



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

**EFEITO PROTETOR DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium
occidentale* L.) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

PARNAÍBA

2018

JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

EFEITO PROTETOR DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas tecnologias e metodologias de diagnóstico e tratamento

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

Co-orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

M672e Miranda, João Antônio Leal de.
Efeito protetor da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) na mucosite intestinal induzida por 5 fluorouracil [manuscrito] / João Antônio Leal de Miranda. – 2018.
144 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.

1. Antineoplásico. 2. Anacardiaceae. 3. Inflamação. 4. Mucosa. I. Título.

CDD: 616.3

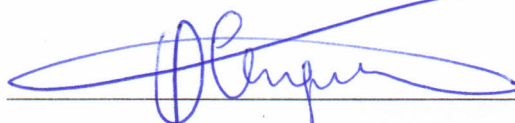
JOÃO ANTÔNIO LEAL DE MIRANDA

EFEITO PROTETOR DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM 31/01/2018

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira - UFC (Presidente)

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI (Membro Interno ao Programa)

Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar - UFPI (Membro externo ao Programa)

PARNAÍBA

2018

Dedico,

À Deus, grandioso em bondade, e em toda as suas maneiras de guiar seu rebanho.

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

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, minha segunda casa, desde quando sai da minha cidade natal, em busca da realização de um sonho, tornar-me bacharel em Biomedicina, e a esta mesma instituição retorno para vislumbrar o grau de mestre em Ciências Biomédicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, em especial, ao professor e coordenador do curso Giovanni Rebouças Pinto, por tornar este sonho uma realidade, e pela prontidão do mesmo em sanar muitas das minha inquietações e dúvidas, sempre com zelo e prontidão, ao lidar com seus alunos. A todo o quadro docente que compõem o programa, que muito alavancou meu conhecimento no meio científico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira, que no meio desta jornada acadêmica, teve mais do que tudo, compreensão e paciência acerca do meu envolvimento com o mestrado, e conciliação com minha vida profissional, bem como prontidão e dedicação em me ajudar a procurar melhor caminho a percorrer no decorrer do programa, e na resolução de percalços que muito se fizeram presentes, mais que com seu apoio, consegui transpor.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, pela sua ajuda, sempre que necessária, pelas palavras de motivação, e pela sabedoria ao dar sugestões valiosas que muito enriqueceram o meu trabalho.

Ao Nucleo de Pesquisa em Biodiversidade Biotecnologia – BIOTEC, em especial a Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva pela disponibilização da Goma do Cajueiro, material de estudo deste trabalho.

Aos amigos e colegas do mestrado, pela companhia dentro aulas e fora de sala de aula, além da preocupação demonstrada sempre que nos “esbarrávamos” pelos corredores da universidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório LAFFEX na UFPI, por sempre se demonstrarem solícitos, e se dispuseram a ensinar ou ajudar em experimentos e duvidas acerca deles, em especial à Khetyma, Reyca, Ana Patrícia, José Junior, Thiago, Kerolayne, Beatriz.

Aos colegas e amigos do Nucleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens – NEMPI na UFC, desde os técnicos Junior, Flávia, Josi, aos alunos de Iniciação científica e pós-graduação, em especial a Deiziane, Roberta, Delon.

À minha amiga e parceira de pesquisa Dainesy Martins, por ter sido meu braço direito, e por que não dizer o esquerdo também, nesta empreitada, por ter aberto às portas de seu lar em Fortaleza, pelo momentos dentro da UFC e fora deles também, apesar de poucos terem sidos os momentos de lazer durante minha estadia, foram pra mim gratificantes, a tudo isso meu muito obrigado sumida!

Ao meu amigo e aluno de iniciação científica Paulo Vitor, por muito que contribuiu no andamento do meu estudo, sempre com uma prontidão surpreendente, sem objeção, e muitas das vezes, abdicando seus momentos de lazer pra ajudar na pesquisa.

Ao Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFC, em nome da Camila, pela ajuda na realização da PCR em tempo real.

À minha amiga Francilene, sempre torceu pelo meu sucesso, e em momentos difíceis lá estava ela pra me dar uma luz no fim do túnel e me socorrer no decorrer deste estudo.

Aos colegas da turma de Biomedicina, em especial pros meus amigo-irmãos Ivan e Victor, por sempre torcerem por mim, e também a duas pessoas estimo bastante, e que sempre soube que poderia contar Samara e Herlice.

Ao meu amigo-irmão Luan Kelves, parceiro desde o curso de biomedicina, amigo pra toda hora, nos bons, ruins e péssimos momentos, pra todos estes posso contar contigo, agradeço, também, por ter me incentivado e impulsionado a fazer o mestrado de ciências biomédicas.

Aos meus irmãos Paula Anaíde e Gabriel Antony, por torcerem sempre por mim e acreditarem que eu conseguiria lograr êxito nesta etapa.

À minha companheira Kellem Dias pela apoio diário, pela confiança em mim depositada, por me trazer esperança, felicidade, paz e amor, em todos os momentos, inclusive nos dias difíceis, meu muito obrigado.

Aos meus colegas e amigos professores da Universidade Regional do Cariri - URCA, que sempre me apoiaram, torceram por mim, com vocês uma viagem diária de 300 km pra Campos Sales era nada comparado ao calor fraternal sentido por esta família que me acolheu durante 2 anos.

Aos meus queridos alunos da Unidade Descentralizada de Campos Sales, URCA, pela preocupação comigo e com o andamento do meu mestrado, bem como a compreensão pelos dias que não estava bem humorado.

Ao professor Dr. Marcelo Filgueiras, por aceitar participar da minha banca de qualificação e por muito que contribuiu em seus comentários para o aperfeiçoamento da minha dissertação.

À Alexandra Elbakyan, por ajudar a transpor as barreiras existentes no mundo científico, sem sua colaboração, pesquisar fora dos portões da universidade seria impossível.

A todos que de maneira direta ou indiretamente colaboraram em algum momento pelo andamento da execução da minha pesquisa, meu muitíssimo obrigado!

RESUMO

A mucosite intestinal é uma complicação frequente no tratamento do câncer com o agente quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). Até o momento ainda não existe tratamento eficaz deste agravo. Na busca de novas alternativas terapêuticas para a redução dos efeitos colaterais oriundos do 5-FU no tratamento do câncer, vários produtos naturais tem sido testados. A goma do cajueiro (GC) tem sido reportada, como um potente anti-inflamatório, bem como apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antileishmaniose e antiulcerogênica. Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo extraído do exsudato de *Anacardium occidentale* L., na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos *Swiss*. Para isso, foram utilizados camundongos (25-30 g), os quais foram divididos em 5 grupos (n=6): grupo salina, grupo 5-FU, e três grupos tratados GC nas doses de 30, 60 e 90 mg/g. Seguindo os dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, e porções dos segmentos intestinais foram removidos para avaliação da mucosite, através dos parâmetros análise ponderal, análise histopatológica e morfométrica, leucograma, malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), Glutathione (GSH), contagem de mastócitos, imunohistoquímica para interleucina 1 beta (IL-1 β) e ciclooxigenase 2 (COX-2). O 5-FU causou intensa perda ponderal, comprometimento da barreira epitelial, promovendo a redução da altura das vilosidades, a perda da integridade do epitélio intestinal caracterizada por descontinuidade do tecido, além de vacuolização das células da mucosa intestinal e intenso infiltrado de células inflamatórias comparado ao grupo salina. Por outro lado, a GC 90 preveniu as alterações histopatológicas promovidas por 5-FU; bem como diminuiu o estresse oxidativo, através da atenuação dos níveis de MDA e aumento da concentração de GSH; diminuiu o processo inflamatório, através da diminuição de MPO, contagem de mastócitos teciduais, expressão de IL-1 β e COX-2. A GC 90 também reverteu a leucopenia provocada pelo tratamento com 5-FU, mas não foi capaz de reverter a perda ponderal. Conclui-se que a GC 90, reverteu os efeitos da mucosite intestinal induzida por 5-FU, figurando-a com um agente protetor na mucosite intestinal induzida por quimioterápico.

Palavras-chave: Antineoplásico. Anacardiaceae. Inflamação. Mucosa.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is a common complication on treatment of cancer induced by the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU). So far, there is no effective treatment for the pathology. In the search for new therapeutic alternatives for reduction of 5-FU side effects, several natural products have been tested. Cashew gum (GC) has been reported as a potent anti-inflammatory, as well as showing antibacterial, antifungal, anti-leishmaniosis and anti-ulcerogenic activity. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of cashew gum, a heteropolysaccharide extracted from the exudate of *Anacardium occidentale* L., on intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in Swiss mice. Mice (25-30 g) were divided into 5 groups (n = 6): saline group, 5-FU group and three GC treated groups at doses of 30, 60 and 90 mg/kg. Histopathological and morphometric analysis, leukogram, malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), Glutathione (GSH), mast cell counts, immunohistochemistry for interleukin 1 beta (IL-1B) and cyclooxygenase-2 (COX-2). 5-FU caused intense weight loss, impairment of the epithelial barrier, promoting a reduction in villus height, a loss of integrity of the intestinal epithelium characterized by discontinuity of the tissue, as well as vacuolization of cells of the intestinal mucosa and intense infiltration of inflammatory cells compared to the saline group. On the other hand, a GC 90 prevented histopathological changes promoted by 5-FU, as well as decrease oxidative stress, through attenuation of MDA levels and increasing of GSH concentration; decreased inflammatory process by decreasing MPO, tissue mast cell counts, expression of IL-1 β and COX-2. GC 90 also reversed the leucopenia caused by 5-FU treatment, but was not able to reverse weight loss. It was concluded that GC 90, reversed the effects of intestinal mucositis induced by 5-FU, acting as a protective agent on intestinal mucositis induced by chemotherapy.

Keywords: Antineoplastic. Anacardiaceae. Inflammation. Mucosa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Características da neoplasia.....	21
Figura 02. Estrutural de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.....	24
Figura 03. Mecanismo de Ação do 5-FU.....	25
Figura 04. Organização da mucosa intestinal.....	27
Figura 05. Morfologia do epitélio do intestino delgado: arranjos dos vilos e das criptas.....	28
Figura 06. Fisiopatologia da Mucosite em cinco fases.....	31
Figura 07. Segunda fase da fisiopatologia da mucosite.....	33
Figura 08. Liberação de mieloperoxidase pelos neutrófilos.....	37
Figura 09. Formação do malondialdeído pela peroxidação lipídica.....	39
Figura 10. Síntese de GSH e ciclo catalítico.....	41
Figura 11. Distribuição celular das isoformas de SOD e Mecanismo de ação.....	44
Figura 12. Metabolismo do óxido nítrico: síntese, reações e inativação do óxido nítrico.....	47
Figura 13. Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.) e seus derivados.....	51
Figura 14. Representação esquemática de um fragmento da Goma do Cajueiro (GC)..	52
Figura 15. Esquema da indução e tratamento da mucosite intestinal.....	58
Figura 16. Fluxograma do delineamento experimental.....	59
Figura 17. Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (1978).....	61
Figura 18. Efeito do tratamento com GC sobre a perda ponderal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	71
Figura 19. Efeito do tratamento com GC nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	73
Figura 20. Efeito do tratamento com GC nas alterações morfométricas na altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	78
Figura 21. Efeito do tratamento com GC nas alterações morfométricas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	80
Figura 22. Efeito do tratamento com GC na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	82

Figura 23. Efeito do tratamento com GC na contagem de leucócitos na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU.....	84
Figura 24. Efeito do tratamento com GC nos níveis teciduais de MDA no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	86
Figura 25. Efeito do tratamento com GC na concentração de glutathiona (GSH) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	88
Figura 26. Efeito do tratamento com GC na atividade da mieloperoxidase (MPO) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	90
Figura 27. Efeito do tratamento com GC na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	92
Figura 28. GC reduz o número de mastócitos na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU.....	93
Figura 29. Avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	96
Figura 30. Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	97
Figura 31. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	100
Figura 32. Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	101
Figura 33. Fotomicrografias de Imunohistoquímica para COX-2 do segmento duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	103
Figura 34. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	104
Figura 35. Fotomicrografias de Imunohistoquímica para IL-1 β do segmento duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	106

Figura 36. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para IL-1 β em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	107
Figura 37. Efeito do tratamento com GC sobre a análise ponderal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	107
Figura 38. Modelo hipotético da ação farmacológica da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	122

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 01. Efeitos tóxicos dos quimioterápicos no câncer.....	23
Tabela 02. Propriedades das isoformas de óxido nítrico sintase (NOS).....	48
Tabela03. Efeito do tratamento com GC nos escores histopatológico de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU- Fluoruracil
AK- queratose actínica
CAT- Catalase
CLX - Celecoxibe
CO - Monóxido de Carbono
COX-2- Ciclooxygenase 2
CT- Quimioterapia
DAB- Diaminobenzidine-peróxido
DHFU- dihidrofluorouracil
DPD- dihidropirimidina desidrogenase
dTMP- Monofosfato de desoxitimidina
DTNB- Ácido ditio-nitrobenzoico
dTTP- Desoxitimidina-trifosfato
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
ERO- Espécies reativas de Oxigênio
FdUMP- Monofosfato fluorodesoxiuridina
FdUTP- Trifosfato fluorodesoxiuridina
FUTP- Trifosfato fluororidina
GC- Goma do cajueiro
GI- Gastrointestinal
GSH- Glutathione
HTAB- Brometo de hexadecitrimetilamônio
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-2- Interleucina 2
IL-4- Interleucina 4
IL-6- Interleucina 6
IL-10- Interleucina 10
iNOS- Óxido Nitritico sintetase induzida
L-NAME - N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
LPS - Lipopolissacarídeo
MDA- Malondialdeído

MPO- Mieloperoxidase
MTX - Metotrexato
NET- Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NF- κ B- Fator de transcrição nuclear kappa B
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
OMS- Organização Mundial da Saúde
PBS- Solução Tamponada de Fosfato
PLS- Polissacarídeo
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
RT- Radioterapia
SOD- Superóxido Dismutase
TBARS - Ácido tiobarbitúrico
TCA- ácido tricloroacético
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
TP- Timidina fosforilase
TS- Timidilato sintase
UTP- Trifosfato de uridina
XO- Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1	Câncer: Epidemiologia e Terapêutica.....	21
3.2	5-Fluorouracil (5-FU).....	23
3.3	Histologia do Intestino Delgado.....	26
3.4	Mucosite.....	28
3.5	Mediadores inflamatórios e biomarcadores na mucosite.....	35
3.5.1	Mieloperoxidase (MPO).....	35
3.5.2	Malondialdeído (MDA).....	37
3.5.3	Glutathiona Reduzida (GSH).....	39
3.5.4	Superóxido Dismutase (SOD).....	42
3.5.5	Óxido nítrico (NO) e Nitrito.....	46
3.6	Gomas e Polissacarídeos Naturais.....	50
4	OBJETIVOS.....	54
4.1	Objetivo Geral.....	54
4.2	Objetivos Específicos.....	54
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.1	Coleta de Material Vegetal.....	55
5.2	Isolamento e Purificação da Goma do Cajueiro (GC).....	55
5.3	Animais.....	55
5.4	Considerações éticas.....	56
5.5	Drogas e Reagentes.....	56
5.6	Efeito da Goma de Cajueiro (GC) na mucosite induzida por 5-FU.....	56
5.6.1	Indução da Mucosite.....	56
5.6.2	Tratamento com a GC.....	56
5.6.3	Grupos experimentais.....	57
5.6.4	Parâmetros avaliados.....	58
5.6.4.1	Análise ponderal.....	60
5.6.4.2	Análise Histopatológica e Morfométrica.....	60
5.6.4.3	Leucograma.....	61

5.6.4.4	Dosagem dos níveis de Malondialdeído (MDA).....	62
5.6.4.5	Análise da concentração de Glutathiona (GSH).....	62
5.6.4.6	Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	63
5.6.4.7	Análise da concentração de mastócitos.....	63
5.7	Avaliação do papel do óxido nítrico (NO) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da GC na mucosite intestinal em camundongos.....	64
5.7.1	Análise morfológica e histopatológica.....	65
5.8	Avaliação do papel da ciclooxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da GC na mucosite intestinal em camundongos.....	66
5.8.1	Análise morfológica e histopatológica.....	67
5.8.2	Imunohistoquímica para detecção de IL-1 β e COX-2.....	67
5.9	Análises Estatísticas.....	69
6	RESULTADOS.....	70
6.1	Efeito do tratamento com GC sobre a perda ponderal em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	70
6.2	Efeito do tratamento com GC nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	72
6.3	Efeito do tratamento com GC nos escores histopatológico de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	75
6.4	Efeito do tratamento com GC nas alterações morfológicas na altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	77
6.5	Efeito do tratamento com GC nas alterações morfológicas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	79
6.6	Efeito do tratamento com GC na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	81
6.7	Efeito do tratamento com GC na contagem total de leucócitos sanguíneos de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	83
6.8	Efeito do tratamento com GC nos níveis teciduais de MDA do segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	85

6.9	Efeito do tratamento com GC na concentração de glutathiona (GSH) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	87
6.10	Efeito do tratamento com GC na atividade da mieloperoxidase (MPO) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	89
6.11	Efeito do tratamento com GC na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	91
6.12	Avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	94
6.13	Avaliação do envolvimento da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	98
6.13.1	Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	98
6.13.2	Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	102
6.13.3	Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para IL-1 β em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	105
7	DISCUSSÃO.....	108
8	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124
	ANEXO.....	143

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada por apresentar autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular, potencial ilimitado de replicação, desenvolvimento de angiogênese sustentada, capacidade de invadir e metastatizar, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo. Trata-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (FERREIRA et al., 2012; KUMAR et al., 2013; WHO, 2015).

O tratamento antineoplásico e a busca de melhoria da qualidade de vida do paciente em tratamento crescem de maneira concomitante à incidência de câncer na população mundial. A compreensão sobre o comportamento do corpo humano no decorrer do tratamento do câncer, prognóstico e efeitos colaterais estão no ápice dos estudos (HUANG et al., 2013).

Os agentes quimioterápicos proporcionam a cura de diversos tumores avançados. Atualmente, um dos principais quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer é o 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU é uma pirimidina fluoronada, detentora de atividade antimetabólita, amplamente utilizada no tratamento de vários tipos de câncer e tumores sólidos, incluindo câncer gastrointestinal, câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, próstata, pâncreas, carcinoma (BAYDAR et al., 2005; MIURA et al., 2010; ELBELTAGY et al., 2012b; RAJINIKANTH; CHELLIAN, 2016). Entretanto, toxicidade relacionada a quimioterapia antineoplásica com o 5-FU podem causar efeitos colaterais (CHANG et al., 2012; UDOFOT et al., 2015; WILHELM et al., 2016).

Vários efeitos colaterais estão relacionados ao uso do antineoplásico, como destaque náusea, vômitos, diarreia, mielossupressão, cistite hemorrágica e mucosite (KAWASHIMA et al., 2015a; KAWASHIMA et al., 2015b; KOBUCHI et al., 2016). A mucosite surge a partir de lesões de células basais no trato gastrointestinal devido à quimioterapia ou radioterapia, o que resulta em danos na mucosa, uma reação inflamatória intensa, e consequente ulceração. O quadro de mucosite acomete em torno de 40% dos pacientes tratados com agentes quimioterápicos (PETERSON et al., 2011; KIM et al., 2015).

Produtos naturais são precursores de grande parte de produtos farmacêuticos existente no mercado. Os polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos, apresentando atividades antitumorais, imunestimulante e anti-inflamatória (LEÓDIDO et al., 2017).

Do exsudato do cajueiro, como é conhecido *Anacardium occidentale* L., planta bastante cultivada no estado do Piauí de grande valor medicinal, é obtida um polímero de alto peso molecular, resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses, ou seja, um heteropolissacarídeo complexo extraído do exsudato de *A. occidentale* L. (OFORI-KWAKYE et al., 2012; OLUSOLA et al., 2014). Reportado bastante como Goma do Cajueiro (GC), este heteropolissacarídeo tem sido citado em diversos estudos, como um potente anti-inflamatório, bem como detentor de atividade antimicrobiana, antiulcerogênica e antidiarreica (SCHIRATO et al., 2006; KUMAR et al., 2012; QUELEMES et al., 2013; ARAÚJO et al.; 2015b).

Devido as dificuldade de ferramentas terapêuticas para tratamento da mucosite e na busca de novas alternativas terapêuticas para a redução dos efeitos colaterais oriundos do 5-FU no tratamento do câncer, o presente estudo, objetivou avaliar o efeito da Goma do Cajueiro (GC) em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.

2 JUSTIFICATIVA

Mucosite intestinal, grande percalço no manejo da terapia oncológica, é uma complicação comum durante a quimioterapia. Trata-se de uma inflamação da mucosa oral e/ou gastrintestinal devido a complicações na terapia do câncer com o uso de medicamentos antineoplásicos, entre eles o 5-Fluorouracil (PEREIRA, 2013; MERCADANTE et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015a).

O único tratamento aprovado para mucosite oral, até o momento, é a Palifermina (Kepivance), contudo sua aplicação está limitada a mucosite em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas (CHEN et al., 2016), o que evidencia inexistência, atualmente, de um tratamento padrão e definitivo para a mucosite (BASTOS, 2014; ARAUJO; BARROS, 2015).

Grande parte dos produtos farmacêuticos são desenvolvidos a partir dos produtos naturais. Os polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos, apresentando atividades antitumorais, imunoestimulante e anti-inflamatória (LEÓDIDO et al., 2017).

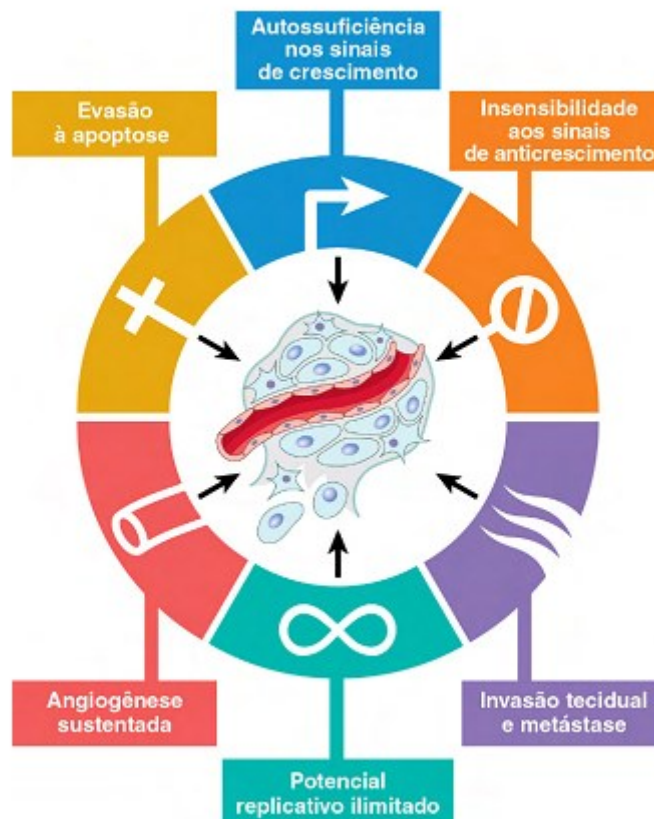
A goma do *Anacardium occidentale* L., planta de grande valor medicinal e bastante cultivada no estado do Piauí, vem sendo utilizada em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, em estudos no processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos; reportando seu potencial anti-inflamatório, bem como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-leishmaniose e antiulcerogênica (TORQUATO et al., 2004; SCHIRATO et al., 2006; KUMAR et al., 2012; QUELEMES et al., 2013; SILVA et al., 2013b; BITTENCOURT et al., 2016). Contudo, não há estudos na literatura que demonstrem o efeito da Goma do Cajueiro como agente eficaz na mucosite intestinal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer: Epidemiologia e Terapêutica

Neoplasia literalmente significa “novo crescimento”. O Câncer, portanto, é uma doença caracterizada por apresentar autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular, potencial ilimitado de replicação, desenvolvimento de angiogênese sustentada, capacidade de invadir e metastatizar, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (Figura 01) (FERREIRA et al., 2012; KUMAR et al; 2013; WHO, 2015).

Figura 01. Características da neoplasia.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al; 2013

Câncer é u nome genérico atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam ao menos, duas características essenciais (crescimento descontrolado e capacidade de metastatizar-se), este agravo é considerado uma condição crônico-degenerativa grave. Trata-se de uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos e, em desenvolvimento, o que deixa as doenças neoplásicas malignas num cenário preocupante de

saúde pública. Tal apreensão, justifica-se pelos índices de morbi-mortalidade referente ao câncer nos últimos anos (KUMAR et al; 2013; ALVES et al. 2017; BENITES et al., 2017).

Em 2012 foram diagnosticados cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer, além disso, a Organização Mundial da Saúde tem estimado que o número de novos casos aumente por volta de 70% nos próximos 20 anos. A estimativa para o Brasil, para o biênio 2016-2017, foi cerca de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2015). Para o ano de 2030, estima-se 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo, decorrentes do crescimento e do envelhecimento populacional (ALVES et al. 2017).

À medida que a incidência de câncer na população mundial cresce, o tratamento antineoplásico e a busca de melhoria da qualidade de vida do paciente em tratamento também se encontram em grande expansão. Dentre os tratamentos do câncer, a quimioterapia tem ocupado um papel de destaque, como um dos principais métodos para o tratamento de diversos tipos de câncer (HUANG et al., 2013). É a opção utilizada principalmente para tratamento de tumores não curáveis por radioterapia e/ou cirurgia, e tem como objetivo principal a destruição das células cancerígenas e preservação das células normais (CHABNER, 2012; BASTOS, 2014).

Atualmente, estão a disposição no mercado diversos tipos de agentes quimioterápicos, capaz de promover erradicação das células cancerígenas por diversos mecanismos de ação, a exemplo, os alquilantes, antimetabólitos, inibidores da topoisomerase (Tabela 01). E apesar dos efeitos dos agentes quimioterápicos para o câncer serem exercidos principalmente na população de células malignas, quase todos os esquemas quimioterápicos empregados hoje também exercem efeitos profundos sobre os tecidos normais. Devido o índice terapêutico e tóxico, na maioria dos quimioterápicos, ser muito estreito ou inexistente, todo efeito colateral do tratamento deve ser pesado contra os benefícios potenciais esperados. Com frequência, a toxicidade relacionada ao tratamento antineoplásico é capaz de causar efeitos colaterais piores que a própria doença, gerando impacto negativo na qualidade de vida do paciente oncológico (CHABNER, 2012; LONGO et al., 2013).

Tabela 01. Efeitos tóxicos dos quimioterápicos no câncer.

Agente Quimioterápico	Mecanismo de ação	Toxicidades
Agentes alquilantes	Acrescenta grupos alquila ao N-7 ou 0-6 da Guanina	Náuseas, vômitos, mielosupressão, esterilidade, alopecia, leucemia aguda.
Antimetabólitos	Inibem a síntese de DNA ou RNA	Náuseas, vômitos, mielosupressão, ulceração oral, hepatotoxicidade, alopecia, sintomas neurológicos
Venenos da tubulina	Bloqueiam a polimerização tubular ou despolimerização	Náuseas, vômitos, mielosupressão, efeito vesicante, íleo paralítico, reações de hipersensibilidade, neuropatia periférica.
Inibidores da topoisomerase	Interferem no desenrolar / reparo do DNA	Náuseas, vômitos, mielosupressão, insuficiência cardíaca
Compostos de platina	Interrompem o reparo do DNA	Náuseas, vômitos, mielosupressão, toxicidade renal, neurotoxicidade

Fonte: Adaptado de LONGO et al., 2013.

3.2 5-Fluorouracil (5-FU)

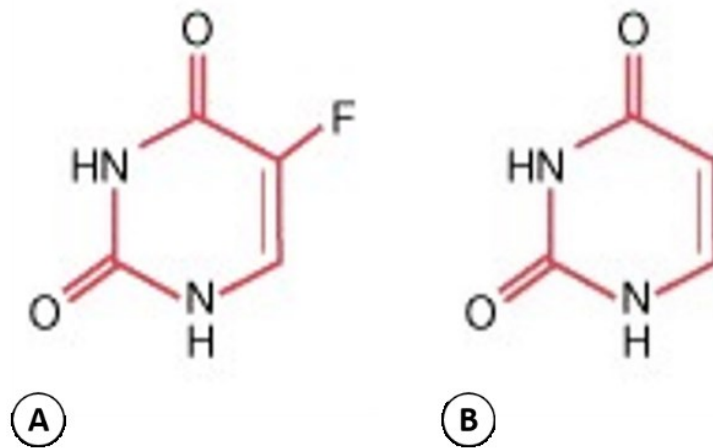
Medicamentos cuja finalidade é tratamento do câncer são denominados de antineoplásico, e atuam por meio da inibição da proliferação de células cancerosas e, deste modo, atuam, por conseguinte, na inibição de crescimento celular ou por matar células cancerosas através de suas interações funcionais do DNA e sinalização celular (ELERSEK et al., 2016). Baseado em seu mecanismo de ação, os antineoplásicos podem ser classificados em agentes alquilantes, complexos de platina, inibidores do fuso mitótico, inibidores da topoisomerase e antimetabólitos (CHABNER, 2012).

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

A fluoropirimidina, 5-fluorouracil (5-FU), um fármaco antimetabólito análogo de nucleosídeo, tem sido utilizado há várias décadas na terapia antineoplásica e, é considerado o agente quimioterápico mais utilizado no mundo (WILHELM et al., 2016). O 5-FU é um composto orgânico aromático heterocíclico com uma estrutura semelhante à das moléculas de pirimidina de DNA e RNA (ZHANG et al., 2008); trata-se de um análogo de uracila com um

átomo de flúor na posição C-5 (Figura 02), em vez de hidrogênio (KUMAR et al., 2010). Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere com o metabolismo de nucleotídeo e pode ser incorporada no RNA e DNA (THOMAS et al., 2015), levando a morte celular e citotoxicidade (ZHANG et al., 2008; UDOFOT et al., 2015).

Figura 02. Estrutural de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.



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

Comumente o 5-FU é administrado por injeção intravenosa (THOMAS et al., 2015), entretanto, a depender do câncer, o 5-FU pode ser administrado por outras vias, como oral (PANGENI et al., 2016) e tópica (RAJINIKANTH; CHELLIAN, 2016). Além da possibilidade de novas formulações com sistema de liberação controlada e continuada do 5-FU no tecido alvo (MINHAS et al., 2016; UDOFOT et al., 2015; WENANDE et al., 2016), bem como da combinação do 5-FU com outros agentes antineoplásicos, por meio de administração concomitante das drogas, melhorando o efeito da quimioterapia contra as células cancerígenas, e reduzindo a toxicidade nas células normais (KOBUCHI et al., 2014; ITO et al., 2016; SUZUKI et al., 2016; GAO et al., 2017).

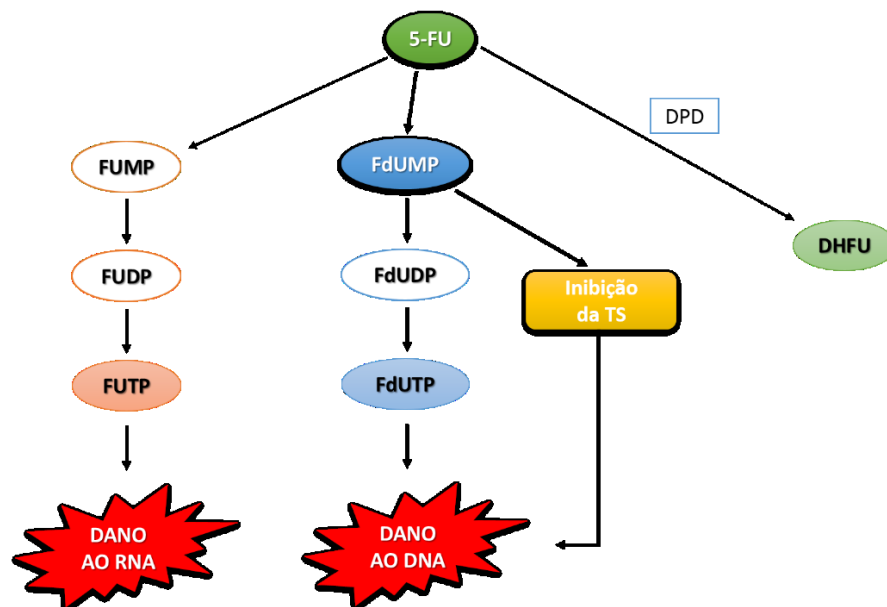
O 5-FU pode ser administrado na forma direta ou na forma de pró-droga, como exemplo a Capecitabina (N4-pentiloxicarbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina), uma solução administrada oralmente de fluoropirimidina carbamato 5-FU. A pró-droga é convertida em 5-FU através de uma cascata enzimática envolvendo três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

Intracelularmente, o 5-FU é convertido em vários metabolitos ativos: o Trifosfato fluorouridina (FUTP), que é incorporada no RNA em vez de trifosfato de uridina (UTP); o Trifosfato fluorodesoxiuridina (FdUTP), que é incorporado no DNA em vez de desoxitimidina-

trifosfato (dTTP); e o monofosfato fluorodesoxiuridina (FdUMP), que forma um complexo estável com a timidilato sintase (TS), inibindo a produção de monofosfato de desoxitimidina (dTMP) (KUMAR et al., 2010). A dTMP é essencial para a replicação e reparação do DNA, e sua depleção, por conseguinte, causa citotoxicidade. Estes metabolitos ativos perturbam a síntese de RNA, bem como a inibição e ação da TS, tal inibição é considerado principal mecanismo de ação do 5-FU (PETERS et al., 2002; NOORDHUIS et al., 2004; HOSKINS; BUTLER, 2007). Com isso, a FUTP provoca alterações no processamento e função do RNA, já a FdUTP e a FdUMP causam danos ao DNA (LONGLEY et al., 2003; MIURA et al., 2010).

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

Figura 03. Mecanismo de Ação do 5-FU.



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

A pirimidina fluorada, 5-fluorouracil (5-FU), é o fármaco de quimioterapia mais utilizados na prática clínica oncológica, onde desde a sua introdução, o 5-FU tem sido

amplamente utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer e tumores sólidos, incluindo câncer gastrointestinal, ginecológico, câncer de mama e câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal avançado, próstata, pâncreas, pele e queratose actínica (AK) e carcinoma (BAYDAR et al., 2005; MIURA et al., 2010; CHANG et al., 2012; ELBELTAGY et al., 2012b; RAJINIKANTH; CHELLIAN, 2016; WENANDE et al., 2016; LIU et al., 2016).

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

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

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

A prevalência de mucosite em pacientes submetidos a quimioterapia de dose padrão é de cerca de 40%, e essa proporção é superior a 50% em protocolos de quimioterapia de alta dose (BAYDAR et al., 2005; PETERSON et al., 2011).

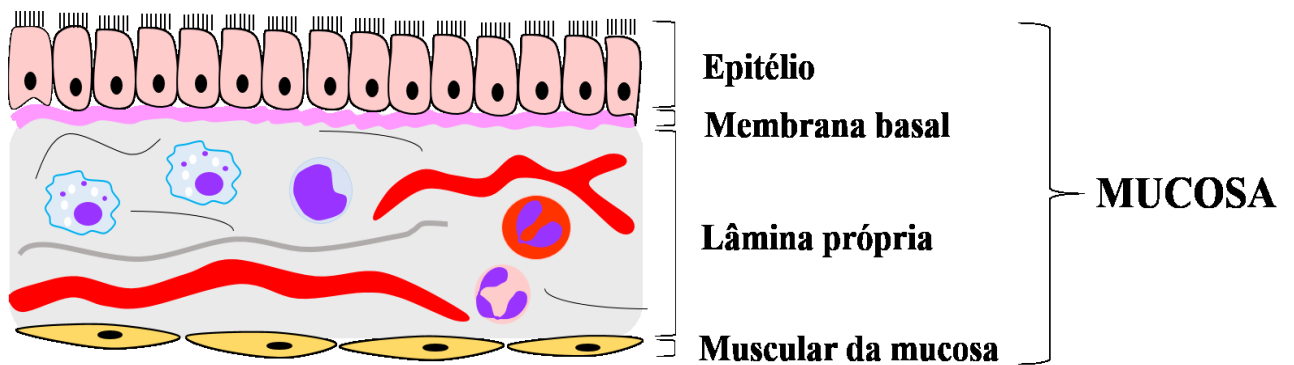
3.3 Histologia do Intestino Delgado

O intestino delgado é sítio terminal de digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina. Compreendendo a porção mais longa do trato gastrointestinal, com 35

centímetros em camundongos e cerca de 7 metros em humanos, sua extensão encontra-se dividida em segmentos denominados duodeno, jejuno e íleo (TREUTING; VALASEK, 2012). O intestino delgado desempenha a absorção de nutrientes através das células epiteliais de revestimento presentes na camada mucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O epitélio da mucosa intestinal é de natureza colunar, em que uma camada simples de células cilíndricas altas, que separa o lúmen intestinal das camadas mais profundas da parede do intestino, bem como atua como barreira intestinal de permeabilidade seletiva. Abaixo do epitélio encontra-se uma membrana basal, que reveste uma camada de tecido conectivo frouxo, conhecida como lâmina própria, tal camada contém terminações nervosas e vasos sanguíneos, bem como uma rica variedade de células imunológicas e inflamatórias. A união epitélio e a lâmina própria designa-se de mucosa (Figura 04). A mucosa também contém uma fina camada de músculo liso, conhecida como muscular da mucosa, que pode ser importante ao proporcionar o movimento das vilosidades (DUNCAN; GRANT, 2003; BARRETT, 2015; ARAÚJO; BARROS, 2015).

Figura 04. Organização da mucosa intestinal.

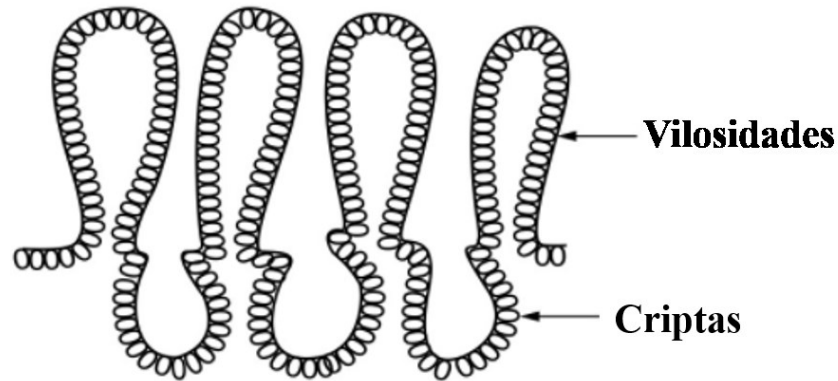


Fonte: Autoria própria.

A área de superfície do epitélio intestinal é amplificada por seu arranjo em estruturas, criptas e vilosidades (Figura 05). As vilosidades intestinais ou vilos são projeções digitiformes, que fazem protrusão no lúmen intestinal, enquanto as criptas ou glândulas de Lieberkühn são glândulas tubulares simples, localizadas entre os vilos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BARRETT, 2015).

Figura 05. Morfologia do epitélio do intestino delgado: arranjos dos vilos e das criptas.

Lúmen Intestinal



Fonte: Adaptado de BARRETT, 2015.

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

3.4 Mucosite

Dentre os efeitos colaterais relacionados ao uso do antineoplásico, destacam-se náusea, vômitos, diarreia, mielossupressão, cistite hemorrágica e mucosite (ELBELTAGY et al., 2012a).

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

Com uma patogênese complexa, sabe-se que a mucosite intestinal surge a partir de lesões de células basais no trato gastrointestinal devido à quimioterapia e/ou radioterapia, o que

resulta em danos na mucosa, reação inflamatória intensa, e consequente ulceração (MERCADANTE et al., 2015). Apesar de serem escassos os estudos epidemiológicos prospectivos em torno da mucosite intestinal, pesquisas demonstram que susceptibilidade dos pacientes à lesão da mucosa e incluem múltiplos fatores associados ao paciente e ao tratamento (ANTHONY et al., 2006), dessa forma tem-se ciência que o aumento da incidência dessa desordem não está relacionado somente com os tipos de fármacos utilizados, mas também com o número de ciclos de quimioterapia, dose, cronograma, sequenciamento de drogas, idade, gênero e estado nutricional do paciente (D'HONDT et al., 2006; KEEFE, 2007).

O quadro de mucosite acomete em torno de 40% dos pacientes tratados submetidos à quimioterapia padrão, podendo chegar em até 100% de pacientes submetidos a doses elevadas de quimioterapia (PICO, 1998; RUBENSTEIN et al., 2004; KIM et al., 2015). ELTING et al. (2003) ao avaliar 590 pacientes com receberam quimioterapia para tumores sólidos ou linfoma cerca de 50% dos pacientes desenvolveram mucosite oral e/ou GI. Metade dos pacientes também têm que modificar seu tratamento ou requerem analgesia parenteral, para alívio da dor e com isso prejudica seriamente a saúde de os pacientes (ZUO et al., 2015). Estes dados evidenciam como um marcador de dose-limite de toxicidade frente ao tratamento tanto quimioterápico quanto radioterápico (SONIS, 1998; HARRIS et al., 2006).

Acometendo cerca de 500.000 pacientes em todo o mundo, anualmente, de alguma forma dessa desordem debilitante (DUNCAN; GRANT, 2003), a mucosite tem impacto negativo tanto na qualidade de vida quanto no custo econômico (MERCADANTE et al., 2015). Pacientes que receberam quimioterapia para tumores sólidos ou linfoma, representam um custo estimado de hospitalização de US\$ 3.893,00 por ciclo de quimioterapia sem mucosite, e, gastos de US\$ 6.277,00 e US\$ 9.132,00 por ciclo com mucosite oral e intestinal, respectivamente (LALLA et al., 2008); nos EUA, estima-se que gastos com mucosite varia entre US\$ 3.000,00 ± 1.000,00 por paciente (MEIROVITZ et al., 2010).

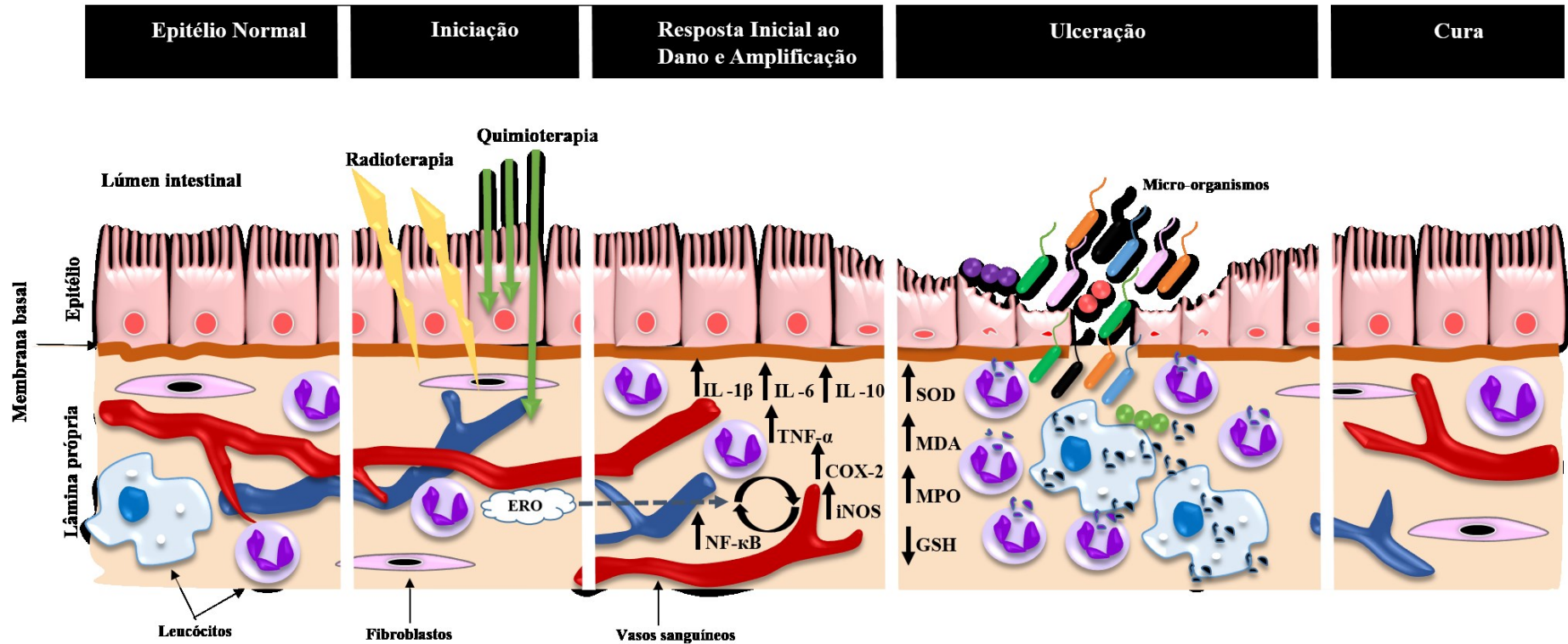
Para os pacientes tratados com quimioterapia, a mucosite é geralmente um evento agudo, e sua forma grave pode ocorrer a qualquer momento entre a segunda e sexta semana do tratamento (MEIROVITZ et al., 2010). Quando comparado a mucosite oral da m. intestinal em relação ao surgimento das primeiras lesões, danos à mucosa oral são visualizados cerca de uma semana após a administração da terapia antineoplásica, em contraste, os danos intestinais são vistos dentro de 2 dias. De modo geral, os primeiros sintomas começam cerca de 3-5 dias após infusão da droga, a ulceração é notado alguns dias depois, e tem auto-resolução dentro de 2 semanas (SONIS, 2004; SONIS, 2009). Mucosites não resolvidas ou não tratada pode levar a

infecções secundárias, bacteremia e sepse (CHEN et al., 2016), bem como comprometimento do estado nutricional, e outras complicações que podem aumentar a morbidade, e impactar portanto, diretamente, na sobrevivência e na qualidade de vida do paciente (AL-ASMARI et al., 2015).

A sintomatologia é dividida em duas categorias: dor e inflamação. Os sintomas de dor incluem inapetência e eventual anorexia, enquanto da inflamação incluem diarreia, vômito, e redução na absorção de nutrientes (HARRIS et al., 2006; REINKE et al., 2015; ARAÚJO; BARROS, 2015; ZUO et al., 2015; KISSOW, 2015). A fisiopatologia destes sintomas é de grande complexidade e variabilidade ao longo do curso da doença e múltiplos mecanismos podem sobrepor-se (MERCADANTE et al., 2015).

A exata fisiopatologia da mucosite não está totalmente elucidada. Estudos recentes indicaram que os mecanismos fundamentais envolvidos na patogênese da mucosite são muito mais complexos do que somente danos direto ao epitélio, sugere-se que tal condição representa uma interação sequencial de eventos e passos que incluem geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas pró-inflamatórias, mediadores de apoptose, acarretando, em última instância, danos e ruptura da barreira epitelial. De acordo com evidências, a patogênese da mucosite segue modelo de cinco estágios básicos: Iniciação, Resposta Inicial ao dano, Amplificação, Ulceração e, Cura; contudo, não é obrigatório a presença de todas as fases para o estabelecimento da doença (Figura 06) (PETERSON, 2005; D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; GUABIRABA et al., 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; VASCONCELOS et al., 2016; CHEN et al., 2016).

Figura 06. Fisiopatologia da Mucosite em cinco fases.



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

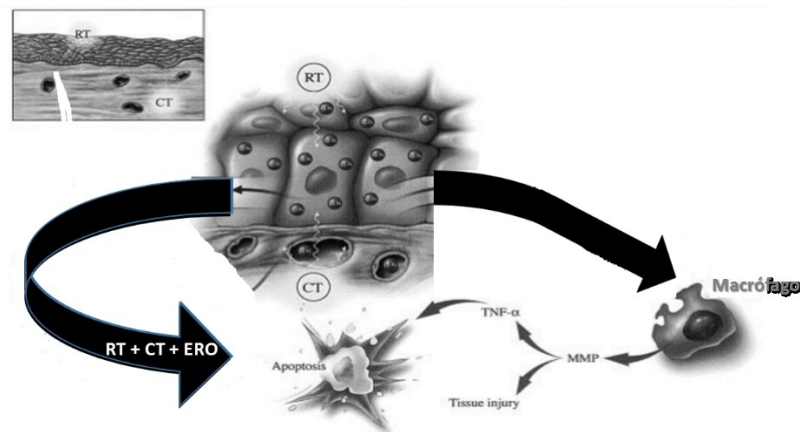
O primeiro estágio da mucosite denomina-se Iniciação e, caracteriza-se pelo dano celular da mucosa e submucosa induzida pela quimioterapia e/ou radioterapia. Lesão das células epiteliais da mucosa e vasos sanguíneos da submucosa é resultado de eventos como inibição da síntese de DNA e agressão ao DNA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

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

Na sinalização (Figura 07), sabe-se que radio e/ou quimioterapia podem ativar diretamente o NF- κ B, fator de transcrição pró-inflamatório chave gênese da processo inflamatório, e indiretamente, ele pode ser ativado por ERO os segundos mensageiros que transmitem sinais de receptores na superfície celular para o ambiente celular interno, levando a regulação positiva. De maneira orquestrada e subsequente, a ativação do NF- κ B promove a expressão de vários genes associados com vias inflamatórias, como consequência, as principais citocinas pró-inflamatórias (exemplo, TNF- α , IL -1 β , e IL-6), e a via da ceramida são ativadas.

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

Figura 07. Segunda fase da fisiopatologia da mucosite.



Fonte: Adaptado de SONIS et al., 2004. Corresponde à Regulação Positiva e Geração de mensagens, ao final desta etapa, lesão tecidual e apoptose. RT: radioterapia; CT: quimioterapia; ERO: espécies reativas de oxigênio.

Na amplificação ocorre a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e $\text{IL-1}\beta$, produzida principalmente por macrófagos, causando lesão de mucosas células, e também ativação das vias moleculares que amplificam a injúria no epitélio, endotélio e fibroblastos. A produção dessas proteínas tem dois efeitos, um direcionado para causar lesão à célula-alvo e o outro dirigido a sinalização e à amplificação do processo. O $\text{TNF-}\alpha$, por exemplo, além de ser um mediador eficaz lesão celular e tecidual, atua numa série de sinalização e amplificação de sinais, através da ativação de feedback positivo por meio do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ para amplificar a sua resposta. O epitélio então, começa a perder integridade, o que é exacerbado na próxima fase, conhecida como ulceração (SONIS et al., 2004;

D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; SONIS, 2009; TRUCCI et al., 2009; ÁVILA, 2013; BASTOS, 2014; ARAÚJO; BARROS, 2015; KIM et al., 2015).

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

O estágio final da patobiologia da mucosite é o processo de cicatrização e cura. Nesta fase, os sintomas começam a diminuir, e é caracterizada pela proliferação epitelial, bem como diferenciação celular e do tecido, restaurando a integridade do epitélio. Infelizmente, em sua maioria, mesmo após a reposição completa do epitélio, a estrutura da submucosa reconstituída difere do seu estado de antes da realização do tratamento quimio-radioterápico. O processo de restauração da integridade epitelial ocorre de maneira concomitante com o retorno da contagem de glóbulos brancos aos valores normais (PETERSON, 2005; D'HONDT et al., 2006; LALLA et al., 2008; ÁVILA, 2013; MONEIM et al., 2017).

A mucosite é um agravo clínico grave, geralmente associado a pacientes em tratamento do câncer, e ainda sem tratamento eficaz (BASTOS, 2014). O medicamentos citotóxicos mais frequentemente associada à mucosite incluem bleomicina, citarabina, doxorubicina, etoposido, 5-fluorouracil, ifosfamida, mercaptopurina, metotrexato, paclitaxel, vinblastina, vincristina, e vinorelbina (HARRIS et al., 2006).

Apesar da importância clínica, não existe tratamento curativo para mucosite. Uma vez instalada, o tratamento da mucosite é apenas sintomático e dependerá do seu grau de gravidade, objetivando tão somente o alívio dos sintomas, como dor e diarreia, por exemplo (ARAÚJO; BARROS, 2015; KISSOW, 2015).

Agentes terapêuticos em busca de tratamento efetivo da mucosite estão em alta demanda e recebem atenção crescente. Estudos recentes concentraram-se na utilização de bioativos, fatores de crescimento, hormônios ou interleucinas para modificar o metabolismo epitelial e reduzir a susceptibilidade do trato à mucosite (DUNCAN; GRANT, 2003).

A palifermina, um fator crescimento de crescimento de queratinócitos, figura entre os medicamentos atualmente disponíveis no tratamento da mucosite. Ela tanto protege o epitélio da mucosa de danos quanto estimula a reparação após quimioterapia e/ou radioterapia. Esta

droga atua por meio da inibição da apoptose e danos no DNA, além da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e aumento da migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais. Entretanto, a utilização da Palifermina é restrita a neoplasias malignas hematológicas (KEEFE, 2007; SANTOS et al., 2009).

Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) tem sido sugerido como potencial agente terapêutico da mucosite. Secretado juntamente com o hormônio antidiabético *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) pelas células enteroendócrinas L na lesão do intestino delgado induzida por quimioterapia (KISSOW, 2015).

A Solução de clorexidina diminuiu a mucosite e a ulceração nos pacientes que passaram por quimioterapia, porém, apresentou pouco efeito naqueles que receberam radiação em altas doses. Analgésicos de uso interno são quase sempre administrados. A associação com opióides dependerá da escala da dor na qual o paciente se encontra (PETERSON et al., 2011).

3.5 Mediadores inflamatórios e biomarcadores na Mucosite

Sabe-se que em grande parte dos pacientes em tratamento de neoplasias por meio de quimioterapia e/ou radioterapia desenvolvem processo inflamatório nas mucosas do trato gastrointestinal (SABUNCUOGLU et al., 2012). Vários são os mediadores da inflamação, assim como diversos são os meios para avaliar a progressão ou não da inflamação. No âmbito científico, usualmente têm-se utilizado o malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase como possíveis biomarcadores capazes de mensurar a inflamação e predizer sobre a eficácia de produtos e/ou métodos de terapêutica às novas drogas que tem se avaliado no tratamento nas doenças inflamatórias do TGI, em especial na mucosite.

3.5.1 Mieloperoxidase (MPO)

À medida que o antineoplásico 5-FU apresenta citotoxicidade inespecífica para células com alta taxa de replicação, o mesmo inibe a proliferação do câncer e das células normais, como o revestimento de enterócitos no trato digestivo. Por conseguinte, este processo acarreta em inflamação aguda das mucosas, a mucosite, caracterizada por ulceração, encurtamento de vilos e diminuição da relação vilo/cripta, e infiltração leucocitária, em especial de neutrófilos (CARVALHO et al., 2017).

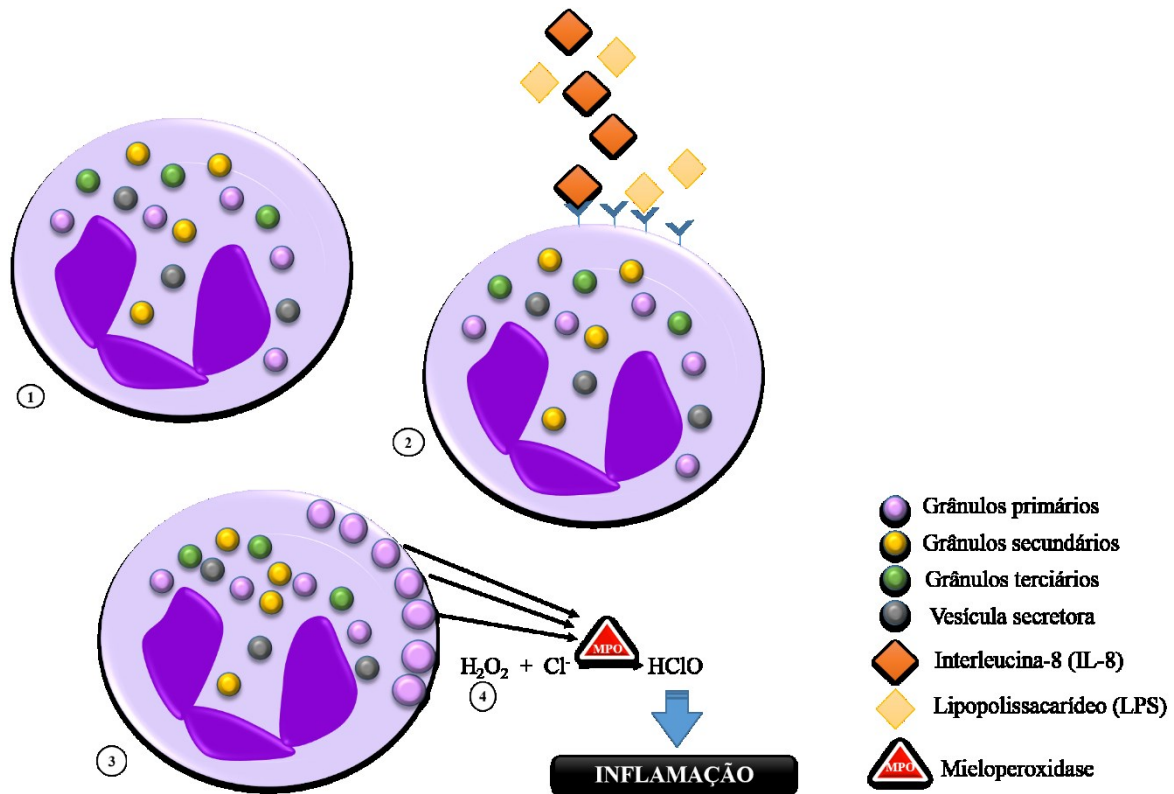
Os neutrófilos são glóbulos brancos altamente móveis e de curta duração, densamente preenchidos com grânulos de secreção, que são sintetizados na medula óssea (MO),

amadurecem e, emigram da MO para o sangue e tecidos. No sangue periférico de indivíduos saudáveis, os neutrófilos constituem a maioria das células brancas (40-80%) (LACY, 2006). Os neutrófilos são a primeira linha de defesa celular do inato sistema imunológico, apresentando papel importante na defesa contra micro-organismos patogênicos por fagocitose, e mediando cicatrização de feridas no tecido. No entanto, a acumulação e superativação dos neutrófilos exacerba processo inflamatório e, acarreta efeitos prejudiciais ao tecido. O processo lesivo da ativação neutrofilica se deve a liberação de mediadores, em geral proteínas, derivados dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (MONTESEIRÍN et al., 2001; LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; JOHNSON et al., 2011; RYMASZEWSKI et al., 2014).

Os neutrófilos contêm pelo menos quatro tipos diferentes de grânulos: grânulos primários, também chamados de grânulos azurofílicos; grânulos secundários, conhecido também como grânulos específicos; grânulos terciários; e vesículas secretoras (Figura 09). Os grânulos primários são os principais locais de armazenamento do mediadores tóxicos, denominados de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET), que incluem elastase, catepsinas, defensinas e mieloperoxidase (MPO) (LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

Expressa e secretada pelos neutrófilos, a MPO chega a constituir 5% da proteína celular total do neutrófilo. Trata-se de uma enzima hemo-peroxidase altamente catiônica de peso 144 kDa capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) como mecanismo de remoção de patógenos. A partir da ativação de neutrófilos, os grânulos primários contendo MPO podem se fundir com a membrana plasmática para secretar o conteúdo no meio extracelular (Figura 08). Durante a explosão respiratória, a MPO utiliza H_2O_2 para produzir em conjunto com halogenetos (geralmente o Cl^-) compostos oxidantes como o ácido hipocloroso (HClO), que por sua vez, reage com proteínas, ácidos gordos insaturados e qualquer grupo oxidável, e, dessa maneira, induz mutações genéticas, alteração na síntese proteica e influencia no caminhos de sinalização. Desta maneira, os neutrófilos ao mesmo tempo, liberar espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, além de recrutar leucócitos adicionais para a região da inflamação (MONTESEIRÍN et al., 2001; KINDZELSKII et al., 2006; LACY, 2006; RYMASZEWSKI et al., 2014). Para que ocorra a desgranulação de neutrófilos e por conseguinte a liberação das NETs extracelularmente, uma ampla gama de mediadores, como interleucina-8 (IL-8) e Lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano, ativam os neutrófilos através de receptores de membrana, como receptores tipo Toll (TLRs) e citocinas inflamatórias (LACY, 2006; JOHNSON et al., 2011).

Figura 08. Liberação de mieloperoxidase pelos neutrófilos.



Fonte: Autoria própria. 1: Neutrófilo em estado basal evidenciados os quatro de tipos de grânulos presentes no interior da célula; 2: Ativação dos neutrófilos por meio da ligação de mediadores inflamatórios aos receptores de membrana do neutrófilo; 3: translocação e adesão dos grânulos à membrana seguida pela desgranulação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET) como exemplo a mieloperoxidase (MPO); 4: Formação das espécies reativas de oxigênio e compostos oxidantes capazes de exacerbar o processo inflamatório.

A atividade da enzima MPO, estritamente produzida por neutrófilos, permite estimar o influxo celular na lâmina própria intestinal. Com isso, o MPO tem sido utilizado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo, inflamação e infiltração de granulócitos em vários tecidos, incluindo o trato gastrointestinal. A extensão do acúmulo de neutrófilos na mucosa intestinal pode ser quantificada por meio da avaliação da atividade de MPO, que pode ser medida em sangue e tecidos por ensaios espectrofotométricos utilizando peróxido de hidrogênio e dicloridrato de odianisidina como substratos (LORIA et al., 2008; JUSTINO et al., 2014; KREMSEROVA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

3.5.2 Malondialdeído (MDA)

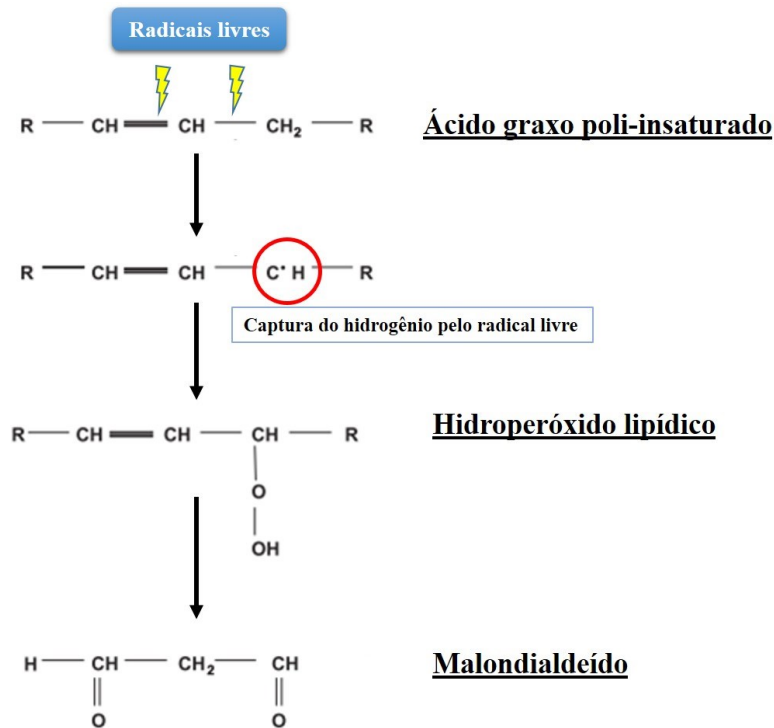
Nos locais da inflamação, a atividade em conjunto da ativação de neutrófilos e fagocitose por macrófagos envolvem fenômenos de explosões respiratórias e desacoplamento da variedade de sistemas redox celular (VYAS et al., 2016). A produção de radicais livres

denominados de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERN) pode ser observada durante o metabolismo humano em diversas reações fisiológicas, e o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar tais reações. As EROs mais importantes envolvidas nos processos patológicos são hidroxila (OH^-), superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e entre as ERNs, o óxido nítrico (NO^-), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (GROTTO et al., 2009; ELIAS et al., 2010).

Os radicais livres são essenciais para processos biológicos, contudo, a superprodução e constante ação dos radicais livre sobre o organismos humano, aliada a ineficiente neutralização de sua ação, gera um desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidantes denominado estresse oxidativo, este, por sua vez, culmina em danos estruturais e/ou funcionais (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008). Enquanto alguns deles podem ser altamente prejudiciais ao organismo, lesionando membranas dos eritrócitos, proteínas, DNA e danificando células e tecidos, outros reagem apenas com os lipídeos, produzindo peroxidação lipídica. A degradação dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA) e outros aldeídos, são especialmente danosos (ELIAS et al., 2010; HEBER, 2014).

A peroxidação lipídica (PL), também denominada de lipoperoxidação, é uma cadeia de reações mediada por radicais livres que, uma vez iniciada, desencadeando à deterioração oxidativa dos lipídios poli-insaturados de membrana. O alvo de espécies reativas é a ligação covalentes carbono-carbono e carbono-hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados, na qual, quando enfraquecida, permite a abstração do hidrogênio pelo radical livre com facilidade. Uma vez iniciado o processo (Figura 09), as espécies reativas desencadeia uma série de reações oxidativas sucessivas que levam a formação de hidroperóxido lipídico, tal composto é instável e, sua fragmentação resulta na formação de aldeídos altamente reativos tóxicos, tal como N-(epsilon)-(2-propenal) [malondialdeído (MDA)] (GROTTO et al., 2009; RAGHAVAN et al., 2012). Considerado um dos produtos finais da PL, o MDA é um aldeído de baixo peso molecular de três carbonos e, atua como segundos mensageiros tóxicos que potencializam a lesão e morte celular já iniciada pelos radicais livres, além de promover mutações e danos ao DNA (GROTTO et al., 2009; KULKARNI et al., 2011; RAGHAVAN et al., 2012; VYAS et al., 2016).

Figura 09. Formação do malondialdeído pela peroxidação lipídica.



Fonte: Adaptado de GROTTTO et al., 2009.

O MDA é, de longe, o indicador mais importante biomarcador de peroxidação lipídica (SULISTYOWATI et al., 2014; VYAS et al., 2016) e, pode ser utilizada como marcador de lesão da membrana celular. Nos últimos 20 anos, a quantificação de MDA tem sido amplamente utilizada em estudos, que se dão na maioria das vezes pela reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras biológicas, através de ensaios de espectrofotômetro ou detecção fluorescente (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008; GROTTTO et al., 2009).

3.5.3 Glutationa Reduzida (GSH)

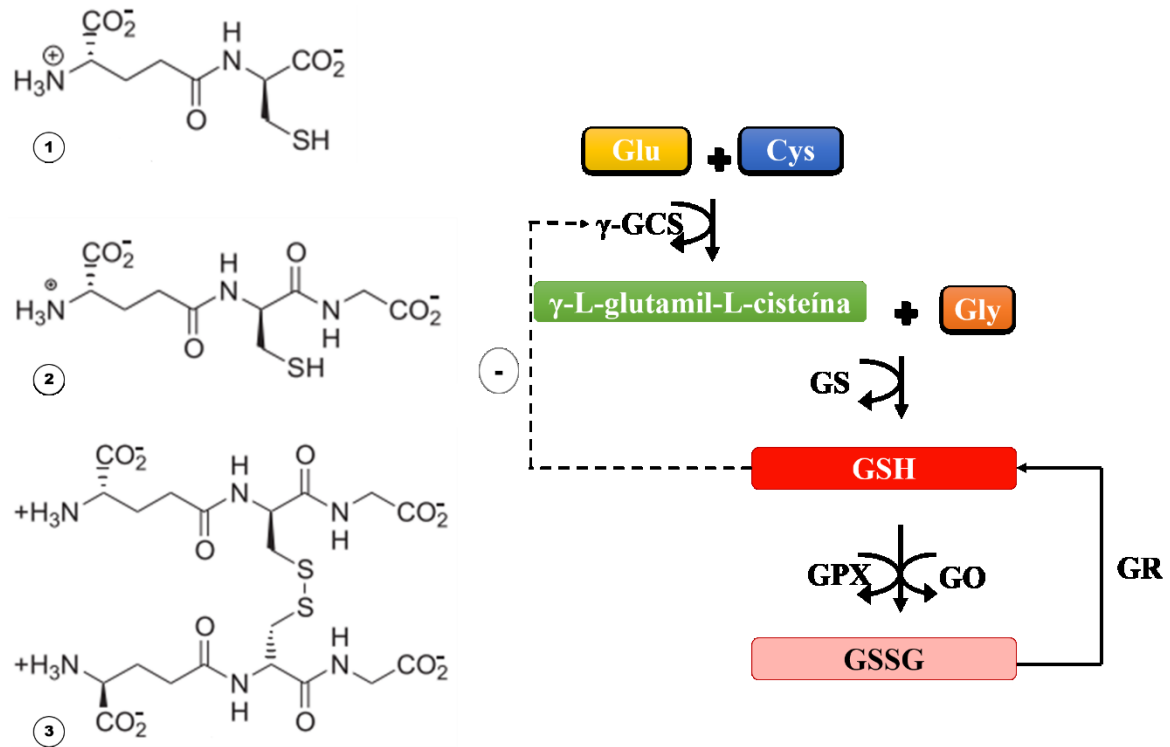
O trato gastrointestinal (GI) é uma fonte crucial na produção radicais livre. Apesar da barreira protetora proporcionada pela camada epitelial, materiais ingeridos e agentes patogênicos podem causar inflamação do epitélio, ativação dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e os macrófagos e, estes aumentar a inflamação por meio de citocinas e outros mediadores que contribuem aumento dos radicais livres nas formas de ROS e RNS, que são subprodutos do metabolismo celular normal. Em baixas e moderadas quantidades, esses compostos detêm efeitos benéficos em vários processos fisiológicos, incluindo a morte de agentes patógenos invasores, cicatrização de feridas e processos de reparação tecidual, além de atuar como moléculas de essenciais de sinalização (BHATTACHARYYA et al., 2014).

No tratamento do câncer por agentes quimioterapêuticos e radioterapias depende em grande parte formação de ROS e/ou RNS para destruir células malignas por apoptose. No entanto, o desequilíbrio entre a geração radicais livres e a capacidade antioxidante representa um grave problema para a homeostase corporal, conhecido como estresse oxidativo (ALDEMIR et al., 2015).

Para diminuir o estresse oxidativo e defender as células contra os efeitos nocivos da ROS e/ou RNS, o corpo está equipado com agentes antioxidantes, coletivamente chamado de sistema de defesa antioxidante. Antioxidantes removem os radicais livres, limitam os efeitos adversos dos ROS/RNS e inibem a oxidação por meio da redox. O sistema de defesa antioxidante engloba mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. Dentre os antioxidantes enzimáticos endógenos, destacam-se o superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd), catalase e superóxido reductases; já entre os antioxidantes não-enzimáticos endógenos, os principais são Tioredoxina, Melatonina e Glutathione reduzida (GSH) (BHATTACHARYYA et al., 2014; KART et al., 2016).

Considerado o mais importante antioxidante não enzimático, a Glutathione, é encontrada das células eucarióticas, em geral na sua forma reduzida, GSH (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina). Trata-se de tripeptídeo tiol (sulfidrilo) e tem como precursor os aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico (glutamato). Embora expresso de forma ubíqua, a biossíntese da GSH ocorre, predominantemente, no fígado e conta com a ação consecutiva de duas enzimas (Figura 10). Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamylcysteinyl synthetase (γ -GCS), levando à γ -L-glutamyl-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione synthetase (GS). Em geral, a atividade da γ -GCS determina a taxa de síntese de glutathione, e a mesma sofre regulação pela GSH através de um feedback negativo, o que previne a produção excessiva de GSH ou o acúmulo do intermediário γ -glutamylcysteinyl (SIDO et al., 1998; RAHMAN; MACNEE, 2000; HUBER; ALMEIDA, 2008; GAURAV et al., 2012; BHATTACHARYYA et al., 2014; CHENG et al., 2017).

Figura 10. Síntese de GSH e ciclo catalítico.



Fonte: Adaptado de HUBER; ALMEIDA, 2008. 1: γ -L-glutamyl-L-cisteína; 2: GSH; 3: GSSG. Glu: Glutamato; Cys: Cisteína; Gly: Glicina; GS: Glutaciona sintetase; GSH: Glutaciona reduzida ou γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina; GPx: Glutaciona Peroxidase; GO: Glutaciona oxidase; GR: Glutaciona redutase; GSSG: Glutaciona dissulfeto.

Para o desenvolvimento da atividade protetora da glutaciona expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutaciona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, que se dá pela atividade de três grupos de enzimas: a glutaciona peroxidase (GSH-Px ou GPX), a glutaciona oxidase (GSH-O ou GO) e a glutaciona redutase (GSH-Rd ou GR) que formam o sistema de glutaciona. As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH. Sabe-se que a GSH-Px além de oxidar o GSH, pode também reduzir hidroperóxidos, como H_2O_2 a H_2O e hidroperóxidos de lípidos (ROOH) para álcoois estáveis correspondentes (HUBER; ALMEIDA, 2008; CHENG et al., 2017).

O estado redox intracelular (níveis GSH/GSSG) da célula é frequentemente usado como um marcador da capacidade antioxidante das células. A manutenção de uma alta relação intracelular GSH/GSSG (> 90%) minimiza a acumulação de dissulfetos e fornece um ambiente redutor dentro da célula. Por conseguinte, o sistema redox GSH torna-se crucial para manutenção da homeostase intracelular e processos fisiológicos celulares normais e, representa

um dos mais importantes sistemas de defesa antioxidante para as células epiteliais e inflamatórias. Em muitas doenças inflamatórias no trato gastrointestinal, o esgotamento dos níveis de GSH intracelular ou aumento dos níveis de GSSG está presente em concomitante com a indução de mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (RAHMAN; MACNEE, 2000; GAURAV et al., 2012; SCHMITT et al., 2015).

A avaliação dos níveis de GSH intracelular ilustra um breve panorama da capacidade antioxidante frente a um processo inflamatório. Onde níveis elevados de GSH sugere capacidade protetora ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose, enquanto que a diminuição dos níveis de GSH sugere baixo efeito antioxidante e/ou exacerbação do estresse oxidativo/inflamação (CHENG et al., 2017).

Para quantificação do GSH, ou seus precursores e metabólitos, nas várias matrizes biológicas, tem-se à disposição uma vasta coletânea métodos analíticos, que se dividem em cromatográficos e não cromatográficos. Dentre os métodos não-cromatográficos, podemos citar a espectrofotometria, espectrofluorimetria e amperometria, que permitem a análise de GSH e derivados. Para determinação da concentração de glutathione, pelo ensaio espectrofotométrico, tem como base uma reação cinética de oxidação da GSH a GSSG, promovida pelo ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), ou simplesmente, DTNB, ou reagente de Elman (HUBER; ALMEIDA, 2008).

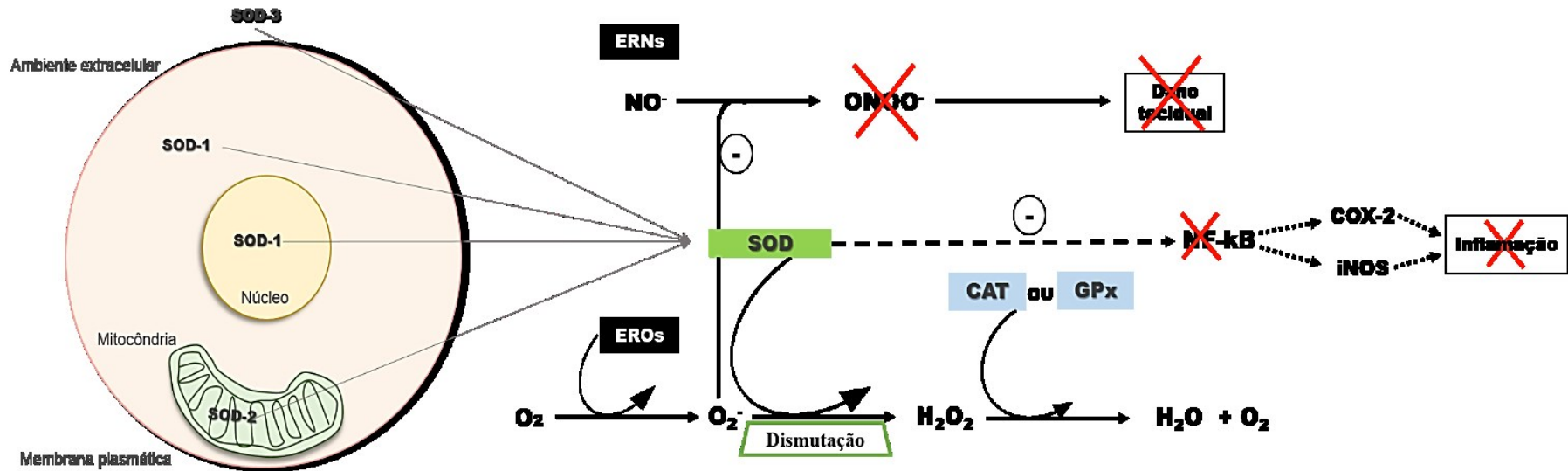
3.5.4 Superóxido dismutase (SOD)

O processo inflamatório instaurado na mucosa intestinal, a mucosite, é uma resposta complexa aos estímulos nocivos, como dano ao DNA e geração de EROs e ERNs, e por sua vez desencadeiam uma série de eventos biológicos interativos, dentre eles, ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e expressão de citocinas pro-inflamatórias (a exemplo IL-1 β , IL-6, TNF- α). Todo esse processo gera e exacerba o estresse oxidativo, e os tecidos lesados são estimulado a expressar antioxidantes enzimáticos como glutathione peroxidase (GPX), glutathione-redutase (GR), catalase, superóxido redutases e superóxido dismutases (SOD) no combate dos radicais livres e consequentemente, prevenção de danos acidentais, sobrevivência organizacional e integridade estrutural dos tecidos. Vários estudos demonstram a relevância das enzimas antioxidantes na regulação da inflamação (GAO et al., 2008; KWON et al., 2012; KWON, 2016).

Superóxido dismutases (SOD) são enzimas que requerem cofatores de íons metálicos como Cu, Zn, Mn, Ni, Fe para catalisar a dismutação de superóxido (O_2^-) em O_2 e peróxido de

hidrogênio (H_2O_2). Com base nisso existem pelo cinco isoformas de SOD: enzima citosólica e nuclear contendo cobre e zinco (Cu-Zn-SOD ou SOD-1), enzima mitocondrial contendo manganês (Mn-SOD ou SOD-2), enzima extracelular contendo cobre e zinco (EC-SOD ou SOD-3), enzima contendo ferro (Fe-SOD ou SOD-4) e enzima contendo níquel (Ni-SOD ou SOD-5). Além dos requisitos de cofatores metálicos, as SOD apresentam diferenças na estrutura proteica e compartimentação celular. Em relação à sua localização, as enzimas SOD-1, SOD-2 e SOD-3 estão presentes em humanos (Figura 11), já a Fe-SOD está presente em bactérias e plantas, e a Ni-SOD está presente apenas nos procariotas. Cerca de 99 % SOD-3 encontra-se na matriz extracelular e glicocálice de superfícies celulares, onde está ancoradas sulfato de heparina de proteoglicanos e, tem ampla destruição no corpo humano, em especial pulmão, vasos sanguíneos, rins e coração. Em relação ao tamanho, SOD-3 é a maior SOD presente nos mamíferos, a mesma apresenta na forma de um homotetrâmero de 135 kDa, seguido pela SOD-2 (homotetrâmero de 96 kDa) e, por último SOD-1, que se apresenta na forma de homodímero de 32 kDa (KWON et al., 2012; BHATTACHARYYA et al., 2014).

Figura 11. Distribuição celular das isoformas de SOD e Mecanismo de ação.



Fonte: Adaptado de KWON et al., 2012 e QUÉRÉ et al., 2014. SOD: Superóxido dismutase; EROs: Espécies reativas de oxigênio; ERNs: Espécies reativas de nitrogênio; NF-κB: Fator nuclear de transcrição Kappa B; CAT: Catalase; GPx: Glutationa Peroxidase; COX-2: Cicloxigenase 2; iNOS: Óxido nítrico sintetase induzida.

A posição na célula explica a atividade e funcionalidade de cada uma das SOD, apesar de todas possuírem a papel crucial na eliminação de ânions superóxidos. A localização subcelular distinta das isoformas de SOD podem ser particularmente importantes para sinalização redox nos mais variados compartimentados do corpo. A SOD-3 devido suas altas concentrações ao nível no espaço intersticial dos tecidos e fluidos extracelulares, a referida enzima apresenta grande atividade de SOD no plasma, linfa e fluido sinovial. A dismutação do radical superóxido ao peróxido de hidrogênio e oxigênio nos espaços intersticiais dos tecidos e em fluidos extracelulares, representando assim uma parte crucial do mecanismo de defesa antioxidante celular e na prevenção da degradação oxidativa dos componentes da matriz extracelular (LUBRANO et al., 2006; GAO et al., 2008). A SOD-2 por estar localizada no interior das mitocôndrias, além de ter como principal função a proteção das mitocôndrias do dano de ROS, ela é uma das primeiras enzimas da cadeia a mediar a ROS gerado pela redução parcial de O_2 , sua atividade tem sido implicado em uma série de fatores relacionados ao estresse oxidativo (MURPHY et al., 2008; LI; ZHOU; 2011). A SOD-1 é uma enzima chave na dismutação de superóxido radicais resultantes do metabolismo oxidativo celular em peróxido de hidrogênio. Em contraste, a inibição da SOD-1 diminui essa capacidade, resultando em inibição da resposta imune (MARIKOVSKY et al., 2003).

De modo geral, a SOD é definido como a primeira linha de defesa antioxidante do corpo, conhecida como antioxidante primário. A SOD exibe um catalisador muito alto taxa de reação e está constantemente se renovando, na qual o SOD converte o superóxido extremamente reativo (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (figura 10), que por sua vez, é convertido em H_2O pela catalase ou glutathione peroxidases (GPx). Ao dissolver O_2^- , a SOD impede a liberação de íons de ferro livres e, assim, a formação de ROS prejudiciais como OH^- . Ao mesmo tempo, a SOD protege a sinalização vascular de NO^- , impedindo sua reação com O_2^- e a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio (ERNs) prejudicial (MAYBAUER et al., 2006; KWON et al., 2012; QUÉRÉ et al., 2014). A SOD ainda apresenta mecanismo de ação contra a inflamação, por meio da modulação da expressão e distribuição de fatores angiogênicos e mediadores inflamatórios. A SOD é capaz tanto de diminuir a fosforilação da proteína quinase C (PKC) e quanto a expressão de NF- κ B. Por conseguinte, devido a dependência da expressão de NF- κ B, enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 e iNOS também decairiam. E a SOD também atua na resposta imune através do bloqueio da infiltração de células imunes, como neutrófilos nos locais de inflamação (YASUI; BABA, 2006; QUÉRÉ et al., 2014).

3.5.5 Óxido nítrico (NO) e Nitrito

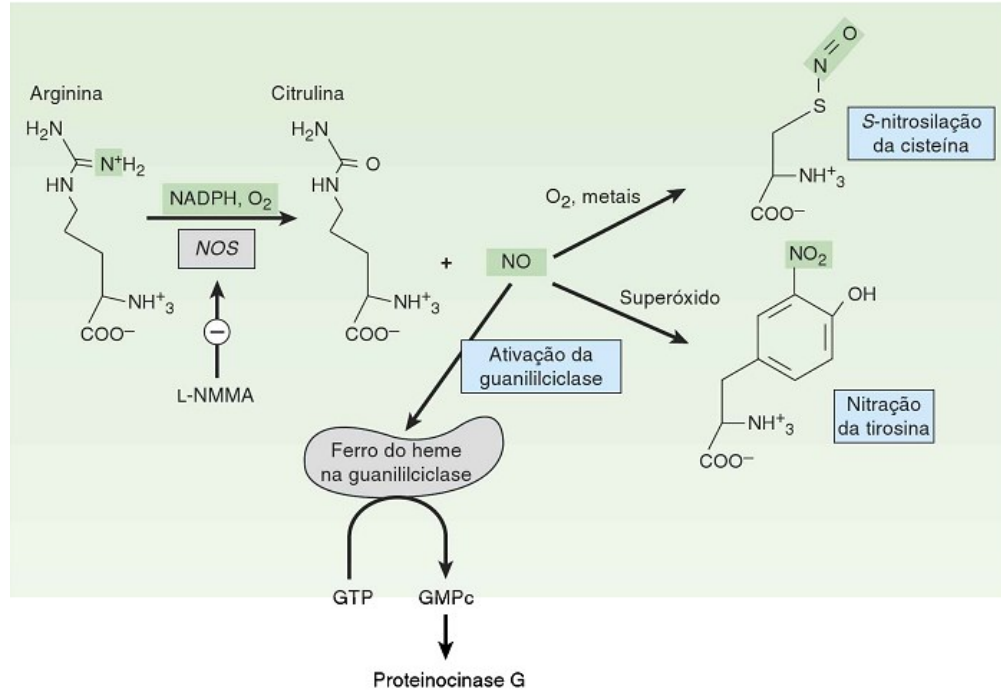
O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso ubíquo capaz de difundir-se rapidamente pelas membranas celulares e regular uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos de natureza cardiovascular, inflamatório e neuronal. O NO, juntamente, com Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) e Monóxido de Carbono (CO), compreende os gasotransmissores cujas as propriedades fisio-farmacológicas tem sido melhor categorizadas e estudadas nas últimas décadas (RANG et al., 2012; KATZUNG, 2014).

NO foi a primeira de uma nova classe de moléculas de sinalização (LUCETTI et al., 2017). O conhecimento acerca do NO atmosférico perduram há séculos, este observado pela primeira vez em 1774 por Joseph Priestly, e suas as propriedades vasoativas foram relatadas somente em 1859 por Frederick Guthrie (ALLAIN et al., 2011). Descrito no início dos anos 80, como "Fator relaxante derivado endotelial" (EDRF), somente a partir do início da metade dos anos 1990, evidenciou-se avanços no conhecimento da biologia NO, e a descoberta de sua produção endógena em mamíferos conferiu o Prêmio Nobel de Medicina a Murad, Furchgott e Ignarro em 1998 (ALDERTON et al., 2001; PAVANELLI; SILVA, 2010; BURGER; FENG, 2011). No decorrer de quase 30 anos, o óxido nítrico foi conhecido por ser um determinante crítico do tom vascular, e concomitante a isso, inúmeros estudos buscando elucidar os diversos papéis fisiológicos de uma das moléculas mais versáteis em animais e humanos (BATH et al., 2017).

O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio é um intermediário metabólico sintetizado durante a reação de oxidação complexa do nitrogênio, a partir de L-Arginina, Oxigênio (O₂) e Cofatores em L-Citrulina, NO e água (ARZUMANIAN et al., 2003; CHOKSHI et al., 2008). Este processo é catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e por fim, o NO reage ativamente com radicais O₂ e superóxido, tióis, metais de enzimas e é oxidado para íons inativos de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (Figura 12) (CORREA-ARAGUNDE et al., 2013). Existem ao menos seis cofatores que participam na síntese de NO: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), nucleotídeo de flavanina adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN), tetrahydrobiopterina (BH₄), cálcio (Ca²⁺), calmodulina (CaM) e protoporfirina de ferro IX (heme). A NOS é expressa em quase todas as células do corpo humano, contudo, a depender da localização e expressão gênica podem ser classificados em três isoformas distintas: NOS endotelial (eNOS ou NOS3), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS induzível (iNOS ou NOS2). Todas catalisam a mesma reação que culmina a síntese de NO a partir do substrato L-arginina, oxigênio molecular e fosfato de nicotinamida-adenina-nucleotídeo reduzido

(NADPH) e requerem ligação de vários co-fatores (GAUTAM; JAIN, 2007; BURGER; FENG, 2011; MATTILA; THOMAS, 2014; BATH et al., 2017).

Figura 12. Metabolismo do óxido nítrico: síntese, reações e inativação do óxido nítrico.



Fonte: KATZUNG, 2014.

As isoformas de NOS são flavoproteínas homodímeras produzidas em diferentes genes e apresentam composição e tamanho variável (Tabela 02) (GAUTAM; JAIN, 2007; CAMPBELL et al., 2014). Em humanos, o gene da nNOS está localizado na região 12q24.2 do cromossomo 12, consistindo em 29 éxons e 28 íntrons, a proteína expressa detêm 1434 aminoácidos. O gene da iNOS encontra-se na região 17q11.2-q12 do cromossomo 17, consistindo em 26 éxons e 25 íntrons e a isoforma da NOS expressa possui 1153 aminoácidos; já o gene da eNOS localiza-se na região 7q35-36 do cromossomo 7, contêm 26 éxons e 25 íntrons e a proteína expressa possui 1203 aminoácidos. Sabe-se que cada NOS detêm estrutural própria e especificidade funcional, com isso, as isoformas podem ser classificadas como constitutivas (cNOS) e induzíveis (iNOS) (WANG; MARSDEN, 1995; THAMEEM et al., 2008; NATH et al., 2009; SILVEIRA, 2015; ZENG et al., 2016).

A eNOS e nNOS são tidas como isoformas constitutivas, devido ao fato se serem expressos constitutivamente em níveis baixos, ou seja, em condições de homeostase, estas enzimas produzem concentrações picomolares de NO. eNOS e nNOS contêm um domínio de ligação à calmodulina e são ativados pela calmodulina de forma dependente do cálcio. A

produção de NO pelas formas constitutivas é transitória com duração variável de segundos a minutos. A terceira isoforma, iNOS, é independente do cálcio, uma vez que se liga à calmodulina com alta afinidade por condições fisiológicas repletas de cálcio. Em contraste, iNOS não é expressa em condições normais, mas é induzido em níveis elevados durante processos inflamatórios, estimulados por citocinas (IL-1 β e TNF- α) e micro-organismos. Uma vez que a iNOS é expressa, a mesma produz NO nas concentrações nanomolar a micromolar e tem longa duração, perdurando horas ou dias (KOLIOS et al., 2004; CHOKSHI et al., 2008; LIMA JÚNIOR et al., 2011; FORSTERMANN; SESSA, 2012; MATTILA; THOMAS, 2014; CAMPBELL et al., 2014; MONTESINOS et al., 2016; LUCETTI et al., 2017).

Tabela 02. Propriedades das isoformas de óxido nítrico sintase (NOS)

Propriedades	Isoformas		
	NOS neuronal	NOS induzível	NOS endotelial
Sinônimos	nNOS, NOS-1	iNOS, NOS-2, NOS macrofagal	eNOS, NOS-3
Localização do gene	12q24.2	17q11.2-q12	7q35-36
Tamanho da proteínas	1434 a.a	1153 a.a	1203 a.a
Tecidos	Neurônios, esquelético, plaquetas, pulmão	m. Macrófagos, células musculares lisas	Células endoteliais, neurônios, epitélio respiratório e plaquetas
Expressão	Constitutiva	Indução transcricional	Constitutiva
Regulação por Cálcio	Sim	Não	Sim
Níveis de NO	Baixo	Alto	Baixo

a.a: Aminoácidos

A nNOS é encontrada primeiramente (e predominante) no tecido neuronal, mas também nos trombócitos, células beta do pâncreas, músculo, pulmão, células epiteliais do estômago, útero e células endoteliais de arteríolas aferentes e eferentes. A outra forma constitutiva, eNOS, não é restrita apenas células endoteliais vasculares, fazendo-se presente também em miócitos cardíacos, osteoblastos e osteoclastos, epitélio respiratório, e em pequenas quantidades nas plaquetas. E a iNOS está presente em uma ampla gama de células e tecidos, sofrendo grande estimulação dos macrófagos (razão de também ser chamada NOS macrofagal), neutrófilos, células de kupffer, fibroblastos, micróglia e células musculares lisas. Independente da célula, essas três isoformas estão presentes no citoplasma, já a outra NOS, denominada de NOS mitocondrial (mtNOS) está presente exclusivamente nas mitocôndrias (GAUTAM; JAIN, 2007; RANG et al., 2012; BATH et al., 2017).

Com a síntese do NO pela ação das NOS, este gás por sua vez, apresenta alta difusibilidade em água e lipídios, e é rapidamente absorvido pelas membranas biológicas. Além

do mais, o NO apresenta um elétron não pareado em sua estrutura química, o que o torna um radical livre muito reativo e, de meia-vida muito curta, cerca de 5 segundos. *In vivo*, o NO é instável capaz reagir com diversos metais, tióis e espécies de oxigênio e, desse modo, modificar proteínas, DNA e lipídeos, estabelecendo basicamente duas vias principais: via GMPc-dependente (caminho NO-sGC-GMPc) e a via independente do GMPc (BRYAN; GRISHAM, 2007; LEITÃO et al., 2011; FORSTERMANN; SESSA, 2012; RANG et al., 2012; CORREA-ARAGUNDE et al., 2013; KATZUNG, 2014).

O NO reage muito rapidamente com ânion superóxido (O_2^-) para produzir ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), um forte agente oxidativo e nitrosativo, e é responsável por alguns de seus efeitos tóxicos, como morte celular apoptótica e necrótica através da peroxidação lipídica (ALLAIN et al., 2011; VANNINI et al., 2015). O heme possui uma afinidade pelo NO mais de 10.000 vezes maior do que pelo oxigênio, razão pela qual o NO tem como principal alvo, o ferro do heme das metaloproteínas, a exemplo, guanililciclase solúvel (sGC), uma enzima que contém grupo heme e, ao se ligar com NO, sofre ativação enzimática e acarreta em aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez culmina em relaxamento do músculo liso e diminuição da agregação plaquetária. O NO também reage com tióis, compostos que contêm o grupo SH, para formar nitrosotióis. Este processo de modificação pós-traducional que proteínas detentoras de grupos tiol sofrem é denominado de S-nitrosilação do resíduo cisteína, e promovem perda de função e estabilidade da proteína em questão. O NO é inativado pela combinação com o heme e hemoproteínas, como hemoglobina e oxiemoglobina, que oxida NO em nitrato ou nitrito. O NO também pode ser inativado pela reação com oxigênio molecular (O_2) para formar dióxido de nitrogênio (BRYAN; GRISHAM, 2007; LEITÃO et al., 2011; FORSTERMANN; SESSA, 2012; RANG et al., 2012; CORREA-ARAGUNDE et al., 2013; KATZUNG, 2014).

A rota metabólica do NO é a oxidação gradual para nitrito e nitrato. Estes metabólitos do óxido nítrico são moléculas homeostáticas centrais na biologia do NO. Devido ao vínculo intrínseco nitrito e NO, a detecção e quantificação precisa do nitrito em amostras biológicas tornou-se método confiável para avaliação da atividade da NOS, além da aquisição de informações sobre a origem do estímulo da síntese da NOS e com isso compreender os efeitos do NO, usando pra isso o nitrito como marcador indireto dos níveis de NO em sangue e tecidos. Ao contrário do "ensaio L-citrulina", o "ensaio de nitrito/nitrato" é geralmente aplicável e permite quantificação completa e irrestrita de NO *in vivo*, já que a detecção de NO propriamente dita, torna-se inviável devido sua meia-vida muito curta, instabilidade por ser um radical livre.

Das várias abordagens e métodos analíticos disponíveis até agora para a quantificação de nitrito e nitrato, os métodos baseados em cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria dentro de suas vantagens e limitações, são os métodos de maior utilização para este fim (YAO et al., 2004; TSIKAS, 2004; BRYAN; GRISHAM, 2007; BELLAVIA et al., 2015).

Por meio da espectrofotometria, ensaios baseados nas alterações de cor causada pelo NO em soluções SULF/NEDD (sulfanilamida)/(cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina), conhecido como reação de Griess, durante mais de um século vem sendo utilizado para quantificar nitrito em uma variedade de situações (BELLAVIA et al., 2015). O método é uma reação de diazotação da sulfanilamida e uma condensação adicional da produção sal de diazônio com cloridrato de naftil-etilenodiamina, ou seja, o nitrito da amostra reage com a sulfanilamida (SULF) em meio ácido, então um íon de diazônio formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um cromóforo vermelho com uma forte absorbância a 540 nm (YAO et al., 2004; RAMOS et al., 2006; BRYAN; GRISHAM, 2007).

3.6 Gomas e Polissacarídeos Naturais

Gomas podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solvente ou agente de inchamento apropriado e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Com esta definição, o termo aplica-se a uma vasta variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos de alto peso molecular, borrachas, proteínas, polissacarídeos. No entanto, o termo goma, é mais específico, e está associado a polissacarídeos e seus derivados (RODRIGUES et al., 1993).

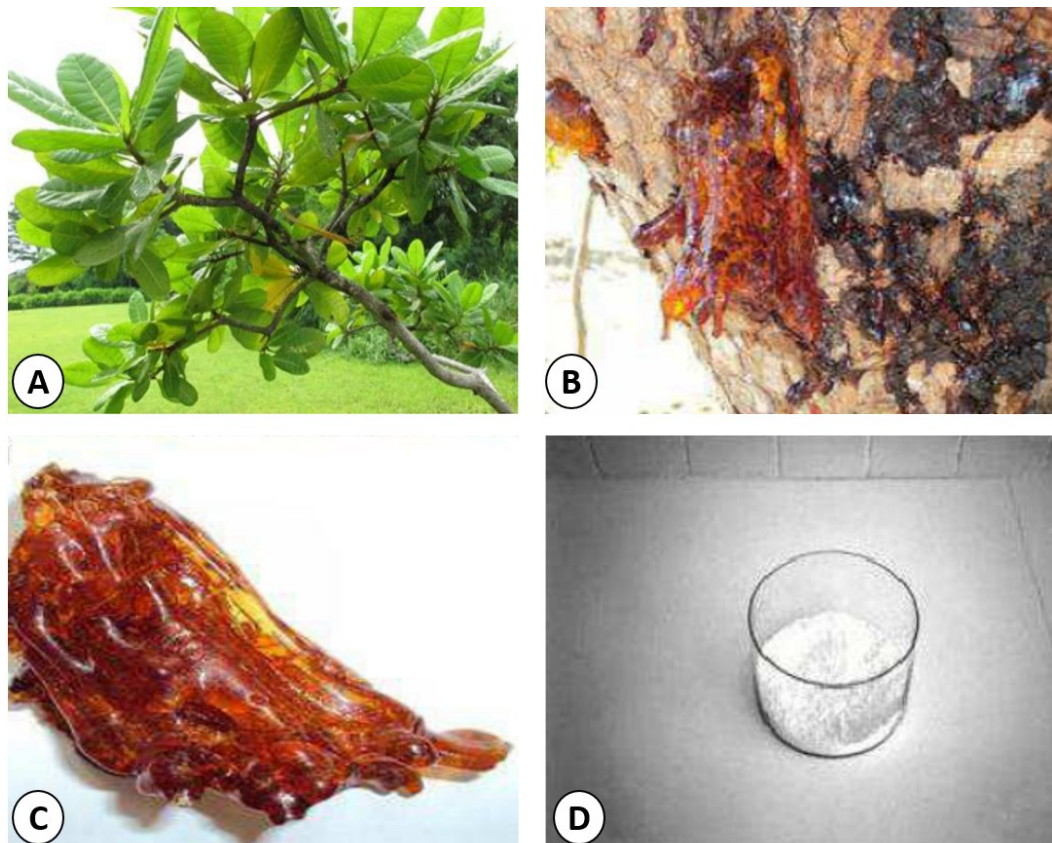
As gomas polissacarídicas são de natureza hidrofílica e pode ser classificada como natural, semi-sintética ou sintética e modificados. As gomas naturais são descritas substâncias pegajosas produzidas por certas plantas (VITORINO-FILHO, 2011; ANDRADE et al., 2013). Uma notável famílias de plantas produzem gomas, são: Anacardiaceae, Combretaceae, Meliaceae, Rosaceae e Rutaceae. Várias são as razões para a produção de gomas por parte das plantas, incluindo: mecanismo de proteção contra um condição patológica que aflige a planta; como uma lesão mecânica (OLUSOLA et al., 2014) ou como consequência da infecção de uma planta por microrganismos (OFORI-KWAKYE et al., 2010).

A família Anacardiaceae figura como uma das famílias produtoras de gomas naturais, tendo como representantes a *Lannea coromandelica* e *Anacardium occidentale* Linn. (CHOUDHARY; PAWAR, 2014). Presente em muitos países tropicais e subtropicais e,

conhecida tradicionalmente como cajueiro, a *Anacardium occidentale* L. (Fig. 13-A), produz um exsudado a partir da casca do seu caule (OFORI-KWAKYE et al., 2012).

O exsudato de cajueiro tem sido usado desde os tempos antigos pelos habitantes locais para fins múltiplos, como desordens gastrintestinais (Fig. 13-B, C) (ARAÚJO et al., 2015b). Atualmente tem sido estudada extensivamente como potencial farmacêutico e aplicações biomédicas; devendo-se ao fato de sua ocorrência natural nas plantas, ou seja, ampla disponibilidade, e, em geral, por suas características de baixa toxicidade, flexibilidade para modificação, caráter hidrofílico, baixo custo, biocompatibilidade e biodegradabilidade (OFORI-KWAKYE et al., 2010; CHOUDHARY; PAWAR, 2014; NGWULUKA et al., 2014; GOSWAMI; NAIK, 2014; PAWAR et al., 2015).

Figura 13. Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e seus derivados.

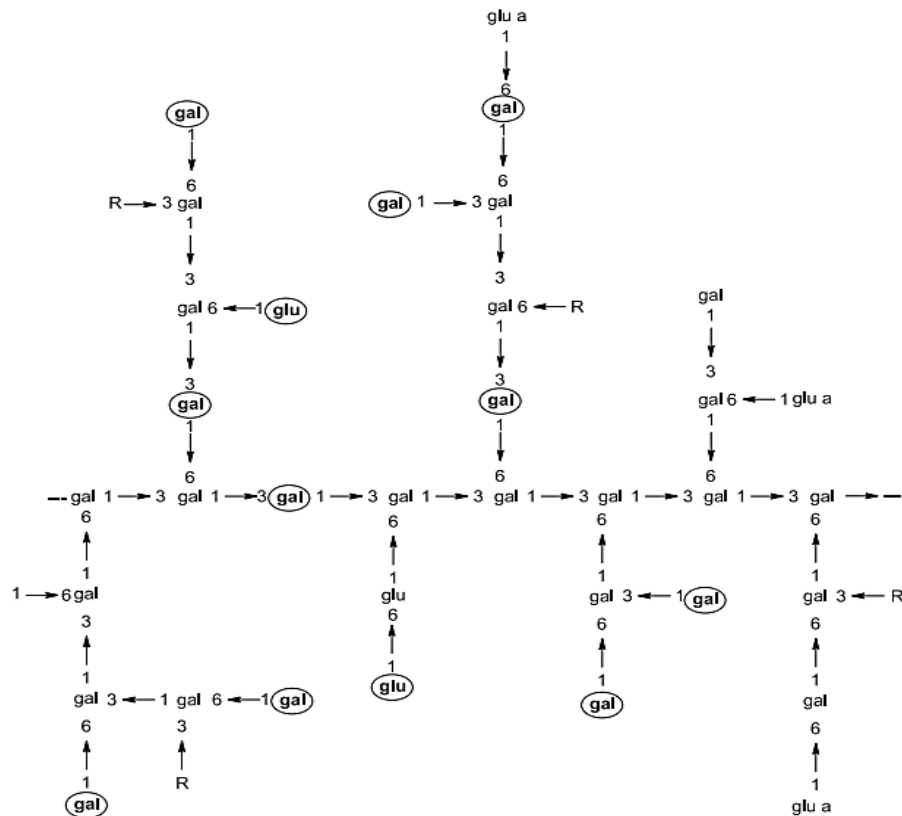


Fonte: Adaptado de VITORINO-FILHO, 2011; SILVA, 2013. A: Planta in natura; B e C: Exsudato; D: Polissacarídeo do cajueiro purificado.

Grande parte da composição da goma do cajueiro (GC) corresponde a carboidratos (98,25%), seguido de proteínas (0,90%), lipídios (0,01%) e cinza (0,84%) (PORTO et al., 2015). A fração de carboidratos, corresponde a polissacarídeo, especificamente, um heteropolissacarídeo complexo, ou seja; é formado por diferentes monossacarídeos (dois ou

mais) que se unem por meio de ligações glicosídicas para originar tal polímero; ramificado e de alto peso molecular extraído do exsudado da cajueiro (Fig. 13-D). O heteropolissacarídeo é composto quimicamente (% em peso) de galactose (72-73%), glicose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glicurônico (4,7-6,3%), além de outros resíduos de açúcar como manose, xilose e ácido metilglicurônico (SILVA et al., 2009b; OLUSOLA et al., 2014). Tal porcentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica (SILVA et al., 2006; QUELEMES et al., 2013). A cadeia principal possui unidades de galactose β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) substituídas por cadeias laterais de α -L-Raminose, β -D-Glicose, β -D-Galactose e α -L-Arabinose (Figura 14) (CUNHA et al., 2007; CHOUDHARY; PAWAR, 2014). A GC na forma bruta contém ainda, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} e quantidades vestigiais de K^+ e Na^+ como cátions neutralizados, cujo nível reduz-se após purificação (COSTA et al., 1996; OFORI-KWAKYE et al., 2012).

Figura 14. Representação esquemática de um fragmento da Goma do Cajueiro (GC).



Fonte: CUNHA et al., 2007. gal: Galactose; glu: Glicose; glu a: Ácido Glucurônico; R: D-Mannose, L-Ramnose, L-Arabinose.

A goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo proveniente da *Anacardium occidentale* L., vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos

satisfatórios, revelando diversos efeitos farmacológico de GC. Propriedade depurativas e expectorantes da goma já foram relatadas por Chaves et al. (2010). Mostrou-se também uma boa atividade hipoglicemiante, em experimentos realizados com ratos wistar normais (normoglicêmicos) e diabéticos tratados com a GC, bem como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-leishmaniose (TORQUATO et al., 2004; KUMAR et al., 2012; QUELEMES et al., 2013; SILVA et al., 2013b; BITTENCOURT et al., 2016).

A GC tem sido relatada com atividade antitumoral, em sarcoma de camundongos (KUMAR et al., 2012). Araújo et al. (2015b) em experimentos realizados em roedores, demonstrou que o GC possui atividade antidiarreico, sendo eficaz na diarreia aguda, inflamatória, secretora. E em estudos no processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos a GC foi eficaz recuperação da lesão (SCHIRATO et al., 2006). Entretanto, não há estudos na literatura sobre o efeito da goma do cajueiro em processos inflamatórios no trato gastrointestinal, dentre eles a mucosite, apesar de já relatado seu efeito benéfico em algumas desordens intestinais.

O estudo de polissacarídeos na prevenção e cura da mucosite têm sido promissores. Estudos demonstram que o polissacarídeos extraídos da *Ganoderma lucidum* promovem a proliferação e migração celular epitelial e reduzem a lesão intestinal que é induzida por fármacos na quimioterapia (CHEN et al., 2011). Zhao et al. (2014), indicou que polissacarídeos extraídos *Lycium barbarum* e *Astragalus membranaceus* podem proteger contra a colite ulcerativa experimental promovendo a recuperação da barreira intestinal. E Zuo et al., (2015) determinou evidenciou que polissacarídeos da *Acaudina molpadioides* podem proteger contra as alterações intestinais induzidas pela quimioterapia. Este dados evidencia o potencial farmacológico dos polissacarídeos naturais contra a inflamação no trato gastrointestinal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da Goma do Cajueiro, extraído do exsudato de *Anacardium occidentale* L., na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos *Swiss*.

4.2 Objetivos Específicos

- Reproduzir o modelo de mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU em camundongos *Swiss*.
- Avaliar o efeito da goma do cajueiro (GC) sobre a perda ponderal de camundongos no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Identificar os efeitos da GC sobre as alterações histopatológicas em vilosidades e criptas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal;
- Analisar o efeito da GC sobre a contagem de leucócitos totais sanguíneos após a indução da mucosite intestinal por 5-FU.
- Estudar o efeito da GC no estresse oxidativo induzidos por 5-FU na mucosite intestinal, por meio da mensuração dos níveis de MDA e GSH.
- Determinar o efeito da GC na inflamação induzidos por 5-FU na mucosite intestinal, por meio da mensuração dos níveis de MPO.
- Mensurar o efeito da GC na contagem de mastócitos teciduais induzidos por 5-FU na mucosite intestinal.
- Investigar o envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito protetor da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU, por meio da análise histopatológica.
- Verificar o envolvimento da via cicloxigenase-2 (COX-2) no efeito protetor da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU, por meio da análise histopatológica e da imunohistoquímica para COX-2 e IL-1 β .

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de Material Vegetal

Amostras brutas do polissacarídeo provenientes do exsudato foram coletadas em 2013 pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia - BIOTEC, Brasil, a partir do tronco de cajueiros nativos (*A. occidentale* L.), no município de Ilha Grande, Piauí, Brasil (Latitude, graus decimais S -2,8242; longitude, graus decimais W -41,7331). A árvore foi identificada pela Profa. Dra. Ivanilza Moreira de Andrade, Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Piauí e uma amostra de voucher do espécime, número de voucher 52, foi depositado no herbário HDELTA (Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil).

5.2 Isolamento e Purificação da Goma do Cajueiro (GC)

A goma do cajueiro (GC) foi purificada como um sal de sódio utilizando método descrito anteriormente (DE PAULA et al., 2001). Nódulos livres da casca foram selecionados e dissolvidos em água destilada à temperatura ambiente a fim de se obter uma solução a 5% (p/v). O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7,0 por adição de NaOH aquoso diluído. A solução clara obtida no processo foi sucessivamente filtrada através de vidro sinterizado e o heteropolissacarídeo precipitado com etanol, possuindo rendimento superior a 90% (SILVA et al., 2006; 2009).

5.3 Animais

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

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

5.4 Considerações éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí sob número 208/16.

5.5 Drogas e Reagentes

As drogas L-NAME e L-Arginina foram obtidas a partir da *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*. O quimioterápico 5-FU (FauldFluor[®]) foi obtido da Libbs, Brazil, e o Celecoxibe (Celebra[®]) proveniente da Pfizer, Brazil. Todos os produtos químicos e reagentes eram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

5.6 Efeito da Goma de Cajueiro (GC) na mucosite induzida por 5-FU

5.6.1 Indução da Mucosite

Utilizou-se o modelo de mucosite intestinal experimental em Camundongos *Swiss* descrito por Soares et al. (2008). Foi administrado o antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU) na concentração de 450 mg/kg por via intraperitoneal (i.p), em dose única, no primeiro dia do protocolo experimental, e os camundongos foram eutanasiados por xilazina (10 mg/kg) e cetamina (70 mg/kg) por via intramuscular três dias após a administração do quimioterápico. Este período, de acordo com o modelo proposto, é capaz de mimetizar os efeitos inflamatórios e funcionais que ocorrem no intestino de humanos ocasionados pelo uso desse quimioterápico.

5.6.2 Tratamento com a GC

Os animais foram pré-tratados com a Goma de Cajueiro (GC) extraído do exsudato do *Anacardium occidentale* L., nas doses de 30, 60, 90 mg/kg, via oral (v.o.), durante 3 dias consecutivos, após administração do 5-FU, para a avaliação do efeito de GC na mucosa intestinal e determinação da concentração do GC eficaz no tratamento da mucosite. No dia seguinte, os animais foram, então, eutanasiados, de modo a se proceder à obtenção de amostras biológicas para análises dos parâmetros indicadores sobre o referido modelo de mucosite intestinal. Amostras do duodeno, jejuno e íleo foram retiradas para análise histológica. Amostras de sangue também foram coletadas para determinação da contagem total de leucócitos.

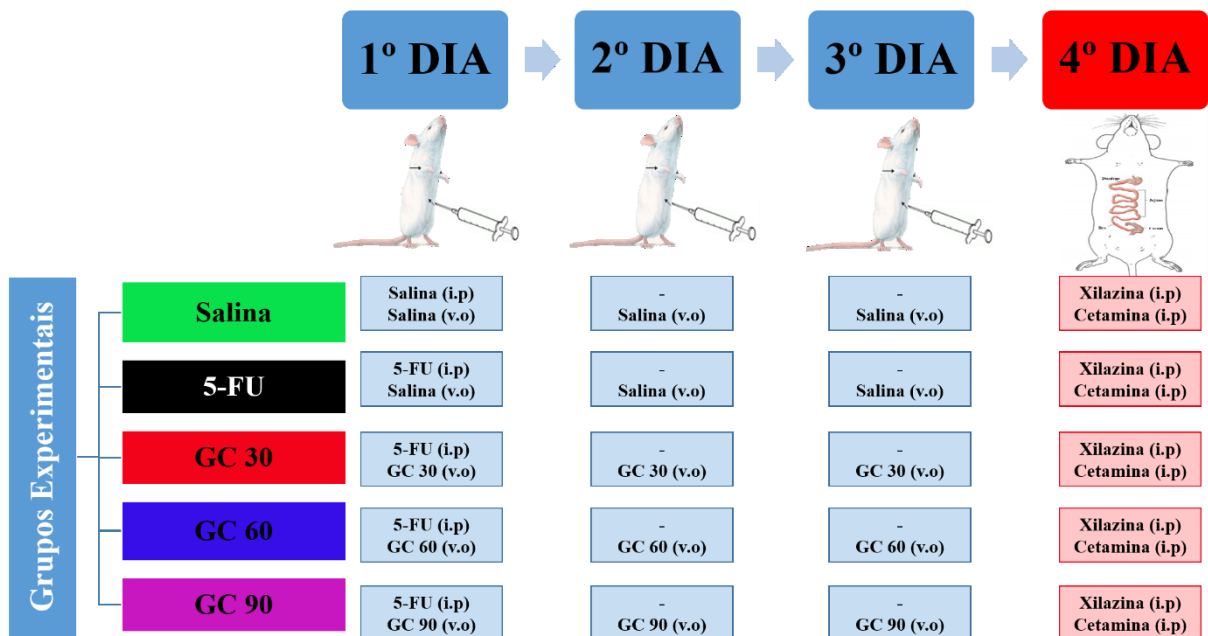
5.6.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos, inicialmente, em 5 grupos, sendo cada grupo composto por 6 animais:

- **Grupo Salina:** os animais deste grupo foram tratados apenas com soro fisiológico (NaCl a 9%), por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), para mimetizar a condição de estresse submetido aos demais grupos.
- **Grupo 5-FU:** os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e soro fisiológico por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas soro fisiológico por via oral.
- **Grupo GC 30:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Goma de Cajueiro (30 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas goma do cajueiro (30 mg/kg) por via oral.
- **Grupo GC 60:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Goma de Cajueiro (60 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas goma de cajueiro (60 mg/kg) por via oral.
- **Grupo GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas goma de cajueiro (90 mg/kg) por via oral.

As doses de Goma de Cajueiro (GC) utilizadas neste estudo foram estabelecidas com intuito de determinação da concentração eficaz no tratamento da mucosite intestinal e, em conformidade com resultados estabelecidos em Araújo, et al. (2015b). Durante todo o experimento, os animais foram monitorados peso corporal. O protocolo experimental de indução da mucosite e tratamento com o GC encontra-se ilustrado na figura 15.

Figura 15. Esquema da indução e tratamento da mucosite intestinal.

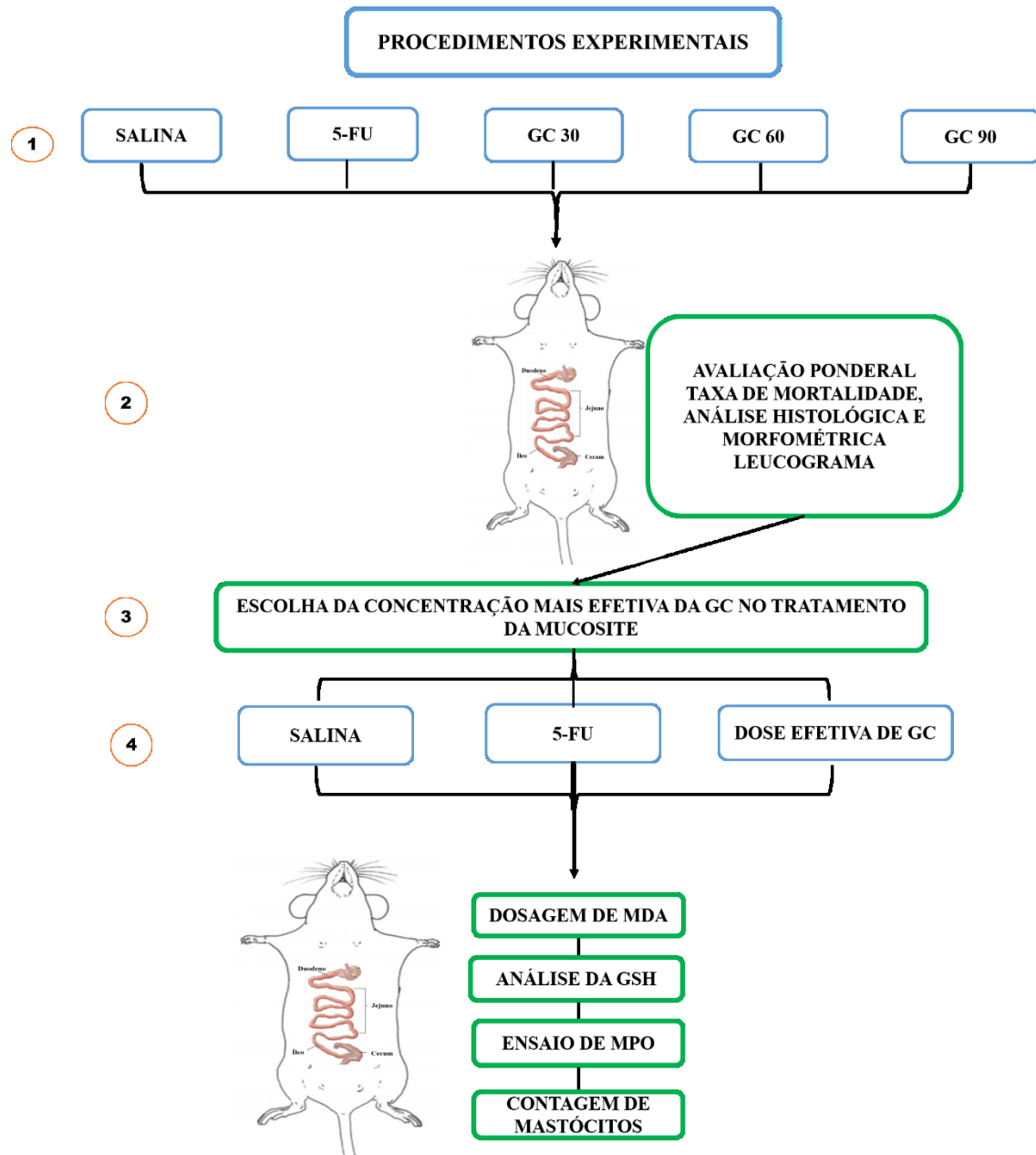


O 1º dia compreende o dia da indução da mucosite induzida pelo 5-FU e, início do tratamento da mucosite com Goma de Cajueiro (GC) ou Salina (soro fisiológico), a depender do grupo em questão. Dias 2 e 3 compreendem os dias de continuidade do tratamento mucosite com GC ou (soro fisiológico); 4º dia corresponde ao dia da eutanásia dos animais com cetamina e xilazina. Em todos os dias do protocolo experimental o peso corporal dos animais foram mensurados. 5-FU: 5-FU na concentração de 450 mg/kg; Salina: Soro fisiológico (NaCl a 9%); GC 30: Goma de Cajueiro na concentração de 30 mg/kg; GC 60: Goma de Cajueiro na concentração de 60 mg/kg; GC 90: Goma de Cajueiro na concentração de 90 mg/kg; Xilazina: xilazina na concentração de 30mg/kg; Cetamina: Cetamina na concentração de 70 mg/kg; i.p: intraperitoneal; v.o: via oral.

5.6.4 Parâmetros avaliados

Após a indução da mucosite, o delineamento dos procedimentos experimentais se deu por meio da realização da eutanásia, após os dias de tratamento com o GC, avaliação dos parâmetros: análise histopatológica e morfométrica, análise ponderal e taxa de mortalidade, Leucograma, dosagem de Malondialdeído (MDA), análise da concentração de Glutathiona (GSH), ensaio de Mieloperoxidase (MPO) e contagem de mastócitos teciduais de acordo com a figura 16, item 1 e 2.

Figura 16. Fluxograma do delineamento experimental.



Fonte: Autoria própria. 5-FU: antineoplásico 5- Fluorouracil; GC: Goma do Cajueiro; MPO: Mieloperoxidase; GSH: Glutathiona reduzida; MDA: Malondialdeído.

5.6.4.1 Análise ponderal

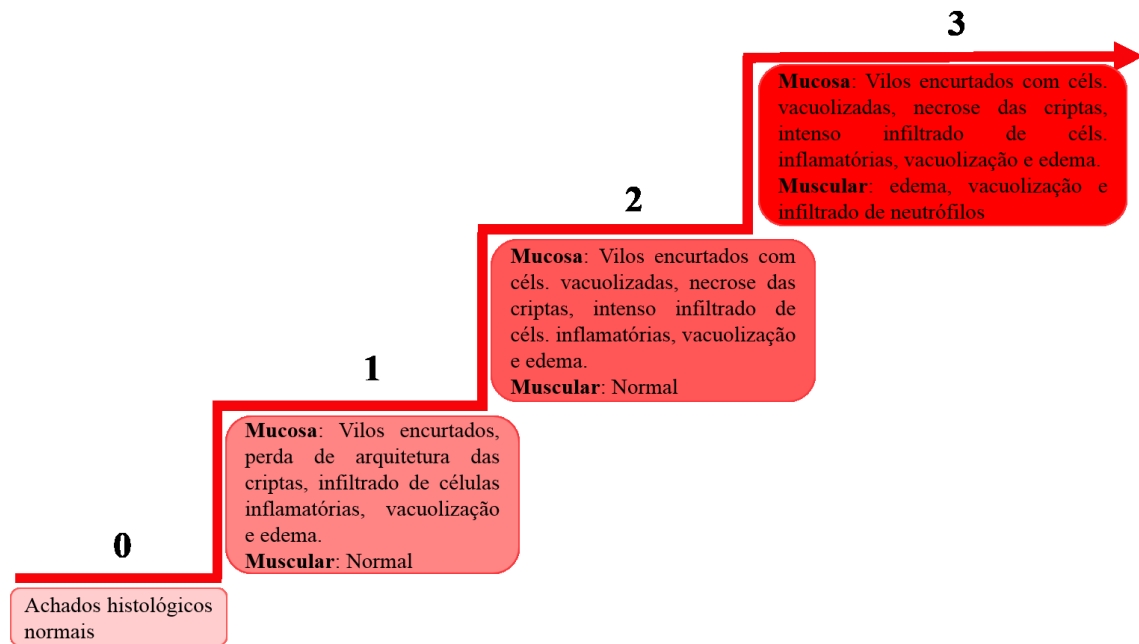
Durante todo o período experimental, a massa dos camundongos foi aferida em balança antes da administração de quaisquer dos compostos (Salina 9%, 5-FU e GC), de modo a se acompanhar o processo de perda de massa corpórea induzida pelo 5-FU, bem como avaliar a suposta ação protetora dos tratamentos da GC sobre o processo de perda de massa (Figura 16, item 2).

5.6.4.2 Análise Histopatológica e Morfométrica

Para a análise Histopatológica e Morfométrica, após a eutanásia dos animais por combinação de anestésicos foram obtidas amostras de tecido dos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Considerou-se como duodeno, o segmento que corresponde à porção anterior a 3 cm do ligamento de Treitz; jejuno, a porção anterior a 10 cm do ligamento de Treitz; e íleo, a porção anterior a 6 cm da válvula íleo-cecal (CARNEIRO-FILHO et al., 2004). Tais amostras, após fixação por 24h em formol a 10% e conservação em álcool a 70%, foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos em micrótomo, de modo a se obter as lâminas a serem avaliadas, coradas com H&E (Hemotoxilina-Eosina) (Figura 16, item 2).

Na análise histopatológica foi realizado um estudo-cego e randomizado, por um histopatologista experiente, de forma a avaliar a severidade da mucosite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura tecidual, com enfoque nos vilos e criptas, e ocorrência de infiltrados celulares (em especial a infiltração neutrofílica), típicos de processo inflamatório. Os níveis de intensidade da mucosite foram, então, definidos por um sistema de escores (Macpherson e Pfeiffer, 1978), conforme segue: 0 - ausência de lesão (achados histológicos normais); 1 - vilos encurtados, perda de arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 2 - vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal; 3 - vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos (figura 17).

Figura 17. Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (1978).



Fonte: Adaptado de Macpherson; Pfeiffer, 1978.

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

Com a realização da análise dos parâmetros (análise ponderal, histopatológica, morfométrica) foi então determinada a concentração efetiva de Goma do Cajueiro (GC) no tratamento da mucosite intestinal (Figura 16, item 3), e partindo da melhor dose do GC, deu-se continuidade a avaliação dos demais parâmetros (Figura 16, item 4).

5.6.4.3 Leucograma

O leucograma, foi realizado previamente ao sacrifício, os animais foram anestesiados com combinação de anestésicos (xilazina 10 mg/kg e cetamina 70 mg/kg), no qual foram obtidas amostras de sangue periférico da artéria ocular ou diretamente do coração, que foram diluídas em líquido de Turk a uma proporção de 20 μL de sangue para 380 μL de solução. Após

isso, foi realizada a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer (MOURA et al, 1998), com resultados expressos na forma de número total de leucócitos por/mm³ de sangue (Figura 16, item 4).

5.6.4.4 Dosagem dos níveis de Malondialdeído (MDA)

Malondialdeído (MDA) é um aldeído formado pela decomposição dos hidroperóxidos lipídico. Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica que consiste na ação de radicais livres nos fosfolipídios da membrana celular, causando ruptura da membrana celular, mutações no DNA e ativação da via do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) (REINALDO, 2015).

Considerado o mais importante indicador de estresse oxidativo tecidual, a determinação de MDA, usando o teste do ácido tiobarbitúrico – TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), foi utilizada como estimativa para a taxa de lipoperoxidação da mucosa intestinal. Para este procedimento, as mucosas das porções do duodeno, jejuno e íleo foram lavados com salina gelada para minimizar a interferência da hemoglobina com radicais livres e remover o sangue aderido à mucosa. As mucosas dos tecidos macerados foram homogeneizados a 10% com cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 µL foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375 µL de ácido fosfórico (1%) e 125 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo. Em seguida, as amostras foram imersas em banho-maria por 45 min a 100°C. Decorrido este tempo, adiciona-se a cada amostra 500 µL de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foi inserido na placa de 96 poços e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm (MIHARA; UCHYAMA, 1978). Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína (Figura 16, item 4).

5.6.4.5 Análise da Concentração de Glutationa (GSH)

A glutaciona é um antioxidante endógeno que é consumido na presença de estresse oxidativo, desta forma, redução dos seus níveis está relacionada a presença de estresse oxidativo (QUARESMA, 2016).

A concentração de GSH nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa

intestinal dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA 0,02M para cada 100mg de tecido. Aliquotas de 100 μ L do homogeneizado foram misturadas a 80 μ L de água destilada e a 20 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 100 μ L do sobrenadante foi adicionado a 200 μ L de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 μ L de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μ g de GSH/mg de tecido a partir da curva padrão (Figura 16, item 4).

5.6.4.6 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. A MPO, ao reagir com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), forma radicais livres e substâncias oxidantes que causam processo inflamatório e lesão tecidual (ÁVILA, 2013; BASTOS, 2014; REINALDO, 2015; QUARESMA, 2016).

A avaliação da atividade da MPO foi determinada (Figura 16, item 4), resumidamente, 50-100 mg de tecido do segmento duodenal do intestino delgado foram homogeneizados em 1 ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB) a cada 50 mg de tecido, em seguida, centrifugado a 4.000 rpm durante 7 minutos a 4°C. A atividade de MPO no sedimento ressuspenso foi analisada através da medição da alteração na absorbância a 450 nm utilizando dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram registrados como unidades de MPO por mg de tecido. A atividade da MPO por mg de tecido foi determinada através da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982).

5.6.4.7 Análise da concentração de mastócitos

Para evidenciar a presença e contagem de mastócitos (Figura 16, item 4), os blocos de parafina com amostras de mucosa intestinal do segmento duodeno foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany (2008). A coloração de azul de toluidina foi realizada após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70% em seguidas as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa a 60° C por uma hora para secar. Após a secagem as

lâminas clareadas com uma série de xilol são montadas. Para a contagem de mastócitos presentes nas lâminas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), realizou-se a captura das imagens digitais, para contagem posterior de no mínimo 10 campos, com auxílio de software ImageJ. Os resultados representam a média de 10 campos de cada grupo.

5.7 Avaliação do papel do óxido nítrico (NO) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da GC na mucosite intestinal em camundongos.

Na segunda investigação objetivou-se avaliar o efeito do papel do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos, e avaliação do envolvimento deste neurotransmissor no efeito protetor (já determinado na primeira parte da investigação) da Goma do Cajueiro (GC) na mucosite. Foi realizado o mesmo protocolo de indução da mucosite intestinal, contudo utilizou-se os seguintes grupos experimentais (n=6 animais):

- **Grupo Salina:** os animais deste grupo foram tratados apenas com soro fisiológico (NaCl a 9%), por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), para mimetizar a condição de estresse submetido aos demais grupos.
- **Grupo 5-FU:** os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e soro fisiológico por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas soro fisiológico por via oral.
- **Grupo L-NAME:** os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e L-NAME (20 mg/kg i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas L-NAME (20 mg/kg i.p).
- **Grupo GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas goma do cajueiro (90 mg/kg) por via oral.
- **Grupo L-Arginina e GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral (v.o) e L-Arginina (300 mg/kg i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas GC (90 mg/kg) por via oral (v.o) e L-Arginina (300 mg/kg i.p).

- **Grupo L-NAME e GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral e L-NAME (20 mg/kg i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas GC (90 mg/kg) por via oral e L-NAME (20 mg/kg i.p).

Pretendeu-se com a administração da L-Arginina, um substrato verdadeiro da NOS, a inserção de grande quantidade de NO nos animais e, assim avaliar a atuação do NO na mucosite e sua interação com a Goma do Cajueiro (GC). Por meio da administração do N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME, um inibidor não específico da oxido nítrico sintase (NOS), pretendeu-se avaliar como o bloqueio da síntese de NO, influenciaria na mucosite, positivamente ou não na evolução do tratamento da mucosite intestinal com a GC.

Posterior ao protocolo de indução da mucosite intestinal foi realizado a eutanásia e retiradas das amostras do segmento duodenal, para avaliação da mucosite, efeitos dos bloqueadores e ativadores do NO bem como interação com a GC, através das análises histopatológicas e morfométricas pelo método de coloração H&E.

5.7.1 Análise morfométrica e histopatológica

Após a eutanásia dos animais por combinação de anestésicos foram obtidas amostras de tecido do segmento duodenal do intestino delgado. Tais amostras, após fixação por 24h em formol a 10% e conservação em álcool a 70%, foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos em micrótomo, de modo a se obter as lâminas a serem avaliadas, coradas com H&E (Hemotoxilina-Eosina).

Para as análises morfométricas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas a altura dos vilos (topo à base) e profundidade das criptas intestinais para a correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos e criptas foi calculada utilizando-se o software ImageJ, por meio da aferição da altura de 10 vilosidades e a profundidade das criptas intestinais, ambas em μm , sendo a análise feita por campo. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão da média (epm) das alturas das vilosidades e profundidade das criptas. Na análise histopatológica foi realizado a avaliação da severidade da mucosite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura tecidual, com enfoque nos vilos e

criptas, e ocorrência de infiltrados celulares (em especial a infiltração neutrofílica), típicos de processo inflamatório.

5.8 Avaliação do papel cicloxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da GC na mucosite intestinal em camundongos.

Na terceira investigação objetivou-se investigar o efeito do papel da via da cicloxigenase na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos, e avaliação do envolvimento desta via no efeito protetor (já determinado na primeira parte da investigação) da Goma do Cajueiro (GC) na mucosite. Foi realizado o mesmo protocolo de indução à mucosite intestinal, contudo utilizou-se os seguintes grupos experimentais (n=6 animais):

- **Grupo Salina:** os animais deste grupo foram tratados apenas com soro fisiológico (NaCl a 9%), por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), para mimetizar a condição de estresse submetido aos demais grupos.
- **Grupo 5-FU:** os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e soro fisiológico por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas soro fisiológico por via oral.
- **Grupo GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, e Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral. Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas goma do cajueiro (90 mg/kg) por via oral.
- **Grupo Celecoxibe:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).
- **Grupo Celecoxibe e GC 90:** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450 mg/kg de peso do animal) por via intraperitoneal, Goma de Cajueiro (90 mg/kg de peso do animal) por via oral e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p). Nos dois dias seguintes do protocolo experimental foram administrados apenas GC (90 mg/kg) por via oral e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).

Pretendeu-se com a administração da Celecoxibe, um bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), avaliar como o bloqueio da síntese de prostanóides, atuaria na fisiopatologia da

mucosite e como sua interação com a GC influenciaria no efeito protetor da mesma no tratamento da mucosite intestinal.

Posterior ao protocolo de indução da mucosite intestinal foi realizado a eutanásia e retiradas das amostras do segmento duodenal, para avaliação da mucosite, efeito do bloqueador da COX, bem como sua interação com a GC, através das análises histopatológicas e morfométricas pelo método de coloração H&E, Imunohistoquímica para detecção de COX-2 e IL-1 β .

5.8.1 Análise morfométrica e histopatológica

Após a eutanásia dos animais por combinação de anestésicos foram obtidas amostras de tecido do segmento duodenal do intestino delgado. Tais amostras, após fixação por 24h em formol a 10% e conservação em álcool a 70%, foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos em micrótomo, de modo a se obter as lâminas a serem avaliadas, coradas com H&E (Hemotoxilina-Eosina).

Para as análises morfométricas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas a altura dos vilos (topo à base) e profundidade das criptas intestinais para a correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos e criptas foi calculada utilizando-se o software ImageJ, por meio da aferição da altura de 10 vilosidades e a profundidade das criptas intestinais, ambas em μm , sendo a análise feita por campo. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão da média (epm) das alturas das vilosidades e profundidade das criptas. Na análise histopatológica foi realizado a avaliação da severidade da mucosite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura tecidual, com enfoque nos vilos e criptas, e ocorrência de infiltrados celulares (em especial a infiltração neutrofílica), típicos de processo inflamatório.

5.8.2 Imunohistoquímica para detecção de IL-1 β e COX-2

A imunohistoquímica para IL-1 β , e COX-2 foi realizada de acordo com o método estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Para a realização da imunohistoquímica realizou-se cortes histológicos dos segmento intestinal duodeno a partir dos cassetes obtidos no experimento de modulação da via da COX, conforme o item 5.8. Os cortes

(com espessura de 4 μm) foram colocados em lâminas recobertas com poli-Llisina, apropriadas para a realização da imunohistoquímica.

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

Para a quantificação da imunomarcção por COX-2 e IL-1 β presentes nas lâminas, imagens da imunohistoquímica foram capturadas com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA).

Para a imagens com imunomarcção para COX-2 realizou-se a quantificação por células imunomarcadas com auxílio do com auxílio de software Image J. E para as imagens com imunomarcção com IL-1 β , realizou-se a quantificação através da mensuração da % de área imunomarcada com o auxílio do Adobe Phtoshop 10.

5.9 Análises Estatísticas

Os resultados quantitativos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e, para os dados qualitativos como os escores histológicos foram expressos pela mediana \pm mínimo e máximo.

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

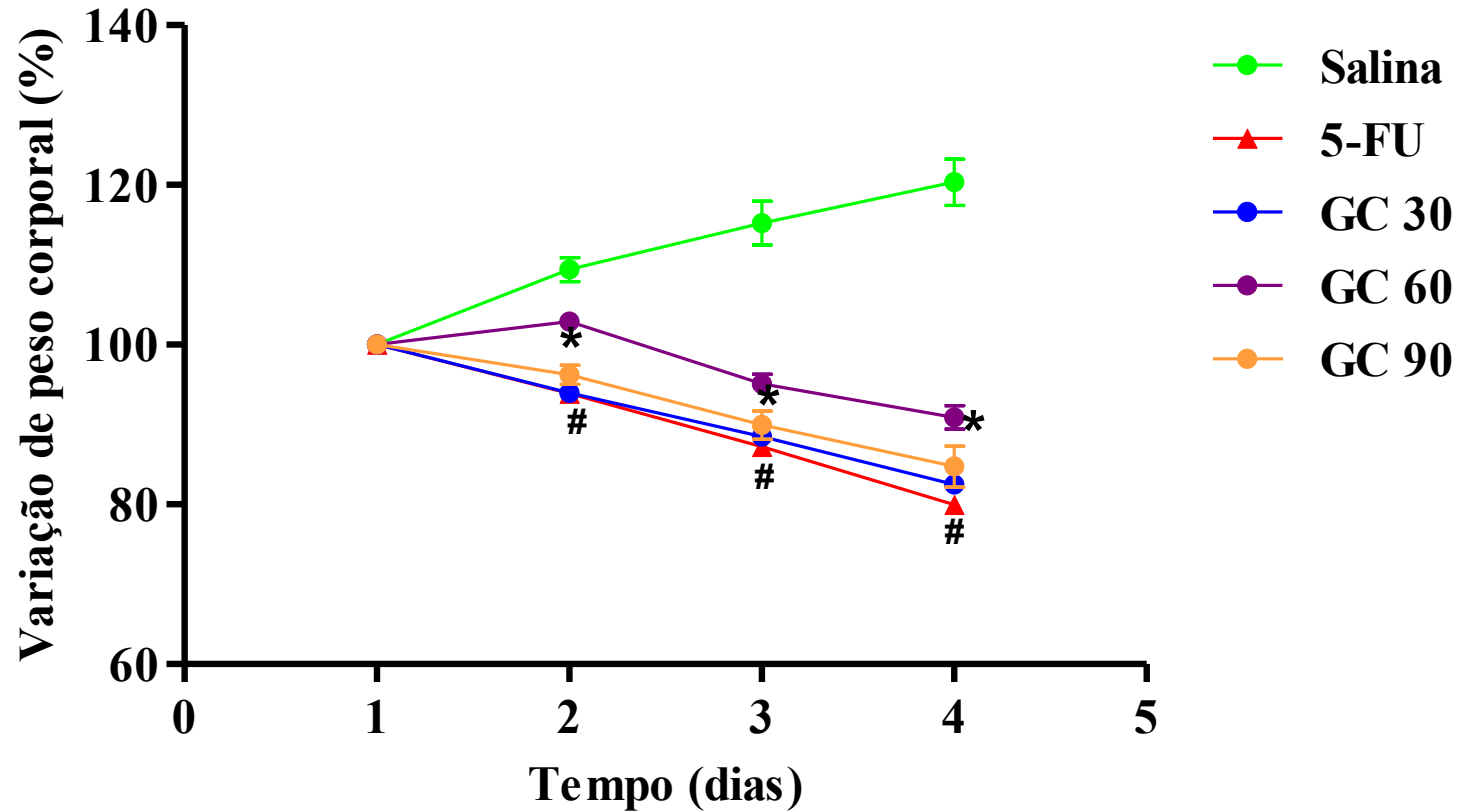
6 RESULTADOS

6.1 Efeito do tratamento com GC sobre a perda ponderal em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A perda de peso no decorrer da quimioterapia é um dos efeitos adversos comuns no tratamento com o 5-FU. Diante do exposto, a avaliação ponderal é um dos parâmetros avaliados, no decorrer de quatro dias consecutivos, para confirmar o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Conforme o esperado, observado na figura 18, todos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU apresentaram perda de peso progressiva, a partir do segundo dia após a indução de mucosite intestinal, com diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo salina ($p < 0,05$). Observa-se que apenas a GC 60 preveniu a perda de peso induzida pelo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 18. Efeito do tratamento com GC sobre a perda ponderal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



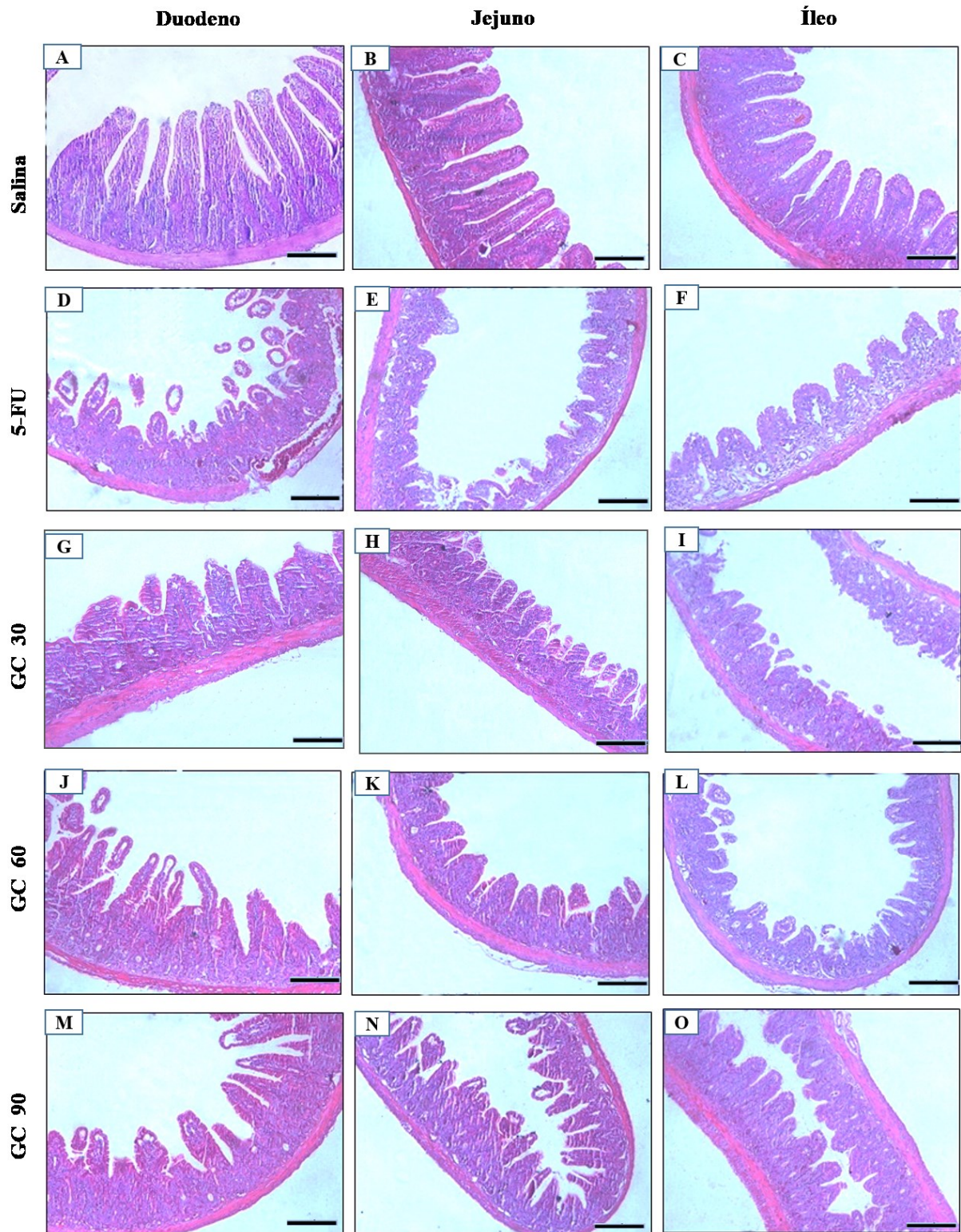
Salina: Salina a 0,9%; 5-FU: 5-FU a 450mg/kg; GC 30: 5-FU a 450mg/kg + Goma do Cajueiro 30mg/kg; GC 60: 5-FU a 450mg/kg + Goma do Cajueiro 60mg/kg; GC 90: 5-FU a 450mg/kg + Goma do Cajueiro 90mg/kg. Os resultados são expressos como média \pm EPM do percentual de avaliação ponderal do peso inicial, de um mínimo de 6 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste Bonferroni, onde o # $P < 0,05$ comparados com o grupo salina e, * $P < 0,05$ comparados com o grupo 5-FU.

6.2 Efeito do tratamento com GC nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A visualização microscópica dos segmentos intestinais corados em hematoxilina e eosina é uma peça-chave na análise da arquitetura tecidual e suas alterações histológicas promovidas pelo 5-FU.

Em condições fisiológicas, conforme demonstrado neste estudo pelo grupo salina, a morfologia e altura das vilosidades e das criptas no epitélio de revestimento intestinal apresenta-se íntegro, além de ausência de infiltração de células inflamatórias no tecido (duodeno, figura 19A; jejuno, 19B; íleo 19C). A administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciado pela redução da altura das vilosidades e do comprimento das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal e intenso infiltrado de células inflamatórias (duodeno, figura 19D; jejuno, figura 19E; íleo, figura 19F). Evidenciou-se que o tratamento com o GC promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório, redução do encurtamento das vilosidades e do aumento da profundidade das criptas, nos grupos GC 60 (duodeno, figura 19J; jejuno, figura 19K; íleo, figura 19L) e GC 90 (duodeno, figura 19M; jejuno, figura 19N; íleo, figura 19O). GC 30 não preveniu as alterações histológicas induzidas pelo 5-FU, os animais deste grupo apresentaram diminuição da altura das vilosidades, aumento da profundidade das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal (duodeno, figura 19G; jejuno, figura 19H; íleo, figura 19I).

Figura 19. Efeito do tratamento com GC nas alterações histopatológicas de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



A, B, C correspondem aos três segmentos intestinais (duodeno, jeuno e íleo, respectivamente) do grupo salina, neste grupo observa-se integridade em relação morfologia e altura das vilosidades e das criptas e ausência de infiltração de células inflamatórias. D, E e F correspondem aos três segmentos intestinais (duodeno, jeuno e íleo, respectivamente) do grupo 5-FU, o 5-FU induziu infiltrado de células inflamatórias, diminuição nas vilosidades intestinais, perda de arquitetura das criptas intestinais,

vacuolização de células epiteliais. Os grupos em tratamento com a Goma do Cajueiro (GC) nas doses 30, 60 e 90 mg/kg, são representados pelas letras G, H e I para o grupo GC 30; J, K e L para o grupo GC 60 e, M, N e O para o grupo GC 90. Observa-se ao menos em GC 60 e GC 90, em seus três segmentos intestinais, diminuição do infiltrado inflamatório, prevenção do encurtamento das vilosidades e do aumento da profundidade das criptas, com maior reversão do efeito do 5-FU no grupo GC 90. Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μm (X10).

6.3 Efeito do tratamento com GC nos escores histopatológico de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A análise dos escores histopatológicos, apresentados na tabela 03, o grupo salina apresentou achados histológicos normais, evidenciados pelas vilosidades e criptas normais e ausência de células inflamatórias, que lhe conferiu escore 0 nas três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo). A administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciado pela redução da altura das vilosidades, aprofundamento das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal e intenso infiltrado de células inflamatórias, que resultou em aumento significativo dos escores microscópicos em comparação ao grupo salina ($p < 0,05$). Dos animais tratados com a Goma do Cajueiro, apenas a GC 90, apresentaram redução significativa dos escores microscópicos em comparação ao grupo 5-FU ($p < 0,05$), no segmento duodenal. Entretanto, GC 30 e GC 60 não foram capaz de reduzir os escores microscópicos em comparação ao grupo 5-FU ($p > 0,05$).

Tabela 03. Efeito do tratamento com GC nos escores histopatológico de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Segmentos Intestinais	Grupos Experimentais				
	Salina	5-FU	GC (mg/kg)		
			30	60	90
Duodeno	0 (0-0)	2 (1-3) [#]	3 (3-3)	1 (1-2)	1 (0-1) [*]
Jejuno	0 (0-0)	3 (3-3) [#]	3 (2-3)	2 (1-3)	1,5 (1-3)
Íleo	0 (0-1)	3 (2-3) [#]	2 (1-3)	2,5 (1-3)	2 (2-3)

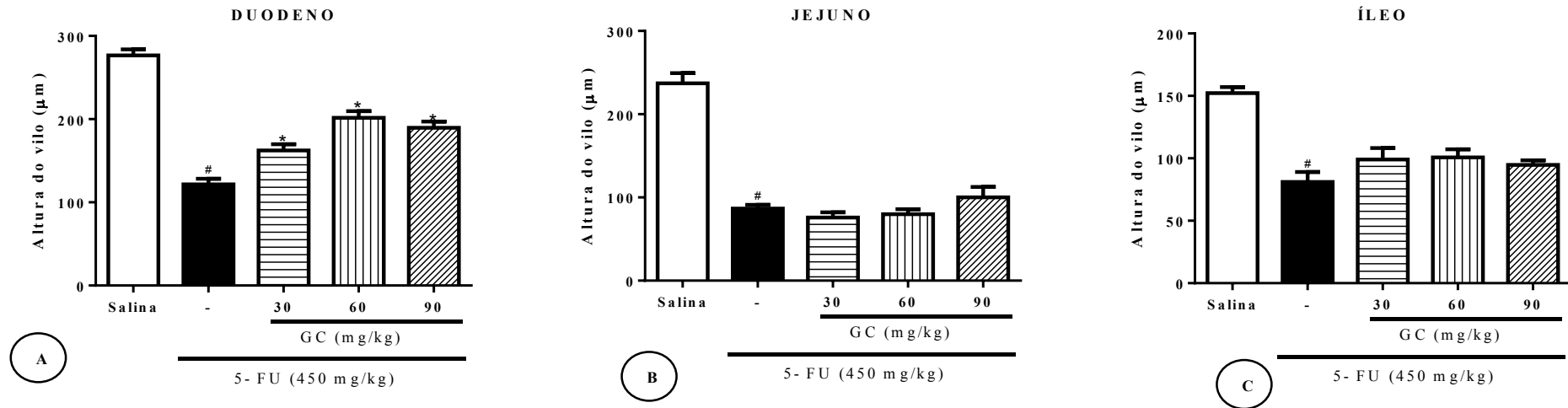
O 5-FU aumenta de forma significativa os escores histopatológicos quando comparado ao grupo salina (salina a 0,9% v.o). O GC 90 na porção duodenal, diminui os escores histopatológicos de maneira estatisticamente significativa em comparação ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Os valores foram expressos como mediana, onde # $p < 0,05$ vs salina e * $p < 0,05$ vs 5-FU (n=6/grupo).

6.4 Efeito do tratamento com GC nas alterações morfométricas na altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Ao mensurar a altura das vilosidades no segmento do duodeno, conforme a figura 20A, observou-se que 5-FU promoveu a redução ($121,7 \pm 6,7 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa da altura das vilosidades quando comparado ao grupo salina ($276,7 \pm 7,2 \mu\text{m}$). Ao passo que o GC 30 ($162,4 \pm 7,4 \mu\text{m}$), GC 60 ($201,6 \pm 8,1 \mu\text{m}$) e GC 90 ($189,7 \pm 7,4 \mu\text{m}$) aumentou a altura das vilosidades quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$).

Conforme a figura 20B, no jejuno, o 5-FU promoveu a redução ($86,7 \pm 4,5 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa da altura das vilosidades quando comparado ao grupo salina ($237,2 \pm 12,2 \mu\text{m}$). Os grupos GC 30 ($75,81 \pm 6,3 \mu\text{m}$), GC 60 ($79,8 \pm 6,2 \mu\text{m}$) e GC 90 ($100,1 \pm 12,6 \mu\text{m}$) não apresentaram-se diferença estatística quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$). Dados similares foram observados para o íleo, conforme visualizado na figura 20C, o 5-FU promoveu redução ($81,1 \pm 8,1 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa da altura das vilosidades quando comparado com o grupo salina ($152,3 \pm 4,8 \mu\text{m}$). Os grupos GC 30 ($99,15 \pm 9,1 \mu\text{m}$), GC 60 ($100,7 \pm 6,4 \mu\text{m}$) e GC 90 ($92,9 \pm 3,9 \mu\text{m}$) não apresentaram-se diferença estatística quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 20. Efeito do tratamento com GC nas alterações morfológicas da altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



O 5-FU diminuiu de forma significativa a altura dos vilos no segmentos duodeno, jejuno e íleo quando comparado ao grupo Salina. Apenas no segmento do duodeno, GC nas concentrações 30, 60 e 90 mg/kg revertem de forma significativa o encurtamento dos vilos quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. A: Altura da vilosidade do duodeno; B: Altura da vilosidade do jejuno; C: altura da vilosidade do íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM das alturas vilosidades em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o $\#p < 0,05$ vs grupo salina e $*p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

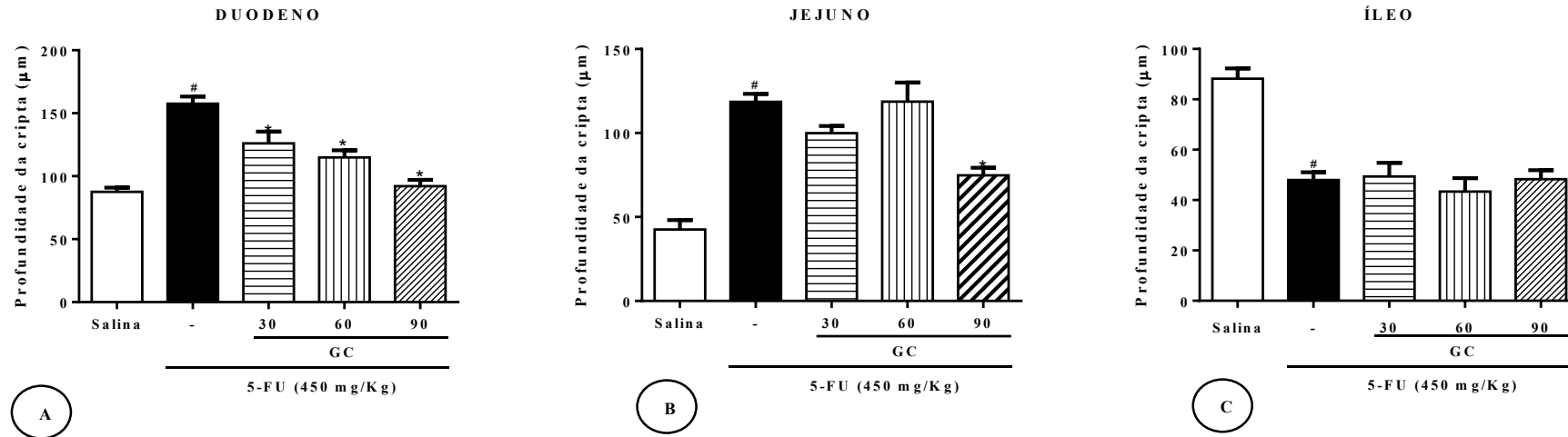
6.5 Efeito do tratamento com GC nas alterações morfométricas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Ao mensurar profundidade das criptas no segmento do duodeno, conforme a figura 21A, observou-se que 5-FU promoveu aumento na profundidade das criptas ($157,5 \pm 5,6 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($87,5 \pm 3,4 \mu\text{m}$). Ao passo que GC 30 ($126,1 \pm 9,2 \mu\text{m}$) GC 60 ($114,9 \pm 5,6 \mu\text{m}$) e GC 90 ($92,1 \pm 5,0 \mu\text{m}$) reverteu o aprofundamento das criptas em comparação ao grupo 5-FU de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Conforme a figura 21B, no jejuno, o 5-FU promoveu o aprofundamento das criptas ($118,6 \pm 4,8 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($42,6 \pm 5,6 \mu\text{m}$). GC 30 ($99,9 \pm 4,2 \mu\text{m}$), GC 60 ($118,7 \pm 11,3 \mu\text{m}$) não reverteram o aprofundamento das criptas de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 5-FU. GC 90 ($74,7 \pm 4,5 \mu\text{m}$) reverteu o aumento da profundidade das criptas de maneira significativa quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

No íleo, conforme visualizado na figura 21C, o grupo 5-FU não apresentou aprofundamento das criptas ($47,9 \pm 3,1 \mu\text{m}$), contudo, apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo salina ($81,8 \pm 5,1 \mu\text{m}$). GC 30 ($48,6 \pm 5,0 \mu\text{m}$), GC 60 ($43,3 \pm 5,3 \mu\text{m}$) e GC 90 ($48,2 \pm 3,6 \mu\text{m}$) não apresentaram-se diferença estatística quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 21. Efeito do tratamento com GC nas alterações morfológicas da profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



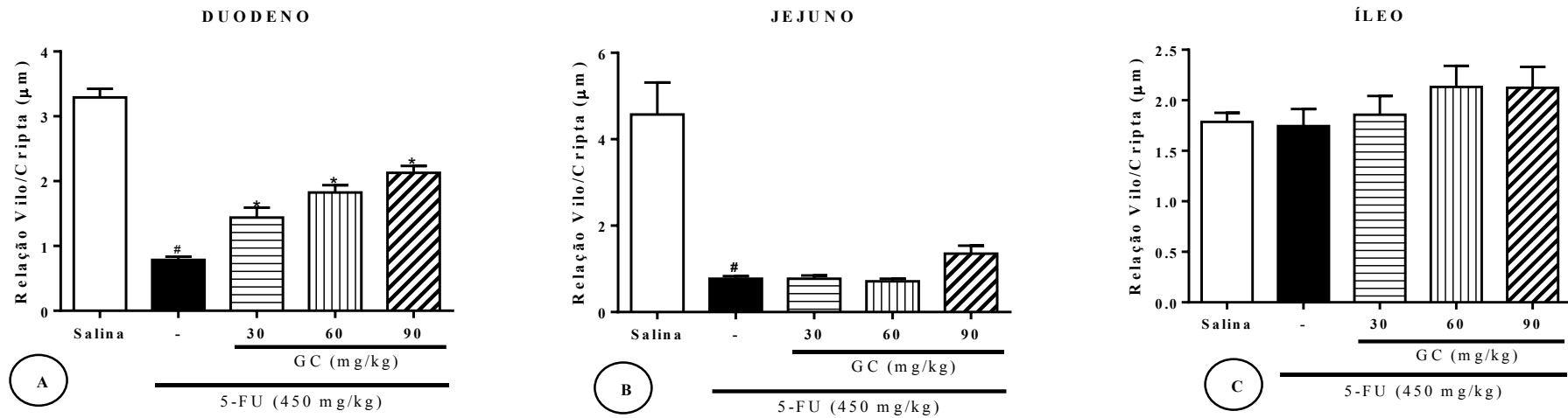
O 5-FU promoveu o aprofundamento das criptas de maneira estatisticamente significativa nos segmentos duodeno, jejuno e íleo quando comparado ao grupo salina. No segmento do duodeno, o GC 30, GC 60 e GC 90 revertem de forma significativa o aprofundamento das criptas quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. No jejuno, apenas o GC 90 reverteu o aprofundamento das criptas em relação ao grupo 5-FU. A: Profundidade das criptas no duodeno; B: Profundidade das criptas no jejuno; C: Profundidade das criptas no íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM da profundidade das criptas em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.6 Efeito do tratamento com GC na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Ao avaliar a relação vilo/cripta no segmento do duodeno, conforme a figura 22A, observou-se que grupo 5-FU promoveu redução da relação vilo/cripta ($0,7 \pm 0,04 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($3,2 \pm 0,13 \mu\text{m}$). GC 30 ($1,44 \pm 0,15 \mu\text{m}$), GC 60 ($1,82 \pm 0,11 \mu\text{m}$) e GC 90 ($2,12 \pm 0,10 \mu\text{m}$) apresentaram aumento da relação vilo/cripta estatisticamente significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$).

Conforme a figura 22B, no jejuno, o 5-FU ($0,77 \pm 0,06 \mu\text{m}$) apresentou diminuição da relação vilo/cripta de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($4,5 \pm 0,73 \mu\text{m}$). Ao passo que o GC 30 ($0,77 \pm 0,07 \mu\text{m}$), GC 60 ($0,72 \pm 0,06 \mu\text{m}$) e GC 90 ($1,3 \pm 0,18 \mu\text{m}$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa da relação vilo/cripta quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Dados similares foram observados para o íleo, conforme visualizado na figura 22C, o 5-FU ($1,74 \pm 0,16 \mu\text{m}$) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($1,78 \pm 0,09 \mu\text{m}$). O GC 30 ($1,85 \pm 0,18 \mu\text{m}$), GC 60 ($2,13 \pm 0,21 \mu\text{m}$) e GC 90 ($2,12 \pm 0,20 \mu\text{m}$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando em comparação ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 22. Efeito do tratamento com GC na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



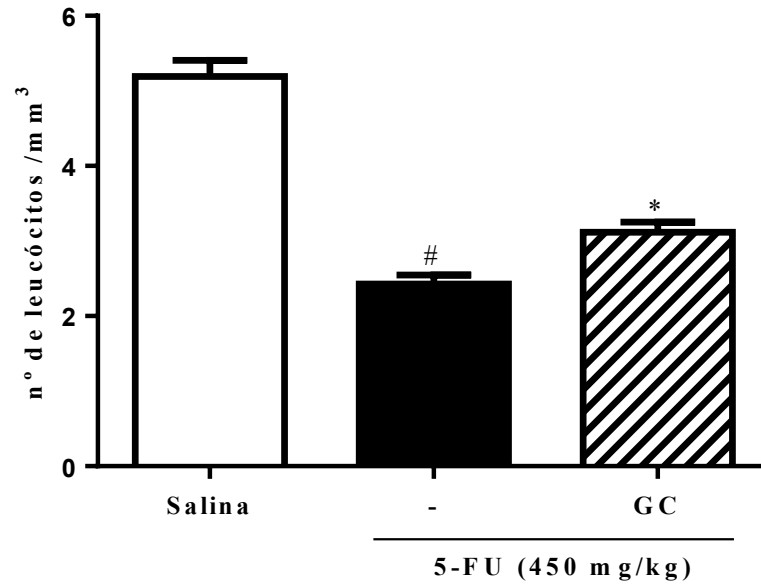
O 5-FU promoveu a diminuição de forma significativa da relação vilo/cripta das criptas apenas nos segmentos duodeno e jejuno, em relação ao grupo salina. Contudo, apenas na porção duodenal, a GC, nas três concentrações testadas, conseguiu aumentar a relação vilo/cripta de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. A: Relação vilo/cripta no duodeno; B: Relação vilo/cripta no jejuno; C: Relação vilo/cripta no íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM da relação vilo/cripta em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.7 Efeito do tratamento com GC na contagem total de leucócitos sanguíneos de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A mucosite e mielossupressão são dois dos principais efeitos adversos no tratamento quimioterápico com o 5-FU (KUMAR et al., 2010; KAWASHIMA et al., 2015a; KOBUCHI et al., 2016).

Dessa forma, na figura 23, demonstrou-se que o grupo tratado apenas com 5-FU, apresentou significativa diminuição ($p < 0,05$) do número de leucócitos totais ($2,4 \pm 0,1$) em comparação ao grupo salina ($5,1 \pm 0,2$). Já o grupo tratado com GC 90 apresentou significativa reversão da diminuição da contagem de leucócitos totais ($3,1 \pm 0,1$) quando comparado com o grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 23. Efeito do tratamento com GC na contagem de leucócitos na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU.



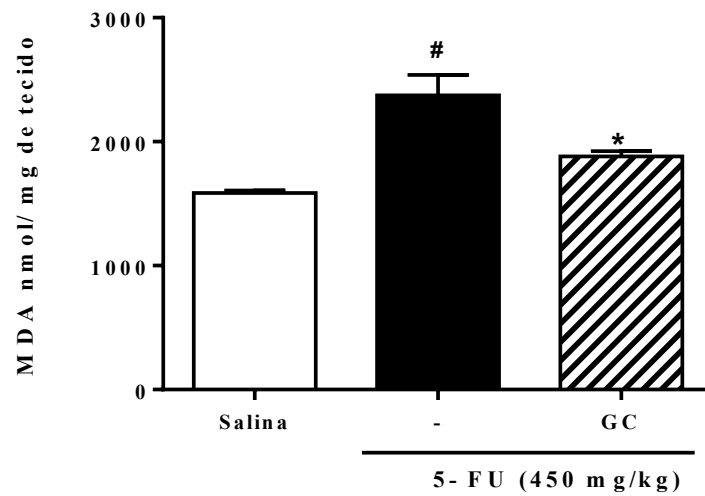
O sangue da artéria ocular foi coletado para mensurar a contagem total de leucócitos plasmáticos, como parâmetro para avaliar a mielossupressão na mucosite intestinal. O 5-FU diminuiu a contagem de leucócitos totais quando comparados com grupo salina. GC 90 reverteu a diminuição da contagem de leucócitos causadas pelo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de leucócitos por mm³. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.8 Efeito do tratamento com GC nos níveis teciduais de MDA do segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica e, encontra-se em altos níveis, quando presente condições de estresse oxidativo.

De acordo com a figura 24, observou-se que o 5-FU ($2373 \pm 166,6$) elevou de forma estatisticamente significativa os níveis de MDA no duodeno quando comparado ao grupo salina ($1585 \pm 20,02$). GC 90 ($1880 \pm 44,72$) foi capaz de diminuir de maneira significativa os níveis de MDA em comparação com o grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 24. Efeito do tratamento com GC nos níveis teciduais de MDA no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



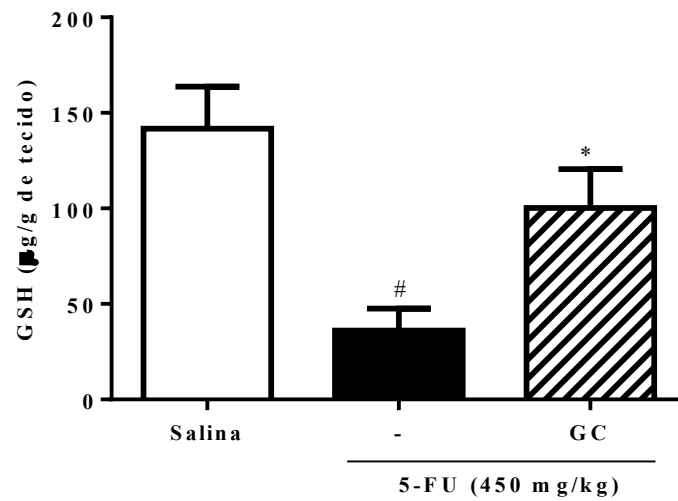
Segmentos duodenais foram coletados para mensuras os níveis de MDA, um produto da peroxidação lipídica. O 5-FU aumenta os níveis de MDA no duodeno quando comparados com grupo salina. GC 90 reduziu os níveis de MDA no duodeno. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de MDA expressos em nmol/g de tecido. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.9 Efeito do tratamento com GC na concentração de glutathiona (GSH) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Devido sua atividade antioxidante em processos inflamatórios, a avaliação dos níveis de GSH intracelular ilustra um breve panorama da capacidade antioxidante frente a um processo inflamatório. Os níveis elevados de GSH sugere capacidade protetora ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose, enquanto que a diminuição dos níveis de GSH sugere baixo efeito antioxidante e/ou exacerbação do estresse oxidativo/inflamação (SCHMITT et al., 2015; CHENG et al., 2017).

Conforme representado na figura 25, animais submetidos ao tratamento com 5-FU ($36,1 \pm 11,4$) apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos níveis de GSH ($\mu\text{g/g}$ de tecido do segmento duodenal), em comparação com o grupo salina ($141,8 \pm 21,8$). Já os animais que receberam o tratamento com a Goma do Cajueiro (GC) na concentração de 90 mg/kg, ou seja GC 90, tiveram aumento dos níveis de GSH ($100,2 \pm 20,3$), quando comparado com grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Figura 25. Efeito do tratamento com GC na concentração de glutathione (GSH) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



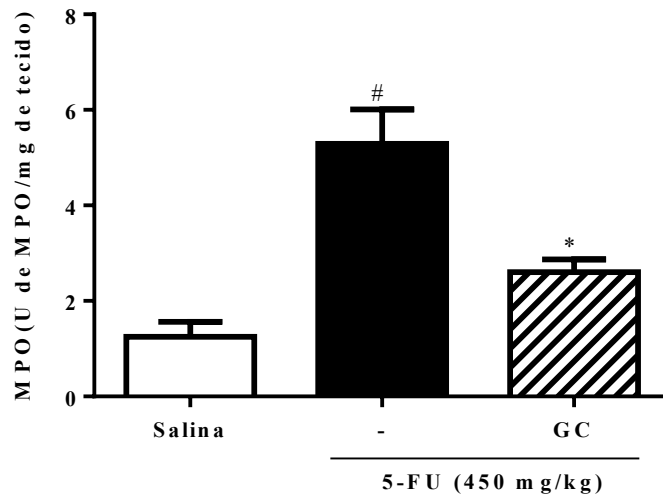
O segmento duodenal foi coletado para mensurar a concentração de glutathione (GSH), um antioxidante intracelular. O 5-FU diminuiu a concentração de GSH no duodeno quando comparados com grupo salina. GC 90 reverteu a diminuição da concentração de GSH no duodeno. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da concentração de GSH expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Newman-Keuls, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.10 Efeito do tratamento com GC na atividade da mieloperoxidase (MPO) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Expressa e secretada pelos neutrófilos, a enzima mieloperoxidase (MPO) tem sido utilizado como um marcador bioquímico de infiltração granulocítica. A avaliação da atividade de MPO permite a estimar (quantificar) a extensão do acúmulo de neutrófilos.

De acordo com a figura 26, o grupo 5-FU apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dos níveis de MPO por mg de tecido do segmento duodenal ($5,29 \pm 0,71$) em comparação com o grupo salina ($1,25 \pm 0,31$). O grupo tratado com a GC de 90mg/kg ($2,60 \pm 0,27$) apresentou diminuição significativa dos níveis de MPO em comparação ao grupo 5-FU ($p < 0,05$) e, por conseguinte, diminuição do infiltrado de polimorfonucleares.

Figura 26. Efeito do tratamento com GC na atividade da mieloperoxidase (MPO) no segmento intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



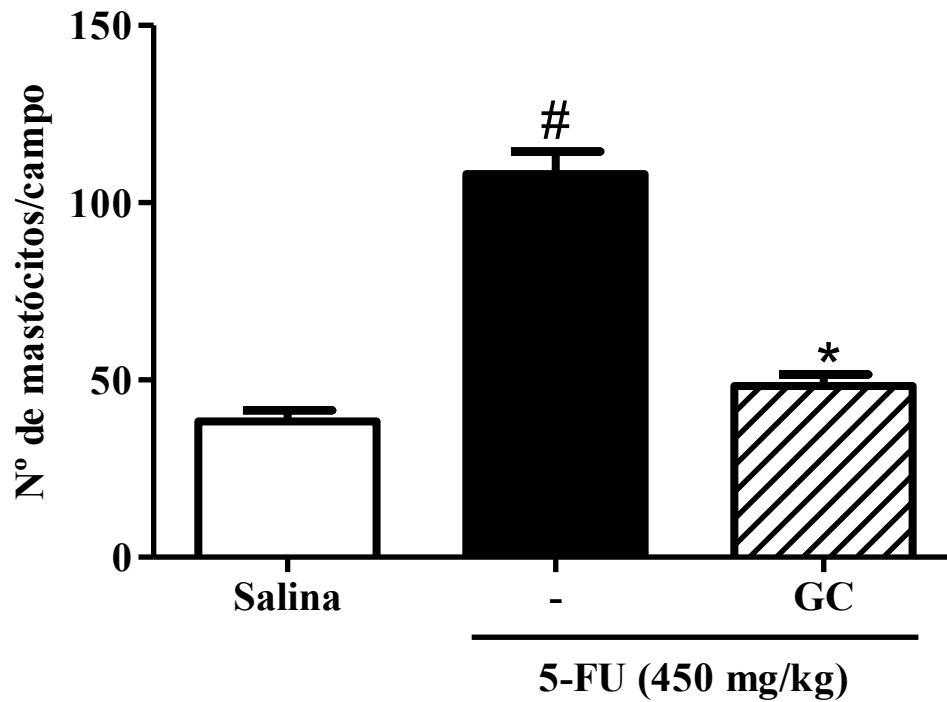
O segmento duodenal foi coletado para mensurar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador bioquímico de infiltração granulocítica. O 5-FU aumentou os níveis de MPO no duodeno quando comparados com grupo salina. GC 90 reverteu o aumento dos níveis de MPO no duodeno. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da atividade de MPO expressos em Unidade (U) de MPO/mg de tecido. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.11 Efeito do tratamento com GC na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Os mastócitos desempenham um papel crítico na regulação imune e inflamação, na mucosite os mastócitos protegem contra lesões provocadas pela radiação intestinal precoce (LOPES JUNIOR, 2016).

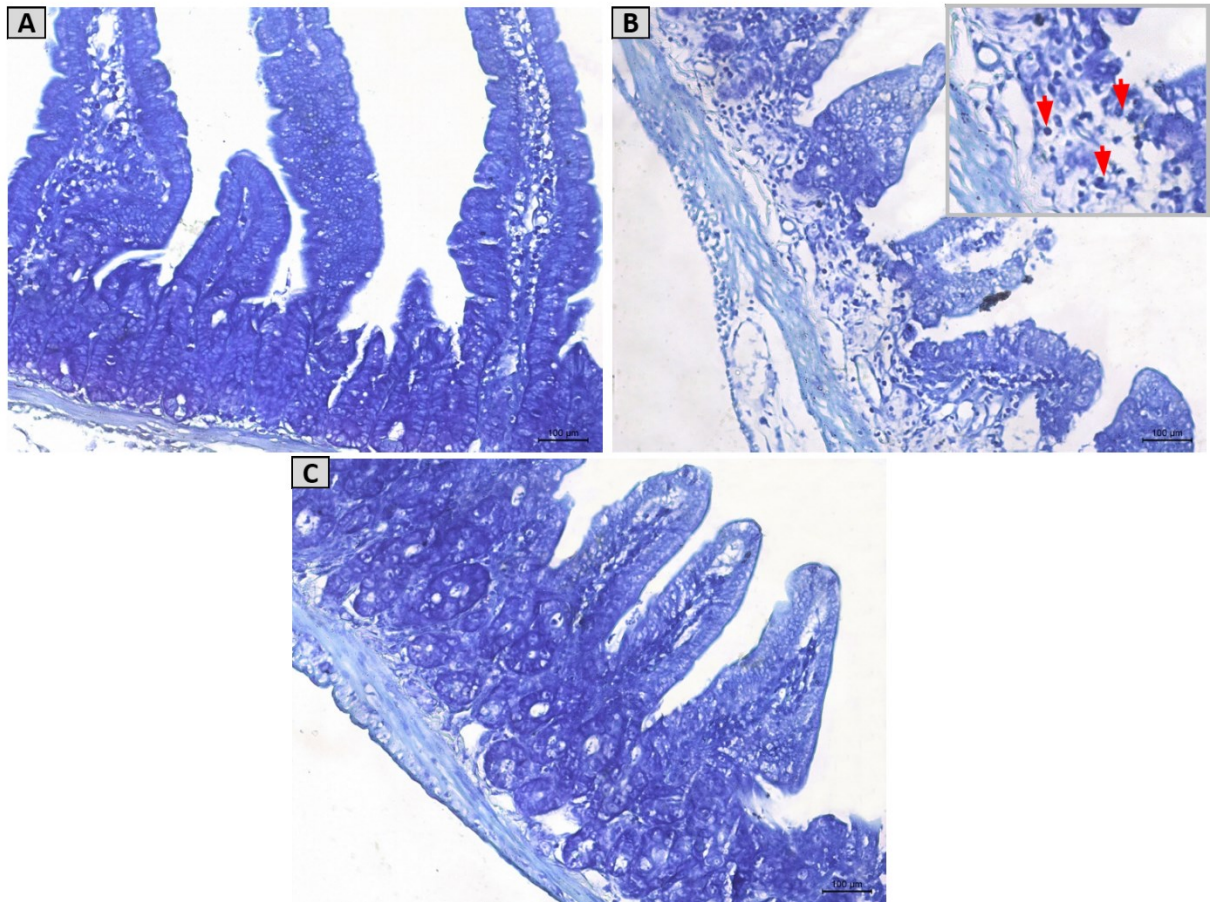
De acordo com a figura 27 e 28, observou-se que 5-FU estimulou de forma estatisticamente significativa o aumento do número de mastócitos por campo no segmento duodeno, quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$), obtendo médias, respectivamente de $108,0 \pm 6,5$ e $38,2 \pm 3,1$ para os grupos 5-FU e grupo salina. Já o grupo GC 90 apresentou diminuição significativa do número de mastócitos quando comparado com o grupo lesivo 5-FU ($48,3 \pm 3,3$).

Figura 27. Efeito do tratamento com GC na contagem de mastócitos no segmento duodenal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Na contagem de mastócitos no segmento duodenal, o 5-FU promoveu aumento da contagem de mastócitos quando comparados com grupo salina. GC 90 reverteu o aumento da contagem de mastócitos causadas pelo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de mastócitos por campo. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 28. GC reduz o número de mastócitos na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU.



Na contagem de mastócitos no segmento duodenal, o 5-FU (B) promoveu aumento da contagem de mastócitos quando comparados com grupo salina (A). GC 90 (C) reverteu o aumento da contagem de mastócitos causadas pelo 5-FU. Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de mastócitos por campo. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

6.12 Avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A análise histopatológica do segmento duodeno, demonstrou no grupo salina (Fig. 30A), achados histológicos normais, evidenciados pelas vilosidades e criptas normais e ausência de células inflamatórias. A administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciado pela redução da altura das vilosidades, aprofundamento e destruição das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal, intenso infiltrado de células inflamatórias e perda da arquitetura celular (Fig. 30B). Os animais tratados com GC 90 (Fig. 30C), apresentaram aumento significativo da altura das vilosidades, diminuição da vacuolização das células da mucosa intestinal e do intenso infiltrado de células inflamatórias em comparação ao grupo 5-FU. O tratamento da mucosite com a GC 90, em associação com L-NAME (Fig. 30D) ou tratamento somente com L-NAME (Fig. 30F), foram capazes de reverter as alterações histopatológicas evidenciados no grupo lesivo 5-FU. O grupo tratado com GC 90 em associação com L-Arginina (Fig. 30E), também foi capaz de reverter a redução dos vilos, infiltração de células inflamatórias e perda da arquitetura celular quando comparado ao grupo lesivo 5-FU, entretanto, de maneira parcial.

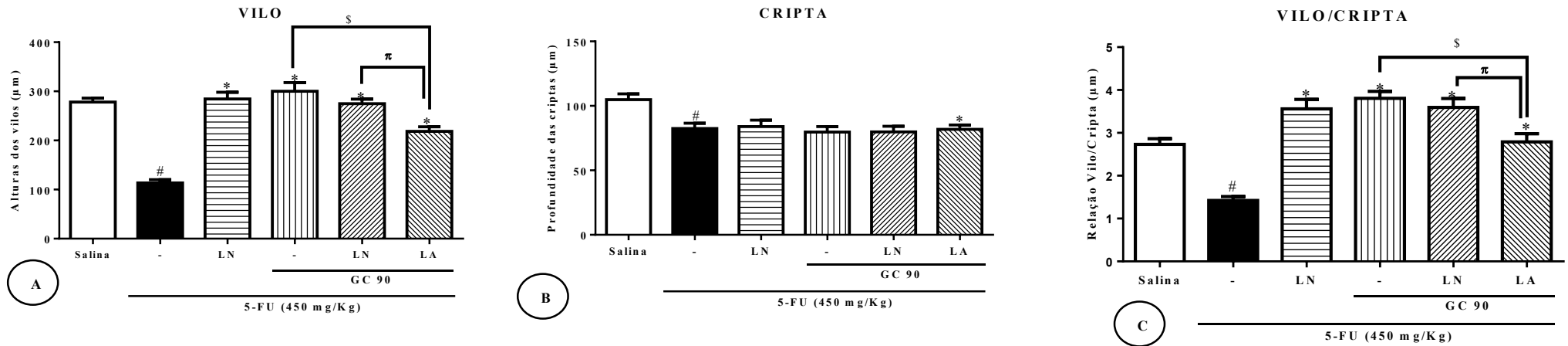
Ao mensurar a altura das vilosidades no segmento do duodeno, conforme a figura 29A, observou-se que 5-FU promoveu a redução ($113,6 \pm 6,5 \mu\text{m}$) de maneira significativa ($p < 0,05$) da altura das vilosidades quando comparado ao grupo salina ($278,1 \pm 8,1 \mu\text{m}$). Ao passo que o GC 90 ($300,2 \pm 17,8 \mu\text{m}$) promoveu o aumento da altura das vilosidades quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). O tratamento com L-NAME, um inibidor não específico da NOS, também preveniu o encurtamento das vilosidades de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. L-NAME associado com a GC 90 ($274,7 \pm 9,5 \mu\text{m}$) também preveniu o encurtamento dos vilos, quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$). Já o tratamento da GC 90 com L-Arginina, um substrato verdadeiro da NOS ($218,4 \pm 9,5 \mu\text{m}$), apesar de prevenir o encurtamento das vilosidades de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo lesivo 5-FU, apresentou efeito significativamente menor ($p < 0,05$) que a reversão do encurtamento dos vilos visto nos grupos tratados somente com CG 90 ou tratados com GC 90 em associação com L-NAME. Determinou-se que o tratamento somente de GC 90, assim como o tratamento L-NAME com GC 90, na prevenção do encurtamento das vilosidades foram mais efetivos que o tratamento combinado de GC 90 e L-Arginina ($p < 0,05$),

evidenciando que a liberação de grandes quantidades de NO promove comprometimento na integridade da mucosa intestinal.

Ao mensurar a profundidade das criptas no segmento do duodeno, conforme a figura 29B, observou-se que 5-FU promoveu intensa necrose das criptas, contudo foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da profundidade das criptas ($82,4 \pm 4,1 \mu\text{m}$) em relação ao grupo salina ($104,8 \pm 4,4 \mu\text{m}$). Ao passo que o tratamento com L-NAME ($83,9 \pm 4,9 \mu\text{m}$), GC 90 ($79,7 \pm 4,2 \mu\text{m}$), L-NAME e GC 90 ($79,8 \pm 4,3 \mu\text{m}$) e L-Arginina e GC 90 ($81,7 \pm 3,4 \mu\text{m}$) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao aprofundamento das criptas em comparação ao grupo 5-FU.

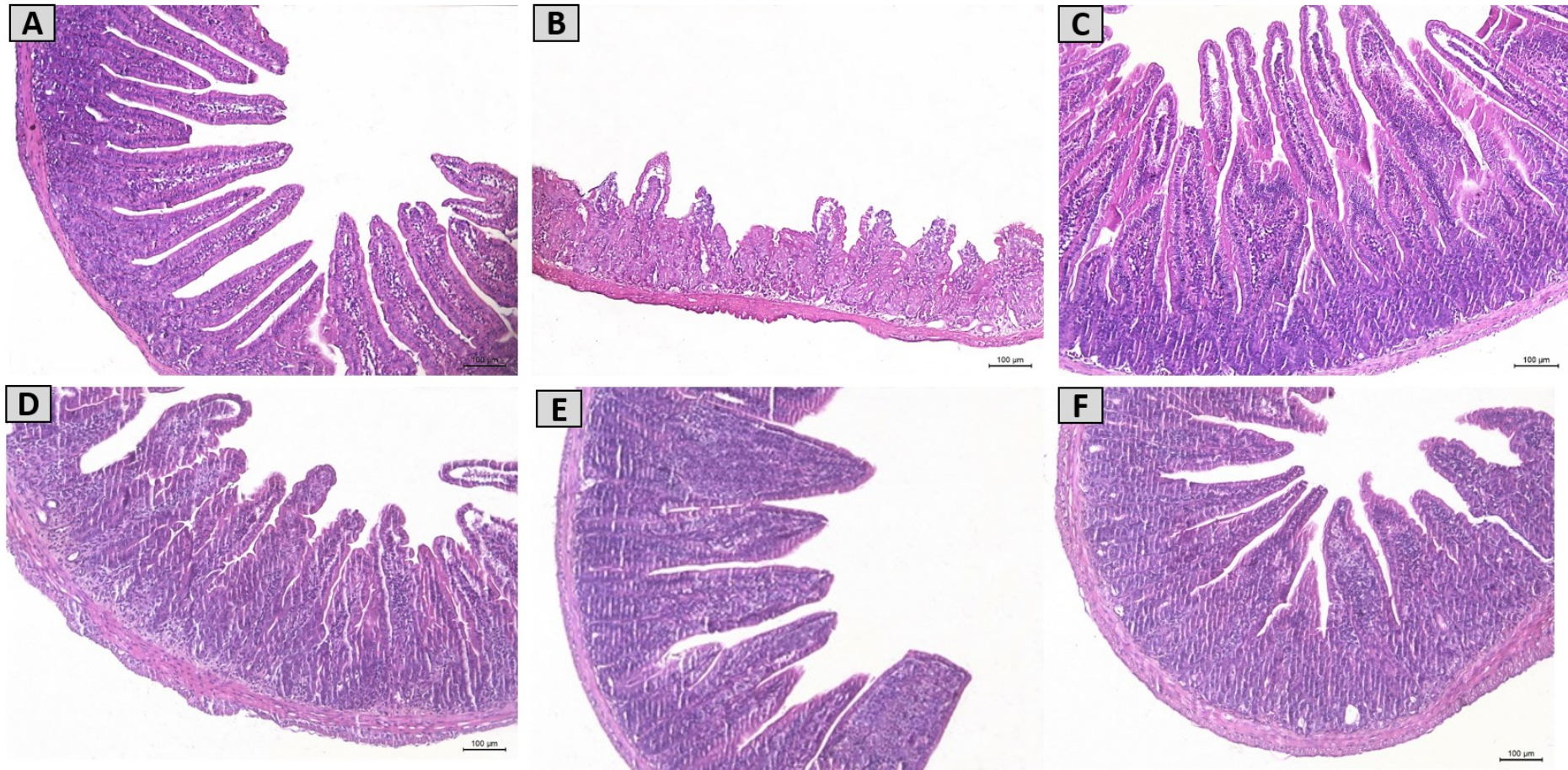
Ao avaliar a relação vilosidade/cripta no segmento do duodeno, conforme a figura 29C, observou-se que grupo 5-FU apresentou redução da relação vilosidade/cripta ($1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Os grupos tratados com L-NAME ($3,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$), GC 90 ($3,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$), L-NAME e GC 90 ($3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$) apresentaram aumento da relação vilosidade/cripta significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Aumento da relação vilosidade/cripta também foi evidenciado no grupo tratado com L-Arginina e GC 90 ($2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$) quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Contudo, evidenciou-se diferença significativa entre os animais tratados com GC 90 ou GC 90 associado a L-NAME em comparação ao grupo tratado com GC 90 e L-Arginina, o que evidencia novamente o efeito lesivo do NO nas alterações histopatológicas na mucosite intestinal.

Figura 29. Avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



A mucosite intestinal foi induzida por dose única (i.p.) de 450 mg/kg de 5-FU, no 1º dia da indução da mucosite. Os animais receberam, de acordo com o grupo e protocolo de modulação da via do NO, salina 0,9% (i.p.), GC 90 (90 mg/kg, v.o), substrato verdadeiro da NOS, a L-Arginina (300 mg/kg i.p.), inibidor não específico da NOS, o L-NAME (20 mg/kg, i.p.) diariamente, até o sacrifício, no 4º dia. Segmentos do duodeno foram removidos e processados para coloração pelo método de H&E para análise morfológica e histopatológica. **A:** Altura das vilosidades; **B:** Profundidade das criptas; **C:** Relação vilo/cripta; **LN:** L-NAME; **LA:** L-Arginina. Os valores foram expressos como média ± EPM para altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta em µm. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o [#]p<0,05 vs grupo salina, ^{*}p<0,05 vs grupo 5-FU, ^{\$}< vs grupo GC 90 e ^κ<0,05 vs grupo L-NAME e GC 90.

Figura 30. Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento do NO no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Os animais receberam, de acordo com o grupo e protocolo de modulação da via do NO, além do 5-FU (450 mg/kg; i.p.) dose única, Salina 0,9% (i.p.), GC 90 (90 mg/kg, v.o), L-Arginina (300 mg/kg i.p.), L-NAME (20 mg/kg, i.p.) diariamente, até o sacrifício, no 4º dia. Segmentos do duodeno foram removidos e processados para coloração pelo método de H&E. **A:** Grupo Salina; **B:** Grupo 5-FU; **C:** Grupo GC 90; **D:** Grupo L-Arginina e GC 90; **E:** Grupo L-NAME e GC 90; **F:** Grupo L-NAME.

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

6.13.1 Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

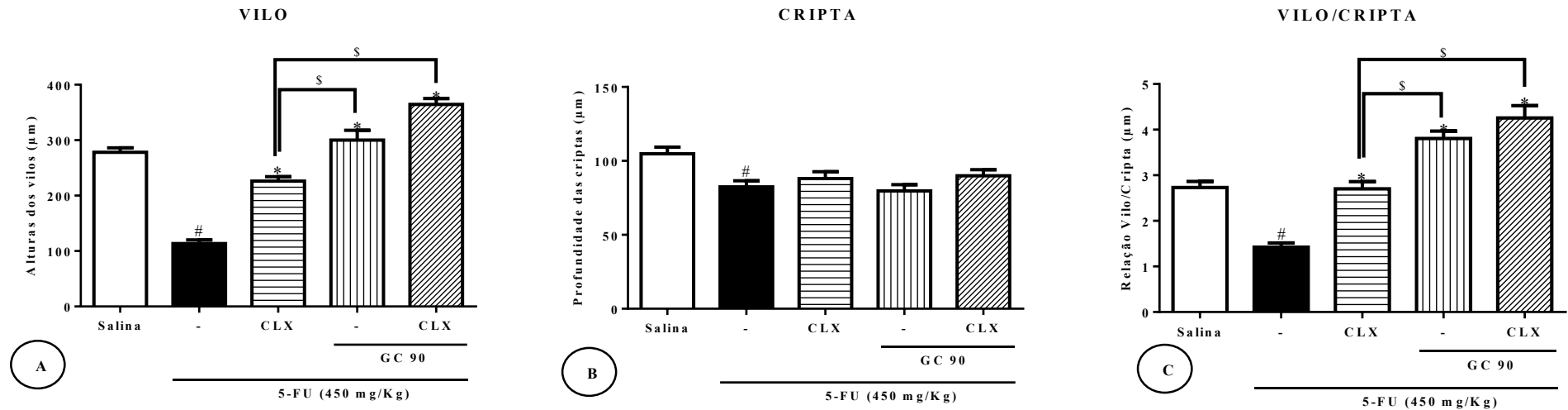
A análise histopatológica dos segmento duodeno, evidenciou no grupo salina (Fig. 32A), como previsto, achados histológicos normais, evidenciados pelas vilosidades e criptas normais e ausência de células inflamatórias. A administração de 5-FU induziu alterações da mucosa intestinal, evidenciado pela redução da altura das vilosidades, aprofundamento das criptas, vacuolização das células da mucosa intestinal e intenso infiltrado de células inflamatórias (Fig. 32B). Os animais tratados com GC 90 (Fig. 32D), apresentaram aumento significativo da altura das vilosidades, diminuição da vacuolização das células da mucosa intestinal e do intenso infiltrado de células inflamatórias em comparação ao grupo 5-FU. O tratamento com o bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), o Celecoxibe (Fig. 32C), assim como o tratamento combinado do Celecoxibe e GC 90 (Fig. 32E), foram capazes de prevenir, de forma significativa ($p < 0,05$), a destruição das criptas, encurtamento das vilosidades com vacuolização celular, infiltrado de células inflamatórias e edema, além da prevenção da perda da arquitetura celular.

Ao mensurar a altura das vilosidades no segmento do duodeno, conforme a figura 31A, observou-se que 5-FU promoveu a redução ($113,6 \pm 6,5 \mu\text{m}$) de maneira significativa ($p < 0,05$) da altura das vilosidades quando comparado ao grupo salina ($278,1 \pm 8,1 \mu\text{m}$). Ao passo que o GC 90 ($300,2 \pm 17,8 \mu\text{m}$) promoveu o aumento da altura das vilosidades quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). O tratamento com o bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), o Celecoxibe ($226,3 \pm 7,8 \mu\text{m}$), também preveniu o encurtamento das vilosidades de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. Evidenciou-se também que o tratamento da GC 90 com o Celecoxibe ($364,6 \pm 10,6 \mu\text{m}$) foi capaz de prevenir efetivamente o encurtamento das vilosidades de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo lesivo 5-FU. Observou-se também que os animais tratados a GC 90 apresentaram maior eficácia na reversão do encurtamento da vilosidades, promovido pelo 5-FU, que os animais tratados somente com o Celecoxibe ($p < 0,05$). Contudo, ao realizar o tratamento com a administração de GC 90 e Celecoxibe, obtem-se maior reversão do encurtamento das vilosidades que o grupo GC 90 ou Celecoxibe sozinhos ($p < 0,05$).

Ao mensurar a profundidade das criptas no segmento do duodeno, conforme a figura 31B, observou-se que 5-FU promoveu intensa necrose das criptas, contudo foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da profundidade das criptas ($82,4 \pm 4,1 \mu\text{m}$) em relação ao grupo salina ($104,8 \pm 4,4 \mu\text{m}$). Ao passo que o tratamento com GC 90 ($79,7 \pm 4,2 \mu\text{m}$), Celecoxibe ($88,1 \pm 4,6 \mu\text{m}$) e, GC 90 e Celecoxibe ($89,9 \pm 4,2 \mu\text{m}$) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao aprofundamento das criptas em comparação ao grupo 5-FU.

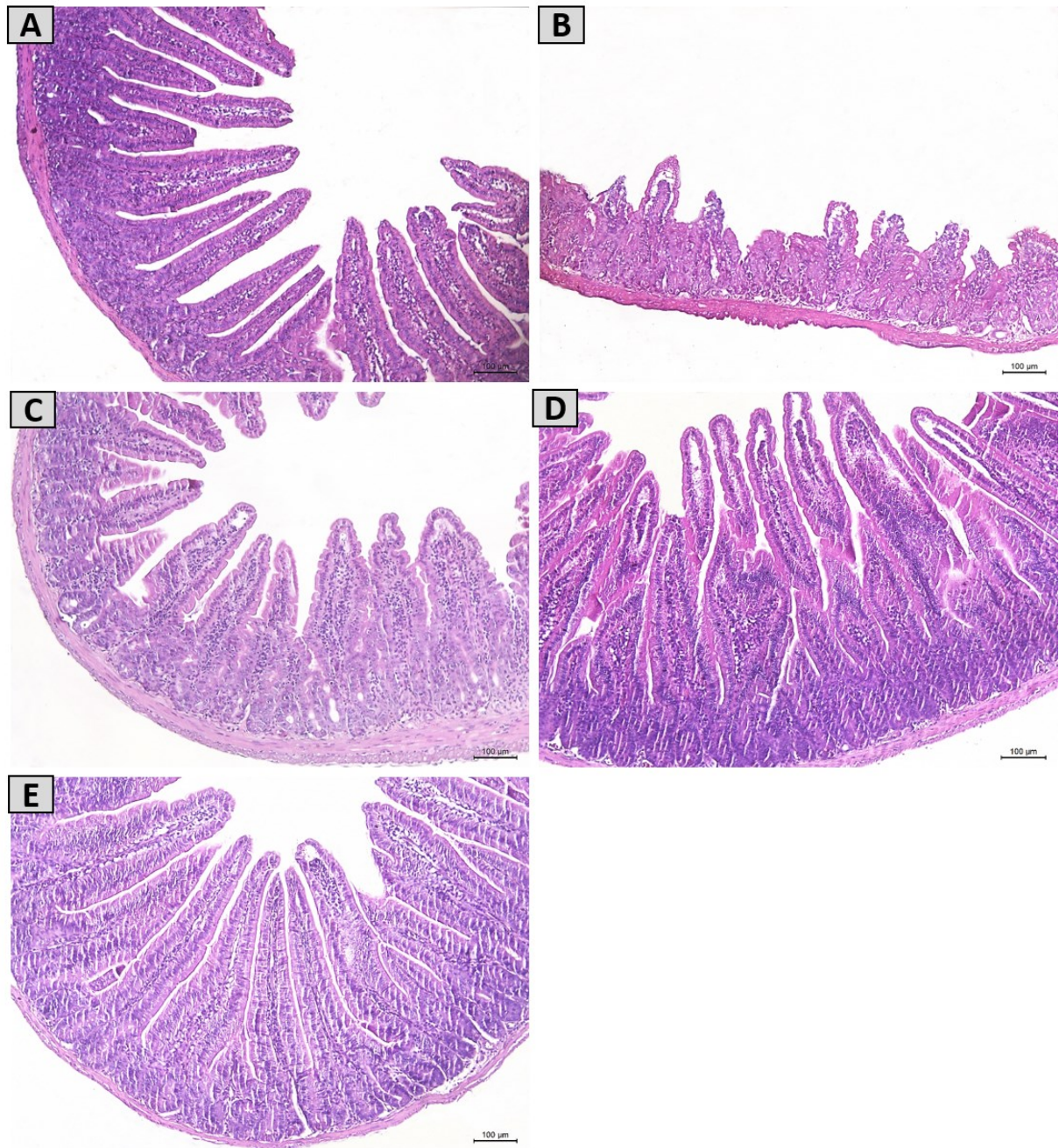
Ao avaliar a relação vilosidade/cripta no segmento do duodeno, conforme a figura 31C, observou-se que grupo 5-FU promoveu redução da relação vilosidade/cripta ($1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina ($2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Os grupos tratados com GC 90 ($3,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$), Celecoxibe ($2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$), GC 90 e Celecoxibe ($4,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$) apresentaram aumento da relação vilosidade/cripta significativa quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Evidenciou-se também os animais tratados com a GC 90 apresentaram maior relação vilosidade/cripta quando comparados com os animais tratados com o Celecoxibe ($p < 0,05$). Assim como também observou-se que animais tratados com a combinação de GC 90 e Celecoxibe apresentaram maior relação vilosidade/cripta que os animais tratados apenas com o Celecoxibe ($p < 0,05$).

Figura 31. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



A mucosite intestinal foi induzida por dose única (i.p.) de 450 mg/kg de 5-FU, no 1º dia da indução da mucosite. Os animais receberam, de acordo com o grupo e protocolo de modulação da via da Cicloxigenase (COX-2), salina 0,9% (i.p.), GC 90 (90 mg/kg, v.o), bloqueador da cicloxigenase, o Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p.), diariamente, até o sacrifício, no 4º dia. Segmentos do duodeno foram removidos e processados para coloração pelo método de H&E para análise morfométrica e histopatológica. **A:** Altura das vilosidades; **B:** Profundidade das criptas; **C:** Relação vilo/cripta; CLX: Celecoxibe. Os valores foram expressos como média ± EPM para altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta em µm. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo salina, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, \$ $p < 0,05$ vs grupo CLX.

Figura 32. Fotomicrografias pelo método de Hematoxilina & Eosina do segmento duodeno de camundongos na avaliação do envolvimento da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.



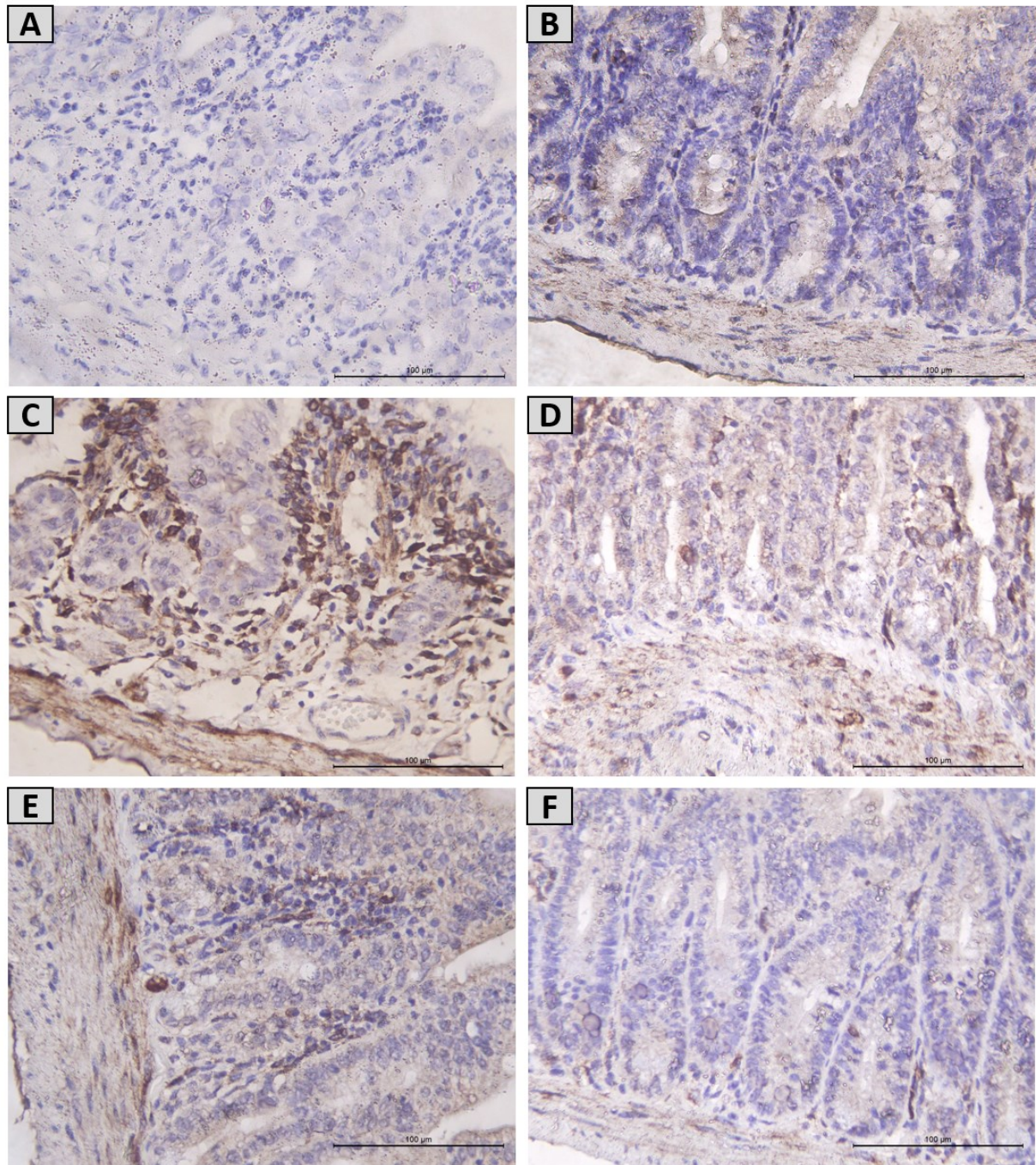
A mucosite intestinal foi induzida por dose única (i.p.) de 450 mg/kg de 5-FU, no 1º dia da indução da mucosite. Os animais receberam, de acordo com o grupo e protocolo de modulação da via da Cicloxigenase (COX-2), salina 0,9% (i.p.), GC 90 (90 mg/kg, v.o), bloqueador da cicloxigenase, o Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p.), diariamente, até o sacrifício, no 4º dia. Segmentos do duodeno foram removidos e processados para coloração pelo método de H&E para análise morfométrica e histopatológica. **A:** Grupo Salina; **B:** Grupo 5-FU; **C:** Grupo CLX; **D:** Grupo GC 90; **E:** CLX e GC 90.

6.13.2 Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Para analisar a importância da via da COX-2 na mucosite intestinal, bem como atuação da GC nesta via e seu efeito protetor na mucosite intestinal foi avaliada a imunomarcção das células para COX-2 de maneira quantitativa conforme a figura 34.

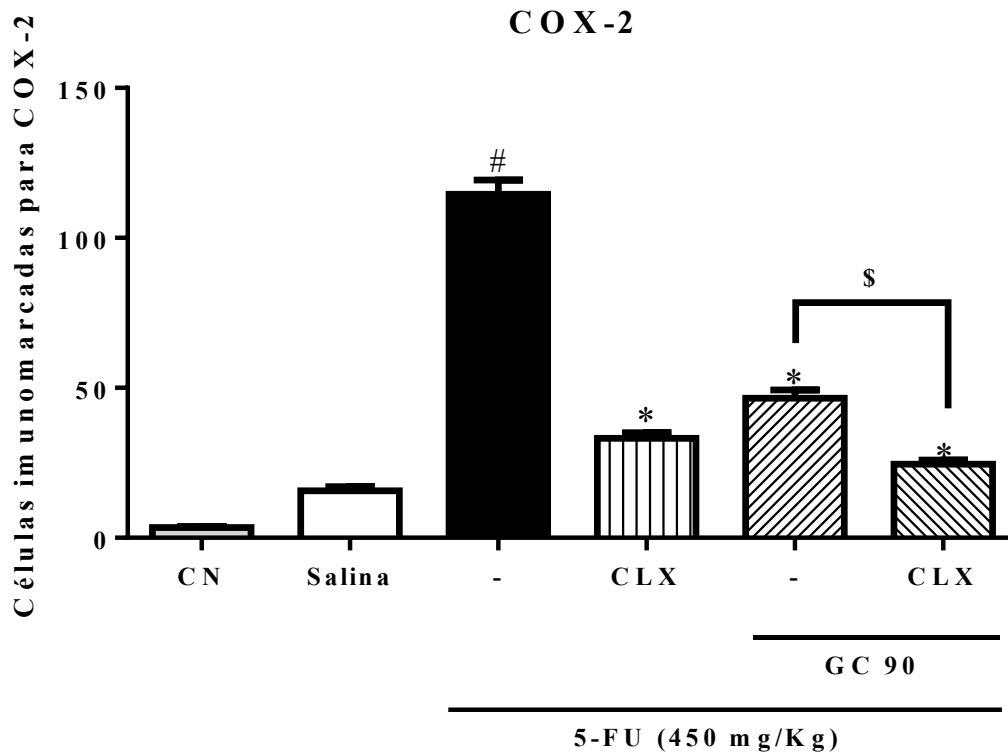
Na figura 33B, pode-se observar que os animais tratados apenas com salina apresentaram imunomarcção sutil para COX-2, quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$), na qual observa-se intensa e generalizada imunomarcção para COX-2 (Fig. 33C). Na figura 33D, que corresponde ao grupo de animais tratados com GC 90 observa-se diminuição da imunomarcção quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Imunomarcção sutis também são visualizadas no grupo de animais tratados apenas com o Celecoxibe (Fig. 33E) e, grupo tratados pela combinação de GC 90 e Celecoxibe (Fig. 33F), ambos comparados ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). E ao compararmos o padrão de imunomarcção bem como a quantidade de células imunomarcadas para COX-2 entre o grupo que recebeu GC 90 e Celecoxibe e o grupo em que foi administrado apenas a GC 90, percebe-se que primeiro grupo apresentou menor quantidade de células imunomarcadas que o grupo tratado com GC 90 ($p < 0,05$). A figura 33A corresponde ao controle negativo, na qual representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra COX-2.

Figura 33. Fotomicrografias de Imunohistoquímica para COX-2 do segmento duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para realização da imunohistoquímica para COX-2. **A:** Controle Negativo; **B:** Grupo Salina; **C:** Grupo 5-FU; **D:** Grupo GC 90; **E:** Grupo Celecoxibe; **F:** Grupo Celecoxibe e GC 90. O Controle negativo representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra COX. Nota-se aumento da imunomarcação para COX-2 nos animais submetidos a mucosite por 5-FU (painel C) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (painel B). Animais tratados somente com a GC 90 (painel D) ou Celecoxibe (painel E) apresentaram diminuição da imunomarcação para COX-2 quando comparado com grupo 5-FU (painel C). Animais tratados com a combinação de GC 90 e Celecoxibe (painel F) apresentaram diminuição da imunomarcação para COX-2 quando comparado com grupo GC 90 (painel D).

Figura 34. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



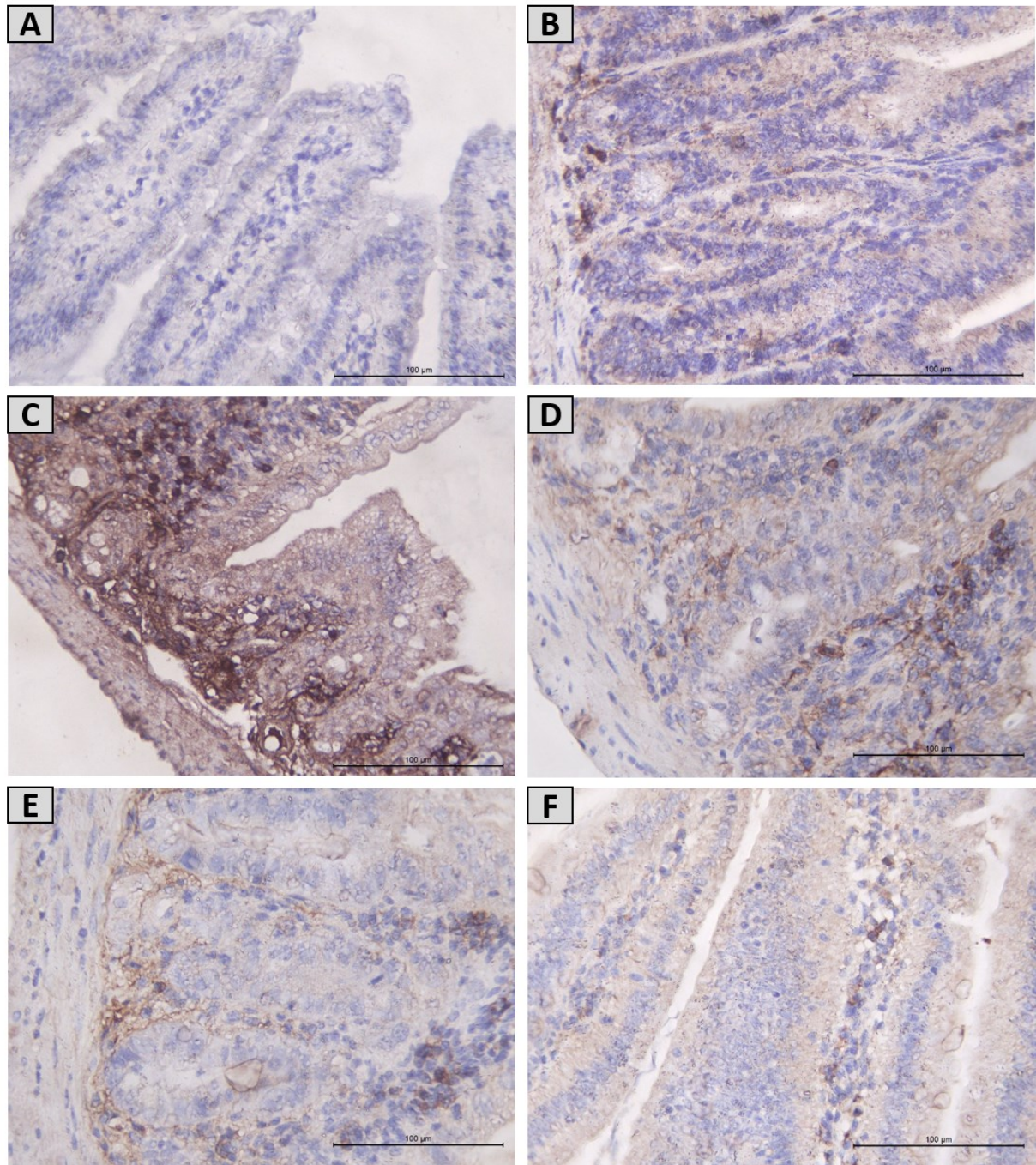
Segmentos do duodeno foram removidos e processados para realização da imunohistoquímica para COX-2. CN: Controle Negativo, representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra COX. CLX: Celecoxibe. Nota-se aumento da imunomarcção para COX-2 nos animais submetidos a mucosite por 5-FU quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Animais tratados somente com a GC 90 ou Celecoxibe apresentaram diminuição da imunomarcção para COX-2 quando comparado com grupo 5-FU. Animais tratados com a combinação de GC 90 e Celecoxibe apresentaram diminuição da imunomarcção para COX-2 quando comparado com grupo GC 90. Os valores foram expressos como média \pm EPM da quantidade de células imunomarcadas para COX-2. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo salina, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, \$ $p < 0,05$ vs grupo GC 90.

6.13.3 Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para IL-1 β em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina 1 beta (IL-1 β) são hiperexpressas em processos inflamatórios como na mucosite intestinal. A quantificação da imunomarcção para IL-1 β figura como um importante parâmetro devido sua modificação ao uso de antileucotrienos e, partir daí avaliação da via da COX-2 na mucosite intestinal, bem como atuação da GC nesta via e seu efeito protetor na mucosite intestinal, conforme demonstrado na figura 36.

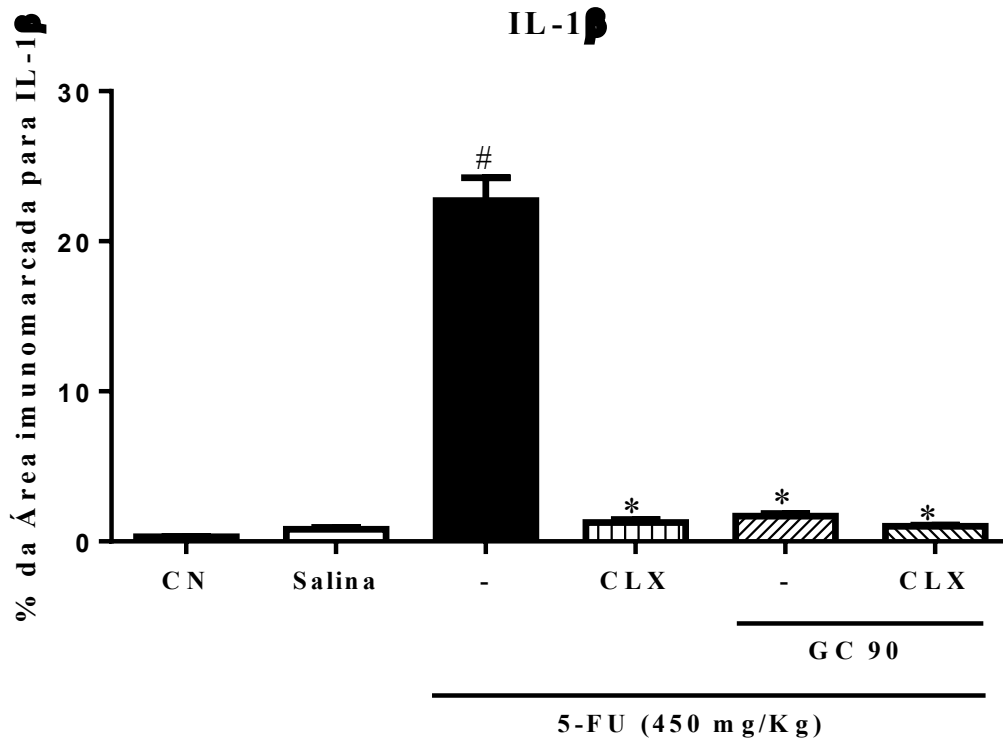
Na figura 35B, pode-se observar que os animais tratados apenas com salina apresentaram imunomarcção sutil para IL-1 β , quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$), na qual observa-se intensa e generalizada imunomarcção para IL-1 β (Fig. 35C). Na figura 35D, que corresponde ao grupo de animais tratados com GC 90 observa-se diminuição da imunomarcção quando comparado ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). Imunomarcção sutis também são visualizadas no grupo de animais tratados apenas com o Celecoxibe (Fig. 35E) e, grupo tratados pela combinação de GC 90 e Celecoxibe (Fig. 35F), ambos comparados ao grupo lesivo 5-FU ($p < 0,05$). A figura 35A corresponde ao controle negativo, na qual representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra COX-2.

Figura 35. Fotomicrografias de Imunohistoquímica para IL-1 β do segmento duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para realização da imunohistoquímica para IL-1 β . **A:** Controle Negativo; **B:** Grupo Salina; **C:** Grupo 5-FU; **D:** Grupo GC 90; **E:** Grupo Celecoxibe; **F:** Grupo Celecoxibe e GC 90. O Controle negativo representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra IL-1 β . Nota-se aumento da imunomarcação para IL-1 β nos animais submetidos a mucosite por 5-FU (painel C) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (painel B). Animais tratados somente com a GC 90 (painel D), Celecoxibe (painel E) ou GC 90 e Celecoxibe combinados (painel F) apresentaram diminuição da imunomarcação para IL-1 β quando comparado com grupo 5-FU (painel C).

Figura 36. Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da GC sobre a imunomarcção para IL-1 β em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para realização da imunohistoquímica para COX-2. CN: Controle Negativo, representa uma amostra duodenal onde o anticorpo primário é substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para IL-1 β . CLX: Celecoxibe. Nota-se aumento da imunomarcção para IL-1 β nos animais submetidos a mucosite por 5-FU quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Animais tratados somente com a GC 90, Celecoxibe ou GC e Celecoxibe apresentaram diminuição da imunomarcção para IL-1 β quando comparado com grupo 5-FU. Os valores foram expressos como média \pm EPM do percentual da área imunomarcadas para IL-1 β . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo salina, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram o efeito lesivo do quimioterápico 5-FU na mucosa intestinal de camundongos, podendo ser evidenciado nestes animais a fisiopatologia da mucosite. Por meio dos achados histopatológicos, como diminuição e vacuolização das vilosidades intestinais, aprofundamento e necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, perda da arquitetura celular, diminuição da relação vilo/cripta; bem como aumento do estresse oxidativo, através da peroxidação lipídica (medido pelos níveis de MDA) e infiltração neutrofílica (avaliado pela atividade de MPO); depleção de antioxidantes como GSH, e leucopenia através da contagem total de leucócitos sanguíneos, pode-se evidenciar o quadro de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

No presente estudo determinou-se também o efeito protetor da Goma do Cajueiro (GC) na mucosite intestinal, sendo a mesma capaz reverter as alterações histopatológicas causadas pelo quimioterápico. A GC também mostrou-se eficiente na reversão na elevação do estresse oxidativo, depleção do antioxidante, reversão da leucopenia, aumento da concentração de mastócitos teciduais. Esses achados também foram acompanhados com diminuição a imunomarcagem para IL-1 β e COX-2.

Nesse estudo utilizou-se o modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU descrito por Soares et al. (2008). Trata-se de um modelo experimental por meio do qual realiza-se administração única de 450 mg/kg de 5-FU em camundongos Swiss. Segundo dados na literatura, esta dose vem sendo amplamente utilizada devido sua capacidade de mimetizar a fisiopatologia da mucosite, com os achados clínicos observados em pacientes em tratamento pelo quimioterápico, como diarreia, perda de peso, mielossupressão, inflamação e ulceração da mucosa intestinal. Entretanto o protocolo experimental de indução bem com a dose a ser utilizada varia a depender do animal e sua linhagem. Para camundongos, além de trabalhos que corroboram com nosso estudo (AZEVEDO, et al., 2012; ARAUJO et al., 2015a; LU et al., 2015; COSTA, 2016; QUARESMA, 2016), também foi observado estudos em que se trabalharam com protocolos de indução da mucosite com 5-FU em concentrações distintas da que realizamos e também obtiveram êxito na mimetização da mucosite intestinal (SANTOS, 2011; KIM et al., 2015; AVILA et al., 2015; CARVALHO et al., 2017).

A princípio, demonstrou-se no presente estudo, através dos achados histopatológicos, que o 5-FU promoveu diminuição e vacuolização das vilosidades intestinais, necrose das criptas, infiltração de células inflamatórias, perda da arquitetura celular, diminuição da relação vilo/cripta. Observou-se também que o tratamento com a Goma de Cajueiro na concentração

de 90 mg/kg (GC 90) foi capaz de reverter os efeitos lesivos promovidos pelo 5-FU, como por exemplo, a GC 90 preveniu o encurtamento dos vilos, diminuiu a vacuolização das vilosidades, diminuiu a necrose das criptas, bem como diminuiu a infiltração neutrofilica e a relação vilocripta. O efeito anti-inflamatório, ao menos em lesões cutâneas, da GC já foi relatado por Schirato et al. (2006), e Araujo et al. (2015a) relatou que a GC na concentração de 90mg/kg, assim como 60 mg/kg, foi eficaz no tratamento da diarreia aguda e inflamatório, o que corrobora com nossos resultados, onde a concentração de 90 mg/kg, foi a melhor concentração no tratamento das alterações histopatológicas na mucosite intestinal.

A mucosite juntamente com mielossupressão são dois dos principais efeitos adversos no tratamento quimioterápico com o 5-FU (KUMAR et al., 2010; KAWASHIMA et al., 2015a; KOBUCHI et al., 2016). Em nosso estudo pode-se observar que o 5-FU provocou a diminuição do número de leucócitos totais, culminado no quadro conhecido como leucopenia, a GC 90 foi capaz de reverter a diminuição do número de leucócitos. Soares et al. (2008) também evidenciou o quadro de leucopenia em camundongos tanto na administração única de 150 mg/kg quanto na de 450 mg/kg. Quaresma (2016) ao avaliar o efeito dos probióticos na mucosite intestinal também evidenciou o quadro de leucopenia quando administrado 5-FU para induzir a mucosite intestinal em camundongos. Sabe-se que a fase ulcerativa da mucosite, é descrita pela perda de integridade epitelial da mucosa, tornando-a foco para colonização bacteriana, assim como sabe-se que aliado à leucopenia, bactérias podem invadir vasos da mucosa e causar bacteremia ou sepse (SONIS, 2004; GUABIRABA et al., 2014; KIM et al., 2015); diante disso, pode-se inferir que a GC figura como um importante agente na reversão da leucopenia, e conseqüentemente, fundamental para evitar possíveis infecções bacterianas generalizada no quadro de mucosite intestinal.

Nos processos inflamatórios, como exemplo a mucosite intestinal, instala-se um desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidantes denominado estresse oxidativo, gerado na grande maioria das vezes, pela superprodução de radicais livres e constante ação dos mesmo sobre o organismo, além da ineficiente neutralização de sua ação, este desequilíbrio culmina em danos estruturais e/ou funcionais (KHALILI; BILOKLYTSKA, 2008). Dentre os prejuízos a homeostase corpórea, pode-se relacionar a lesão das membranas eritrocitárias, proteínas, DNA, além da capacidade de reatividade com os lipídeos, produzindo peroxidação lipídica. A degradação dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA) e outros aldeídos, são especialmente danosos (ELIAS et al., 2010; HEBER, 2014). O MDA é considerado segundo mensageiro tóxico devido sua capacidade de

induzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e ativação de várias vias de sinalização, incluindo NF- κ B, um fator de transcrição fundamental na gênese do processo inflamatório, incluindo a mucosite (RAGHAVAN et al., 2012; AL-ASMARI et al., 2016).

Com base nisso, ao mensurar os níveis de MDA no segmento intestinal (duodeno) de camundongos com mucosite por 5-FU, evidenciou-se que a GC 90 reverteu o aumento dos níveis dos níveis de MDA, promovidos pelo tratamento com o antineoplásico 5-FU, e com isso, diminui o estresse oxidativo evidenciado na mucosite intestinal. Estes dados demonstram o efeito antioxidante da GC frente a mucosite intestinal, realizando supressão do dano celular e tecidual promovido pelo MDA. Estudos tem demonstrado o efeito antioxidante de formulações de plantas e ervas através da diminuição dos níveis de MDA (HEBER, 2014). Santos Filho et al. (2016) e Ávila et al. (2015) obtiveram, assim como no presente estudo, redução dos níveis de MDA em intestino de camundongos ao trata-los da mucosite induzida por 5-FU com extratos de plantas da família Zingiberaceae e Asteraceae, respectivamente.

O sucesso no tratamento do câncer por agentes quimioterapêuticos depende em grande parte formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou de nitrogênio (RNS) para destruir células malignas por apoptose. No entanto, o desequilíbrio entre a geração radicais livres e a capacidade antioxidante representa um grave problema para a homeostase corporal, conhecido como estresse oxidativo (ALDEMIR et al., 2015). O sistema de defesa antioxidante entra e defesa para diminuir o estresse oxidativo e defender as células contra os efeitos nocivos dos radicais livres. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos endógenos, destaca-se a Glutathione reduzida (GSH) (BHATTACHARYYA et al., 2014; KART et al., 2016).

No presente estudo evidenciou-se que a GC 90 aumentou o poder antioxidante por meio da prevenção do consumo de GSH em animais que receberam a GC 90, quando comprado com os animais que receberam apenas 5-FU. Devido sua atividade antioxidante em processos inflamatórios, a avaliação dos níveis de GSH intracelular ilustra um breve panorama da capacidade antioxidante da GC frente a mucosite. Estes dados complementam a observação relatadas nos achados histopatológicos, já que mesmo inseridos em um processo inflamatório, os animais tratados com GC, apresentaram quadro inflamatório relativamente menor quando comparado ao grupo 5-FU, no qual a diminuição dos níveis de GSH sugerem baixo efeito antioxidante e/ou exacerbação do estresse oxidativo/inflamação (SCHMITT et al., 2015; CHENG et al., 2017).

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa celular do inato sistema imunológico, apresentando papel importante na defesa contra micro-organismos patogênicos por fagocitose.

No entanto, a acumulação e superativação dos neutrófilos exacerba processo inflamatório e, acarreta efeitos prejudiciais ao tecido. O processo lesivo da ativação neutrofílica se deve a liberação de mediadores, em geral proteínas, derivados dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (MONTESEIRÍN et al., 2001; LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; JOHNSON et al., 2011; RYMASZEWSKI et al., 2014). Nos grânulos primários dos neutrófilos estão localizados e armazenamento alguns dos principais mediadores tóxicos, denominados de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET), que incluem elastase, catepsinas, defensinas e mieloperoxidase (MPO) (LACY, 2006; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

A MPO trata-se de uma enzima hemo-peroxidase altamente catiônica de peso 144 kDa, que a partir da ativação de neutrófilos, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) como mecanismo de remoção de patógenos. A MPO utiliza H_2O_2 para produzir em conjunto com halogenetos (geralmente o Cl^-) compostos oxidantes como o ácido hipocloroso (HClO), que por sua vez, reage com grupo orgânicos e podem influenciar nos caminhos de sinalização celular, desta maneira, além da liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, a MPO pode recrutar leucócitos adicionais para a região da inflamação (MONTESEIRÍN et al., 2001; KINDZELSKII et al., 2006; LACY, 2006; RYMASZEWSKI et al., 2014).

Os resultados da avaliação da atividade da MPO na mucosite intestinal, evidenciaram que a GC 90 reverteu o aumento os níveis de MPO causados por 5-FU, e que foram observados elevados no grupo que recebeu apenas o quimioterápico. Sabe-se que a MPO tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. Com isso, ao mensurar a atividade da MPO na mucosite intestinal, evidenciou diminuição da infiltração neutrofílica no intestino, devido ação da GC 90, já nos animais tratados apenas com o 5-FU observou-se elevação da infiltração neutrofílica, o que permite sugerir que a GC 90 além de reverter a infiltração e superativação dos neutrófilos, atue como anti-inflamatório e antioxidante. Assim como no presente estudo, Bastos (2014), Justino et al.(2014), Ávila et al. (2015), Al-Asmari et al. (2015b) e Carvalho et al. (2017), evidenciaram elevação da atividade de MPO após a indução da mucosite intestinal por 5-FU, seguido da reversão dos níveis de MPO com administração dos seus respectivos seus produtos farmacológicos que foram testados no enfretamento da mucosite intestinal.

Mastócitos são células provenientes de células progenitoras hematopoiéticas mielóides pluripotentes da medula óssea, de onde circulam no fluxo sanguíneo e migram para os tecidos periféricos, como epitélio das mucosas. Na lâmina própria do trato gastrointestinal normal, os

mastócitos compreendem 2-5% das células mononucleares. Os mastócitos contêm grânulos citoplasmáticos abundantes preenchidos por mediadores biologicamente ativos, e quando estimulados, os mastócitos liberam dos grânulos quimiocinas, proteases, fatores de crescimento, fatores de agregação plaquetária (PAF), leucotrienos, serotonina, heparina e citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, além de histamina que por sua vez desencadeiam o processo inflamatório. Dessa forma, os mastócitos desempenham um papel crítico na regulação da imunidade inata ou adquirida, reposta à infecções bacterianas e parasitárias, bem como modulação da inflamação. Na mucosite protegem contra lesões provocadas pela radiação intestinal precoce (WALLACE, 2005; RAMSAY et al., 2010; DE WINTER et al., 2012; AMIN, 2012; PILLAI et al., 2015).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que a GC reverteu a mastocitose (aumento na contagem do número de mastócitos) nos segmentos intestinais dos animais com mucosite intestinal quando comparado com os segmentos de animais que receberam apenas o 5-FU. Também foi evidenciado que os animais do grupo salina não apresentavam infiltração de mastócitos no intestino como foi visto no grupo 5-FU. Os dados obtidos no presentes estudo corrobora com os resultados obtidos em outros estudos, quando administrados quimioterápicos para induzir a mucosite em camundongos (AL-ASMARI et al., 2015b; NOGUEIRA et al., 2017) e reafirmam a natureza anti-inflamatória da GC.

Como visto na literatura, o papel dos mastócitos no trato gastrointestinal é paradoxal, variando sua função a depender também da natureza dos seus receptores de superfície e mediadores envolvidos. Sabe-se que os mastócitos contribuem para a homeostase intestinal, por meio da proteção imune, regulação da arquitetura e permeabilidade da barreira epitelial e, remodelação do tecido mucoso, por meio da estimulação de crescimento de fibroblastos (HAMILTON et al., 2014), contudo, são considerados críticos na patogênese de processos inflamatórios como a mucosite, devido sua superexpressão e, conseqüentemente amplificação da resposta inflamatória, que se deve da liberação seletiva de mediadores (DE WINTER et al., 2012; THEOHARIDES et al, 2012).

Além da exacerbação da inflamação, há relatos que a mastocitose no TGI culminam em mudanças arquitetônicas, como a alargamento das vilosidades e mudanças no tamanho da cripta no intestino delgado (RAMSAY et al., 2010).

O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso ubíquo capaz de difundir-se rapidamente pelas membranas celulares e regular uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos de natureza cardiovascular, inflamatório e neuronal (RANG et al., 2012; KATZUNG, 2014).

Este intermediário metabólico é sintetizado durante a reação de oxidação complexa do nitrogênio, a partir de L-Arginina, Oxigênio (O_2) e Cofatores em L-Citrulina, NO e água (ARZUMANIAN et al., 2003; CHOKSHI et al., 2008). Este processo é catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e por fim, o NO reage ativamente com radicais O_2 e superóxido, tióis, metais de enzimas e é oxidado para íons inativos de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) (CORREA-ARAGUNDE et al., 2013).

A NOS é expressa em quase todas as células do corpo humano, contudo, a depender da localização e expressão gênica podem ser classificados em três isoformas distintas: NOS endotelial (eNOS ou NOS3), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS induzível (iNOS ou NOS2). Todas catalisam a mesma reação que culmina a síntese de NO a partir do substrato L-arginina, oxigênio molecular e fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido (NADPH) e requerem ligação de vários co-fatores (GAUTAM; JAIN, 2007; BURGER; FENG, 2011; MATTILA; THOMAS, 2014; BATH et al., 2017). A isoforma induzida, a iNOS, não é expressa em condições normais, mas é induzida em níveis elevados durante processos inflamatórios, estimulados por citocinas (IL-1 β e TNF- α); a mesma produz elevadas concentrações de NO, que perduram horas ou dias (KOLIOS et al., 2004; CHOKSHI et al., 2008; LIMA JUNIOR et al., 2011; FORSTERMANN; SESSA, 2012; MATTILA; THOMAS, 2014; CAMPBELL et al., 2014; MONTESINOS et al., 2016; LUCETTI et al., 2016).

O NO reage muito rapidamente com ânion superóxido (O_2^-) para produzir ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), um forte agente oxidativo e nitrosativo, e é responsável por alguns de seus efeitos tóxicos, como morte celular apoptótica e necrótica através da peroxidação lipídica (ALLAIN et al., 2011; VANNINI et al., 2015).

Devido a importância fisiológica do NO em diversos sistemas, várias estratégias terapêuticas tem sido propostas através da suplementação de NO por meio da administração de NO, NO doadores ou precursores; aprimoramento de atividade de NOS para modular ou aumentar a produção endógena de NO; e inibição direta ou indireta de NOS (BATH et al., 2017). Nesse contexto, a L-arginina, um doador de NO, tem sido bastante relatado na literatura (BRITO et al., 2013; LEOCÁDIO et al., 2015), assim como o N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME, um inibidor competitivo e não seletivo da NOS (REIS et al., 2009; LEITÃO et al., 2011; LIMA JUNIOR et al., 2012; LUCETTI et al., 2016).

No presente estudo, ao avaliar a possível envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito protetor da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos, através das alterações morfométricas e histopatológicas, pode-se evidenciar que a L-Arginina interferiu no

efeito protetor da GC frente a mucosite intestinal induzida por 5-FU, através da diminuição da altura do vilos e da relação vilo/cripta e, da necrose das criptas para o grupo que recebeu tratamento da mucosite com a administração L-Arginina e GC, quando comparado ao grupo tratado apenas com GC. Adicionalmente, ao tratar os animais que sofrem indução da mucosite com L-NAME e GC percebeu-se melhora na reversão dos efeitos da mucosite intestinal. Todavia, o tratamento da mucosite com o L-NAME apresentou-se mais efetivo que o tratamento com a GC, quando administrado em conjunto com a L-Arginina.

Estes resultados permitem inferir que a GC é eficaz no tratamento da mucosite, e que o óxido nítrico (NO) interfere no tratamento da mucosite pela GC, devido ao fato dele exacerbar efeito lesivo/inflamatório evidenciado na mucosite. Como previsto o L-NAME bloqueou os efeitos do NO, por meio da inibição não específica da NOS e, conseqüentemente atuou sinergicamente com a GC para tratar a mucosite intestinal.

O papel do NO em doenças intestinais inflamatórias é controverso, uma vez que há evidências bem definida das funções protetoras dessa molécula no trato gastrointestinal, existem também estudos afirmando que quando superproduzida, como no caso da ativação do iNOS, os resultados podem ser patogênicos (LANAS, 2008; MAGIEROWSKI et al., 2015).

Leocádio et al. (2015) ao avaliar o efeito da L-Arginina na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos, evidenciou que a L-Arginina promoveu, de forma intermediária, melhora do processo inflamatório, da arquitetura da mucosa, contudo na avaliação do estresse oxidativo pela peroxidação lipídica (MDA) e avaliação da infiltração neutrofílica (MPO) não observou-se melhora significativa, ou seja, diferença estatística do grupo 5-FU com o grupo tratado com L-Arginina. Leitão et al. (2011) determinou em seu estudo que inibidores de NOS, L-NAME e Aminoguanidina, preveniram o dano intestinal observado na mucosite intestinal por quimioterápicos e, sugerindo com isso, o papel nocivo do NO, através do iNOS induzível. Lima Junior et al. (2012) também evidenciou o papel lesivo do óxido nítrico na patogênese da mucosite intestinal, onde os efeitos da mucosite podem ser revertidos pela inibição do óxido nítrico sintase induzível, a iNOS. Bastos Moura et al. (2015) sugeriu em seu trabalho que inibidores seletivos de iNOS podem ter papel fundamental no tratamento da mucosite oral. Já Kochar et al. (2011) afirma que em quantidade nanomolares, o NO demonstra propriedades gastroprotetoras contra diferentes tipos de agentes agressivos. No entanto, ausência de NO resulta num aumento da susceptibilidade do trato GI a lesões, assim como em concentrações elevadas de NO estão relacionados com vários processos patológicos da TGI.

Muito tem-se escrito sobre papel multifacetado do NO nas reações inflamatórias no intestino, o que sugere fortemente uma relação de dependência entre a expressão de NO (concentração, local, tempo de administração, via de administração e isoforma de NOS) e a biológica resposta. Este fenômeno é bem aceito na farmacologia (TRIPATHI et al., 2007; VANNINI et al., 2015; WALLACE et al., 2015).

A cinética do desenvolvimento da mucosite intestinal sugere que muito de sua fisiopatologia deve-se a uma série de eventos provocados por mediadores celulares que desempenham papel crucial na inflamação. Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator nuclear kappa-B (NF-kB), moléculas de adesão e subsequente ativação da via ciclooxigenase-2 (COX-2) conduzem a tecido lesão, apoptose e angiogênese e, tem sido associado à fase de sinalização e amplificação da mucosite intestinal (SONIS, 2004; SONIS et al., 2004; SONIS, 2009; LEE et al., 2014; AL-ASMARI et al., 2015). Por esta razão, são identificados como excelentes marcadores da resposta inflamatória induzida por quimioterapia (AL-DASOOQI et al., 2013).

Ciclooxigenases (COX) são um grupo de enzimas que catalisam o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs) e tromboxano. Duas isoformas COX já foram identificadas, referidas como COX-1 e COX-2. Estas enzimas regulam muitas respostas fisiológicas e patológicas, incluindo a toxicidade de agentes quimioterapêuticos (ISHIHARA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016). A COX-1 é predominantemente uma forma constitutiva da enzima que é expressa em todo o corpo e fornece várias funções homeostáticas, como manter a mucosa gastrintestinal normal, facilitar o fluxo sanguíneo renal e auxiliar na coagulação do sangue. Em contraste, a COX-2 é uma forma indutível da enzima e é expressa principalmente em resposta a estímulos inflamatórios e medeia a produção de prostaglandinas que apoiam o processo inflamatório, evidenciado pelo aumento da permeabilidade dos vasos, dor e febre. A expressão de COX-2 é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral alfa em muitas células, incluindo células endoteliais, macrófagos e fibroblastos. A COX-2 é inibida por glicocorticóides e por alguns inibidores seletivos de COX-2 de nova geração (KOEHNE; DUBOIS, 2004; KESKEK et al., 2006; MAGIEROWSKI et al., 2015).

A introdução de inibidores seletivos da COX-2, como o celecoxibe, rofecoxibe e nimesulida, forneceu uma nova classe de fármacos com abordagem promissora para a prevenção e o possível tratamento de várias doenças inflamatórias, inclusive gastrintestinais (JAVLE et al., 2007; ISHIHARA et al., 2010; SHORT et al., 2013; LEE et al., 2014).

No presente estudo também avaliou-se o envolvimento da GC na via COX-2 sobre seu efeito protetor na mucosite intestinal nas alterações morfométricas e histopatológicas observadas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU, bem como o seu após com GC 90, Celecoxibe, e a combinação de GC e Celecoxibe.

Evidenciou-se neste estudo que o 5-FU causou diminuição das vilosidades, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias e perda de arquitetura celular, demonstrando o efeito lesivo do 5-FU na mucosa intestinal. O tratamento com GC, assim como seu tratamento em associação com celecoxibe, promoveu reversão dos efeitos lesivos na mucosa intestinal citados pela administração de 5-FU. Todavia, o tratamento da mucosite com a combinação de GC e celecoxibe foi melhor, na reversão dos efeitos histopatológicos, do que o tratamento somente com o celecoxibe, um medicamento anti-inflamatório não esteroideal (AINEs) disponível no mercado e, que atua como inibidor seletivo da COX-2.

Os resultados obtidos da imunomarcagem para COX-2, realizados no presente estudo, também evidenciaram que tanto o tratamento com GC como com o celecoxibe diminui a imunomarcagem de COX-2 nas porções duodenais de camundongos que sofreram indução de mucosite por 5-FU; ao passo que os animais que receberam apenas 5-FU apresentaram elevada imunomarcagem de COX-2 no intestino delgado. Determinou-se também que o tratamento da mucosite com a associação da GC com celecoxibe diminui a expressão de COX-2, inclusive mais que no tratamento da mucosite somente com GC.

A avaliação da COX-2 e modulações farmacológicas baseadas em sua via de ativação, objetivando melhor compreensão do papel da COX-2 na mucosite intestinal, tem aumentado no decorrer dos anos. Al-Asmari et al. (2016) ao evidenciar o efeito protetor da vitamina E na mucosite intestinal induzida por 5-FU, pontuou que muito dos efeitos anti-inflamatórios da vit. E deve-se a sua capacidade de inibir a expressão de COX-2, iNOS e NF- κ B. Alvarenga et al. (2016) ao avaliar o papel do carvacrol na mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) reforçou o papel lesivo da COX-2 na mucosite e, provou que a diminuição da expressão de NF- κ B e COX-2, promovida pelo carvacrol, é capaz de induzir os efeitos anti-inflamatórios do carvacrol, através da redução da produção de PGE₂. Freitas et al. (2012) definiu como promissora o papel da proteína de látex (LP) de *Calotropis procera*, no tratamento da mucosite oral induzida por 5-FU, ao observar que a LP diminuiu significativamente a imunomarcagem para IL-1 β e COX-2 em comparação ao grupo lesivo 5-FU.

Corroborando com os resultados obtidos no presente, Short et al. (2013) sugeriu que baixas doses de celecoxibe, inibidor seletivo de COX-2, podem ser utilizadas terapêuticamente

na proteção da barreira intestinal em pacientes com distúrbios inflamatórios intestinais, devido a capacidade de redução da expressão da COX-2 pelo celecoxibe, o que pode indicar que este medicamento interrompe uma regulação por feedback positivo do gene COX-2 pelo seu produto final, PGE2. Arslan et al. (2016) ao avaliar o efeito da nimesulida, um inibidor seletivo pra COX-2, no tratamento de mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico metotrexato (MTX), evidenciou equilíbrio entre os sistemas oxidante/antioxidante no tecido do intestino delgado de ratos, bem como restauração em grande parte os distúrbios histopatológicos no intestino delgado causados pelo MTX. Javle et al. (2007) determinou que a combinação de irinotecano (CPT-11) e celecoxibe resultou em um efeito antitumoral com melhoria na diarreia induzida pelo irinotecano e diminuição da letalidade devido à altas doses deste quimioterápico.

Keskek et al. (2006) descreveu que ao tratar lesões intestinais induzidas por radioterapia em ratos, com administração de rofecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, obteve-se alívio a lesão após a fase aguda do processo inflamatório, contudo, dados sobre a utilidade dos inibidores da COX-2 em outros processos inflamatórios, ainda são conflitantes. O que sugere-se, maior avaliação do papel dos inibidores seletivos da COX-2 na redução das complicações intestinais induzidas por agentes quimio e/ou radioterápicos.

Para a imunomarcção pra IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória relatada na literatura devido sua hiper-expressão nas doenças inflamatórias intestinais, como exemplo a mucosite, observou-se que os animais tratados com GC e/ou celecoxibe apresentaram diminuição da imunomarcção quando comparada ao grupo lesivo 5-FU. O resultado imunomarcção para IL-1 β , obtida neste estudo, corrobora com o resultado da imunomarcção para COX-2, e não poderia se esperar o contrário, já que se sabe que a IL-1 β , quando produzida por macrófagos, monócitos e células glia, por sua vez induzem a expressão de mediadores inflamatórios, como por exemplo a COX-2 e a subsequente libertação de seus produtos, prostaglandinas e início do dano primária tecidual e progressão do mesmo (VERRI et al., 2006; AL-AZRI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

A IL-1 β é uma citocina multifuncional que tem um efeito sobre uma grande variedade de tipos de células e múltiplos efeitos biológicos. Comumente, IL-1 β é descrita na patogênese de uma série de doenças inflamatórias, como doença inflamatória intestinal (IBD), artrite reumatóide, septicemia, e mais importante, na mucosite. As formas ativas de IL-1 β tem sido associadas ao aumento do fluxo de neutrófilos, indução de moléculas de adesão endotelial, além de estar relacionada com a viabilidade celular, migração e proliferação. Esta citocina em

conjunto com o TNF- α está envolvida na ativação da via NF- κ B (LOGAN et al., 2007; SULTANI et al., 2012; BASSO et al., 2015).

Silva (2017) ao avaliar a imunomarcção para COX-2 e IL-1 β , em modelo experimentais de mucosite oral induzida por trauma mecânico e 5-FU, evidenciou diminuição da imunomarcção para COX-2 e IL-1 β nos animais que receberam tratamento da mucosite com celecoxibe, demonstrando a indução do processo inflamatório da mucosite por 5-FU, e, posteriormente, a ação protetora do celecoxibe da inflamação com o bloqueio da COX-2 e inibição da IL-1 β . Esses dados, notoriamente, corroboram com os resultados da imunomarcção por COX-2 e IL-1 β , obtidos no estudo em questão.

Reafirmando os resultados obtidos no presente estudo, Justino et al. (2014), ao avaliar o efeito do tratamento de *Saccharomyces boulardii* na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos, sugeriu que efeitos benéficos do *S. boulardii* baseava-se na prevenção e diminuição da apoptose das criptas intestinais, que muitas das vezes esta associada à elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β . Al-Dasooqi et al. (2013) afirmou que a expressão gênica e os níveis de teciduais de TNF- α e IL-1 β estão estreitamente correlacionados com a lesão da mucosa intestinal nos casos de mucosite induzida por quimioterapia. Chang et al. (2012) ao mensurar os níveis de IL-1 β e TNF- α pela imunomarcção nos tecidos intestinais por imunohistoquímica, mostrou que o 5-FU induziu a imunomarcção para IL-1 β e TNF- α nos tecidos, enquanto o Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), um inibidor não seletivo da COX e NF- κ B, suprimiu a produção de IL-1 β e TNF- α nos tecidos pela indução por 5-FU. Esses dados sugeriram que 5-FU induziu mucosite intestinal via NF- κ B/ TNF- α / IL-1 β , e a inibição desta via melhora o dano da mucosa causada por 5-FU no intestino delgado.

A mucosite é caracterizada por múltiplos sinais e sintomas, que incluem inapetência e eventual anorexia, diarreia, vômito, dor abdominal e redução na absorção de nutrientes (HARRIS et al., 2006; REINKE et al., 2015; ARAÚJO; BARROS, 2015; ZUO et al., 2015; KISSOW, 2015; PEREIRA et al., 2016). A fisiopatologia destes sintomas é de grande complexidade e variabilidade ao longo do curso da doença e múltiplos mecanismos podem sobrepor-se (MERCADANTE et al., 2015). Contudo, complicações como comprometimento do estado nutricional, diarreia e perda de peso podem aumentar a morbidade, e impactar portanto, diretamente, na sobrevivência e na qualidade de vida do paciente (AL-ASMARI et al., 2015). Dessa forma, o peso corporal é um parâmetro sempre avaliado na mucosite

experimental, independente da finalidade experimental, seja no desenvolvimento de novo modelo seja na reprodução de modelos já relatados na literatura.

No presente estudo, observou-se que o 5-FU, quando comparado com o grupo salina, promoveu perda de peso no decorrer do período de indução da mucosite, dia após dia, até o último dia de averiguação do peso corpóreo dos animais, que culminou na eutanásia. O tratamento apenas na concentração de 60 mg/kg, GC 60, foi capaz de reverter a perda de peso induzida pelo 5-FU. Ademais, em relação a mortalidade, não evidenciou-se morte em nenhum dos grupos de animais no protocolo de indução da mucosite e seu tratamento com a GG.

Yeung et al. (2015) ao avaliar o efeito de dois tipos de probióticos na mucosite oral induzida por 5-FU, observou que grupos de ratos que receberam somente 5-FU apresentaram maior perda de peso corporal do que aqueles em grupos salinos. Entretanto, o peso corporal do animais que receberam além de 5-FU, um dos probióticos, foram significativamente menores do que aqueles que receberam somente 5-FU. Carvalho et al. (2017) ao estudar o efeito protetor de LL-PAP, uma proteína associada à pancreatite (PAP) por *Lactococcus lactis* (LL), na mucosite experimental induzida por 5-FU em camundongos, mostrou que o 5-FU diminuiu significativamente o peso corporal em comparação ao de grupos salinas, mas o tratamento com LL-PAP não melhorou o peso corporal dos camundongos dos animais que perderam peso, ao receberam 5-FU. Li et al. (2017) ao mensurar o peso corporal de camundongos tratados com 5-FU, observou que os mesmos, diminuiriam dramaticamente do dia 2º ao dia 7º após o tratamento com 5-FU, em comparação com os animais do grupo controle. Todos estes dados demonstram que os resultados obtidos em nosso estudo, encontram-se em consonância com os dados já relatados na literatura científica acerca da diminuição do peso corporal dos animais após indução da mucosite por 5-FU.

No presente estudo, avaliamos os efeitos de um produto natural, especificamente, a goma do cajueiro (GC), um heteropolissacarídeo obtido do exsudato da caule do cajueiro, na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil. Contudo, o interesse na descoberta de produtos naturais com efeitos farmacológicos não é algo inédito, sabe-se que uso de plantas medicinais para prevenção e tratamento de diferentes patologias está em expansão contínua em todo o mundo. No Brasil, um grande número de extratos de ervas são utilizados na medicina popular para tratar uma variedade de distúrbios digestivos, e vários estudos documentaram os benefícios de plantas brasileiras na prevenção tratamento de lesões gastrintestinais (ALRASHDI et al., 2012; BONACORSI et al., 2013).

Neste contexto, cabe destaque a família Anacardiaceae, onde estudos com extrato de *S. pinnata*, indicaram que esta formulação foi capaz de diminuir os escores de gravidade histológica, a inflamação intestinal e alterar a arquitetura da mucosa após a quimioterapia, apontando esta espécie como importante agente farmacológico na promoção da cicatrização do intestino danificado após a quimioterapia (REDDY et al., 2015). Para o cajueiro, *Anacardium occidentale* L. tem se relatado na literatura um diversidade de propriedades farmacológicas, e evidenciando que a casca, as folhas e o óleo da casca são usados em preparações medicamentosas como anti-inflamatórios e astringentes, objetivando o tratamento da diarreia (CHIKEZIE, 2011). Em estudos com extratos da casca do caule do cajueiro tem-se relatado efeito hipoglicemiante (OKPASHI et al., 2014; JAISWAL et al., 2016), antioxidante e anti-inflamatória (CHAVES et al., 2010; SOUZA et al., 2017), atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2007), anti-hipertensiva (TCHIKAYA et al., 2011); já para a casca e o fruto do cajueiro há relatos de eficácia sobre no tratamento da gastrite, diarreia e feridas (OKPASHI et al., 2014; PALHETA et al. 2017), além de atividade anticancerígena (OKONKWO et al., 2010). E para a castanha do caju foram relatadas atividades anti-inflamatórias e potencial cicatrizante de feridas (VASCONCELOS et al., 2015).

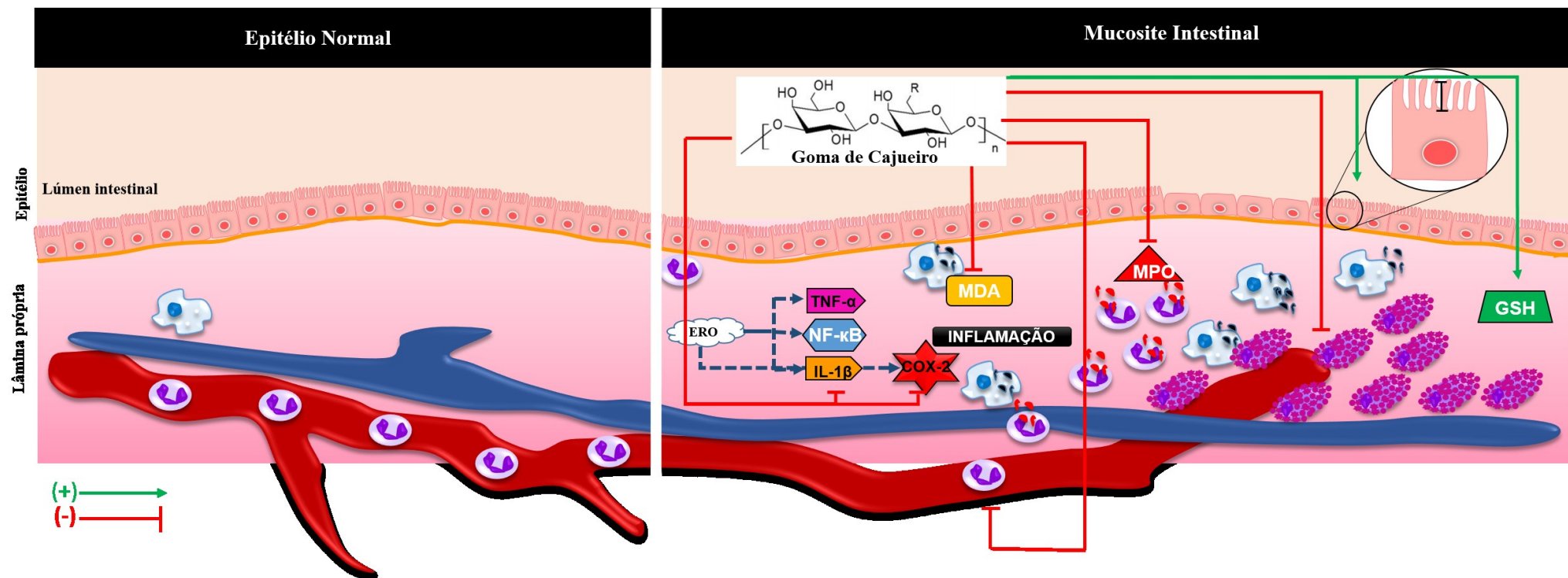
Estudos acerca da goma de caju (GC), um biopolímero natural e versátil, tem demonstrado aplicações crescentes na indústria farmacêutica e biotecnológica. Dentre as aplicações farmacológicas da GC, destacam-se atividade antitumoral, hipoglicemiante, antimicrobiana (KUMAR et al 2012; QUELEMES, et al., 2013). Carvalho et al. (2015) ao avaliar a ação da GC nas gastrite induzida por AINEs, evidenciou que a CG possui efeito gastroprotetor contra o dano induzido por naproxeno, e que esta propriedade, muito se deve à sua atividade antioxidante, através da diminuição da produção de radicais livres e à peroxidação lipídica. Estes dados sugerem que a GC possa figurar como uma nova e atraente estratégia de tratamento e prevenção de lesões no trato gastrintestinal. Ainda para a GC, há relatos que este heteropolissacarídeo atue como um bom excipiente farmacêutico, podendo ser utilizada em sistema de liberação controlada ou como aglutinante para cápsulas e pílulas (KUMAR et al 2012; RAMALHO, 2014; NGWULUKA et al., 2014).

Além da GC, outros polissacarídeos naturais tem sido sugeridos com atividades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, que podem estar ligadas aos mecanismos de proteção gástrica e intestinal, visto que apresentam potencial cicatrizante de feridas e atividade antiulcerogênica (LEÓDIDO et al., 2017). Zuo et al. (2015) demonstrou que a ingestão de SC-

FUC, um polissacarídeo obtido do *Acaudina molpadioides*, pode proteger contra a mucosite intestinal induzida por quimioterapia.

Aliado a essas informações, estudos também afirmam que o uso de gomas naturais para aplicações farmacêuticas é atraente devido ao caráter econômico, já que encontram-se prontamente disponíveis, não tóxicos, capazes de modificações químicas, potencialmente biodegradáveis e, com poucas exceções, também biocompatíveis (CHOUDHARY; PAWAR, 2014). As gomas possuem uma estrutura polimérica complexa e ramificada por causa da qual exibem altas propriedades coesivas e adesivas, tais propriedades utilizadas na preparação farmacêutica (GOSWAMI; NAIK, 2014). O estudo e a utilização de polissacarídeos naturais em patologias inflamatórias intestinais, em especial a mucosite, é uma realidade atual, e promessa futura para a adição no mercado de medicamentos efetivos no tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para o efeito da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos realizou-se o modelo hipotético de ação da GC apresentado na figura 38.

Figura 38. Modelo hipotético da ação farmacológica da GC na mucosite intestinal induzida por 5-FU.



No modelo hipotético de ação farmacológica da Goma do Cajueiro (GC) na mucosite intestinal induzida por 5-FU, pode-se evidenciar que a GC reverteu a inflamação intestinal por meio inibição de MDA, MPO, IL-1 β , COX-2, ERO, mastocitose e inibiu a leucopenia. A GC também estimulou aumento das vilosidades e aumento dos níveis de GSH, um antioxidante. ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa; NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa b; IL-1 β : Interleucina 1 beta; COX-2: Ciclooxigenase 2; MDA: Malondialdeído; MPO: Mieloperoxidase; GSH: Glutathiona reduzida. Setas verde (estimula/aumenta), setas vermelhas (inibe).

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU pode-se concluir que:

- A Goma do Cajueiro (GC) na concentração de 90 mg/kg, desempenha efeito protetor no segmento duodenal mucosa intestinal, após indução de lesão por quimioterápico.
- A GC reverte a diminuição das vilosidades, relação vilo/cripta, necrose das criptas e perda de arquitetura celular promovida pelo 5-FU.
- A GC reverte a leucopenia promovida pelo 5-FU na mucosite intestinal.
- A GC diminui o estresse oxidativo, através da reversão do aumento do MDA e da diminuição dos níveis de GSH, na mucosite intestinal promovida por 5-FU.
- A GC atenua o processo inflamatório, por meio da diminuição dos níveis de MPO e da contagem de mastócitos teciduais, na mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- A GC protege a mucosa intestinal (após a indução da mucosite por 5-FU) através da inibição da COX-2, sendo evidenciado pela diminuição da imunomarcação da COX-2 e pelas alterações histopatológicas.
- A GC promove diminuiu da imunomarcação da IL-1 β , citocina pro-inflamatória, evidenciando proteção contra a mucosite intestinal induzida por 5-FU.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, K. C. S. et al. Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, v. 23, n. 5, p. 667-71, 2013.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**. v. 106, p. 9-14, 2012.
- AL-ASMARI, A. K. et al. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 908–916, 2015.
- AL-ASMARI, A. K. et al. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. **Human and Experimental Toxicology**, p. 1-11, 2015b.
- AL-ASMARI, A. K. et al. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 377-385, 2016.
- AL-DASOOQI, N. et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. **Supportive care in cancer**, v. 21, n. 7, p. 2075-2083, 2013.
- AL-AZRI, A. R. et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMP-3 and MMP-9) in the pathogenesis of irinotecan-induced oral mucositis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 44, n. 6, p. 459-467, 2015.
- ALDEMIR, M. et al. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with renal cell carcinoma. **Cent European J Urol**, v. 68, p. 415-420, 2015.
- ALDERTON, W. K. et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.
- ALLAIN, A. V. et al. Role of nitric oxide in developmental biology in plants, bacteria, and man. **Current topics in pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 25, 2011.
- ALRASHDI, A. S. et al. Mechanisms of gastroprotective effects of ethanolic leaf extract of *Jasminum sambac* against HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1-15, 2012.
- ALVARENGA, E. M. et al. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. **Chemico-biological interactions**, v. 260, p. 129-140, 2016.
- ALVES, M. O. et al. A regionalização da saúde e a assistência aos usuários com câncer de mama. **Saude soc.**, v. 26, n. 1, p. 141-154, 2017.

ANTHONY, L. et al. New thoughts on the pathobiology of regimen-related mucosal injury. **Support Care Cancer**, v. 14, p. 516-18, 2006.

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, 2015a.

ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, n. 15. p. 378-87, 2015b.

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

ARSLAN, A. et al. Effects of nimesulide on the small intestine mucositis induced by methotrexate in rats. **Experimental animals**, v. 65, n. 4, p. 329-336, 2016.

ARZUMANIAN, V. et al. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. **Medicina (Kaunas)**, v. 39, n. 6, p. 535-41, 2003.

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

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.

AUGUSTO, C. M. J. et al. Avaliação do Extrato de *Uncaria tomentosa* na Prevenção de Mucosite Oral Induzida: Estudo Experimental em Animais. **Rev Odontol Bras Central**, v. 18, n. 48, p. 57-61, 2010.

BASSO, F. G. et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 91, n. 4, p. 952-956, 2015.

BASTOS, C. C. C. **Efeitos da formulação mucoadesiva de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) e *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) no tratamento da mucosite intestinal.** 2014. 80p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BASTOS MOURA, J. F. et al. A novel model of megavoltage radiation-induced oral mucositis in hamsters: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. **International journal of radiation biology**, v. 91, n. 6, p. 500-509, 2015.

BARRETT, K. E. **Fisiologia gastrintestinal.** 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

BATH, P. M. W. et al. Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. **The Cochrane Library**, v. 4, p. 1-155, 2017.

BAYDAR, M. et al. Prevention of Oral Mucositis Due to 5-Fluorouracil Treatment with Oral Cryotherapy. **Journal of the national medical association**, v. 97, n. 8, p. 1161-64, 2005.

BENITES, A. C. et al. Significados da espiritualidade para pacientes com câncer em cuidados paliativos. **Estud. psicol.**, v. 34, n. 2, p. 269-79, 2017.

BELLAVIA, L. et al. Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo. **Future science OA**, v. 1, n. 1, 2015.

BITTENCOURT, C. R.; C. R. et al. Immobilization of cationic antimicrobial peptides and natural cashew gum in nanosheet systems for the investigation of anti-leishmanial activity. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 59, p. 549–555, 2016.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**, v. 94, p. 329-54, 2014.

BONACORSI, C. et al. Comparison of Brazilian plants used to treat gastritis on the oxidative burst of *Helicobacter pylori*-stimulated neutrophil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

BRITO, T. V. et al. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 724-733, 2013.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

BURGER, D. E.; FENG, Q. Protective role of nitric oxide against cardiac arrhythmia - an update. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 3, n. 1, p. 38-47, 2011.

CAMPBELL, M. G. et al. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. E3614-E3623, 2014.

CARNEIRO-FILHO, B. A. et al. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digest. Dis. Sci.**, v. 49, n. 1, p. 65-72, 2004.

CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. **Drug development research**, v. 76, n. 3, p. 143-151, 2015.

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

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

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

CHANG, C. T. et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31808, 2012.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106-112, 2010.

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**, v. 7, n. 3, e31808, 2012.

CHEN, L. H. et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides reduce methotrexate-induced small intestinal damage in mice via induction of epithelial cell proliferation and migration. **Acta Pharmacol Sin**, v. 32, p. 1505-12, 2011.

CHEN, P. et al. A Novel Peptide for Simultaneously Enhanced Treatment of Head and Neck Cancer and Mitigation of Oral Mucositis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1-16, 2016.

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

CHIKEZIE, P. C. Sodium metabisulfite-induced polymerization of sickle cell hemoglobin incubated in the extracts of three medicinal plants (*Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, and *Terminalia catappa*). **Pharmacognosy magazine**, v. 7, n. 26, p. 126, 2011.

CHOKSHI, N. K. et al. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. In: **Seminars in perinatology**. WB Saunders, v. 32, p. 92-99, 2008.

CHOUDHARY, P. D.; PAWAR, H. A. Recently Investigated Natural Gums and Mucilages as Pharmaceutical Excipients: An Overview. **Journal of Pharmaceutics**, v. 1, p. 1-9, 2014.

CORREA-ARAGUNDE, N. et al. Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-3, 2013.

COSTA, S. M. O. Monitorização do Processo de Purificação de Gomas Naturais: Goma do Cajueiro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1996.

COSTA, D. V. S. **Papel da via S100 β /RAGE/NF- κ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-Fluorouracil**: Desregulação de células gliais e de neurônios entéricos. 2016. 155p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CUNHA, P. L. R. et al. Oxidation of Cashew Tree Gum Exudate Polysaccharide with TEMPO Reagent. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p. 85-92, 2007.

DE PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of Albizia lebeck gum exudates. **Carbohydr. Polym.**, v. 44, p. 133–139, 2001.

DERISSEN, E. J. B. et al. Exploring the intracellular pharmacokinetics of the 5-fluorouracil nucleotides during capecitabine treatment. **Br J Clin Pharmacol**, v. 81, p. 949–957, 2016.

DE WINTER, B. Y. et al. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, p. 66–73, 2012.

D'HONDT, L. et al. Oral mucositis induced by anticancer treatments: physiopathology and treatments. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 2, p. 159-69, 2006.

DICARLO, G.D. et al. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytother. Res.** v. 8, p. 42-4, 1994.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis — causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, p. 853-74, 2003.

ELBELTAGY, M. et al. Fluoxetine improves the memory deficits caused by the chemotherapy agente 5-fluorouracil. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 112–117, 2012a.

ELBELTAGY, M. et al. The effect of 5-fluorouracil on the long term survival and proliferation of cells in the rat hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 88, p. 514–518, 2012b.

ELERSEK, T. et al. Toxicity of the mixture of selected antineoplastic drugs against aquatic primary producers. **Environ Sci Pollut Res**, 2016.

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

FERREIRA, J. E. V. et al. Chemometric Study on Molecules with Anticancer Properties. In: Varmuza, K. **Chemometrics in Practical Applications**, InTech, 326p. ISBN: 978-953-51-0438-4, 2012.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FOCAC CETTI, C. et al. Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. **PLOS ONE**, p. 1-25, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2011.

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.

GAO, F. et al. Extracellular Superoxide Dismutase Inhibits Inflammation by Preventing Oxidative Fragmentation of Hyaluronan. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n. 10, p. 6058-66, 2008.

GAO, Y. et al. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- κ B/iNOS signaling pathways. **Journal of pineal research**, v. 62, n. 2, 2017.

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

GAUTAM, P.; JAIN, S. K. Functions and significance of nitric oxide in patho-physiological processes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 293-304, 2007.

GOSWAMI, S.; NAIK, S. Natural gums and its pharmaceutical application. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v.3, n. 1, p. 112-121, 2014.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

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

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

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

HAMILTON, M. J. et al. The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 20, n. 12, p. 2364–2378, 2014.

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

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

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

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

HUANG, J. et al. The effect of palonosetron hydrochloride in the prevention of chemotherapy-induced moderate and severe nausea and vomiting. **Experimental and therapeutic medicine**, v.5, n.5, p.1418–26, 2013.

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

INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 122 p, 2015.

ISHIHARA, T. et al. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 11, p. 1622-1633, 2010.

ITO, K. et al. Molecular targeted photoimmunotherapy for HER2-positive human gastric cancer in combination with chemotherapy results in improved treatment outcomes through different cytotoxic mechanisms. **BMC Cancer**, v. 16, n. 37, 2016.

JAISWAL, Y. S. et al. Antidiabetic activity of extracts of *Anacardium occidentale* Linn. leaves on n-streptozotocin diabetic rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.007>.

JAVLE, M. M. et al. Celecoxib and mucosal protection: translation from an animal model to a phase I clinical trial of celecoxib, irinotecan, and 5-fluorouracil. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 3, p. 965-971, 2007.

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

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. **Trato Digestivo**. In: _____. Histologia básica; 11.ed: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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

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

KART, A. et al. The Therapeutic Role of Glutathione in Oxidative Stress and Oxidative DNA Damage Caused by Hexavalent Chromium. **Biol Trace Elem Res**, 2016.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

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

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

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

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

KESKEK, M. et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in radiation-induced small bowel injury in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 135, n. 1, p. 76-84, 2006.

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

KIM, H. J. et al. Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 179-183, 2015.

KINDZELSKII, A. L. et al. Myeloperoxidase accumulates at the neutrophil surface and enhances cell metabolism and oxidant release during pregnancy. **Eur. J. Immunol**, v. 36, p. 1619-28, 2006.

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

KOBUCHI, S. et al. Semi-physiological pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling and simulation of 5-fluorouracil for the whole time course of alterations in leukocyte, neutrophil and lymphocyte counts in rats. **Xenobiotica**, v. 44, n. 9, p. 804-18, 2014.

KOBUCHI, S. et al. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5 Fluorouracil for Toxicities in Rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 2016.

KOCHAR, N. I. et al. Nitric Oxide and the Gastrointestinal Tract. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 31-39, 2011.

KOEHNE, C. H.; DUBIOS, R. N. COX-2 inhibition and colorectal cancer. In: **Seminars in oncology**, v. 31, n. 2, sup. 7, p. 12-21, 2004.

KOLIOS, G. et al. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 427-437, 2004.

KREMSEROVA, S. et al. Lung Neutrophilia in Myeloperoxidase Deficient Mice during the Course of Acute Pulmonary Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

KULKARNI, R. et al. Role of Tumor necrosis factor alpha, Malondialdehyde & serum Iron in Anemic Tuberculosis Patients. **Biomedical Research**, v. 22, n. 1, p. 69-72, 2011.

KUMAR, S. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 415–420, 2010.

KUMAR, A. et al. Cashew Gum A Versatile Hydrophylic Polymer: A Review. **Current Drug Therapy**, v. 7, n. 2, p. 2-12, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9ed, Elsevier: Rio de Janeiro, 928 p. 2013.

KWON, M. J. et al. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v. 67, p. 81-7, 2012.

KWON, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2007–16, 2016.

LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2006.

LALLA, R. V. et al. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. **Dent Clin North Am**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 2, p. S4, 2008.

LEE, C. S. et al. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 14, p. 3751, 2014.

LEITÃO, R. F. C et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 90, 2011.

LEOCÁDIO, P. C. L et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-fu in mice. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 486-493, 2015.

LEÓDIDO, A. C. M. et al. Prospecção tecnológica de polissacarídeos com atividade antidiarreica. **Revista GEINTEC**, v. 7, n. 1, p. 3655- 68, 2017.

LI, C.; ZHOU, H. M. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in Inflammation Defense. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

LI, Y. et al. TLR9 Regulates the NF- κ B–NLRP3–IL-1 β Pathway Negatively in Salmonella-Induced NKG2D-Mediated Intestinal Inflammation. **The Journal of Immunology**, p. j11601416, 2017.

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

LIU, X. et al. MicroRNA-149 Increases the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-Fluorouracil by Targeting Forkhead Box Transcription Factor FOXM1. **Cell Physiol Biochem**, v. 39, p. 617-629, 2016.

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.

LONGO, D. L et al. **Quimioterapia do Câncer**. In: LONGO, D. L et al. Manual de Medicina de HARRISON. 18^a ed. AMGH: Porto Alegre, 2013.

LONGLEY, D. B. et al. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews-cancer**, v. 3, p. 330-8, 2003.

LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, n. 135625, p. 1-4, 2008.

LU, H. et al. The chemokine CXCL9 exacerbates chemotherapy-induced acute intestinal damage through inhibition of mucosal restitution. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 141, n. 6, p. 983-92, 2015.

LUBRANO, V. et al. Role of superoxide dismutase in vascular inflammation and in coronary artery disease. **Clin Exp Med**, v. 6, p. 84-8, 2006.

LUCETTI, L. T. et al. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Interact When Modulating Gastric Physiological Functions in Rodents. **Digestive diseases and sciences**, v. 62, n. 1, p. 93-104, 2017.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-50, 1978.

MAGIEROWSKI, M. et al. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9099-9123, 2015.

MARIKOVSKY, M. et al. Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2993-3001, 2003.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 1-5, 2014.

MAYBAUER, M. O. et al. The role of superoxide dismutase in systemic inflammation. **Shock**, v. 25, n. 2, p. 206-207, 2006.

MCCARTHY, G. M. et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. **Oral Oncology**, v. 34, p. 484- 90, 1998.

MEIROVITZ, A. et al. Cytokines levels, Severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer - a prospective pilot study. **Radiation Oncology**, v. 5, n. 16, p. 1-7, 2010.

MELO, M. L. et al. A Role of cytokines (TNF- α , IL-1 α 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, 2008.

MERCADANTE, S. et al. Prevalence of oral mucositis, dry mouth, and dysphagia in advanced cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 23, p. 3249–55, 2015.

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

MIHARA, M.; UCHYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem**, v. 86, p. 271-278, 1978.

MINHAS, M. U. et al. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin hydrogels: crosslinked polymeric network for targeted delivery of 5-fluorouracil. **Cellulose Chem. Technol**, v. 50, n. 2, p. 233-242, 2016.

MIURA, K. et al. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. **Cancers**, v. 2, p. 1717-1730, 2010.

MONEIM, A. E. A. et al. Oral Mucositis: Melatonin Gel an Effective New Treatment. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, n. 1003, p. 1-20, 2017.

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

MONTESINOS, M. M. et al. Nitric oxide-repressed Forkhead factor FoxE1 expression is involved in the inhibition of TSH-induced thyroid peroxidase levels. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 420, p. 105-115, 2016.

MOURA, R. A. et al. **Estudos dos elementos figurados do sangue**. In: _____. Técnicas de laboratório. 3.ed, São Paulo: Editora Atheneu, cap. 32, p. 343-74, 1998.

MURPHY, C. K. et al. Efficacy of Superoxide Dismutase Mimetic M40403 in Attenuating Radiation-Induced Oral Mucositis in Hamsters. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 13, p. 4292-97, 2008.

NAIDU, M. U. R. et al. Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis- Complicating the Treatment of Cancer. **Neoplasia**, v.6, n. 5, p. 423 – 431, 2004.

NATH, S. D. et al. The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 (27 bp-VNTR) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is associated with albumin to creatinine ratio in Mexican Americans. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 331, n. 1-2, p. 201-205, 2009.

NGWULUKA, N. C.; OCHEKPE, N. A.; ARUOMA, O. I. Naturapolyceutics: The Science of Utilizing Natural Polymers for Drug Delivery. **Polymers**, v, 6, p. 1312-1332, 2014.

NOGUEIRA, L. T. et al. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 79, 1-13, 2017.

NOORDHUIS, P. et al. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

OFORI-KWAKYE, K. et al. Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 105-109, 2010.

OFORI-KWAKYE, K. et al. Mechanical and tablet coating properties of cashew tree (*Anacardium occidentale* L) gum-based films. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 4, p. 62-68, 2012.

OKONKWO, T. J. N. et al. Sub-chronic hepatotoxicity of *Anacardium occidentale* (*Anacardiaceae*) inner stem bark extract in rats. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 72, n. 3, p. 353, 2010.

OKPASHI, V. E. et al. Comparative effects of some medicinal plants: *Anacardium occidentale*, *Eucalyptus globulus*, *Psidium guajava*, and *Xylopi aethiopica* extracts in alloxan-induced diabetic male Wistar albino rats. **Biochemistry research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

OLUSOLA, A. et al. Carboxymethylation of *Anacardium Occidentale* L. Exudate Gum: Synthesis and Characterization. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)**, v. 3, n. 2, p. 213-216, 2014.

PAIVA, M. G. **Utilização do polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização cutânea experimental**. 2003. 109f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2003.

PALHETA, I. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of Abaetetuba, Pará state, Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 3, p. 206-262, 2017.

PANGENI, R. et al. Multiple nanoemulsion system for an oral combinational delivery of oxaliplatin and 5-fluorouracil: preparation and in vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6379–6399, 2016.

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

PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. J. N. The role of nitric oxide in immune response against *Trypanosoma cruzi* infection. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 2, p. 1-6, 2010.

PAVESI, V. C. S. et al. Efeito de cogumelos medicinais na reabilitação da inflamação química induzida. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 37, n. 1, p. 10-14, Jan/Mar, 2008.

PAWAR, H. A. et al. An Overview of Natural Polysaccharides as Biological Macromolecules: Their Chemical Modifications and Pharmaceutical Applications. **Biology and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2015.

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

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, 2016.

PETERS, G. J. et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1587 p. 194–205, 2002.

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

PETERSON, D. E. et al. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**, v. 22, suppl. 6, p. 78- 84, 2011.

PICO, J. L. Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. **The Oncologist**, v. 3, p. 446-451, 1998.

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

PINHO, A. P. et al. Mucosite no paciente em tratamento de câncer. **Science in Health**, v. 1, n. 3, p. 145-60, 2010.

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

PORTO, B. C. et al. Effect of dynamic high pressure on technological properties of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 187-93, 2015.

QUARESMA, M. P. **Lactobacillus spp. e Bifidobacterium sp. atenuam a mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil em camundongos**. 2016. 86p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

QUELEMES, P. V. et al. Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 4969-4981, 2013.

QUÉRÉ, S. L. et al. The role of superoxide dismutase (SOD) in skin disorders. **Nutrafoods**, v. 13, p. 13-27, 2014.

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

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

RAJINIKANTH, P. S.; CHELLIAN, J. Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5067–5077, 2016.

RAMALHO, Í. M. M. et al. Biopolímero da goma do cajueiro (*anacardium occidentale* L.) como potencial excipiente farmacêutico. In III Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica (EBIT), 2013, Recife. **Anais do III Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica (EBIT)**, Recife, 2013.

RAMOS, L. A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114, 2006.

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

RANG, P. H. et al. **Rang and Dale Farmacologia**. 7. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2012.

REDDY, S. C. et al. Oral Ingestion of *Spondias pinnata* Bark Extract Trim Down Severity of Small Intestinal Mucositis in Etoposide Treated Rats. **Cancer Science & Therapy**, v. 7, n. 2, p. 030-033, 2015.

REINALDO, M. P. O. S. **Efeito da Olmesartana na resposta inflamatória em modelo de mucosite intestinal em ratos**. 2015. 71p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

REINKE, D. et al. Herbal Substance, Acteoside, Alleviates Intestinal Mucositis in Mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 1, p. 1-9, 2015.

REIS, O. T. G. et al. Effect of L-Arginine and L-NAME treatments on polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells influx during tumor growth. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 107-111, 2009.

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

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1993.

RUBENSTEIN, E. B. et al. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Cancer Therapy–Induced Oral and Gastrointestinal Mucositis. **American Cancer Society**, v. 100, n. 9, p. 2026-46, 2004.

RYMASZEWSKI, A. L. et al. The Role of Neutrophil Myeloperoxidase in Models of Lung Tumor Development. **Cancers**, v. 6, p. 1111-27, 2014.

SABUNCUOGLU, S. et al. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 47, p. 651-56, 2012.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Interleukin-1beta contributes to the inflammation-induced increase in nerve-growth factor levels and in inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265 -75, 1995.

SANTOS, P. S. S. et al. Mucosite oral: perspectivas atuais na prevenção e tratamento. **RGO**, Porto Alegre, v. 57, n. 3, p. 339-44, 2009.

SANTOS, L. C. **Efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil no perfil do tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes do receptor de LDL (LDLr/-)**. 2011. 131p. Dissertação Programa de Pós-Graduação em m Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

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, 55-62, 2016.

SCHIRATO, G. V. et al. Application of the polysaccharide from cashew gum in the rehabilitation of experimental cutaneous lesions in mice. In: Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biológica molecular, 32., 2003, Caxambu, Minas Gerais. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. p. 100.

SCHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.149-154, Jan-Fev, 2006.

SCHMITT, B. et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. **Redox Biology**, v. 6, p. 198-205, 2015.

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

SHORT, S. S. et al. Low doses of celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis. **Laboratory Investigation**, v. 93, n. 12, p. 1265-1275, 2013.

SIDO, B. et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 485-92, 1998.

SILVEIRA, V. R. S. **Polimorfismos nos genes interleucina10, NOS2A e ESR2 em portadores de periodontite crônica e agressiva**. 2015. 98p. Tese. Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, p. 91-8, 2008.

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. A Biological Approach to Mucositis. **J Support Oncol**, v. 2, n. 1, p. 21–36, 2004.

SONIS, S. T. et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury. **Supplement to cancer**, v. 100, n. 9, p. 1995-2025, 2004.

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

SOUZA, N. C. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Anacardium occidentale Leaf Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

SILVA, D. A. et al. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 16–26, 2006.

SILVA, J. G. da et al. Atividade antimicrobiana do extrato de Anacardium occidentale Linn. em amostras multiresistentes de Staphylococcus aureus. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 4, p. 572-7, 2007.

SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 29, p. 437-441, 2009.

SILVA, D. R. **Obtenção e caracterização de micropartículas utilizando goma de cajueiro**. 2013. 109p. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SILVA, M. C. C. et al. Prospecção tecnológica: aplicação da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em nanotecnologia. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 4, p. 55-69, 2013b.

SILVA, V. C. **Estudo da participação da via dos leucotrienos no modelo experimental de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**. 2017. 115p. Tese. Programa de Pós-graduação Ciências Médico-Cirúrgicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SULISTYOWATI, A. D. et al. The relationship between sérum malondialdehyde levels and severity of acne vulgaris on male. **J Med Sci**, v. 46, n. 4, p. 167-73, 2014.

SULTANI, Masooma et al. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy research and practice**, v. 2012, 2012.

SUZUKI, N. et al. Effect of a novel oral chemotherapeutic agent containing a combination of trifluridine, tipiracil and the novel triple angiokinase inhibitor nintedanib, on human colorectal cancer xenografts. **Oncology reports**, v. 36, 3123-30, 2016.

TCHIKAYA, F. O. et al. Anacardium occidentale linn.(anacardiaceae) stem bark extract induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 4, 2011.

THAMEEM, F. et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 5, n. 2, p. 109-113, 2008.

THEOHARIDES, T. C. et al. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1822, p. 21–33, 2012.

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

THORN, C. F. et al. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 4, p. 237–242, 2011.

TORQUATO, D. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cahew tree gum. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, p. 505-507, 2004.

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

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **Pathogens and Disease**, v. 51, n. 3, p. 443-452, 2007.

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

TSIKAS, D. Measurement of nitric oxide synthase activity in vivo and in vitro by gas chromatography-mass spectrometry. **Nitric Oxide Protocols**, p. 81-103, 2004.

UDOFOT, O. et al. Cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines. **Integr Cancer Sci Therap**, v. 2, n. 5, p. 245-252, 2015.

VANDERHOOF, J. A. et al. Effects of dietary lipids on recovery from mucosal injury. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1226-1231, 1990.

VANNINI, F. et al. The dual role of iNOS in cancer. **Redox biology**, v. 6, p. 334-343, 2015.

VASCONCELOS, M. S. et al. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 12, p. 1648-1655, 2015.

VASCONCELOS, R. M. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis. **Journal of Dental Research**, p. 1-9, 2016.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VITORINO FILHO, R. N. L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (Anacardium occidentale L.) na terapêutica tópica de feridas**. 2011. 66p. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

VYAS, S. et al. Role of malondialdehyde in the serum of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **J Postgrad Med Inst**, v. 30, n. 1, p. 58-61, 2016.

YAO, D. et al. Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchimica Acta**, v. 147, n. 1, p. 1-20, 2004.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm. Res**, v. 55, p. 359-63, 2006.

YEUNG, C; Y. et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138746, 2015.

ZENG, F. et al. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. **Scientific reports**, v. 6, p. 23407, 2016.

ZHAO, L. et al. The in vivo and in vitro study of polysaccharides from a two-herb formula on ulcerative colitis and potential mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 151-59, 2014.

ZHANG, N. et al. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008.

ZUO, T. et al. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* and its enzymatically degraded fragments could prevent intestinal mucositis induced by chemotherapy in mice. **Food Funct**, v. 6, p. 415-422, 2015.

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

WALLACE, J. L. et al. Gaseous mediators in resolution of inflammation. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, v. 27, n. 3, p. 227-233, 2015.

WANG, Y.; MARSDEN, P. A. **Nitric Oxide Synthases: Gene Structure and Regulation**. In: IGNARRO, L.; MURAD, F. Nitric Oxide: Biochemistry, molecular biology and therapeutic implications. Academic Press, San Diego, California, EUA. 1995.

WENANDE, E. et al. Fractional laser-assisted topical delivery leads to enhanced, accelerated and deeper cutaneous 5- fluorouracil uptake. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2016.

WILHELM, M. et al. Prospective, Multicenter Study of 5-Fluorouracil Therapeutic Drug Monitoring in Metastatic Colorectal Cancer Treated in Routine Clinical Practice. **Clinical Colorectal Cancer**, v., p. 1-7, 2016.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2015.

ANEXO

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFPI



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Portales, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-900
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: cocopi@ufpi.edu.br




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) no tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil", registrada nº 208/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. GILBERTO SANTOS CERQUEIRA-Ciências Biomédica_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 04/11/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/ 2016 à Março/2018
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogêneo/ Swis
Nº de Animais	120
Peso/ Idade	20-30gf 1 mês
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Biotério Central e Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFPI.

Teresina, 04 de Novembro de 2016.


 Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora