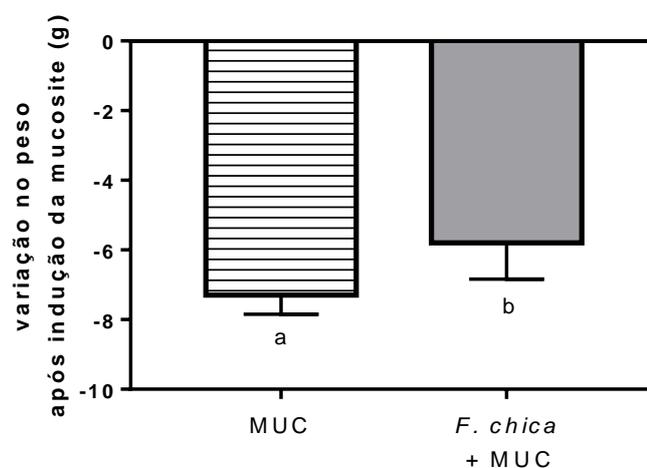
O protocolo escolhido foi aquele em que os animais foram tratados por 4 dias consecutivos com solução salina intraperitoneal e/ou 5-FU (34 mg/kg) e irinotecano (41 mg/kg), totalizando uma dose de 300 mg/kg. Adicionalmente à indução da mucosite, os animais foram tratados com extrato hidroetanólico de *F. chica* (30 mg/kg) e/ou salina durante os 7 dias. A escolha do sétimo dia para eutanásia baseou-se nas observações de Lima-Júnior e colaboradores (2012), que avaliaram o pico de diarreia dos animais e a taxa de mortalidade. Quando os animais foram eutanasiados no oitavo dia, a taxa de letalidade era muito alta e no nono dia essa taxa atingia 100%. Além disso, sabe-se que o 5-FU produz uma diarreia tardia, que tem seu pico 72 horas após a administração do fármaco. O irinotecano é responsável por gerar uma diarreia precoce, com 24 horas, e uma diarreia tardia, com picos 72 horas após a administração do fármaco (PEREIRA, et al, 2015).

Experimento 1:

- Dose utilizada:

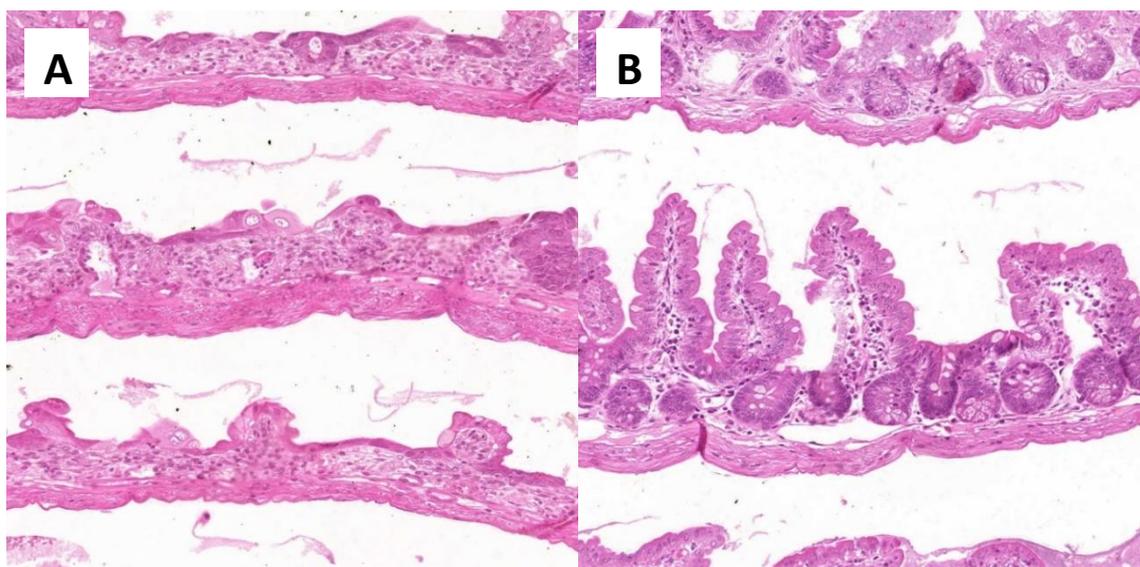
5-FU (mg/kg/dia)	Irinotecano (mg/kg/dia)	Dose total (mg/kg)
37,5	45	320

- Variação ponderal:



Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

- Histologia:



Grupo MUC (A) e grupo *F. chica* + MUC (B)

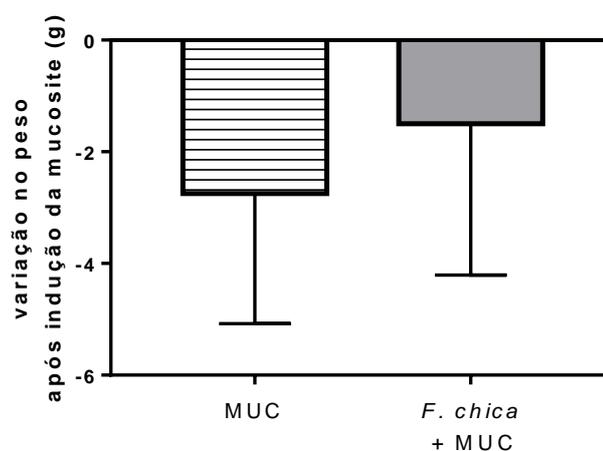
- Conclusão: A dose de associação utilizada foi muito alta, causando a morte dos animais. A lâmina histológica apresentou tecido extremamente destruído, impossibilitando qualquer tipo de análise subsequente.

Experimento 2:

- Dose utilizada:

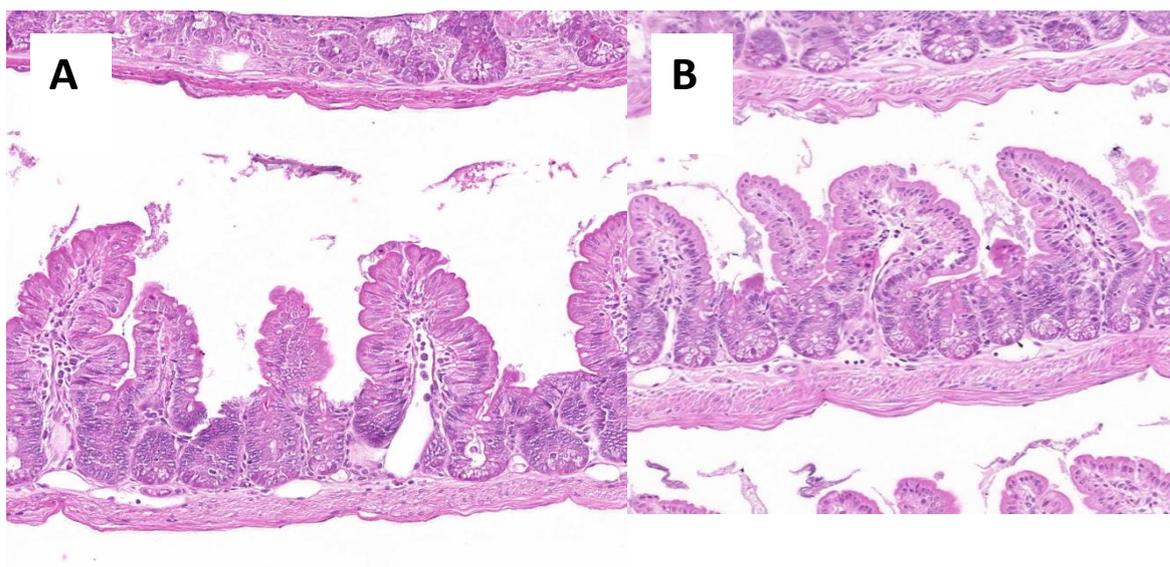
5-FU (mg/kg/dia)	Irinotecano (mg/kg/dia)	Dose total (mg/kg)
26	34	240

- Variação ponderal:



Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

- Histologia:



Grupo MUC (A) e grupo *F. chica* + MUC (B)

- Conclusão: A dose utilizada acabou sendo branda, pois não houve diferença entre as lâminas dos animais doentes e tratados. Não havia destruição ou

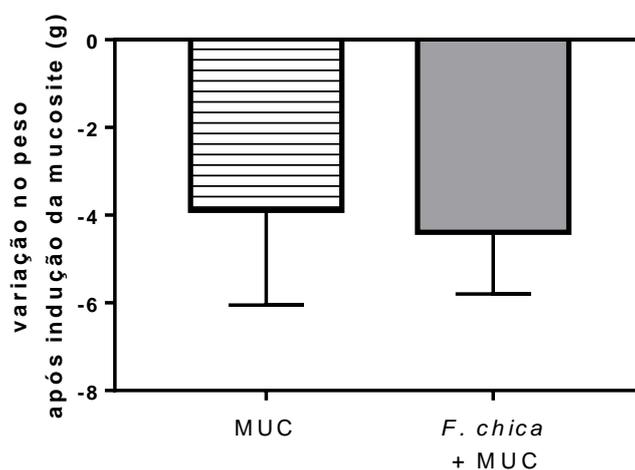
achatamento de criptas e vilosidades, além de pouco infiltrado inflamatório. Além disso, apenas 1 animal doente desenvolveu diarreia severa e 1 animal do grupo tratamento também desenvolveu diarreia severa.

Experimento 3:

- Dose utilizada:

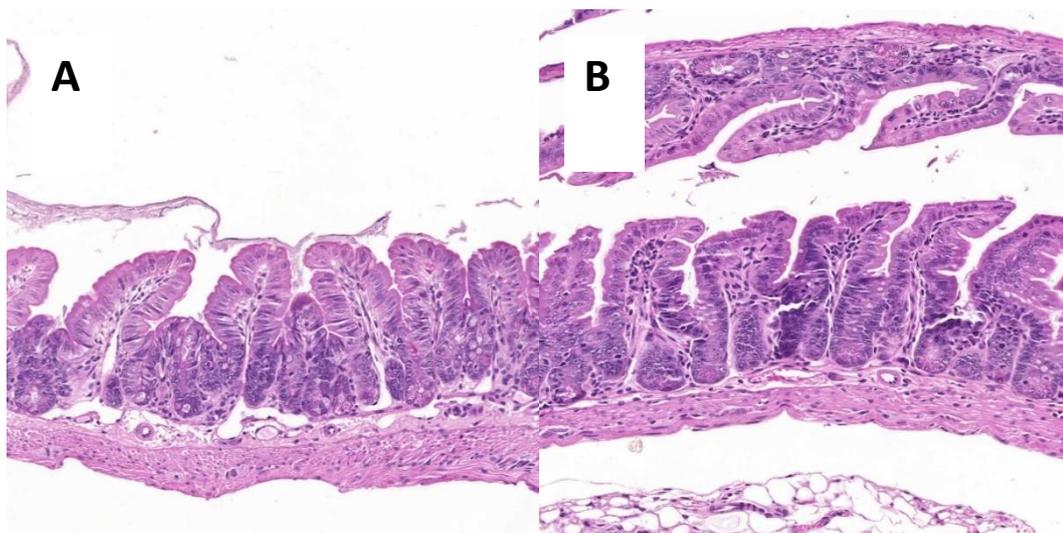
5-FU (mg/kg/dia)	Irinotecano (mg/kg/dia)	Dose total (mg/kg)
29	35	260

- Variação ponderal:



Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=9). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

- Histologia:



Grupo MUC (A) e grupo *F. chica* + MUC (B)

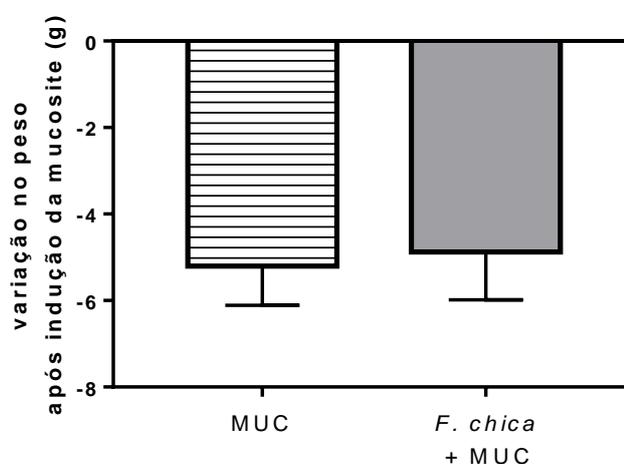
- Conclusão: A dose utilizada ainda continuava branda. Além disso, os animais estavam em um nível de estresse muito elevado, em comparação aos experimentos anteriores, o que pode ter influenciado também os resultados.

Experimento 4:

- Dose utilizada:

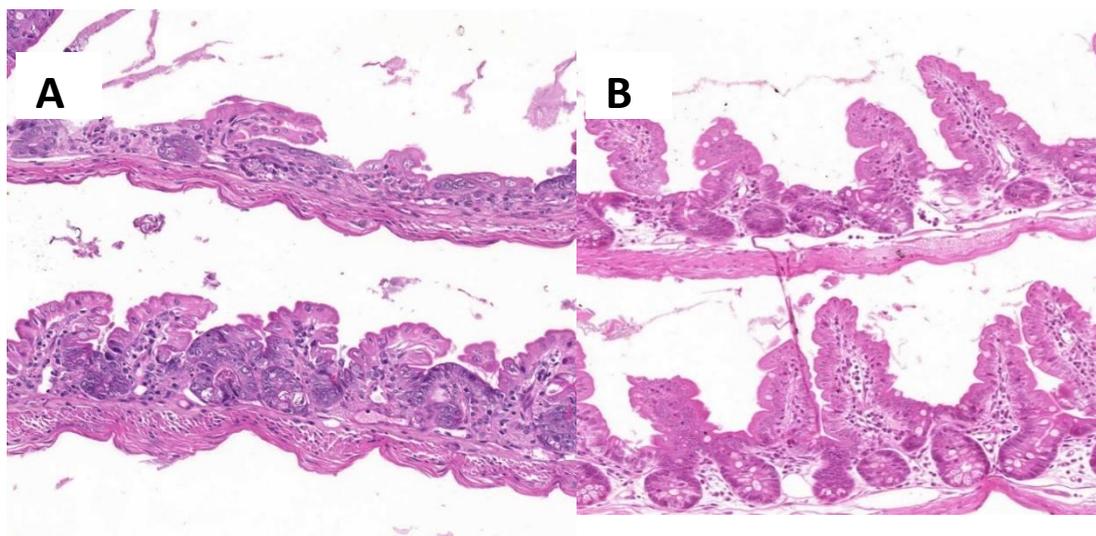
5-FU (mg/kg/dia)	Irinotecano (mg/kg/dia)	Dose total (mg/kg)
31	39	280

- Variação ponderal:



Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

- Histologia:



Grupo MUC (A) e grupo *F. chica* + MUC (B)

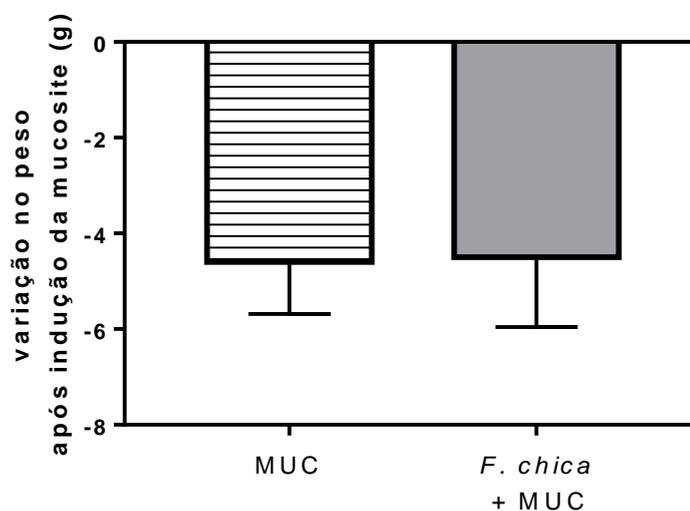
- Conclusão: A dose utilizada estava no limite entre causar inflamação suficiente para realizar as análises propostas. Como nem todos os animais haviam tido diarreia severa e alteração na histologia, decidiu-se tentar uma dose um pouco mais elevada.

Experimento 5:

- Dose utilizada:

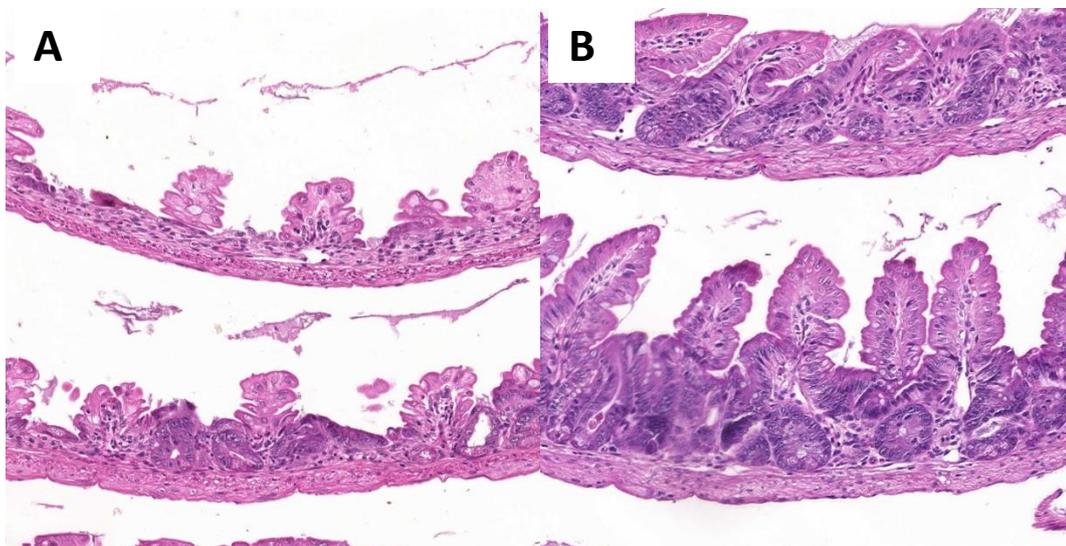
5-FU (mg/kg/dia)	Irinotecano (mg/kg/dia)	Dose total (mg/kg)
34	41	300

- Variação ponderal:



Os dados foram analisados pelo teste *t* não pareado, sendo expressos como média \pm desvio padrão (n=5). Letras diferentes, indicam diferença estatisticamente significativa.

- Histologia:



Grupo MUC (A) e grupo *F. chica* + MUC (B)

- Conclusão: A dose total de 300 mg/kg produziu o efeito inflamatório desejado, sem causar grande mortalidade aos animais. Portanto, foi a dose escolhida para trabalho.

APÊNDICE B – Tabela completa da biodistribuição de *E. coli*-99mTc no sétimo dia do protocolo experimental

Sangue/ Órgãos	CTL (cpm/g)	<i>F. chica</i> (cpm/g)	MUC (cpm/g)	<i>F. chica</i> + MUC (cpm/g)
Sangue	213,9 (181,7- 218,1) ^a	203,6 (194,0- 240,7) ^a	2664,0 (2219,0- 3168,0) ^b	3414,0 (827,0- 6063,0) ^b
Fígado	736,8 (544,2- 846,7) ^a	682,0 (648,5 -702,2) ^a	7304,0 (5629,0- 12156,0) ^b	10063,0 (3303,0- 15624,0) ^b
Baço	229,1 (124,2- 337,1) ^{a,c}	79,7 (57,3- 247,3) ^a	5101,0 (1686,0- 11430,0) ^b	1978,0 (1435,0- 6582,0) ^{b,c}
Coração	221,6 (85,43- 319,1) ^{a,c}	130,6 (43,3 - 192,9) ^a	1169,0 (583,0- 2037,0) ^b	1342,0 (522,5- 1517,0) ^{b,c}
NLM	5097,0 (2167,0- 11050,0) ^a	1195,0 (927,3- 4462,0) ^a	89509,0 (51823,0- 310282,0) ^b	43469,0 (30322,0- 78148,0) ^{a,b}
Pulmão	244,8 (111,8- 319,9) ^{a,c}	137,5 (91,4- 181,5) ^a	1884,0 (1605,0- 3544,0) ^{b,c}	2437,0 (1975,0- 4186,0) ^b
Rins	924,8(752,4- 1260,0) ^{a,c}	243,3 (232,2- 263,7) ^a	13022,0 (10395,0- 22370,0) ^b	11889,0 (4989,0- 15825,0) ^{b,c}

Tabela 6 - Efeito do extrato de *F. chica* sobre a biodistribuição de *E. coli*-99mTc no sétimo dia do protocolo experimental. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo) (n=9). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 355/2017**Título do projeto:** Avaliação da resposta anti-inflamatória de extratos naturais em modelos experimentais murinos de quimioterapia.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Simone Odilia Antunes Fernandes**Unidade:** Faculdade de Farmácia**Departamento:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 04/12/2017. Validade: 04/12/2017 à 03/12/2022

Belo Horizonte, 04/12/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br