



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

MARIA LUCIANNY LIMA BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA EPIISOPILOTURINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DA VIA NO/COX**

PARNAÍBA

2019

MARIA LUCIANNY LIMA BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA EPIISOPILOTURINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DA VIA NO/ COX**

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: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira
Coorientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

B238e Barbosa, Maria Lucianny Lima

Efeito protetor da epiisopiloturina no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos: papel da via no/ cox [manuscrito] / . – 2019.

126 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

MARIA LUCIANNY LIMA BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA EPIISOPILOTURINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DA VIA NO/COX**

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.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

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

Dr. Jand Venes Rolim Medeiros/Universidade Federal do Piauí-UFPI (Coorientador)

Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan/ Universidade de São Paulo- USP (Examinador externo)

Dedico essas linhas ao autor da vida e maior escritor de todos, Deus.

À minha família e a todos os professores que já passaram pela minha história.

AGRADECIMENTOS

Ao incomparável Deus! Amigo meu, amado meu, o meu coração palpita de gratidão a Ti, por ter plantado esse sonho em mim desde muito cedo. Obrigada Pai pelo o dom de aprender, por ter mostrado a minha vocação, obrigada pela presença constante do teu Santo Espírito em cada detalhe dessa jornada.

À minha mãezinha do céu Maria Santíssima, por tornar essa caminhada muito menos exaustiva, obrigada por me ensinar a superar com docilidade todos os desafios, por ser sempre o consolo para minha alma. Obrigada por sua preciosa intercessão junto ao teu filho Jesus.

À minha família, o alicerce seguro que tem me sustentado e estimulado a seguir em frente. Minha mãe Ana Lúcia e meu pai João Barbosa, por vocês vale a pena dar o meu máximo “Lembra-te do teu pai e de tua mãe quando te achares no meio dos poderosos” (Eclesiástico 23, 18).

Aos meus irmãos Carlos Henrique, Lucélia Lima e João Henrique, por todo apoio, ajuda e confiança.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira, por acreditar em mim, por me estimular a alçar voos mais altos, pelos conselhos e correções, por ser como um pai. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros pelas sugestões e contribuições para a concepção e execução do trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade Biotecnologia – BIOTEC na pessoa da Prof. Dra. Leiz Maria Costa Veras, por ter disponibilizado a Epiisopiloturina matéria prima para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens – NEMPI da UFC, pela acolhida. Agradeço de maneira especial a Josyanne Martins, Fátima Regina, Theydes Batista, Júnyor Lima e aos alunos de iniciação científica Mateus Lopes e Leonardo Lustosa, Delon Freitas, Vitória, Bárbara e Yandra.

À Profa. Dra. Renata Carvalho Leitão pelos escores histopatológicos, bem como, pelos conselhos, dicas e principalmente pela inspiração.

Ao laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFC, na pessoa da Roberta Costa pelo auxílio na execução dos testes bioquímicos.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza pela realização do *docking* molecular.

Ao Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos por aceitar participar da

banca de qualificação e pelas contribuições e sugestões para o aprimoramento do trabalho.

À professora Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan por aceitar participar da banca de defesa da dissertação.

Aos amigos do mestrado Larice Carvalho, Helder Pimenta, Lázaro Fidelis, Kethyma Moreira, Lorena Oliveira e Luana Gaudêncio, pela amizade, rizadas e aprendizados compartilhados.

Ao meu namorado Natanael Silva pela cumplicidade, orações e apoio durante esse período.

Às minhas amigas e irmãs de fé Charliene Pereira, Amanda Carvalho e Dayanne Rannayne.

Ao grupo de oração Guerreiros da UFC obrigada por tornarem minhas quartas-feiras mais leves e felizes.

Às amigas da Psicologia, Hédina Rodrigues e Laís Lima, pela estadia em Parnaíba, pelos conselhos, risos e momentos de descontração.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho, muito obrigada! “Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (Antoine de Saint-Exupéry).

Ora et Labora "Ore como se tudo dependesse de Deus e
trabalhe como tudo dependesse de você".

(São Bento)

RESUMO

A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU), que ainda não possui tratamento efetivo, de modo que os produtos de origem natural têm sido amplamente pesquisados como proposta terapêutica para essa patologia. A Epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide derivado da *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, que apresenta potencial antinociceptivo, anti-helmíntico, antioxidante, anti-inflamatório. Assim, sendo a MI uma condição patológica caracterizada pela inflamação e a EPI um composto potencialmente anti-inflamatório, objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito da EPI na MI induzida por 5-FU. Inicialmente, realizou-se o protocolo OECD para a avaliação toxicológica. Os animais receberam doses elevadas de EPI via oral e em seguida foram observados durante 14 dias e avaliados quanto ao número de leucócitos circulantes, a variação ponderal, ingestão de ração, água e peso relativo dos órgãos (rins, fígado, baço, coração e testículo). Posteriormente, investigou-se o efeito da EPI na MI, os animais foram submetidos à indução da MI por meio da administração do 5-FU (450 mg/kg) via intraperitoneal (i.p), e tratados com EPI i.p, por quatro dias. Após a eutanásia realizou-se a remoção do duodeno, jejuno e íleo para avaliação do efeito da EPI na mucosite, através dos parâmetros de variação ponderal, número de leucócitos circulantes, análise histopatológica, morfométrica e avaliação do número de mastócitos. Após essa fase selecionou-se a dose de 10 mg/kg e o segmento jejuno para a execução do mesmo protocolo, porém com o uso do inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe). Avaliou-se então a dosagem de Malondialdeído (MDA), o número de células calciformes, além do envolvimento da COX-2 na MI por meio de imunohistoquímica. Por fim, foi realizada a modulação do óxido nítrico (NO) na MI com L-NAME e L-arginina, o envolvimento do NO foi avaliado por imunohistoquímica para iNOS e *Docking* molecular. Verificou-se que os animais tratados com EPI não apresentaram sinais clínicos de toxicidade, nem alterações no número de leucócitos circulantes e peso relativo dos órgãos. Observou-se ainda que na MI a EPI não atenuou a perda de peso, porém foi capaz de prevenir as alterações morfométricas, histopatológicas e a leucopenia, preveniu o aumento do número de mastócitos, reduzir a dosagem de MDA e preservou as células calciformes, bem como diminuiu de forma estatisticamente significativa a área imunomarcada para COX-2 e iNOS, associada à forte interação molecular da EPI com a iNOS. Diante disso, constatou-se que a EPI é pouco tóxica e que apresentou efeito protetor na mucosite intestinal induzida por 5-FU, reduzindo parâmetros inflamatórios e oxidativos com participação da via COX-2 e NO.

Palavras-chave: Quimioterapia. Inflamação. Mucosite. Toxicologia

ABSTRACT

Intestinal mucositis (MI) is a side effect of the chemotherapy 5-Fluorouracil (5-FU), which does not yet have effective treatment, so that products of natural origin have been widely researched as a therapeutic proposal for this pathology. Epiisopiloturin (EPI) is an alkaloid derived from *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, which has antinociceptive, anthelmintic, antioxidant, anti-inflammatory potential. Thus, since MI is a pathological condition characterized by inflammation and PPE is a potentially anti-inflammatory compound, the objective of this study was to evaluate the effect of EPI on IM induced by 5-FU. Initially, the OECD protocol for the toxicological evaluation. The animals received high doses of EPI orally and then were observed for 14 days and evaluated for the number of circulating leukocytes, weight variation, feed intake, water and relative weight of the organs (kidneys, liver, spleen, heart and testis). Subsequently, the effect of EPI on MI was investigated, animals were submitted to MI induction by intraperitoneal (i.p) administration of 5-FU (450 mg / kg) and treated with i.p. EPI for four days. After euthanasia, the duodenum, jejunum and ileum were removed to evaluate the effect of EPI on mucositis, through the parameters of weight variation, number of circulating leukocytes, histopathological analysis, morphometric analysis and mast cell count. After this phase the dose of 10 mg / kg and the jejunum segment were selected for the execution of the same protocol, but with the use of the selective COX-2 inhibitor (Celecoxib). The dosage of Malondialdehyde (MDA), the number of goblet cells, and the involvement of COX-2 in IM were evaluated by immunohistochemistry. Finally, modulation of nitric oxide (NO) in MI with L-NAME and L-arginine was performed, the involvement of NO was evaluated by immunohistochemistry for iNOS and molecular docking. It was found that the animals treated with EPI had no clinical signs of toxicity or changes in the number of circulating leukocytes and relative body weight. It was also observed that in IM, PPE did not attenuate weight loss, but was able to prevent morphometric, histopathological and leucopenia changes, prevented the increase of mast cells, reduce MDA dosage and preserved goblet cells as well as a statistically significant decrease in the immunolabelled area for COX-2 and iNOS, associated with the strong molecular interaction of EPI with iNOS. In view of this, it was verified that EPI is not very toxic and showed a protective effect on intestinal mucositis induced by 5-FU, reducing inflammatory and oxidative parameters with COX-2 and NO pathway.

Keywords: Chemotherapy. Inflammation. Mucositis. Toxicology

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU- Fluoruracila
ANOVA- Análise de Variância
COX-2- Ciclooxygenase 2
dTMP- Monofosfato de desoxitimidina
DTNB- Ácido ditio-nitrobenzoico
EDTA- Ácido etilendiamino Tetra-Acético
ERO- Espécies reativas de Oxigênio
FdUMP- Monofosfato fluorodeoxiuridina
FdUTP- Trifosfato fluorodeoxiuridina
FUTP- Trifosfato fluororidina
GSH- Glutathiona
HE- Hematoxilina-Eosina
i.p- Intraperitoneal
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6- Interleucina 6
iNOs- Óxido Nitritico sintetase induzida
MDA- Malondialdeído
MPO- Mieloperoxidase
MI-Mucosite Intestinal
NF- κ B- Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS- Solução Tamponada de Fosfato
pH- Potencial Hidrogênico
rpm-Rotações por minuto
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
TP- Timidina fosforilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das bases nitrogenadas pirimidinas uracila e 5-fluorouracil.....	21
Figura 2: Mecanismo de ação do 5-fluorouracil.....	22
Figura 3: A patobiologia da mucosite oral em cinco fases	25
Figura 4: Fisiopatologia da mucosite intestinal.....	26
Figura 5: Planta arbustiva <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex. Wardeworth.....	34
Figura 6: Estrutura química de alcaloides isolados da <i>P. microphyllus</i>	35
Figura 7: Atividades biológicas da Epiisopiloturina.....	38
Figura 8: <i>Docking</i> molecular da EPI com COX-2	40
Figura 9: Esquema de indução e tratamento da mucosite intestinal	44
Figura 10: Coleta das amostras de teciduais	47
Figura 11: Delineamento experimental.....	48
Figura 12: Avaliação morfométrica de vilos e criptas	49
Figura 13: Sistema de escores definido por Woo et al.(2000).....	50
Figura 14: Avaliação da toxicidade aguda da EPI sobre os parâmetros de ingestão de água, ração e do ganho de peso.....	54
Figura 15: Avaliação do efeito da Epiisopiloturina sobre o número de leucócitos.....	55
Figura 16: EPI não atenuou a perda ponderal provocada pela mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos	56
Figura 17: Efeito da EPI na contagem de leucócitos de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU	57
Figura 18: Fotomicrografias dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de camundongos e efeito protetor da EPI sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU	59
Figura 19: Efeito do tratamento com EPI na altura dos vilos no duodeno, jejuno e íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU 5-FU.....	62
Figura 20: Efeito do tratamento com EPI nas alterações morfométricas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	64
Figura 21: Efeito do tratamento com EPI Básica na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	66

Figura 22: A EPI reduz a contagem de mastócitos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU...	68
Figura 23: EPI reduz o número de mastócitos no duodeno e jejuno de camundongos com mucosite intestinal induzida pelo 5-FU	69
Figura 24: EPI previne a redução do número de células caliciformes provocada pelo 5-FU no modelo de mucosite intestinal	70
Figura 25: EPI previne a redução do número de células caliciformes provocada pelo 5-FU no modelo de mucosite intestinal	71
Figura 26: EPI reduz os níveis teciduais de MDA no jejuno de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	72
Figura 27: Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcagem para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU	74
Figura 28: Fotomicrografias de Imunohistoquímica para COX-2 do segmento jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com EPI	75
Figura 29: Envolvimento da cicloxigenase2 (COX-2) no efeito protetor da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos	78
Figura 30: Fotomicrografias do segmento jejuno de camundongos na avaliação do envolvimento da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	79
Figura 31: Avaliação do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcagem para iNOS em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	80
Figura 32: Fotomicrografias de Imunohistoquímica para iNOS do segmento jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com EPI.....	81
Figura 33: Envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	84
Figura 34: Fotomicrografias do segmento jejuno de camundongos na avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	85
Figura 35: <i>Docking</i> molecular da EPI com Inos.....	87
Figura 36: Modelo hipotético da ação farmacológica da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Efeitos tóxicos dos quimioterápicos.....	20
Tabela 1: Efeito da EPI sobre o peso relativo dos órgãos	55
Tabela 2: Repercussões do tratamento com EPI sobre os escores Histopatológicos em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Câncer e quimioterapia.....	19
2.2	5-Fluorouracil	20
2.3	Mucosite	23
2.4	Mucosite intestinal	25
2.5	Mediadores inflamatórios na mucosite	27
2.5.1	NF-kB	28
2.5.2	TNF- α , IL1- β , IL6	29
2.5.3	COX-2.....	30
2.6	Repercussões nutricionais da mucosite.....	31
2.7	Produtos naturais no tratamento da mucosite intestinal	32
2.8	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapfex Wardlew “Jaborandi”	33
2.9	Alcaloides isolados da <i>P.microphyllus</i>.....	34
2.10	Epiisopiloturina	36
2.11	<i>Docking</i> molecular da epiisopiloturina	38
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Geral.....	40
3.2	Específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Coleta do Material Vegetal.....	41
4.2	Isolamento e purificação da Epiisopiloturina	41
4.3	Fármacos, reagentes, materiais e soluções	41
4.4	Animais	41
4.5	Considerações éticas	42
4.6	Avaliação toxicológica da EPI.....	42
4.7	Indução e tratamento da mucosite intestinal	43

4.8	Grupos experimentais	43
4.8.1	Definição da melhor dose.....	44
4.8.2	Avaliação do papel da cicloxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da EPI	44
4.8.3	Avaliação do papel do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da EPI.....	45
4.9	Coleta das amostras de tecidos	46
4.10	Parâmetros avaliados	47
4.10.1	Avaliação ponderal	47
4.10.2	Análise histopatológica e morfométrica	48
4.10.3	Leucograma	49
4.10.4	Análise da concentração de mastócitos	49
4.10.5	Mensuração da produção de muco intestinal com coloração PAS.....	50
4.10.6	Imunohistoquímica para iNOS e COX.....	50
4.10.7	Docagem moléculas com a isoforma de iNOS.....	51
4.11	Análise estatística	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Avaliação toxicidade aguda da EPI	52
5.2	Efeito do tratamento com EPI sobre a análise ponderal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.	55
5.3	Avaliação do efeito da EPI sobre o número de leucócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU.	56
5.4	Efeito do tratamento com EPI sobre as alterações histopatológicas em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.	57
5.5	Efeito do tratamento com EPI nos escores histopatológico de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.	59
5.6	Efeito do tratamento com EPI nas alterações morfométricas na altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.	60

5.7	Efeito do tratamento com EPI nas alterações morfológicas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	62
5.8	Efeito do tratamento com EPI na relação vilos/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	64
5.9	Efeito do tratamento com EPI na contagem de mastócitos dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	66
5.10	Efeito da EPI sobre a produção de muco no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.	69
5.11	Efeito da EPI sobre os níveis teciduais de MDA na mucosite intestinal induzida por 5-FU	71
5.12	Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcção para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU	72
5.13	Avaliação do envolvimento da COX-2 no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	75
5.14	Avaliação do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcção para iNOS em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU	79
5.15	Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	81
5.16	<i>Docking</i> molecular da EPI com iNOS	85
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE A – FÁRMACOS E REAGENTES.....	115
	APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA.....	116

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFC.....	124
ANEXO B- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFPI.....	125

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e a invasão de tecidos e órgãos (COLLER, 2014). Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2018).

O tratamento do câncer envolve a realização de procedimentos cirúrgicos, radioterapia e terapia sistêmica e a quimioterapia. Os medicamentos de quimioterapia exercem os seus efeitos ao interferir no ciclo celular e no processo de mitose, provocando uma maior proporção de morte celular em células cancerosas em oposição às normais (DICKENS; AHMED, 2018). Todavia, os quimioterápicos também podem ser citotóxicos na divisão celular normal, em especial às células com alta rotatividade mitótica, como o osso, medula e mucosas. Neste sentido, a mucosite constitui-se como um dos efeitos colaterais mais significativos no tratamento do câncer e é caracterizada como uma condição complexa resultante da inflamação da mucosa (DICKENS; AHMED, 2018; REYES-GIBBY et al., 2017; KARBELKAR; MAJUMDAR, 2016).

Entre os quimioterápicos de grande relevância clínica e uso terapêutico está o 5-Fluorouracil (5-FU) que é também considerado um dos maiores responsáveis por desencadear a mucosite em pacientes durante o tratamento. Esta, por sua vez, é denominada mucosite oral ou mucosite intestinal, dependendo da área da inflamação (CUBA et al., 2015).

A mucosite intestinal resulta em atrofia de vilosidades, ulceração e perda da função da barreira intestinal. Este mecanismo biológico leva os pacientes a sofrerem de náuseas, vômitos, diarreia, dor, perda de peso, e necessidade de nutrição enteral ou parenteral, tal situação pode ainda provocar estado de desnutrição e desequilíbrio eletrolítico, acarretando conseqüentemente um risco aumentado de sepse e morte (KUIKEN et al., 2016; KIM et al., 2015).

Segundo Bastos et al. (2016) ainda não existe uma terapia eficaz para esta condição clínica, ficando evidente a necessidade de novas terapias preventivas, uma vez que a mucosite pode resultar em necessidades de redução das doses do quimioterápico, assim como aumento dos custos com saúde, permanência prolongada no hospital, comprometimento do estado nutricional e conseqüentemente, da qualidade de vida do paciente.

Devido à gravidade do problema, muitos pesquisadores buscaram investigar novas soluções para o tratamento da mucosite intestinal (KATO et al., 2017; CAIXUAN et al., 2017; OH et al., 2017). A investigação da eficácia dos produtos de origem natural para o tratamento dessa patologia também detém papel de destaque na busca científica pelo desenvolvimento de alternativas para esse grave efeito colateral. Algumas substâncias derivadas de plantas foram investigadas como a *Curcuma longa* L., *Bidens pilosa* L., *Anacardium occidentale* L., e β -Cariofileno (BASTOS et al., 2016; ÁVILAA et al., 2015; MIRANDA, 2018; SILVA, 2018).

Em um contexto onde as substâncias derivadas de plantas com potencial terapêutico estão sendo continuamente investigadas, é possível destacar a *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth (jaborandi, Rutaceae) que é considerada uma espécie medicinal brasileira de grande importância, principalmente devido ao conteúdo de alcaloides encontrado na mesma. Foram identificados 14 alcaloides na *Pilocarpus*, entre eles a pilocarpina, pilosina, anidropilosina, pilocarpidina, isopilocarpidina, isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (EPI) (LIMA et al., 2017).

A EPI já demonstrou eficácia contra a esquistossomose (CAMPELO et al., 2016) e vem sendo investigada por seu potencial anti-inflamatório, antinociceptivo (SILVA et al., 2013) e anti-helmíntico (GUIMARÃES et al., 2015). Nicolau et al. (2017) avaliaram o efeito do cloridato de EPI sobre o dano gástrico e intestinal induzido por naproxeno. Eles observaram que a substância foi capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e o estresse oxidativo, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Mesmo com os resultados animadores obtidos, nota-se, contudo, que ainda não existe nenhum estudo que avalie o efeito desse alcaloide sobre a mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.

Assim, tendo em vista a ineficácia do tratamento para esse efeito colateral, bem como, as graves repercussões sintomatológicas, nutricionais e terapêuticas provocadas, se faz crucial a existência de investigações científicas que contribuam significativamente para a solução desse problema. Nesse sentido, a EPI apresenta-se como um composto com um grande potencial para investigações, por se tratar de um produto de origem natural ainda pouco explorado e que possui propriedade anti-inflamatória, que pode vir a se tornar uma promissora ferramenta terapêutica para o tratamento da mucosite intestinal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer e quimioterapia

O câncer é definido, em esfera mundial, como um problema de saúde pública de grande importância epidemiológica no que se refere à incidência e a morbimortalidade. Em termos gerais caracteriza-se como um grupo de mais de 100 doenças, onde ocorre o acometimento de parte do corpo, assinalada pelo crescimento descontrolado de células anormais que perderam a capacidade de regulação, sendo destacada com um estigma de doença incurável, remetendo o ser humano ao confronto com a finitude da vida (SANTOS et al., 2012; KUMAR et al.; 2013).

Em 2012, o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes, sendo o câncer de fígado, pulmão, estômago, colorretal e câncer de mama, os que provocaram maior mortalidade. Além disso, as estimativas mostram que nas próximas duas décadas espera-se um aumento dos atuais 14 milhões de novos casos anualmente, para 22 milhões (OMS, 2014).

Os tratamentos mais utilizados atualmente para o câncer abrangem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e novas variantes de terapia, tais como as terapias-alvo que procuram abranger apenas as células neoplásicas (DICKENS; AHMED, 2018). A quimioterapia é caracterizada pela administração de substâncias químicas, isoladas ou associadas com outros medicamentos que agem nas diferentes fases do ciclo celular, visando o tratamento da doença sistemicamente. Essa classe de terapêutico não abrange apenas células cancerígenas, como também destroem as normais, uma vez que os dois tipos seguem as mesmas fases do ciclo celular normal (GOLAN, 2014).

O emprego da quimioterapia tem se destacado como uma das maneiras mais importantes e propícias para o combate do câncer. Portanto, alguns fatores devem ser analisados para o seu planejamento, como a idade do paciente, seu estado nutricional, presença ou não de infecções, as funções renais, hepática e pulmonar, tipo de tumor, a presença de metástase e a condição de vida do paciente (NICOLUSSI; SAWADA et al., 2009; JORGE; SILVA, 2010). Simonson (2015) considera que a quimioterapia do câncer produz potenciais efeitos secundários

graves e por vezes letais, permitindo que os oncologistas cultivem a relação positiva entre risco e benefício.

O quadro abaixo (Quadro 1) mostra exemplos de efeitos tóxicos dos quimioterápicos, conforme a época e que se manifestam após aplicação.

Quadro 1: Efeitos tóxicos dos quimioterápicos

Precoces (0 a 3 dias)	Imediatos (7 a 21 dias)	Tardio (meses)	Ultra tardio (meses ou anos)
Náuseas	Mielossupressão	Imussupressão	Infertilidade
Vômitos	Mucosite	Miocardiopatia	Carcinogênese
Mal estar	Cistite hemorrágica	Hiperpigmentação	Distúrbios do crescimento
Adinamia	Imussupressão	Neurotoxicidade	Cirrose hepática
Artralgias	Anemia	Nefrotoxicidade	Mutagênese
Agitação	Plaquetopenia	Alopecia	Fibrose
Exatemas	Aumento dos efeitos da radiação	Pneumonia	Sequelas no Sistema Nervoso Central
Flebites	Granulocitemia	Esclerodemia	

Fonte: Adaptado de INCA, 2017

Tendo em vista a diversidade de efeitos colaterais provocados pelos diferentes quimioterápicos, por vezes se faz necessário a redução da dose ou aumento no intervalo de administração das drogas (DAUGHTON; RUBOY, 2013). Assim, a elaboração de medidas mais eficazes no tratamento de efeitos adversos causados pela quimioterapia tem papel crucial para a melhora da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que podem determinar na sua disposição para completar o tratamento (CHAN; ISMAIL, 2014).

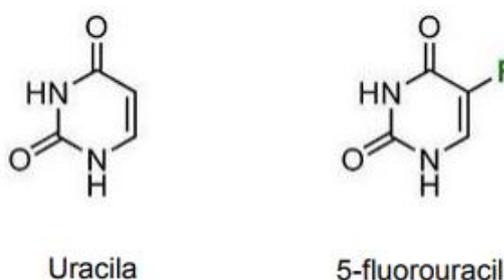
2.2 5-Fluorouracil

O 5-FU é um análogo da uracila (Figura 1) que pertence à classe das fluoropirimidinas. Esse fármaco é um antimetabólito, isto é, pertence a um grupo que

abrande drogas antineoplásicas que exercem maior efeito no tratamento oncológico (CHU; DEVITA, 2001; TODEA et al., 2018).

Desenvolvido na década de 50, o 5-FU tem o objetivo de tratar pessoas com câncer por meio da inibição de processos fundamentais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo desse modo, a síntese e metabolismo de novas células (HEIDELBERGER et al., 1957; RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

Figura 1: Estrutura das bases nitrogenadas pirimidinas uracila e 5-fluorouracil



Fonte: Adaptado de VALENZUELA; NEIDIGH; WALL, 2014.

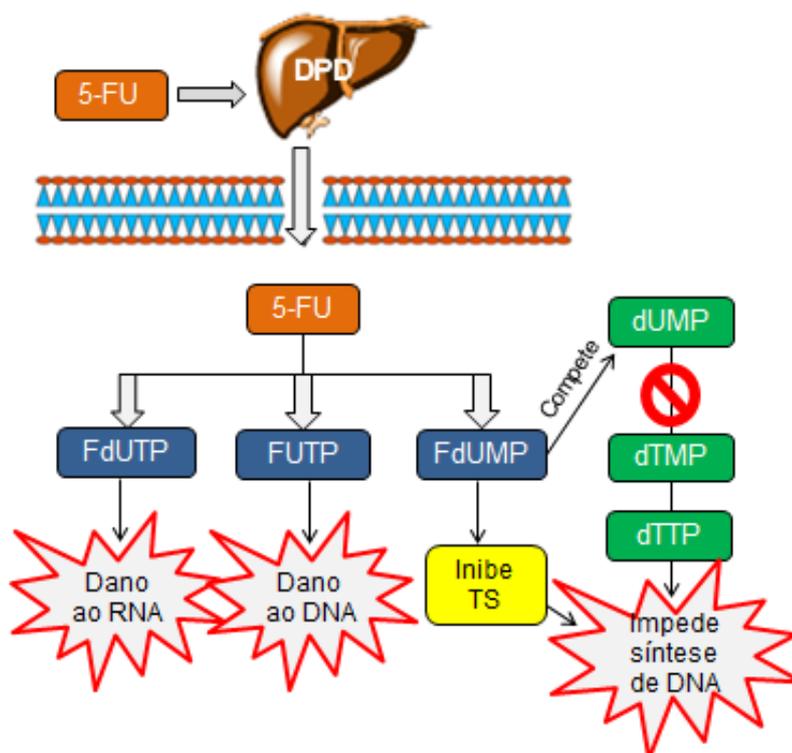
No que diz respeito ao processo de metabolização do 5-FU (Figura 2), sabe-se que o mesmo requer múltiplas conversões para formar metabólitos ativos (KESHISHYAN et al., 2015). A sua entrada na célula pode ocorrer por mecanismo de transporte facilitado, em razão de sua semelhança estrutural com a uracila, bem como por transporte não facilitado. Intracelularmente o 5-FU é convertido em três principais metabólitos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). A citotoxicidade do 5-FU é caracterizada pela incorporação errada de fluoronucleótidos no RNA e DNA e à inibição da enzima timidilato sintase (TS) que é relacionada à síntese de novos nucleotídeos (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; GREM, 1997).

A enzima que cataboliza o 5-FU é a dihidropirimidina desidrogenase (DPD), que converte 5-FU em dihidrofluorouracilo (DHFU). Mais de 80% do 5-FU administrado é normalmente catabolizado principalmente no fígado, onde DPD é abundantemente expressa (HARRIS, 1989).

Em condições normais a TS transfere o grupo metil do 5,10 – metilenotetraidrofolato para a deoxiuridina monofosfato (dUMP), formando a

deoxitimidina monofosfato (dTMP), a qual seria convertida em deoxitimidina trifosfato (dTTP), um dos quatro deoxirribonucleotídeos essenciais para a síntese do DNA. Todavia o FdUMP metabólito ativo do 5-FU compete com dUMP ao se ligar ao TS e ao folato, formando um complexo ternário covalente. Esse complexo bloqueia o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo, inibindo a síntese de dTMP. Desse modo, há um desbalanço nas concentrações de outros deoxinucleotídeos, e a diminuição das concentrações de dTTP além do aumento de deoxiuridina trifosfato (dUTP). Tanto dUTP quanto a FdUTP podem ser incorporados ao DNA. Tal desproporção de deoxinucleotídeos e aumento de dUTP podem causar destruição do DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; PINEDO; PETERS, 1988; CHANG et al., 2012).

Figura 2: Mecanismo de ação do 5-fluorouracil



Fonte: Adaptado de Araújo, 2013. A citotoxicidade do 5-FU é atribuída a três mecanismos: incorporação do fluorouridina trifosfato (FUTP) no RNA, incorporação do fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA e inibição da enzima Timidilato Sintase (TS). 5-FU pode ser convertido a fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) e se ligar a Timidilato Sintase (TS), inibindo a sua atividade e causando um desequilíbrio na síntese dos nucleotídeos.

Conforme observado à ação do 5-FU não se limita somente às células neoplásicas, com isso, essa droga pode atuar em células normais, acarretando consideráveis efeitos colaterais que podem em certas situações determinar desde a redução do esquema terapêutico, como a sua total interrupção, provocando dessa forma graves prejuízos na eficácia do tratamento oncológico (VILLA; SONIS, 2015).

Os efeitos adversos desse quimioterápico variam consideravelmente de acordo com o tratamento, a dose e a via de administração. Além disso, são mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação. Entre os efeitos colaterais do 5-FU aqueles que são considerados mais comuns são a mucosite, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia, e em meio à necessidade de manejo das diversas toxicidades relacionadas ao uso de 5-FU a incidência de mucosite acabou por aumentar nos últimos anos (VERDE, 2007; VANLANCKER et al., 2016).

2.3 Mucosite

As mucosas são camadas brandas, lisas e úmidas de células epiteliais e tecido conjuntivo que revestem as passagens e cavidades do organismo que têm contato direto ou indireto com o meio externo e servem como importante mecanismo de proteção. A inflamação dessa área é dada o nome de mucosite, que é considerada uma toxicidade complexa e limitante que provoca alguns efeitos adversos na cavidade bucal (mucosite oral) e/ou no intestino (mucosite intestinal) (BORGES; MONTANHA; NUNES, 2014; REYES-GIBBY et al., 2017).

A mucosite gastrointestinal é um efeito colateral debilitante do tratamento quimioterápico. Atualmente sem tratamento disponível, trata-se de uma condição dolorosa que pode requerer o uso de analgésicos fortes, e provocar dificuldades para comer, beber e engolir, muitas vezes resultando na necessidade de nutrição enteral. Adicionalmente a mucosite tem sido associado com maior tempo de hospitalização e ao desenvolvimento de infecções (WORTHINGTON, 2011; VANLANCKER et al., 2016).

O mecanismo pelo qual ocorre a mucosite se baseia no fato de que as mucosas apresentam alta atividade mitótica, além de elevado *turnover* celular. Devido ao alto grau de descamação celular, há necessidade contínua de

multiplicação celular para recobrir a mucosa, que é então, rapidamente afetada (SONIS, 2004; SAWADA et al., 2009).

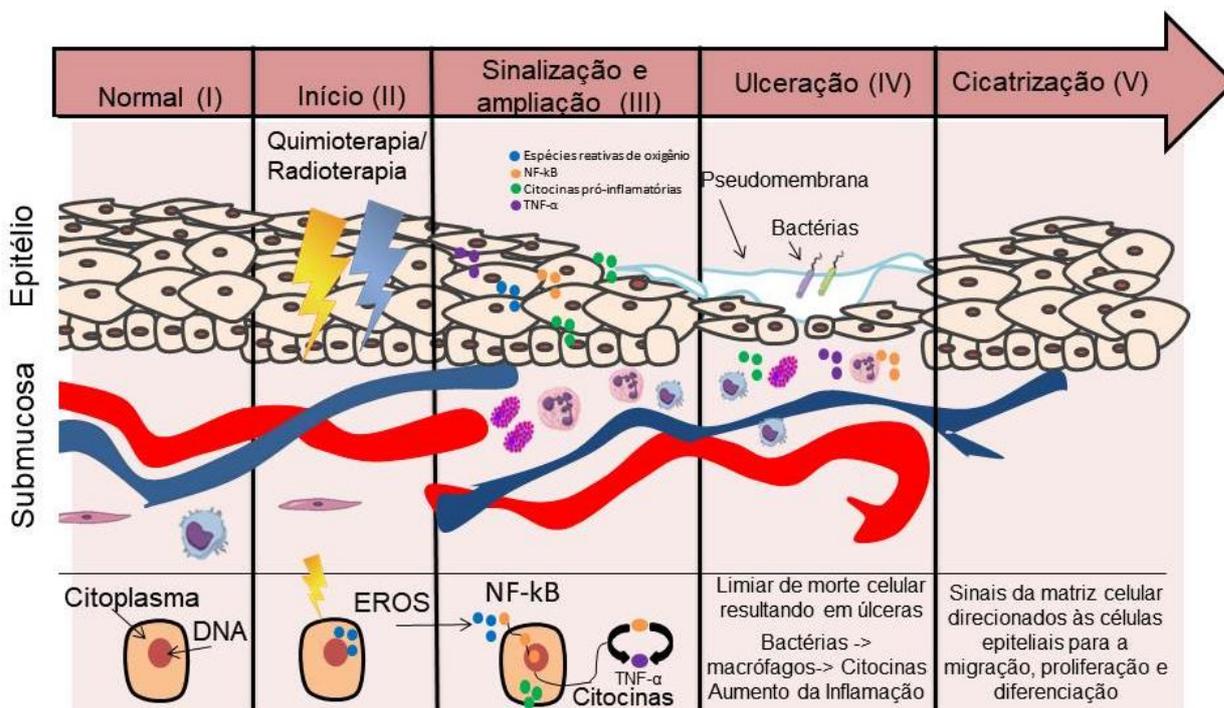
Sonis et al. (2004) descreveram a mucosite oral como um processo biológico, que pode ser dividido em cinco fases sequenciais: iniciação; sinalização; amplificação; ulceração e cicatrização (Figura 3). Assim, o curso evolutivo desta patologia é representado por um complexo de alterações epiteliais e no tecido conjuntivo (LIMA, 2004; SONIS, 2009).

De início, a aplicação de radiação e/ou quimioterapia danifica diretamente o DNA e causa quebras nas fitas, resultando em morte clonogênica, isto é, a perda da capacidade de divisão celular das células basais epiteliais, além da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesta fase ainda não é possível visualizar danos na camada da mucosa, porém se inicia uma série de eventos na submucosa (SONIS et al., 2004; FILHO, 2014).

Posteriormente as ROS estimulam as vias de transdução que sinalizam por sua vez a ativação dos fatores de transcrição, como a p53 e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), este induz a suprarregulação de diversos genes tóxicos para a mucosa, entre eles as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que por conseguinte provocam dano ao tecido conjuntivo e ao endotélio acarretando apoptose das células epiteliais basais e uma cascata de eventos que levam a ulceração epitelial (SCULLY; SONIS, 2006; BOMBA et al., 2013). Também se acredita que alterações da microbiota oral correlacionam-se com a progressão e agravamento da mucosite, visto que a colonização bacteriana e / ou a colonização secundária das úlceras prolongam os tempos de cicatrização correspondentes (XIAO-XIA et al., 2017).

A cicatrização se inicia com um sinal da matriz extracelular, o que leva a proliferação, diferenciação e migração das células epiteliais e restauração da integridade da mucosa (SONIS et al., 2004).

Figura 3: A patobiologia da mucosite oral em cinco fases



Fonte: Adaptado de SONIS, 2009. Processo de desenvolvimento da mucosite oral em cinco estágios: iniciação; primeira resposta ao dano (mensagem e sinalização); amplificação; ulceração e cicatrização.

2.4 Mucosite intestinal

A forma intestinal da mucosite é um efeito colateral comum experimentado por pacientes sob quimioterapia ou radioterapia abdominal para tratamento de cânceres que podem ou não ser originários do trato alimentar. Contudo, não é um processo mediado exclusivamente a nível intestinal, observando-se concomitantemente, lesões orais, êmese, anorexia, indisposição geral, além de dor abdominal e principalmente, diarreia, o que provoca a redução da qualidade de vida e até mesmo a interrupção do tratamento (CAIXUAN et al., 2017; KISSOW et al., 2012).

Estudos que avaliaram a administração de 5-FU em animais observaram que o quimioterápico provoca grave MI, a qual é morfológicamente caracterizada pelo encurtamento e destruição de criptas intestinais e intensa infiltração de células inflamatórias, acompanhada de sintomas como diarreia e perda de peso corporal (WU et al., 2011; CAIXUAN et al., 2017).

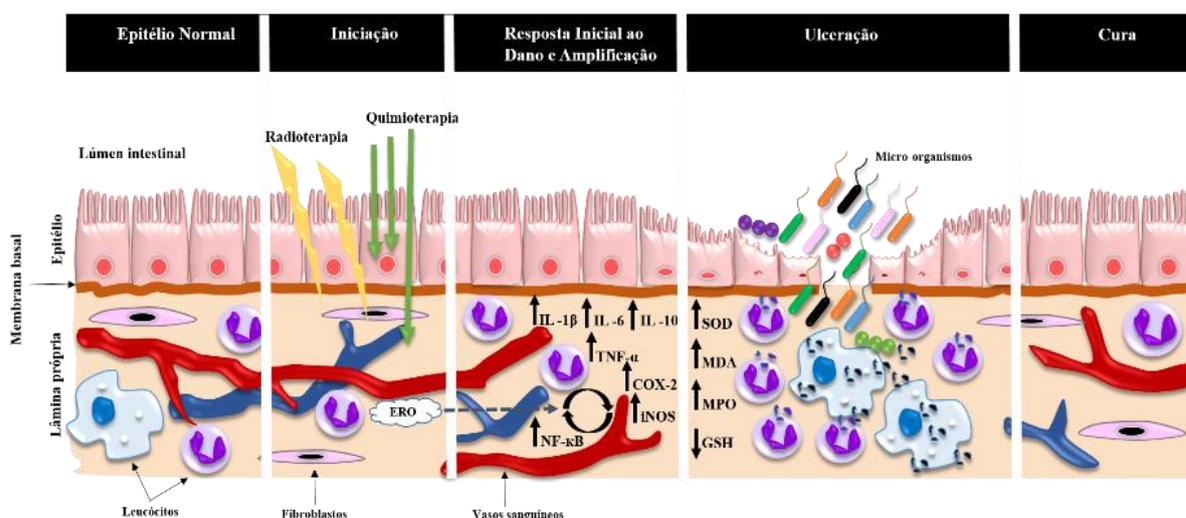
Os mecanismos patogênicos da mucosite intestinal induzida por 5-FU são complexos e heterogêneos, e incluem toxicidade, apoptose, hipo-proliferação, estresse oxidativo e inflamação anormal (YASUDA et al., 2012; RTIBI et al., 2018).

A instalação do estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) estão entre as principais causas de dano e morte celular após a exposição da mucosa intestinal às drogas quimioterápicas (LEE et al., 2009). Esses distúrbios no estado normal de células podem causar efeitos tóxicos através da produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes da célula, incluindo proteínas e lipídios (SENER et al., 2012).

Rtibi et al. (2017) em seu estudo verificou que a intoxicação com 5-FU na mucosite intestinal provoca o esgotamento das atividades das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), bem como efeitos deletérios sobre antioxidantes não enzimáticos, como grupos sulfidrilo. Além disso, foi demonstrado também um aumento apreciável de MDA que é um importante marcador de peroxidação lipídica.

No que diz respeito ao processo de desenvolvimento da MI sabe-se que diferentemente da mucosite oral a MI não apresenta a divisão de fases de desenvolvimento bem delimitadas (COSTA, 2016). A figura 4 apresenta o esquema de desenvolvimento da mucosite intestinal.

Figura 4: Fisiopatologia da mucosite intestinal



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 beta; IL-6: Interleucina 6; IL-10: Interleucina 10; SOD: Superóxido Dismutase; MDA: Malondialdeído; MPO: Mieloperoxidase; GSH: Glutaciona reduzida.

A MI é, portanto, associada com a ruptura da barreira intestinal, e encontra-se relacionada a um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose de células epiteliais do intestino. Duas disfunções têm sido claramente demonstradas na mucosite intestinal: uma diminuição da proliferação e maior apoptose em células das criptas intestinais na fase aguda induzida pelo efeito citotóxico e citostático do 5-FU. A hiperplasia das criptas e aumento compensatório da proliferação celular são elementos necessários para a recuperação da mucosa após a lesão (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Atualmente, não há tratamentos efetivos para mucosite intestinal, assim sendo, é crucial o desenvolvimento de regimes terapêuticos alternativos que proporcionem melhora da ação dos quimioterápicos, por meio da amenização dos efeitos colaterais (OH *et al.*, 2017). Levando-se em consideração, que de modo geral, a terapêutica dessa patologia se concentra no controle da dor, na reidratação, no tratamento básico do intestino, ou até mesmo na redução da dose, duração e intensidade de radiação e quimioterapia (NAIDU *et al.*, 2004).

Entre as medidas clínicas atuais para manejo da diarreia estão as intervenções farmacológicas, com loperamida, enemas de sucralfatos, sulfasalazina, oxigênio hiperbárico e os probióticos, não existindo agente que possa efetivamente controlar os mecanismos patobiológicos subjacentes à droga quimioterápica anticancerígena (VAN *et al.*, 2015). Nesse contexto muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de preencher essa lacuna terapêutica (OH *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; CAIXUAN *et al.*, 2017; KATO *et al.*, 2017).

2.5 Mediadores inflamatórios na mucosite

Durante o curso da mucosite intestinal existe a contribuição de diversos mediadores inflamatórios, isto é, compostos capazes de ativar ou aumentar aspectos específicos da inflamação. Com a quimioterapia ocorre a quebra das fitas de DNA que provocam a produção de espécies reativas de oxigênio que por sua vez desencadeia o processo, denominado de super-regulação caracterizado pela ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B, produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β e IL-6) e da enzima COX-2. As citocinas são mediadores inespecíficos da resposta inflamatória, com atividades quimiotáticas

consideradas como fator chave na gênese da resposta inflamatória, responsáveis por levar à injúria tecidual através de apoptose das células (SONIS, 2007; SONIS, 2013). Assim, tendo em vista a importante contribuição de tais mediadores inflamatórios para a MI se faz crucial o melhor entendimento dos mesmos.

2.5.1 NF- κ B

O estresse oxidativo e a inflamação desempenham um papel vital na toxicidade gastrointestinal induzida por 5-FU. As drogas quimioterápicas causam a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS), que desempenham papel vital na translocação de fator nuclear (NF) κ B via ativação do I κ B (inibidor de κ B) quinase, provocando regulação positiva dos genes de resposta ao estresse, incluindo o NF- κ B (Al-ASMARI et al., 2015; Al-ASMARI et al., 2016).

Definido como uma família de fatores de transcrição latente e indutível, o NF- κ B é fundamental no controle da resposta inflamatória (COLLINS; MITXITORENA; CARMODY, 2016).

O NF- κ B, provavelmente desempenha o papel mais proeminente no desenvolvimento e função do sistema imunológico, quando desregulado, contribui para a fisiopatologia da doença inflamatória (HAYDEN; GHOSH, 2012). Um estudo realizado por Chang et al. (2012) demonstrou que tal molécula desempenhou papel central na rede biológica regulada por 5-FU.

A potencialização do processo inflamatório pelo NF κ B, se dá por meio da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além de receptores de citocinas. As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por iniciar a inflamação em resposta à lesão tecidual (SULTANI et al., 2012; GOLAN et al., 2014).

Além disso, a síntese de todas estas proteínas é mediada por uma via de sinalização dependente de NF- κ B (SHIH; WANG, YANG, 2015). Também existe relação entre a sinalização de NF- κ B e expressão de lipoxigenases e ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), isso ocorre devido a capacidade do NF- κ B aumentar a síntese de eicosanoides, que são os mediadores lipídicos mais importantes da inflamação (MUQAKU et al., 2016).

Por conseguinte, o controle da ativação de NF- κ B pode ser considerado uma

estratégia potente para o tratamento da inflamação, desse modo existe uma tendência para o desenvolvimento de estudos nesse sentido (CHANG et al., 2012).

2.5.2 TNF- α , IL1- β , IL6

Fatores de necrose tumoral (TNF) referem-se a um grupo de citocinas que estão envolvidas na inflamação sistêmica, estimulam a reação de fase aguda e podem causar morte celular. O TNF- α , é o membro mais conhecido desta classe, é produzido principalmente por macrófagos embora também possa ser produzido por outros tipos de células como monócitos, e células T após a exposição à endotoxinas bacterianas. (TRACEY et al., 2008; TAIWE; KUETE, 2017).

Essa citocina exerce múltiplos efeitos pró-inflamatórios, inicialmente o TNF ativa as células endoteliais a suprarregula a expressão de moléculas de adesão de superfície celular, estas sofrem outras alterações fenotípicas que promovem adesão e diapedese dos leucócitos, em seguida o TNF exerce efeito de retroalimentação positiva sobre monócitos e macrófagos adjacentes, promovendo a secreção de citocinas, como a Interleucina-1 (IL-1) (GOLAN et al., 2014).

Interleucinas são citocinas secretadas primariamente por células da linhagem hematopoética. A IL-1 é uma citocina que atua como ponte entre a imunidade inata e a adaptativa. Existem duas formas de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , que são codificadas em genes diferentes. Nos seres humanos, a IL-1 β desempenha principalmente um papel imune, enquanto a IL-1 α pode estar envolvida na manutenção da função das células epiteliais (GOLAN et al., 2014).

A IL-1 β atua como pró-inflamatória produzida e secretada por vários tipos de células em sua maior parte, por células mononucleares ativadas, principalmente as células componentes do sistema imune inato, e é essencial para a resposta imune na resistência a patógenos (DINARELLO, 2011).

Os efeitos pro-inflamatórios de IL-1 β estão relacionados à sua capacidade de promover o recrutamento e retenção de macrófagos no tecido, por via dependente de caspase-1, e induzir a produção de enzimas envolvidas no processo inflamatório, tais como COX-2, iNOS e fosfolipase A (RIDER et al., 2011; MOLDOVEANU; DICULESCU; BRATICEVICI, 2015).

Na mucosite intestinal induzida por 5-FU existe um aumento da expressão de IL-1 β , esta por sua vez estimula a produção de IL-6, aumenta a expressão das moléculas da adesão e incentiva a proliferação célula (ARIFA et al. 2014; BEN-LULU et al., 2012; MIRANDA, 2018).

O aumento da expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6, são relacionados também com a perda de peso, uma vez que, a redução dessas citocinas foi associada à atenuação da perda de peso na mucosite intestinal induzida por 5-FU (BARROS et al., 2018).

Desse modo, compreende-se que as citocinas secretadas pelo sistema imune intestinal são fatores-chave na manutenção da homeostase deste órgão, o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias é fundamental na determinação da imunidade protetora e no controle ou exacerbação da resposta inflamatória na mucosite intestinal (SOARES et al., 2011; JUSTINO et al., 2015; BARROS et al., 2018).

2.5.3 COX-2

A ativação da transcrição do fator nuclear NF-kb na mucosite intestinal também determina a expressão de enzimas fundamentais no processo inflamatório, como é o caso da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (CHANG et al., 2012).

O ácido araquidônico intracelular não esterificado é convertido pelas enzimas ciclo-oxigenase, lipooxigenase ou epoxigenase do citocromo. A via da ciclo-oxigenase leva à formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Nos seres humanos, são encontradas duas isoformas da ciclo-oxigenase, designadas como COX-1 e COX-2, contudo, estudos cinéticos sugerem que possa existir uma terceira isoforma da ciclooxigenase funcional a COX-3 (GOLAN et al., 2014).

A COX-1, é responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas, tais como homeostasia vascular, manutenção do fluxo sanguíneo renal e gastrointestinal, função renal, proliferação da mucosa intestinal, a COX-2 por sua vez, é ativada apenas em resposta a estímulos fisiopatológicos, tais como inflamatórios, citocinas ou toxinas, resultando na liberação excessiva de prostanóides (JUAN et al., 2015).

A administração de 5-FU resulta em expressão elevada de COX-2 o que provoca à superprodução de prostaglandinas e à expressão de metaloproteinases

da matriz (MMPs), que provocam a degradação de colágeno, membrana basal epitelial, formação de edema e, lesão tecidual (SONIS, 2004; LALLA et al., 2010; AL-ASMARI et al., 2016).

Um estudo realizado por Freitas et al (2012) demonstrou que a administração do látex de *Calotropis procera* foi capaz de reverter o aumento de IL-1 β , TNF- α , iNOS e COX-2 provocado pelo 5-FU na mucosite oral.

Araújo et al (2014) avaliou a COX-2 e outros marcadores inflamatórios na mucosite intestinal, e observou que a olmesartana diminuiu os níveis de IL-1 β e TNF- α , MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK / RANKL e SOCs-1.

Compreende-se assim, a relevância do uso de maracadores inflamatórios como parâmetros para avaliar o papel protetor de substâncias na mucosite.

2.6 Repercussões nutricionais da mucosite

O tratamento quimioterápico e radioterápico embora possa contribuir para o controle da doença local e sobrevida do paciente, podem também causar vários sintomas que comprometem a ingestão oral, tais como disfagia, dor, xerostomia, sensibilidade da mucosa, alterações do paladar e trismo. Por esta razão os pacientes com frequência requerem métodos de apoio nutricional (DECHAPHUNKUL et al., 2013; GANZER et al., 2015).

Em pacientes com mucosite oral, os sintomas mais comuns são a odinofagia, xerostomia e disgeusia, estes provocam alterações no paladar, desnutrição e desidratação que, por sua vez, predispõem o paciente a infecções bacterianas e fúngicas (KARBELKAR; MAJUMDAR, 2016).

Na mucosite intestinal por sua vez, o acometimento das diferentes regiões do intestino, provoca alterações substanciais nas funções fisiológicas deste órgão. Existe o comprometimento da superfície das células epiteliais absorptivas, prejudicando a digestão dos componentes da dieta, e a realização do transporte de nutrientes (MOWAT; AGACE, 2016).

As repercussões nutricionais mais comuns na mucosite intestinal estão relacionadas à perda de peso, diarreia grave, perda de eletrólitos má absorção e infecção. (RIBEIRO et al., 2016). Com relação ao tratamento dietoterápico na mucosite, recomenda-se uma dieta com alimentos fáceis de mastigar e engolir,

líquidos, restrita em alimentos ácidos, salgados ou condimentados. O uso do suporte nutricional enteral ou parenteral, e até adiamento ou suspensão do tratamento quimioterápico pode ser necessário (LOPES et al., 2016; DUTRA; SAGRILO, 2014).

Dessa forma, compreende-se que os transtornos gastrointestinais provocados pela mucosite oral e intestinal, podem levar o paciente à desnutrição, acarretando ineficiências nutricionais, e complicações mais graves que elevam o risco de morte sendo necessário desse modo, o acompanhamento nutricional, auxiliando na prevenção e controle de tais deficiências, assim como na tentativa de melhorar a tolerância ao tratamento quimioterápico e radioterápico. Vale a pena destacar que, a recuperação do estado nutricional reduz o risco de complicações, melhorando a resposta ao tratamento (NASCIMENTO et al., 2015).

2.7 Produtos naturais no tratamento da mucosite intestinal

A utilização de plantas no combate a enfermidades é quase tão antiga quanto à história da humanidade. O Brasil, que é detentor de um rico conhecimento tradicional associado às plantas medicinais, sendo a fitoterapia, entendida como parte fundamental da cultura brasileira (ASSIS; MORELLI-AMARAL; PIMENTA, 2015).

As plantas medicinais são empregadas na terapia farmacológica por meio de extratos para a elaboração de produtos fitoterápicos ou como fonte de precursores para a síntese de princípios ativos (BOER; COTINGTING, 2014).

Os estudos científicos em produtos naturais são frequentemente, guiados pelo conhecimento etnobotânico e podem contribuir de forma substancial para a inovação terapêutica de muitas doenças, provendo novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação (TOMCHINSKY et al., 2013). Salienta-se ainda que 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais (ANDRADE, 2014).

Nos últimos anos, têm se despertado o interesse pela investigação do efeito de produtos naturais e seus derivados na mucosite intestinal (SILVA, 2018; BAJIC et al., 2016; KATO et al., 2015; CHEAH et al., 2014).

Diante disso, percebe-se que propício o desenvolvimento de novas pesquisas que busquem o efeito de um produto natural na mucosite intestinal.

2.8 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew “Jaborandi”

“Jaborandi” é a designação popular de um grupo de espécies pertencentes à família Rutaceae, do gênero *Pilocarpus*. Trata-se de um arbusto (Figura 5) que ocorre no sub-bosque de florestas na região de transição entre os biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga (CALDEIRA et al., 2017).

As folhas do “jaborandi” são oriundas, em sua maioria, do extrativismo, no Piauí, Maranhão e Pará. A planta é bastante conhecida principalmente devido à importância medicinal da pilocarpina, que é um dos constituintes farmacêuticos mais extraídos e exportados do Brasil, considerado como uma importante fonte de renda para muitas famílias, que dependem do extrativismo das folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew (*P. microphyllus*) (GRABHER, 2015; CALDEIRAS et al, 2017).

A pilocarpina extraída das folhas de “jaborandi” atua como agente parassimpaticomimético colinérgico, ou seja, que estimula as secreções nas glândulas sudoríparas, lacrimais e salivares possui utilização medicinal comprovada no tratamento do glaucoma e xerostomia (FOX et al., 1986; SIDHU, 2014; PERFEITO, 2018).

O gênero *Pilocarpus* (Rutaceae) é a única fonte natural de pilocarpina atualmente conhecida, sendo a *P. microphyllus* reconhecida como a mais economicamente viável para este fim (ABREU et al., 2007). Atualmente a espécie é explorada comercialmente única e exclusivamente como fonte de pilocarpina (AGBAN et. al., 2016; GIL-MONTOYA et.al., 2016).

A extração da pilocarpina a priori era de responsabilidade da empresa Vegetex, instalada em Parnaíba (PI), no ano de 1973, essa empresa de propriedade da Merck, realizava a extração e comercialização de sais de pilocarpina com matéria-prima vegetal de origem extrativista. Em 2002, a Vegetex foi adquirida pelo Grupo Centroflora, passando a se chamar Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda., que continuou a extrair pilocarpina a partir do “jaborandi” cultivado, ainda de propriedade da Merck, e complementou sua produção com o extrativismo no Piauí Maranhão e Pará (HOMMA, 2012; GUMIER-COSTA et al., 2016).

Em termos econômicos, ressalta-se que a extração do “jaborandi” é responsável por uma grande massa de recursos nas regiões Norte e Nordeste do

Brasil. Em 2014, movimentou aproximadamente 252 toneladas no Norte e Nordeste brasileiro perfazendo em torno de R\$ 1 milhão de um total de R\$ 20,8 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil naquele ano (IBGE, 2014).

Figura 5: Planta arbustiva *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex. Wardeworth



Fonte: PERFEITO, 2018

Vale a pena ressaltar, que a pilorcapina é apenas um dos muitos alcaloidesimidazólicos já isolados a partir da *P. microphyllus*, existindo uma enorme gama de alcaloides isolados dessa planta que ainda são pouco investigados, de modo que é crucial o desenvolvimento de pesquisas que procurem elucidar o potencial desses alcaloides (ANDRADE-NETO; MENDE; SILVEIRA, 1996; SILVA et al., 2013; ROCHA, 2017).

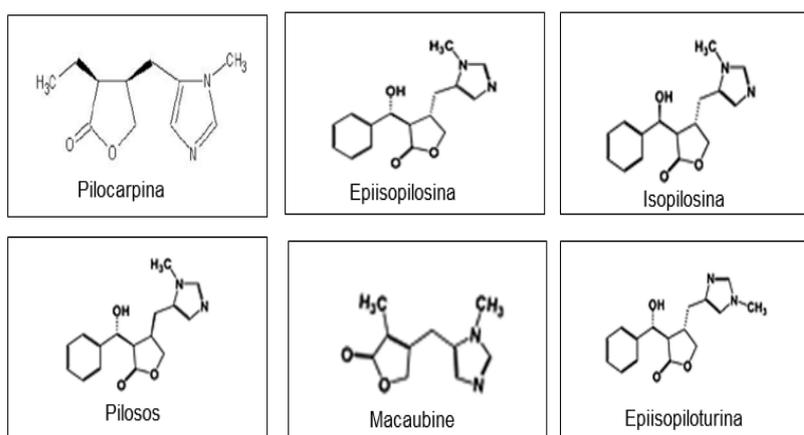
2.9 Alcaloides isolados da *P. microphyllus*

Alcaloides são compostos nitrogenados de origem vegetal que possuem alguma atividade farmacológica. Tais compostos são definidos como básicos por terem a presença de um nitrogênio amínico. Sua distribuição no reino vegetal encontra-se restrita a algumas famílias e gêneros, podendo ser encontrados em vários órgãos das plantas com raiz, caule, sementes, casca e folhas (CARMO, 2014).

Nas espécies *P. microphyllus* já foram identificados vários outros alcaloides

além da pilocarpina, entre os quais a pilosina e epiisopilosina (BENTO et al ., 2010),isopilosina (SANTOS; MORENO, 2004), epiisopiloturina (VERAS et al ., 2013; VOIGTLANDER et al ., 1978) e macaubine (SANTOS E MORENO, 2004). A Figura 6 apresenta as estruturas químicas dos principais alcaloides isolados de *P. microphyllus*.

Figura 6: Estrutura química de alcaloides isolados da *P. microphyllus*



Fonte: Adaptado de CARMO et al.,2017

Além dos efeitos biológicos da pilocarpina, já elucidados anteriormente, existe uma tendência recente a investigação do efeito de outros alcaloides isolados da *P. microphyllus* (FOX et al., 1986, SIDHU, 2014).

Um estudo realizado por Rocha, 2017 demonstrou *in vitro*, *in vivo* e *in silico* que a epiisopilosina apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Além disso, esse alcaloide também foi retratado com atividade Anti- *S. mansoni* e antibacteriana (ROCHA et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2018).

A Isopilosina, macaubine e pilosina segundo Rocha et al. (2017) também desempenham atividade *S. mansoni* e antibacteriana, porém, os estudos com esses alcaloides ainda são escassos.

Diante disso, os alcaloides derivados do *P. microphyllus* são apontados como matéria prima promissora para pesquisas futuras que investiguem novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas dos outros alcaloides que até o presente momento permanecem em sua grande maioria desconhecidos e inexplorados (LIMA et al., 2015).

2.10 Epiisopiloturina

A Epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide imidazólico descrito inicialmente por Voightlander et al. (1978), esse composto hidrofóbico, possui peso molecular 286,33 g/mol, na sua estrutura química, contém um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico por meio de uma ligação C-C e um grupo hidrobenzílico (VERAS et al., 2013).

O principal mecanismo de ação da classe de alcalóides imidazólico é a inibição da síntese do ergosterol, que está relacionado com a integridade e a manutenção da função da membrana celular de microrganismos (MIURA, 2009).

Neste sentido, as primeiras atividades biológicas descritas apontaram para o efeito da EPI sobre microrganismos causadores de doenças negligenciadas. Miura (2009) demonstrou o efeito da EPI contra cepas de *Leishmania amazonenses*, na forma de amastigotas. Porém, outros estudos utilizando essa molécula contra outro tipo de parasita também foram realizados, pesquisadores conseguiram avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, a ação dessa molécula contra o parasita causador da esquistossomose, o parasita *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) (VERAS et al, 2012; GUIMARÃES et al 2015).

Veras et al., (2012) demonstrou que a EPI foi capaz não só de matar esquistossômulos de diferentes idades e esquistossomos adultos, mas também inibe a postura de ovos. Outro aspecto importante desse achado foi a observação de que a atividade anti-esquistossomose da EPI é seletiva, isto é, não exibindo citotoxicidade para células de mamíferos. Além disso, de acordo com Lima (2016b) o composto apresenta segurança, podendo ser aplicado para novos testes *in vivo*.

Tendo em vista os resultados animadores encontrados, as pesquisas com o alcaloide foram ampliadas. Silva e colaboradores (2013) foram os primeiros a publicar sobre o efeito da EPI sobre os parâmetros inflamatórios. No estudo, os autores mostraram que o composto apresentou atividade anti-inflamatória por meio da redução da atividade de mieloperoxidase (MPO) do número de leucócitos, e dos níveis de TNF- α e IL-1 β . O mesmo estudo também apontou a atividade antinociceptiva da EPI, ela reduziu a contorção induzida pelo ácido acético e inibiu a fase inicial aguda (primeira fase), e segunda fase do teste da formalina (SILVA et al., 2013).

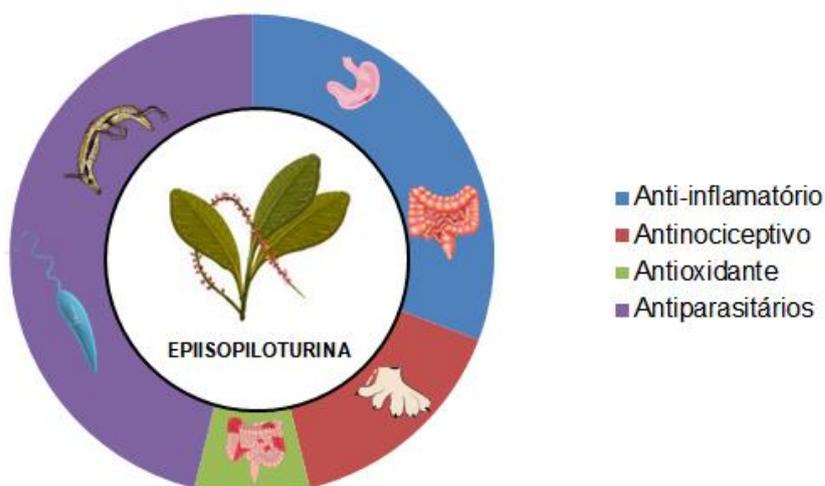
Após esses achados, verificou-se que na literatura já existem dados que

apontam o efeito anti-inflamatório da EPI sobre o trato gastrointestinal. Nicolau et al. (2017) demonstrou que o pre-tratamento com cloridato de EPI reduziu a lesão macroscópica gástrica e intestinal induzida por naproxano, através de mecanismos antioxidantes, redução de citocinas e aumento da taxa de fluxo sanguíneo.

Carvalho et al. (2018) evidenciou que a EPI foi capaz reverter parâmetros de inflamação e peroxidação lipídica, a citar Cicloxigenase -2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), malondialdeído (MDA), além de preservar os níveis de GSH no modelo da doença de Crohn induzido pelo ácido trinitrobenzenosulfônico. Sendo apontada como uma importante ferramenta farmacológica contra as doenças inflamatórias intestinais.

A Figura 7 apresenta uma representação das principais atividades já reportadas pela EPI.

Figura 7: Atividades biológicas da Epiisopiloturina



A EPI mostra-se desse modo, como um protótipo a fármaco, porém ela apresenta baixa solubilidade aquosa, tal condição se apresenta como um entrave na dissolução deste protótipo, podendo repercutir na sua absorção e biodisponibilidade. Assim, novas alternativas tecnológicas estão sendo investigadas com intuito de aumentar a biodisponibilidade desse alcaloide. A complexação com ciclodextrinas, polímero capaz de interagir com o fármaco hidrofóbico, e aumentar a solubilidade incrementou de forma satisfatória o perfil de dissolução da EPI, sendo estes potenciais excipientes para o ajuste desta propriedade (MELO, 2015).

Lima (2016b) demonstrou que uma nanoformulação usando sistema

autoemulsificante se mostrou um bom carreador de EPI, capaz de aumentar sua absorção no sistema gastrointestinal, como também sua concentração na circulação sistêmica, melhorando sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral.

Dessa forma, a EPI é considerada alcaloide promissor com relação as suas atividades farmacológicas, biodisponibilidade e toxicidade, além de possuir elevado potencial econômico, por se tratar de um alcaloide extraído do resíduo de produção da pilocarpina (LIMA, 2016b).

2.11 *Docking* molecular da epiisopiloturina

O *Docking* molecular ou docagem é uma técnica de acoplamento molecular possibilitam a predição da provável forma de ação de uma molécula com seu ligante. Atualmente o *docking* molecular representa um dos métodos mais utilizados no desenho de novos fármacos, em virtude de sua conveniência e baixo custo. Esta ferramenta computacional busca por um ligante capaz de ligar tanto geometricamente quanto energeticamente em um sítio de ligação de uma proteína (LIU et al., 2018).

As associações entre moléculas biológicas são de grande interesse para diferentes áreas que visam interferir de alguma forma na sua atividade, seja para determinar a morte de patógenos, impedir a proliferação destes ou mesmo para reparar processos metabólicos (STAFE Net al., 2017).

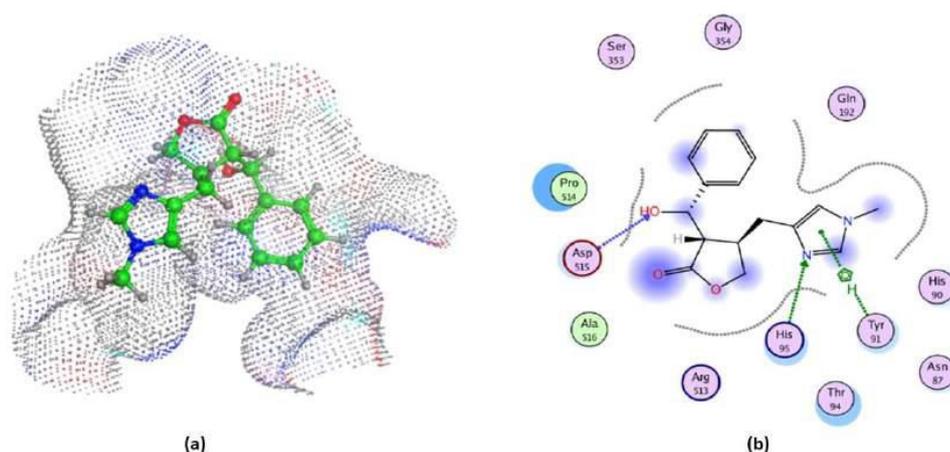
A docagem molecular é uma abordagem computacional desenvolvida para imitar o evento de ligação entre moléculas (SCARPINO et al., 2018; SOTRIFER, 2018). Assim, o *docking* pode ser implementado durante o planejamento de medicamentos auxiliados por computador para descrever interações entre inibidores e alvos biológicos (DONG et al., 2019).

Técnicas de desenho assistido por computador são usadas para a avaliação rápida de bibliotecas químicas, com o objetivo de orientar e acelerar o desenvolvimento em estágio inicial de novos compostos ativos. Nota-se um acelerado e crescente interesse em bancos de dados de produtos naturais e componentes dietéticos que são conhecidos por representarem uma vasta diversidade química com complexidades e arquiteturas subjacentes. De fato, a

maioria dos produtos naturais é variada por grupos químicos que refletem novas propriedades / características moleculares comparadas a compostos sintéticos, e as drogas disponíveis e análises de quimioinformática podem sugerir que várias classes são consideradas como entidades farmacologicamente relevantes (DEL RIO et al., 2014).

Neste sentido, um ensaio de *docking* molecular foi realizado com a EPI (Figura 8), e foi observado que EPI estabeleceu importantes interações com resíduos de aminoácidos considerados essenciais para a ligação com as isoformas COX-1 e COX-2, sendo essas interações maiores para COX-2 (ROCHA, 2017).

Figura 8: *Docking* molecular da EPI com COX-2



Fonte: Rocha, 2017. (a) Conformação de ligação prevista para EPI no sítio de ligação da COX-2 no resíduo Tyr355 (b) Interações entre EPI e COX-2 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1CX2).

A interação direta da EPI com as isoformas COX-1 e COX-2 estimulam e alicerçam ainda mais o desenvolvimento de pesquisas com esse alcaloide (ROCHA, 2017).

Assim, tendo em vista o potencial promissor da EPI como um agente anti-inflamatório e a grande problemática da mucosite intestinal, pretende-se esclarecer a seguinte hipótese: a EPI apresenta um efeito protetor no modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o efeito protetor da Epiisopiloturina (EPI) sobre a mucosite intestinal experimental induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

3.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda da EPI;
- Avaliar os efeitos da EPI sobre a perda ponderal de camundongos no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Verificar o efeito da EPI sobre o número de leucócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- Identificar os efeitos da EPI sobre as alterações histológicas em vilos e cripta induzidas por 5-FU na mucosa intestinal;
- Investigar o efeito do EPI sobre a contagem de mastócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos;
- Avaliar o efeito da EPI sobre o número de células calciformes na mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar os efeitos da EPI sobre os parâmetros oxidativos induzidos pelo 5-FU, por meio da dosagem de malondialdeído;
- Investigar o papel da COX-2 no efeito protetor da EPI;
- Investigar o papel da iNOS no efeito protetor da EPI;
- Realizar o *docking* molecular da EPI com a iNOS;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do Material Vegetal

As folhas de “Jaborandi” (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew) foram obtidas no município de Matias Olímpio, Piauí, Brasil (Latitude, graus decimais S - 3.7158; longitude, graus decimais W -42.5555). A planta foi identificada pela Profa. Dra. Ivanilza Moreira de Andrade, Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e uma amostra de voucher do espécime, número de voucher Exsicata 27.152, foi depositado no herbário HDELTA- UFPI, Parnaíba, Piauí, Brasil.

4.2 Isolamento e purificação da Epiisopiloturina

A purificação da EPI foi realizada segundo patente de depósito número PI 0904110-9 junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). O isolamento de EPI foi realizado pela aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a fim de obter pureza EPI superior a 98%. A viabilidade do método foi confirmada através de HPLC e espectrometria de massa por eletrospray (VERÁS et al., 2013).

4.3 Fármacos, reagentes, materiais e soluções

A EPI foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) 2% conforme descrito por Veras et al. (2013). Os demais reagentes e produtos químicos de grau analítico estão detalhados no Apêndice A.

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com peso entre 20-30g, provenientes do Biotério do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), os mesmos foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia – UFC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Os animais foram separados aleatoriamente (n=6/grupo) e acondicionados em caixas de polipropileno, nas medidas de 41x34x16 com tampas em arame de ferro com tratamento de zincagem nas medidas aproximadas de 41x34x16 cm e mantidos em salas com o horário controlado 12/12 ciclo claro/escuro a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e com alimentos (ração padrão) e água *ad libitum*. Os animais ficaram em uma sala climatizada com exaustão de gases. As gaiolas foram lavadas, e a maravalha substituída duas vezes na semana.

Para a realização da eutanásia se optou pelo método por sobredose de anestésico cetamina 10% (300mg/kg) e Xilazina 2% (30 mg/kg). Os animais foram eutanasiados em um ambiente silencioso. O procedimento foi realizado de acordo com a normativa 37 do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal) e após a eutanásia se realizou a observação cautelosa da ausência de reflexo corneal para confirmar a morte do animal (PACHALY, 2006).

4.5 Considerações éticas

Durante o experimento realizou-se a observância dos princípios éticos da experimentação animal normatizados pelo CONCEA. Além disso, se utilizou do novo método de manipulação de camundongos com as mãos em forma de concha, recomendado pela National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction Animals and Research, objetivando a redução da ansiedade nos animais, bem como melhor desempenho durante os experimentos (GOUVEIA, K.; HURST, 2017). O protocolo experimental foi submetido e aprovado (Anexos A e B) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC (9071050418) e da UFPI (471/18).

4.6 Avaliação toxicológica da EPI

A avaliação da toxicidade pré-clínica aguda para a EPI foi realizada com base nas "Diretrizes para Testes de Produtos Químicos" nº 423 da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 2001), com modificações. Camundongos (n = 3 machos/ grupo) foram submetidos a doses únicas de 50 mg/kg 300 ou 2000 mg / kg de EPI via oral e foram observados quanto aos sinais clínicos de toxicidade (30 min, 1h, 2h e 4 h) e morte por 24h (Apêndice B). Posteriormente se

realizou a comparação entre o grupo controle (DMSO) e a EPI 300 mg/kg por quatorze dias. Durante todos os dias os animais observados cautelosamente para detecção de sinais sugestivos de toxicidade no Sistema Nervoso Central (SNC), ou Autônomo (SNA).

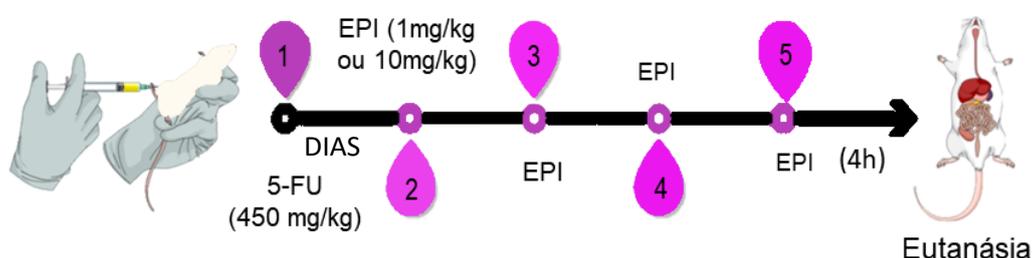
No último dia do protocolo os animais foram anestesiados e o sangue do plexo orbital foi retirado para a avaliação do número de leucócitos circulantes. Em seguida foram eutanasiados e os seguintes órgãos foram retirados: fígado, rins, baço, coração e testículos. Os órgãos foram pesados para a avaliação do peso relativo (Peso do órgão/peso do animal) conforme descrito por Manguiera et al. (2017).

4.7 Indução e tratamento da mucosite intestinal

Utilizou-se o modelo de indução de mucosite intestinal descrito por Carneiro-Filho et al. (2004) adaptado, a qual os camundongos foram tratados com dose única de 5-FU (450 mg/kg) via i.p. A Figura 9 apresenta o esquema de indução e tratamento da mucosite.

Para o tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU, os animais receberam duas diferentes doses de Epiisopiloturina via i.p um dia após a injeção de 5-FU. Os demais grupos receberam a solução contendo substância veículo.

Figura 9: Esquema de indução e tratamento da mucosite intestinal



4.8 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos inicialmente em quatro grupos, sendo cada grupo constituído por 6 (seis) animais. As doses de Episupiloturine foram

estabelecidas após vasto resgate na literatura, e optou-se pelas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg conforme apresentado no trabalho de Rocha, 2017.

4.8.1 Definição da melhor dose

- **Grupo I (DMSO):** receberam solução veículo de DMSO 1mg/kg e intraperitoneal (i.p), paralelamente aos outros grupos tratados ao longo do estudo.
- **Grupo II (5-FU):** os animais receberam no dia da indução da mucosite uma dose única de 5-FU (450mg/kg de peso do animal) i.p. e foram tratados com uma solução de DMSO 2% + água destilada nos quatro dias posteriores.
- **Grupo III (EPI 1mg):** receberam 5-FU 450mg/kg i.p no dia da indução e foram tratadas com Epiisopiloturina i.p diluída em DMSO 2%, na dose de 1mg/kg/dia nos quatro dias posteriores.
- **Grupo IV (EPI 10mg):** receberam 5-FU 450mg/kg i.p e tratamento com Epiisopiloturina i.p diluída em DMSO 2% na dose de 10mg/kg/dia nos quatro dias posteriores.

4.8.2 Avaliação do papel da cicloxigenase 2 (COX-2) na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da EPI

Realizou-se o mesmo protocolo de indução à mucosite intestinal, contudo foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- **Grupo I (DMSO):** receberam a solução veículo de DMSO 2% 10mg/kg e intraperitoneal (i.p), paralelamente aos outros grupos tratados ao longo do estudo.
- **Grupo II (5-FU):** receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) i.p. e foram tratados com foram tratados com uma solução de DMSO 2% + água destilada nos quatro dias posteriores.
- **Grupo III (EPI 10 mg/kg):** receberam 5-FU 450mg/kg i.p no primeiro dia

do experimento e tratamento com Epiisopiloturina (10 mg/kg) diluída em DMSO 2%, na dose de 1mg/kg/dia nos quatro dias posteriores.

- **Grupo IV (Celecoxibe):** receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal (i.p). Nos dias seguintes do protocolo experimental foi administrado apenas Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).
- **Grupo V (Celocoxibe + EPI 10 mg/kg):** os animais receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal (i.p), no segundo dia de protocolo receberam EPI diluída em DMSO 2% (10 mg/kg) e Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p).

4.8.3 Avaliação do papel do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por 5-FU e o seu envolvimento no efeito protetor da EPI

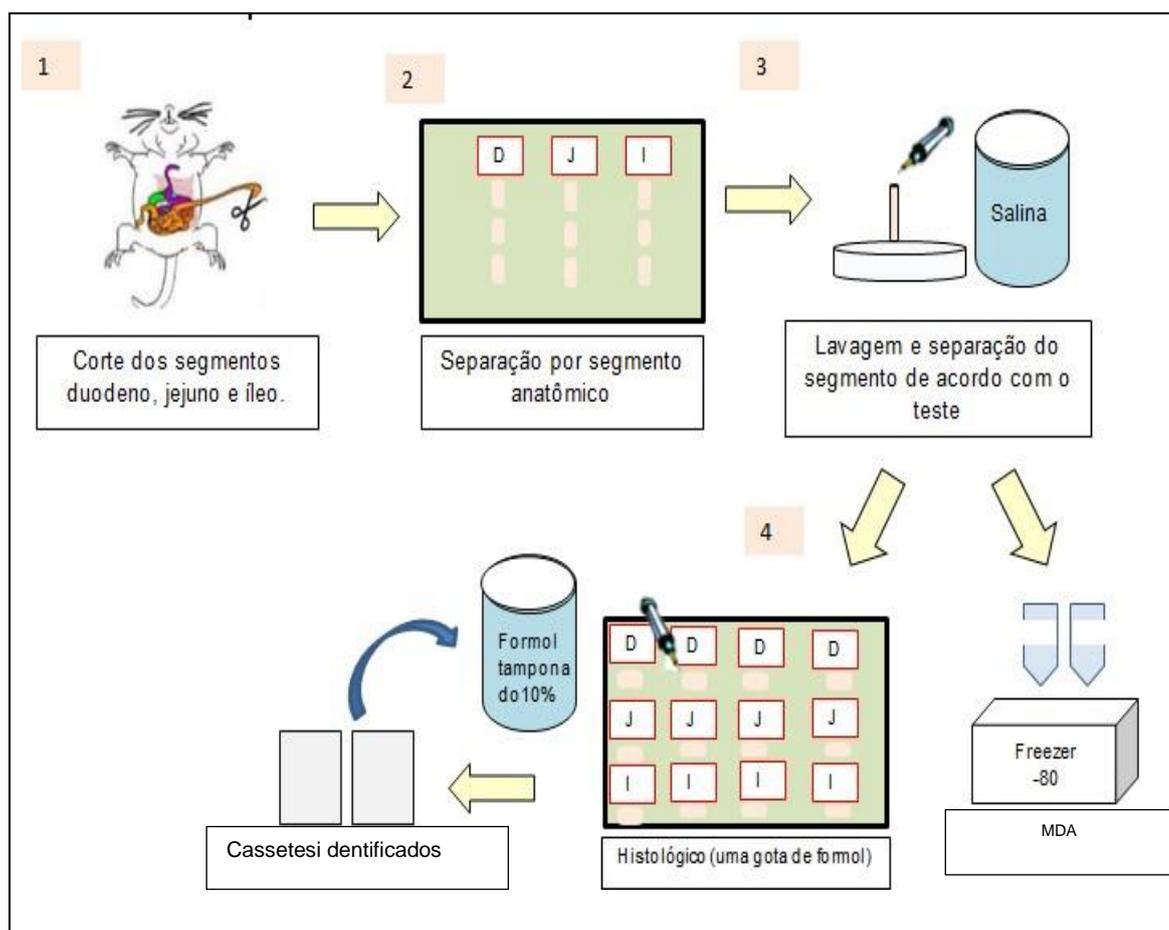
- **Grupo I (DMSO):** receberam a solução veículo de DMSO 2% 10mg/kg e intraperitoneal (i.p), paralelamente aos outros grupos tratados ao longo do estudo.
- **Grupo II (5-FU):** receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) i.p. e foram tratados com DMSO nos quatro dias posteriores.
- **Grupo III (EPI 10):** receberam 5-FU 450mg/kg i.p no primeiro dia do experimento e tratamento com Epiisopiloturina (10 mg/kg) diluída em DMSO 2%, na dose de 1mg/kg/dia nos quatro dias posteriores.
- **Grupo IV (L-NAME):** receberam, no primeiro dia no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) i.p. e foram tratados com o bloqueador da síntese de óxido nítrico L-NAME (20 mg/kg i.p).
- **Grupo V (L-NAME+ EPI 10 mg/kg)** os animais receberam, no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal (i.p). Nos dias seguintes do protocolo experimental receberam L-NAME (20 mg/kg i.p) + EPI 10 mg/kg (diluída em DMSO).

- **Grupo VI (L-Arginina):** receberam no primeiro dia do protocolo experimental, dose única de 5-FU (450mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal (i.p). Nos dias seguintes do protocolo experimental foi administrado L-Arginina (300 mg/kg), um substrato necessário para a síntese de óxido nítrico.

4.9 Coleta das amostras de tecidos

Após a eutanásia os animais foram dissecados para a coleta dos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo, que foram lavados e depositados em eppendorfs previamente identificados ou em cassetes (para amostras histológicas). A figura 10 apresenta o esquema simplificado de coleta da amostra.

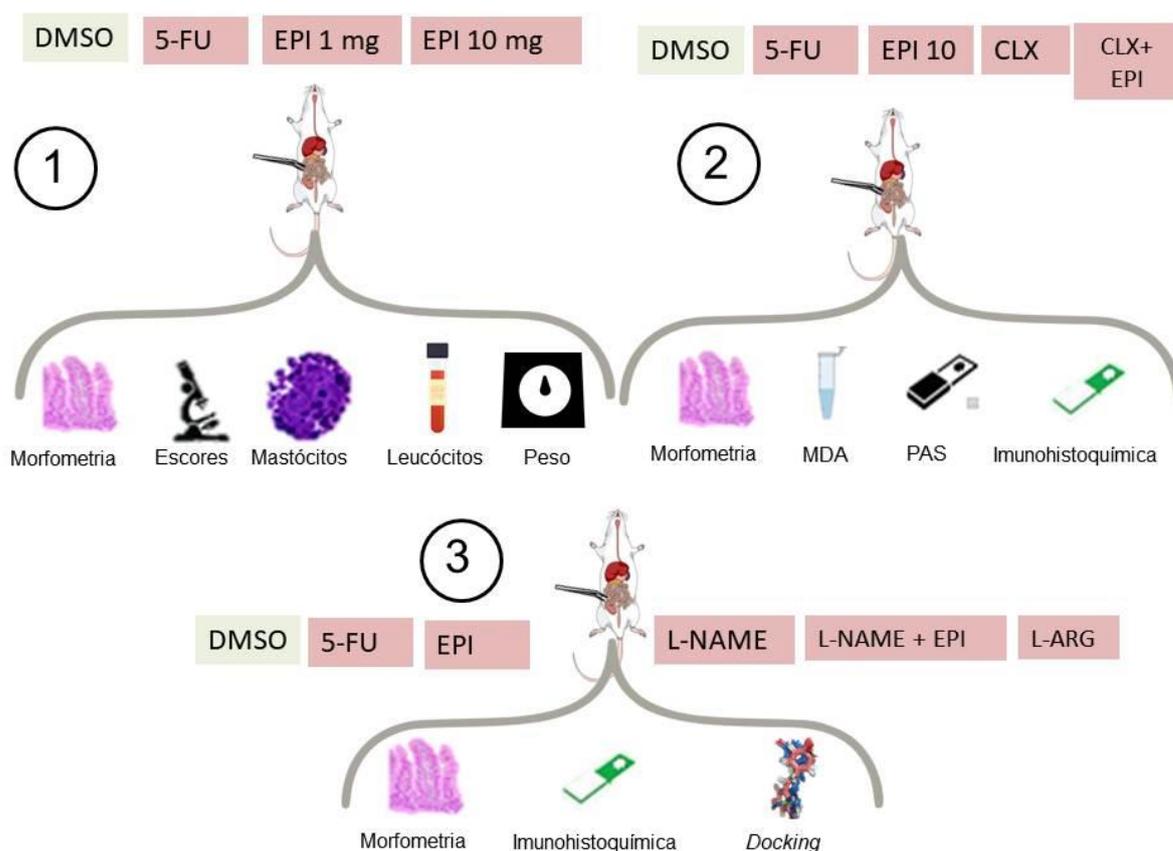
Figura 10: Coleta das amostras de teciduais



4.10 Parâmetros avaliados

A Figura 11 apresenta o fluxograma com o delineamento experimental e os parâmetros avaliados após a eutanásia.

Figura 11: Delineamento experimental



4.10.1 Avaliação ponderal

Durante todo o período experimental, a massa corpórea dos camundongos foi aferida em balança antes da administração de quaisquer dos compostos (DMSO, 5-FU e EPI). Os valores encontrados foram expressos em % de variação de massa corpórea, utilizando-se da seguinte fórmula:

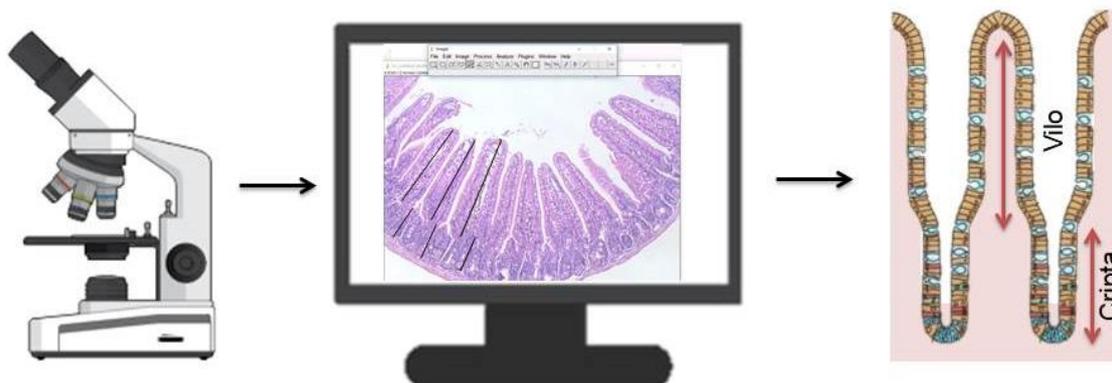
$$\frac{\text{Peso do dia} \times 100}{\text{Peso do primeiro dia}}$$

4.10.2 Análise histopatológica e morfométrica

Para a realização da análise histopatológica as amostras dos segmentos intestinais foram fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 18 horas, retirou-se o material biológico do formol e os mesmos foram inseridos no álcool 70%, posteriormente sofreram processo de desidratação e clareamento. Em seguida a amostra passou por diversos banhos de soluções hidroalcoólicas crescentes (70 a 100% de etanol). Logo em seguida as amostras preparadas foram incluídas em parafina previamente derretida.

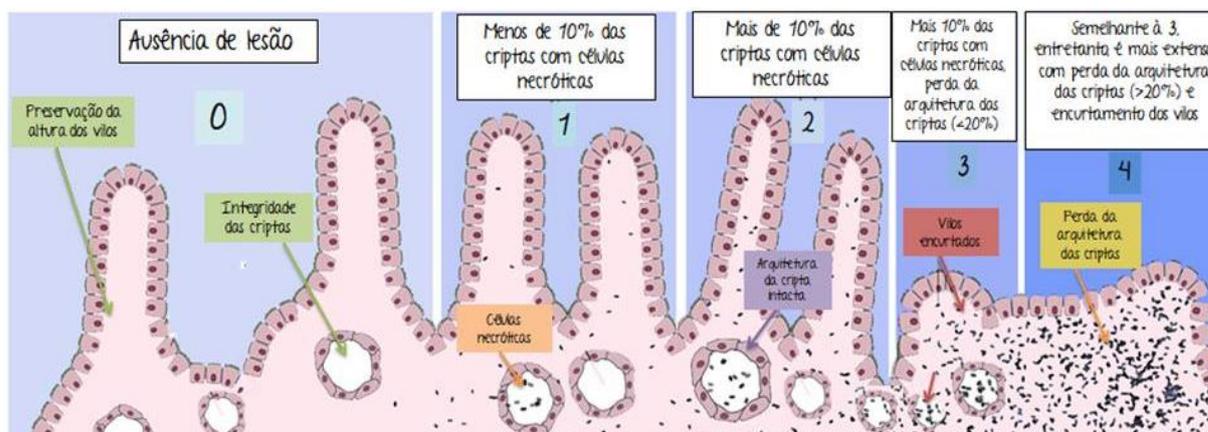
Os blocos rígidos obtidos foram levados para secção em um micrótomo. A análise morfométrica (Figura 12) realizou-se a partir dos tecidos preparados e corados com hematoxilina e eosina (H&E) em um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), utilizou-se do software ImageJ para a aferição da altura do vilos e profundidade da cripta. Ressalta-se que para a conversão das medidas obtidas em pixels no Image J se mensurou a área conhecida de 200 μ m obtida na fotomicrografia, posteriormente o software foi configurado para converter automaticamente os pixels em μ m por meio da opção “Set scale”.

Figura 12: Avaliação morfométrica de vilos e criptas



Na análise histopatológica foi realizado um estudo-cego e randomizado, por uma histopatologista experiente. Durante a análise avaliou-se a severidade da mucosite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura tecidual, com enfoque nos vilos e criptas, e ocorrência de criptas necróticas. Os níveis de intensidade da mucosite foram, então, definidos por um sistema de escores de Woo et al. (2000), descritos na Figura 13.

Figura 13: Sistema de escores definido por Woo et al.(2000)



4.10.3 Leucograma

O leucograma foi realizado previamente a eutanásia, os animais foram anestesiados com combinação de anestésicos (Xilazina 10mg/kg e Cetamina 80mg/kg), e obteve-se amostras de sangue periférico do plexo orbital, que posteriormente foram diluídas em líquido de Turk a uma proporção de 20 μ L de sangue para 380 μ L de solução. Após isso, se realizou a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer (MOURA et al.; 1998), os resultados foram expressos na forma de número total de leucócitos por mm^3 de sangue.

4.10.4 Análise da concentração de mastócitos

Para evidenciar a presença e contagem de mastócitos, os blocos de parafina com amostras de mucosa intestinal foram cortados e corados com a coloração com azul de toluidina, segundo o método de Michalany (1998).

Após a confecção das lâminas, realizou-se a quantificação por meio da contagem dos mastócitos, localizados no tecido conjuntivo e visualizados em coloração metacromática.

Foram contabilizados 10 campos por animal, utilizando-se da objetiva de 40 x no microscópio.

4.10.5 Mensuração da produção de muco intestinal com coloração PAS

O protocolo baseou-se nas recomendações do fabricante EasyPath. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas com banhos crescentes de álcool 99% 95% 70%, posteriormente adicionou-se 10 gotas do ácido periódico, em seguida os tecidos foram lavados em água corrente e em água destilada, cobriu-se o tecido com 10 gotas do reagente de Schiff por 15 minutos em câmara escura, em seguida as lâminas foram lavadas e secas. Adicionou-se então 10 gotas de Hematoxilina de Carazzi por 4 minutos. Por fim as lâminas foram lavadas em água corrente e desidratadas em banho de álcool ascendente até o xilol.

As células foram quantificadas por meio de contagem do número de células calciformes marcadas em púrpuro-magenta em 10 vilos e criptas (SANO et al., 2017).

4.10.6 Imunohistoquímica para iNOS e COX

Imunohistoquímica para iNOS e COX-2 foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Escolheu-se o segmento intestinal e a dose que obtiveram a melhor resposta na primeira etapa do experimento para a avaliação imunohistoquímica. As lâminas contendo os cortes do segmento intestinal foram desparafinizados, por meio de incubação em estufa a 60°C overnight e de três banhos de xilol, durante 5 minutos cada. Decorrido este tempo, os cortes intestinais foram hidratados em dois banhos em etanol absoluto, um banho em etanol (90%), um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, durante três minutos cada. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submersas a um banho de água destilada por 10 minutos e, em seguida, com tampão citrato (DAKO®, pH 7,0) em banho-maria (95°C) por 20 minutos, para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), por 5 minutos. Seguido do bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (Abcam), durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e, depois, incubados *overnight* (4°C) com anticorpo primário rabbit (Abcam) anti-iNOS e Goat anti-COX-2. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados com PBS e incubados

com o anticorpo secundário. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Abcam) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, realizou-se a coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB, DAKO ®), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer, durante 5 minutos. Por fim, se realizou a desidratação das amostras e montagem das lâminas.

4.10.7 Docagem moléculas com a isoforma de iNOS

A estrutura do iNOS foi obtida a partir de um banco de dados de proteínas e a estrutura tridimensional da epiisopiloturina foi determinada. As Conformações de ligação apropriadas foram descobertas através de simulações de acoplamento automático (ALVARENGA et al., 2017).

4.11 Análise estatística

Para a realização da análise estatística entre os grupos utilizou-se o Teste Shapiro Wilk para verificar a normalidade da amostra. Posteriormente realizou-se o teste de análise de variância ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a avaliação da variável perda ponderal, se optou pelo ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de Tukey. Na avaliação toxicológica foi utilizado o teste t de Student.

Para os dados não paramétricos, utilizou-se do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, isto é, resultados que apresentarem $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GradPad Prism, versão 6.0. Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), exceto os scores histopatológicos que foram apresentados pelos valores de mediana, mínimo e máximo.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação toxicidade aguda da EPI

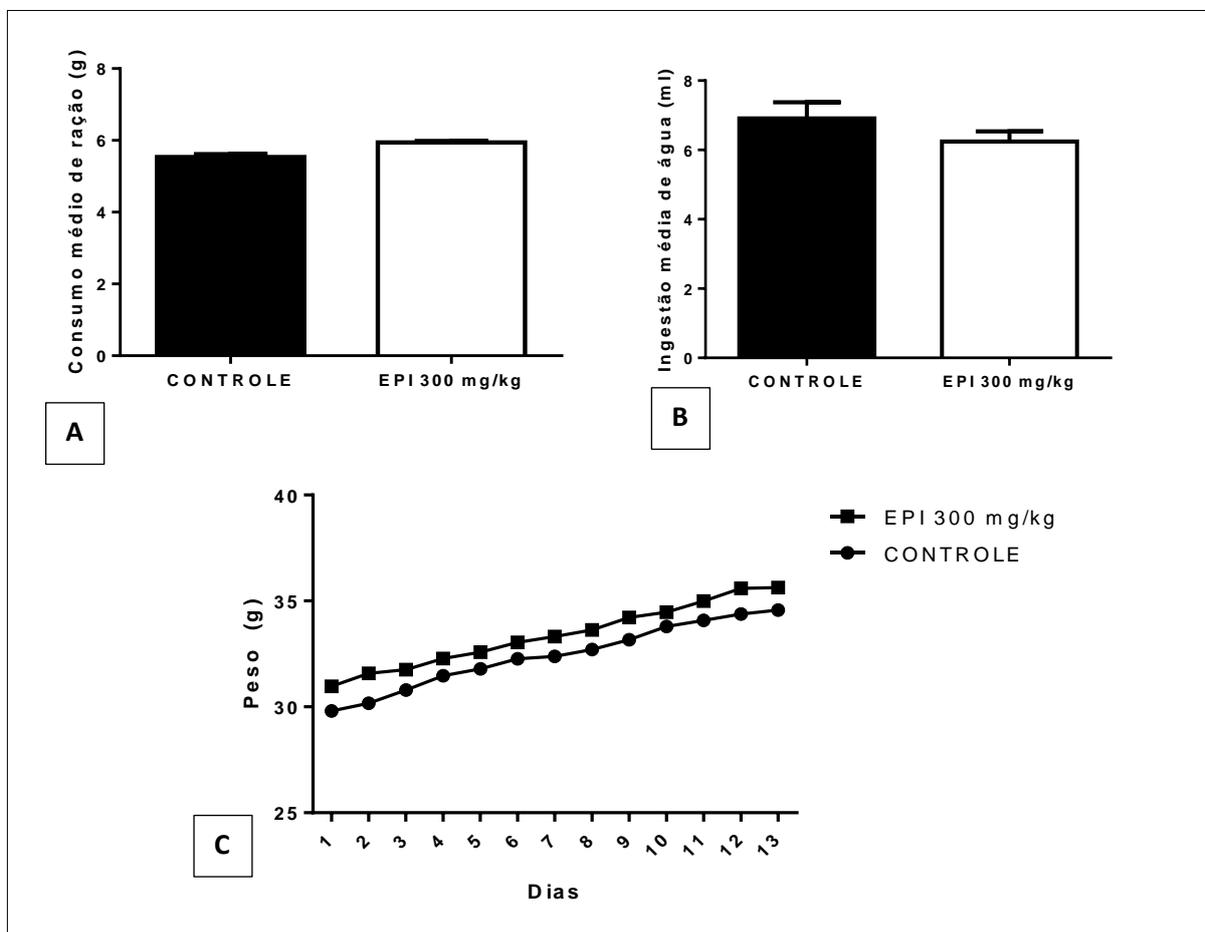
Os grupos tratados não demonstraram diferença significativa de peso nos dias de experimento. A EPI não provocou toxicidade aparente nos animais e não ocorreu nenhuma morte. Durante a observação diária, os animais não apresentaram mudanças comportamentais expressivas, e a EPI não demonstrou possuir capacidade tóxica estimulante ou depressora sobre o sistema nervoso central, além disso, também não apresentaram diarreia, respiração forçada, lacrimejamento, cianose, diminuição da força para agarrar, contorções abdominais e ambulação.

Com relação à variação ponderal (Figura 14 C), observou-se que tanto os grupos tratados com EPI 300 mg/kg, quanto os animais que receberam o veículo (DMSO) aumentaram de peso ao longo dos 14 dias de experimento, contudo, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. De igual maneira, a ingestão média de água e ração não foi diferente estatisticamente entre os grupos controle e EPI 300 mg/kg, conforme demonstrado na Figura 14 A e B.

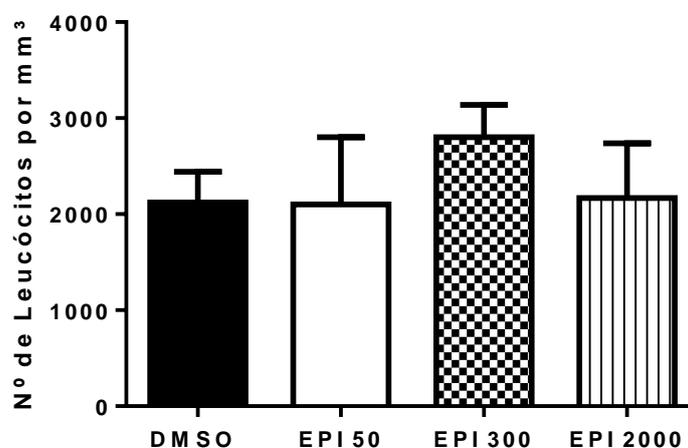
Realizou-se também a contagem dos leucócitos totais dos grupos avaliados demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos EPI 300 mg/kg DMSO (Figura 15).

Observou-se ainda, que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o tratado com EPI com relação ao peso dos órgãos necropsiados (fígado, o rim, o baço, o coração e os testículos). Conforme demonstrado na Tabela 1.

Figura 14: Avaliação da toxicidade aguda da EPI sobre os parâmetros de ingestão de água, ração e do ganho de peso



A: Consumo médio de ração; **B:** Ingestão média de água; **C:** Avaliação ponderal. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da ingestão média de água por camundongo. Para análise estatística foi utilizado o teste t de *student*.

Figura 15: Avaliação do efeito da Epiisopiloturina sobre o número de leucócitos

Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de leucócitos por mm³. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 1: Efeito da EPI sobre o peso relativo dos órgãos

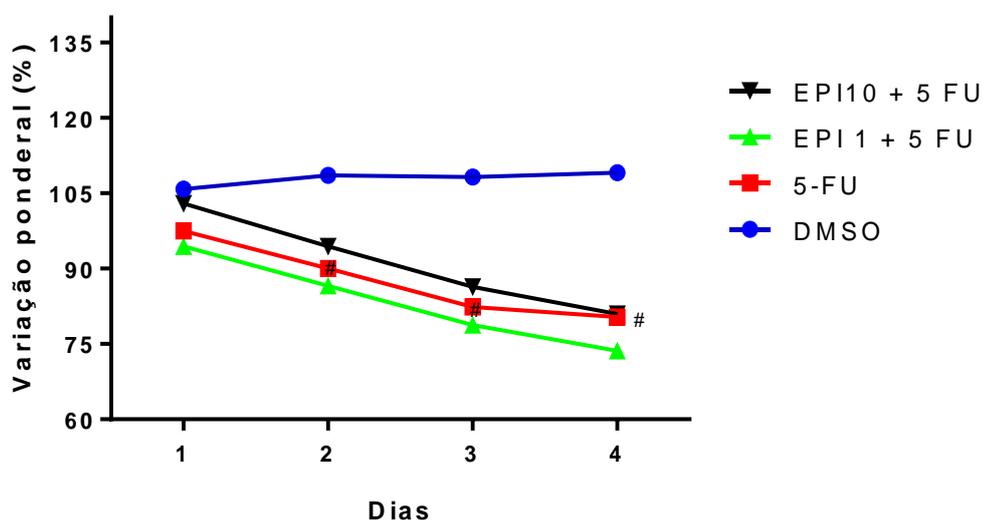
GRUPO	Fígado	Rins	Baço	Coração	Testículos
DMSO	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,001 \pm 0,00	0,004 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00
EPI 50	0,04 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,001 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00
EPI 300	0,04 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,002 \pm 0,00	0,004 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00
EPI 2000	0,04 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,001 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00	0,005 \pm 0,00

Os valores foram apresentados como média \pm DPM do peso do órgão. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA One Way seguido do pós-teste de Tukey.

5.2 Efeito do tratamento com EPI sobre a análise ponderal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Observou-se que a EPI em ambas as doses testadas (1mg/kg e 10 mg/kg) quando comparada com o grupo 5-FU não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O grupo 5-FU diferiu estatisticamente do grupo DMSO, conforme visualizado na Figura 16.

Figura 16: EPI não atenuou a perda ponderal provocada pela mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos



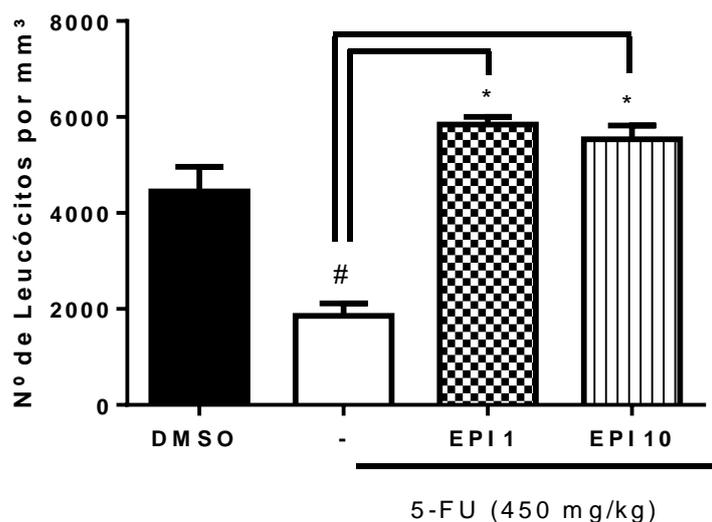
Os resultados foram expressos como média \pm EPM da avaliação ponderal do peso inicial, de um mínimo de 6 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste Tukey, onde o # $p < 0,05$ quando comparados com o grupo DMSO.

5.3 Avaliação do efeito da EPI sobre o número de leucócitos na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Verificou-se, conforme observado na Figura 17, que o grupo DMSO ($4450 \pm 515,2$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Observou-se ainda, que o número de leucócitos encontrados nos grupos tratados com EPI nas doses de 1 mg/kg ($5842 \pm 162,5$) e 10 mg/kg ($5533 \pm 288,9$) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o número de leucócitos observado no grupo 5-FU ($1858 \pm 260,3$).

Figura 17: Efeito da EPI na contagem de leucócitos de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de leucócitos por mm³. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

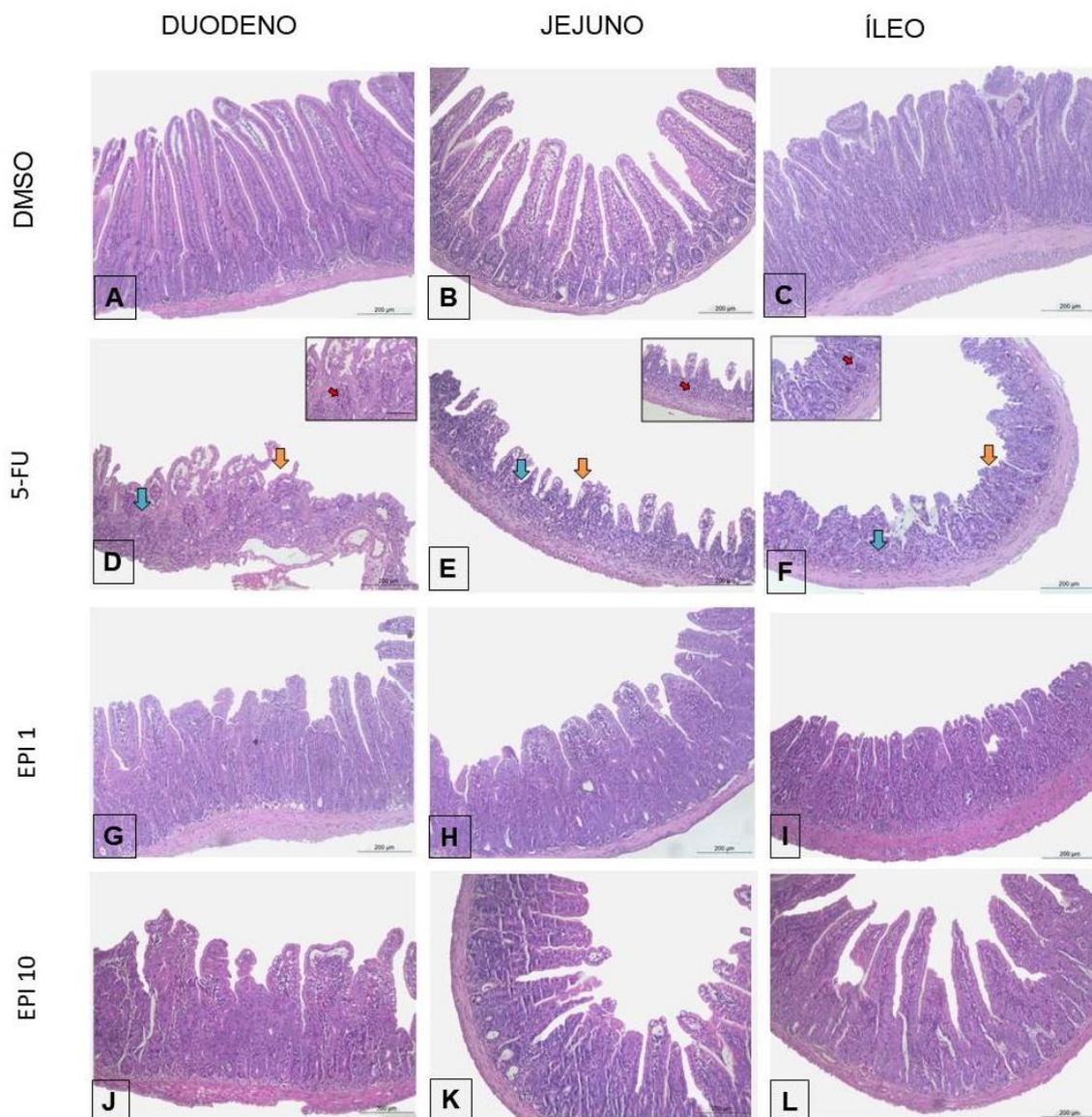
5.4 Efeito do tratamento com EPI sobre as alterações histopatológicas em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O grupo 5-FU (Figura 18 D, E, F) tratado apenas com a solução veículo, apresentou notável encurtamento na altura das vilosidades e no comprimento das criptas, além de vacuolização das células de tecido epitelial e intenso infiltrado de células inflamatórias, quando comparado com o grupo DMSO (Figura 18 A, B, C) que apresentou integridade na arquitetura dos vilos e criptas, e escassez de células inflamatórias.

Verificou-se, por sua vez, que nos grupos tratados com EPI nas doses de 1 mg/kg e 10mg/kg, o duodeno e jejuno apresentaram menor encurtamento dos vilos e profundidade quando comparados com o grupo 5-FU, além disso, evidenciou-se também nos grupos tratados uma diminuição de infiltrados inflamatórios e vacuolização celular.

No segmento íleo, por sua vez, observou-se apenas uma diferença sutil nas alterações histopatológicas dos grupos tratados com EPI 1mg/kg e 10 mg/kg quando comparada com o grupo 5-FU (Figura 18 G, H, I).

Figura 18: Fotomicrografias dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de camundongos e efeito protetor da EPI sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU



A, B, C correspondem aos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo, respectivamente) do grupo DMSO. O infiltrado de células inflamatórias é representado pelas setas vermelhas, as setas laranjas representam diminuição nas vilosidades intestinais, e a perda de arquitetura das criptas intestinais foi ilustrada pelas setas azuis. Os grupos em tratamento com a EPI 1mg/kg são representados pelas letras G, H e I e para o grupo 10mg/kg utilizou-se das letras J, K e L. Todas as imagens foram obtidas na objetiva de 10x (200µm) exceto as imagens ampliadas (D, E, F) que foram obtidas com o aumento de 20x (100µm).

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

O grupo DMSO apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo 5-FU ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 02.

Observou-se ainda uma diferença estatisticamente significativa do grupo EPI nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo 5-FU no duodeno e jejuno.

No íleo, por sua vez, nenhuma das doses apresentou diferença estatisticamente significante quando comparada ao grupo 5-FU ($p < 0,05$).

Tabela 2: Repercussões do tratamento com EPI sobre os escores Histopatológicos em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Segmentos Intestinais	Grupos Experimentais			
	DMSO	5-FU	EPI (mg/kg)	
			1	10
Duodeno	0 (0-0)	4 (4-4)#	1 (1-2)*	1 (1-4)*
Jejuno	0 (0-0)	4(4-4)#	2 (0-4)*	1,7 (1-3,5) *
Íleo	0 (0-0)	4 (4-4)#	2,5 (1-4)	3 (1-4)

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Os valores foram expressos como mediana, mínimo e máximo, onde # $p < 0,05$ vs DMSO e * vs grupo 5-FU.

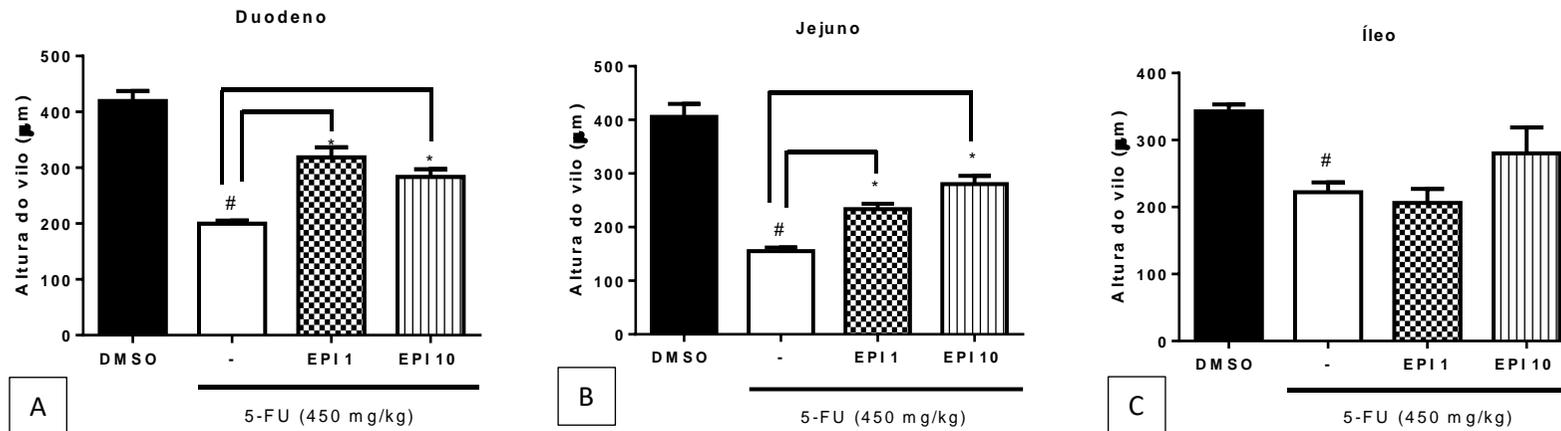
5.6 Efeito do tratamento com EPI nas alterações morfométricas na altura das vilosidades dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A análise morfométrica propiciou a mensuração da altura dos vilos no duodeno, jejuno e íleo (Figura 19 A, B, e C). O grupo 5-FU provocou a redução estatisticamente significativa na altura das vilosidades tanto no segmento duodenal ($199,8 \pm 5,50 \mu\text{m}$) quanto jejunal ($155,0 \pm 7,02 \mu\text{m}$) quando comparado com o grupo DMSO ($419,3 \pm 17,17 \mu\text{m}$; $405,4 \pm 24,31$) nestes segmentos.

Observou-se que no duodeno e jejuno, respectivamente, a EPI 1mg/kg ($318,7 \pm 17,88 \mu\text{m}$; $233,4 \pm 10,34 \mu\text{m}$) e EPI 10 mg/kg ($283,6 \pm 13,68 \mu\text{m}$; $280,1 \pm 15,57 \mu\text{m}$) aumentaram de maneira estatisticamente significativa a altura dos vilos quando comparado ao grupo 5-FU (Figura 19, A e B).

No que se refere ao segmento íleo, observou-se que o tratamento com EPI 1 mg/kg ($206,2 \pm 20,87 \mu\text{m}$) e EPI 10 mg/kg ($280,3 \pm 38,36 \mu\text{m}$) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo 5-FU, este, por sua vez, provocou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na altura das vilosidades ($222,2 \pm 14,64 \mu\text{m}$) quando comparados com o grupo DMSO ($342,7 \pm 10,44$).

Figura 19: Efeito do tratamento com EPI na altura dos vilos no duodeno, jejuno e íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU



A: Segmento duodeno; B: Jejunum; C: Íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

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

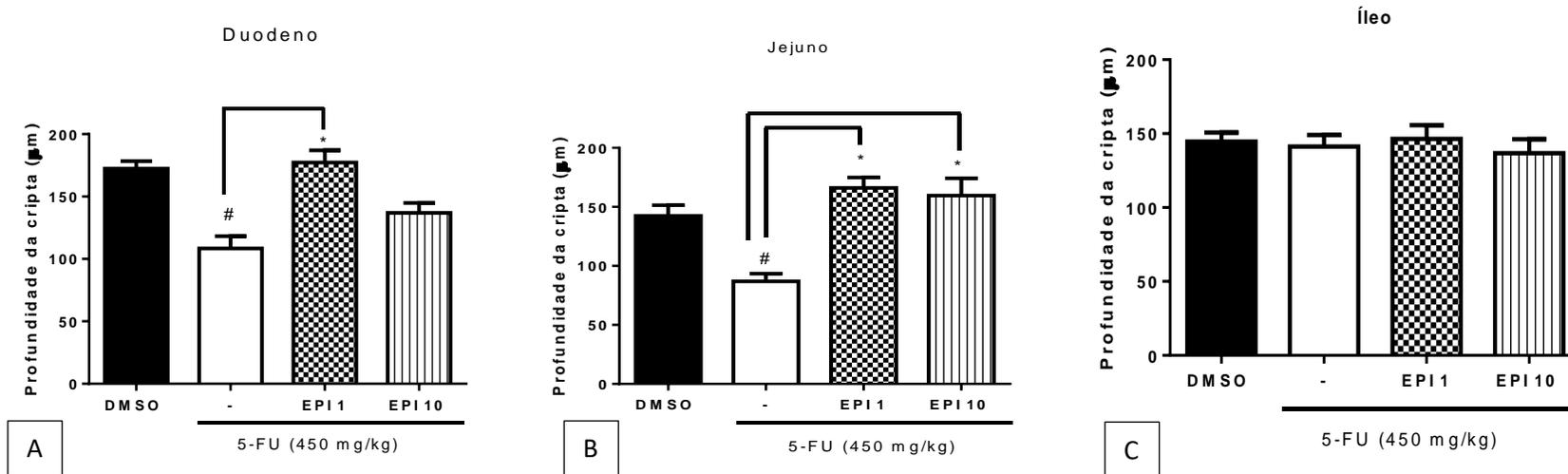
Ao se tratar da análise morfométrica da profundidade das criptas, observou-se que no duodeno o grupo 5-FU diminuiu de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a profundidade da cripta ($108,5 \pm 9,32 \mu\text{m}$), quando comparado com o grupo DMSO.

Verificou-se, ainda que no duodeno a EPI na dose de 1mg/kg ($177,3 \pm 9,74$) diferiu estatisticamente do grupo 5-FU ($108,5 \pm 9,73$), conforme visualizado na Figura 20 A. Contudo a dose de 10mg/kg não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo 5-FU.

Ao se mensurar a profundidade das criptas no segmento do jejuno, conforme a Figura 20 B, observou-se que 5-FU promoveu diminuição na profundidade das criptas ($86,98 \pm 6,41 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significante quando comparado ao grupo DMSO ($142,5 \pm 9,05 \mu\text{m}$). Em contraste notou-se que a EPI nas duas doses provocou reversão do efeito causado pelo 5-FU, isto é, aumento estatisticamente significativo da profundidade da cripta ($166,1 \pm 8,90$ e $159,6 \pm 14,67$) para EPI 1mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente.

Com relação ao íleo, pode-se observar conforme visualizado na figura 20 C, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Figura 20: Efeito do tratamento com EPI nas alterações morfológicas na profundidade das criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU



A: Segmento duodeno; B: Jejunum; C: Íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

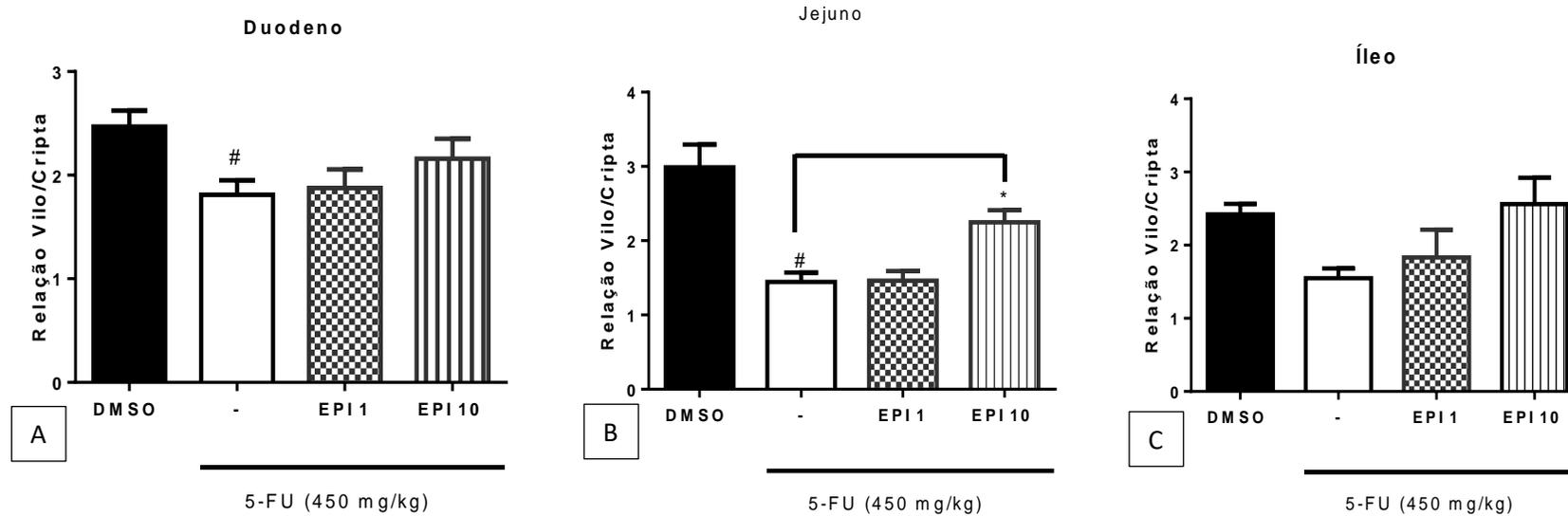
5.8 Efeito do tratamento com EPI na relação vilo/cripta dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Após a mensuração e análise da relação vilo/cripta no segmento do duodeno, (Figura 21 A), observou-se que o grupo 5-FU promoveu redução da relação vilo/cripta ($1,81 \pm 0,13 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significante quando comparado ao grupo DMSO ($2,47 \pm 0,15 \mu\text{m}$). Por sua vez, observou-se que o tratamento com EPI nas duas doses não foi capaz de reverter o efeito provocado pelo 5-FU, não havendo diferença estatisticamente significativa dos grupos EPI 1 ($1,88 \pm 0,17\mu\text{m}$), EPI 10 ($2,16 \pm 0,19\mu\text{m}$) quando comparado com o grupo 5-FU.

No que diz respeito à relação vilo/cripta no jejuno, é possível observar na Figura 21 B que o grupo 5-FU apresentou diferença estatisticamente significativa ($1,44 \pm 0,13 \mu\text{m}$) quando comparado ao grupo DMSO ($2,98 \pm 0,30$). Verificou-se ainda que a EPI na dose de 10mg/kg ($2,25 \pm 0,16 \mu\text{m}$) foi capaz de reverter de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a redução da relação vilo/cripta provocada pelo 5-FU, ao passo que na dose de 1mg/kg por não houve diferença estatisticamente significativa ($1,46 \pm 0,13 \mu\text{m}$).

Em contraste com o que foi observado nos segmentos anteriores, no segmento íleo não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 5-FU ($1,55 \pm 0,13 \mu\text{m}$) e o grupo DMSO ($2,42 \pm 0,14\mu\text{m}$) (Figura 21 C). Os grupos tratados com EPI 1 ($1,83 \pm 0,37 \mu\text{m}$) e EPI 10 ($2,56 \pm 0,36 \mu\text{m}$) também não apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 21: Efeito do tratamento com EPI Básica na relação vilos/criptas dos segmentos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.9 Efeito do tratamento com EPI na contagem de mastócitos dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

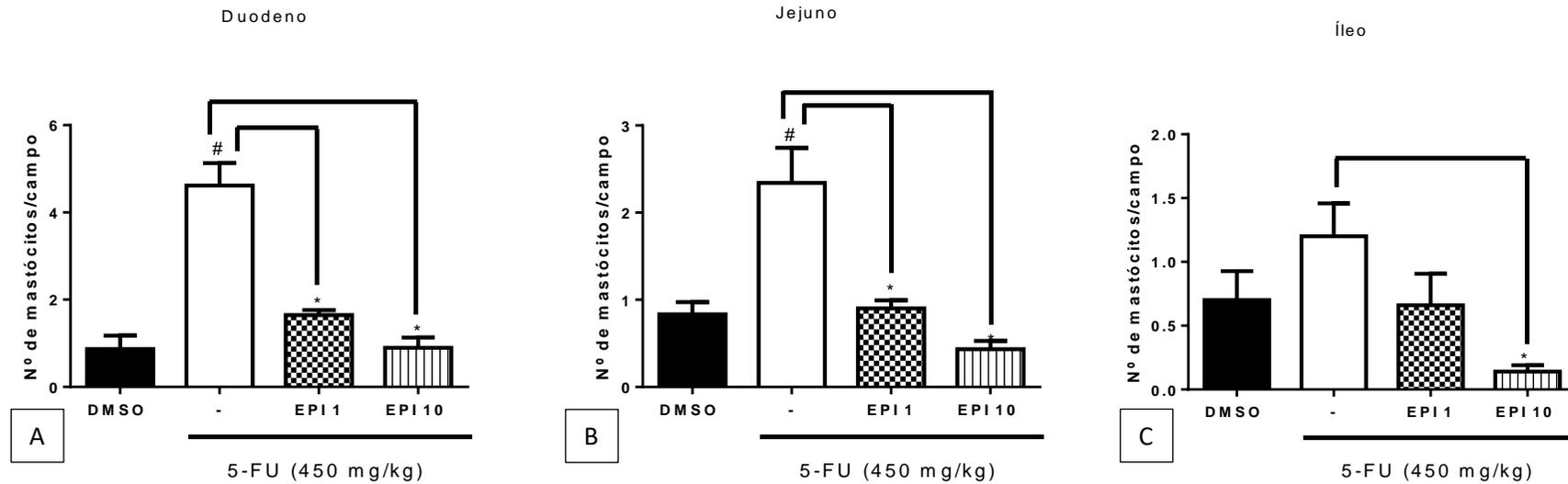
Observou-se que o grupo 5-FU apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de mastócitos quando comparado com o grupo DMSO ($0,86 \pm 0,31$; $0,83 \pm 0,14$) no duodeno e jejuno, respectivamente.

Verificou-se que de maneira semelhante no duodeno e jejuno (Figura 22 A e B) a EPI na dose de 1mg/kg ($1,65 \pm 0,11$; $0,90 \pm 0,09$) e 10mg/kg ($0,90 \pm 0,23$; $0,43 \pm 0,09$) provocou a redução estatisticamente significativa do número de mastócitos, quando confrontado com o grupo 5-FU ($4,62 \pm 0,51$; $2,34 \pm 0,4$).

No íleo por sua vez, observou-se que o tratamento com EPI na dose de 1mg/kg ($0,66 \pm 0,24$) não diferiu de maneira estatisticamente significativa do 5-FU, ao passo que a EPI 10 mg/kg ($0,14 \pm 0,05$) diminuiu de maneira estatisticamente significativa o número de mastócitos quando comparado ao 5-FU.

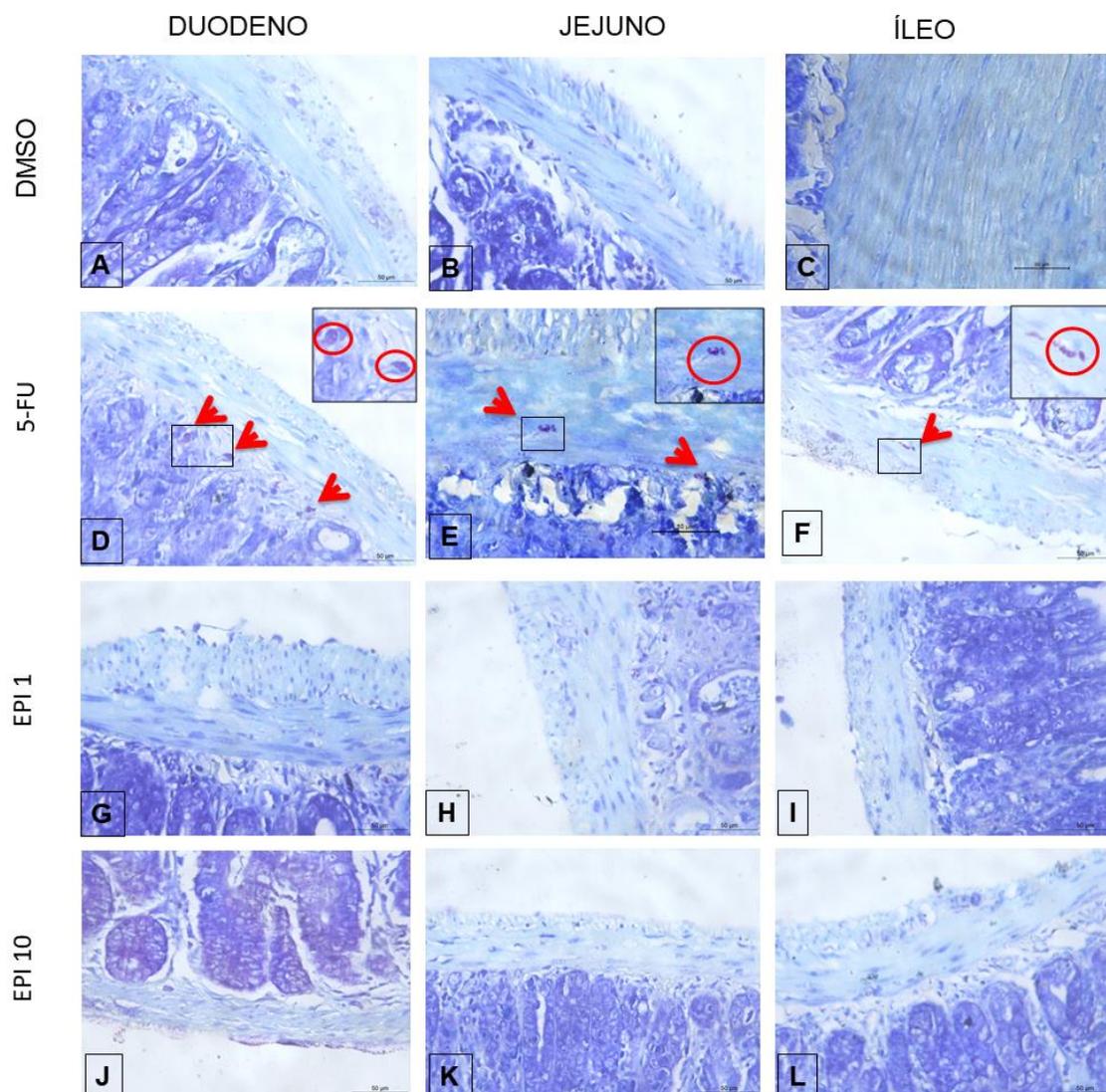
As fotomicrografias da figura 23 representam o número de mastócitos por campo, observou-se que a EPI 1 e EPI 10 foi capaz de reduzir o número de mastócitos por campo no duodeno e jejuno quando comparado com o 5-FU.

Figura 2214: A Epiisopiloturina reduz a contagem de mastócitos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.



A- Duodeno; B- Jejuno e C- Íleo. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 23: EPI reduz o número de mastócitos no duodeno e jejuno de camundongos com mucosite intestinal induzida pelo 5-FU



Os segmentos foram corados com azul de toluidina. **A, B, C:** DMSO no duodeno, jejuno e íleo; **D, E, F:** 5-FU; **G, H, I:** EPI 1 mg/kg; **J, K, L:** EPI 10 mg/kg. Os painéis foram obtidos na escala de 50 μm (40x).

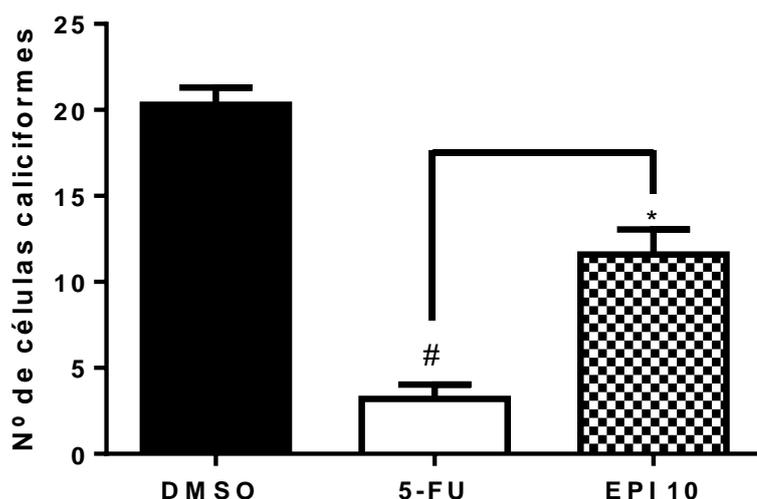
5.10 Efeito da EPI sobre o número de células caliciformes no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A partir dos parâmetros anteriormente observados, optou-se por selecionar a dose de 10 mg/kg e o segmento jejuno para se dar continuidade a avaliação.

Ao se tratar da contagem do número de células caliciformes, observou-se que o grupo 5-FU apresentou estatisticamente ($p < 0,05$) menos células que o grupo controle DMSO ($20,3 \pm 1,0$), conforme ilustrado na Figura 24. Verificou-se ainda que a EPI na dose de 10mg/kg preservou de forma estatisticamente significativa o número de células caliciformes no jejuno ($11,60 \pm 1,4$) quando comparada com o número de células do grupo 5-FU ($3,2 \pm 0,84$).

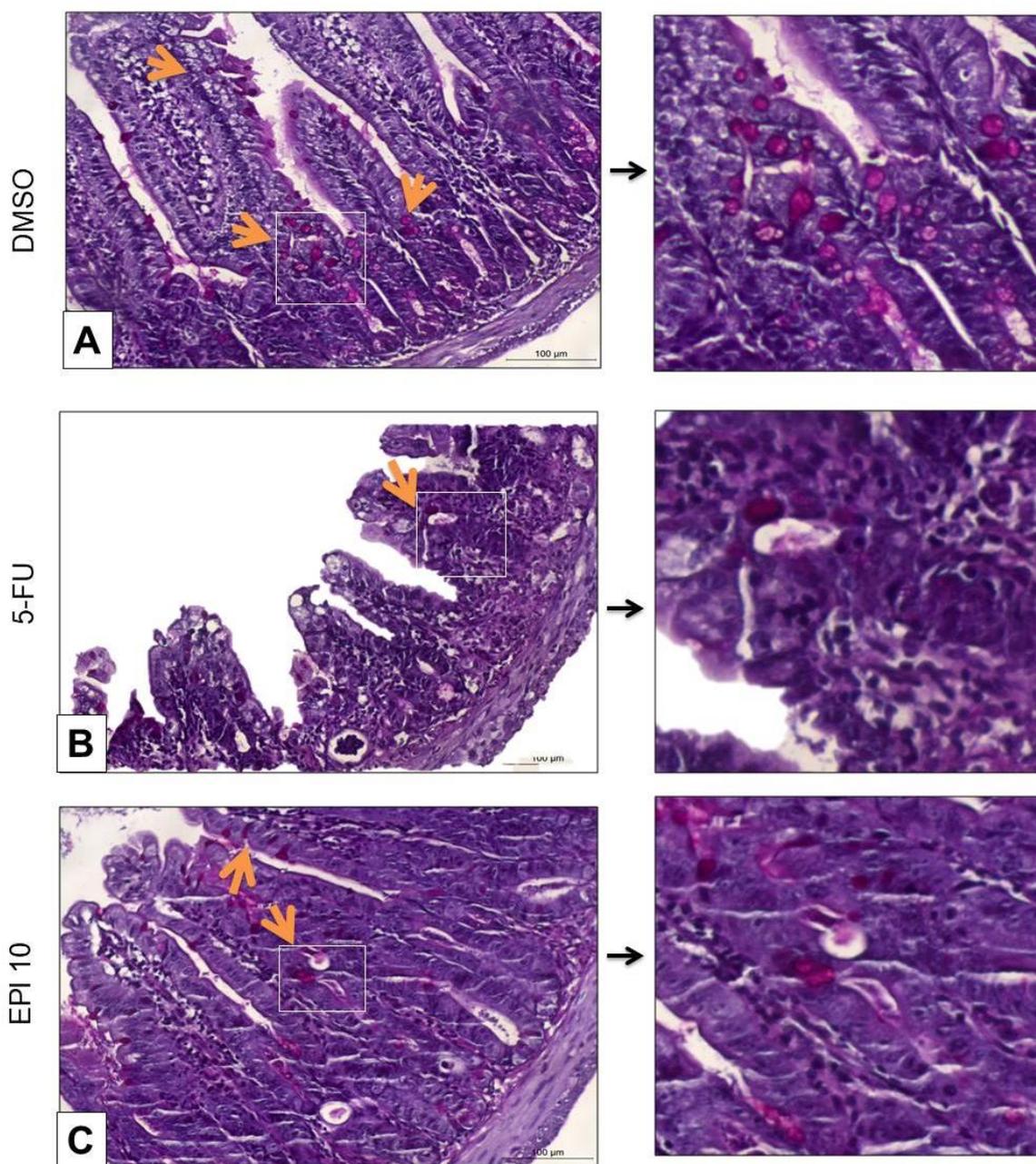
Na figura 24 é possível observar o aumento do número de células caliciformes coradas em púrpura-magenta no grupo EPI 10 mg/kg (Figura 25 C) quando comparado com o 5-FU (Figura 25 B) em que notou-se uma redução de tais células. Evidenciou-se ainda a elevada presença de tais células no grupo controle (Figura 25 A).

Figura 24: EPI previne a redução do número de células caliciformes provocada pelo 5-FU no modelo de mucosite intestinal



Foram contadas as células presentes em 10 vilos e criptas. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, onde o $\#p < 0,05$ vs grupo DMSO e $*p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 25: EPI previne a redução do número de células caliciformes provocada pelo 5-FU no modelo de mucosite intestinal

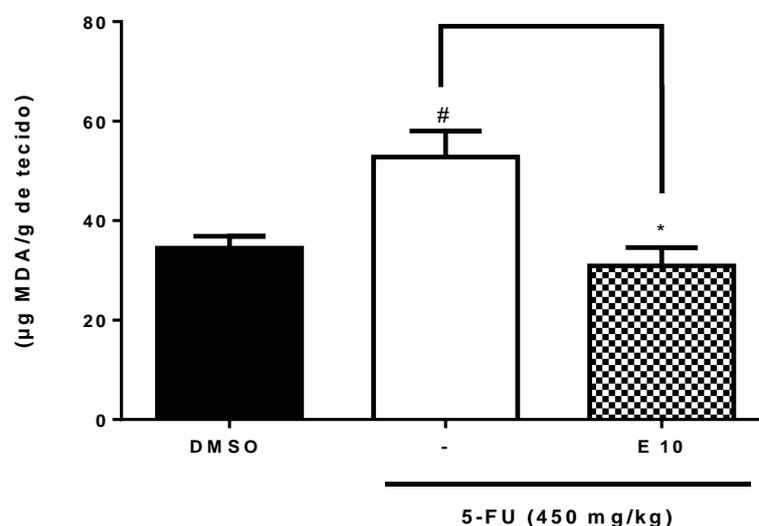


A: DMSO; **B:** 5-FU450 mg/kg; **C:** EPI 10 mg/kg. As células caliciformes são apontadas pelas setas laranjas. Os painéis foram obtidos com o aumento de 20x (100µm).

5.11 Efeito da EPI sobre os níveis teciduais de MDA na mucosite intestinal induzida por 5-FU

O 5-FU ($52,81 \pm 5,23$) provocou aumento ($p < 0,05$) dos níveis de MDA quando comparado com o grupo DMSO ($34,46 \pm 2,41$). Demonstrou-se que no jejuno a EPI na dose de 10mg/kg reduziu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) os níveis de MDA ($30,90 \pm 3,66$), em comparação ao grupo 5-FU (Figura 26).

Figura 26: EPI reduz os níveis teciduais de MDA no jejuno de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de MDA expressos em μg MDA/g de tecido. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, onde # $p < 0,05$ vs grupo DMSO e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.12 Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcação para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU

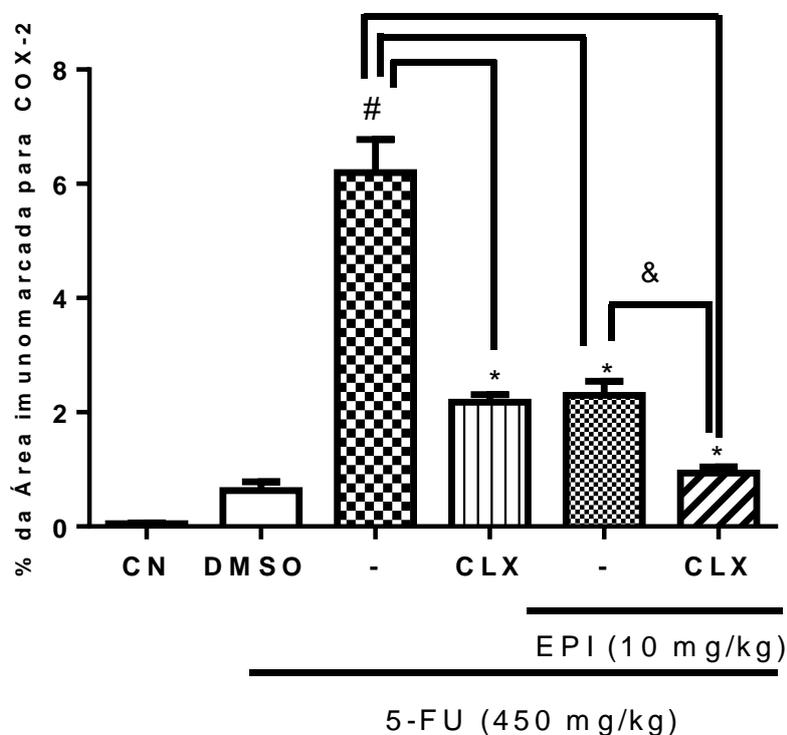
Observou-se a existência de diferença estatisticamente significativa entre o grupo 5-FU e DMSO. Na Figura 28 B, observa-se que os animais tratados apenas com DMSO apresentaram imunomarcação sutil para COX-2, quando comparado ao grupo lesivo 5-FU, na qual se observa intensa e generalizada imunomarcação para COX-2 (Figura 28 C).

Elucidou-se ainda, que os grupos tratados com EPI 10 mg/kg, com CLX e com a combinação de CLX+ EPI (Figura 27) apresentaram redução estatisticamente significativa da área imunomarcada para COX-2 quando comparado com o grupo 5-FU.

Verificou-se também que o tratamento combinado de CLX+ EPI apresentou menor área imunomarcada quando comparado com o grupo tratado apenas com EPI, observando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Figuras 27 e 28 F).

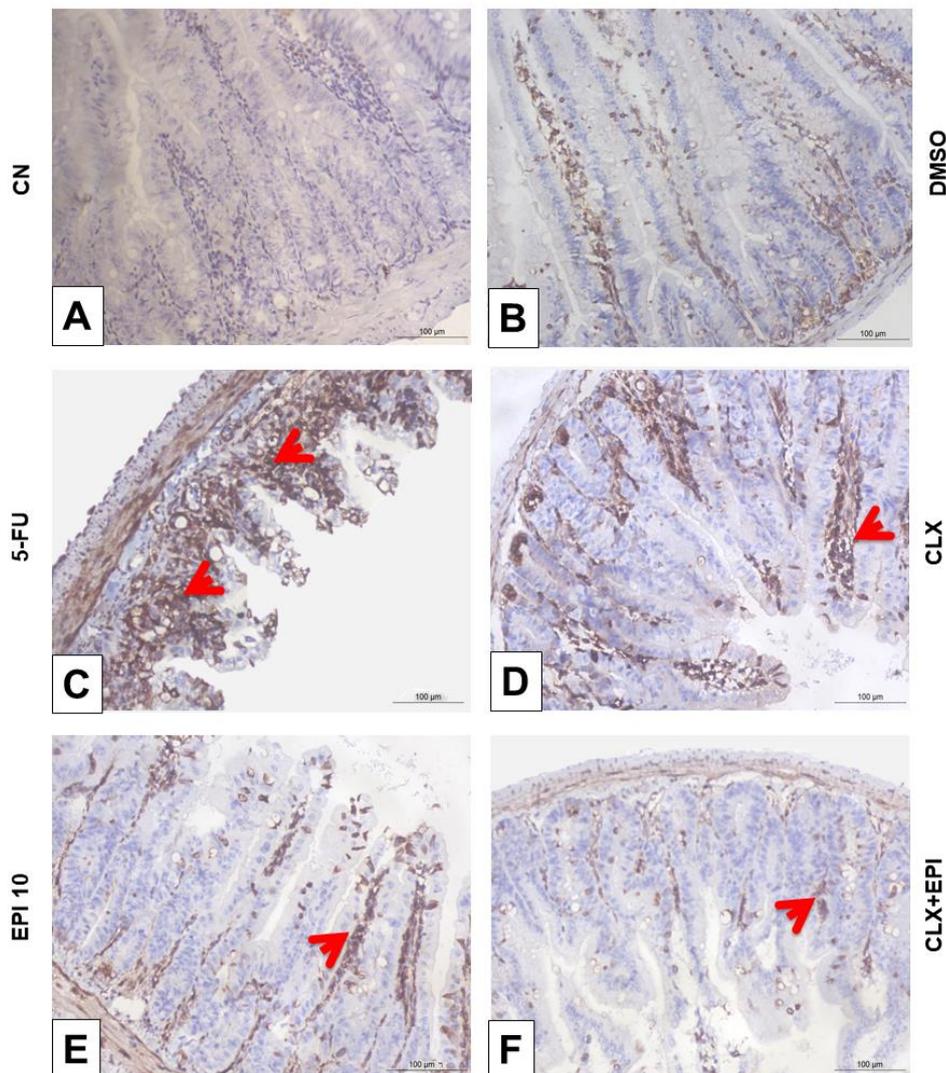
A Figura 28 A corresponde ao controle negativo, na qual representa uma amostra de jejuno onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5%, não sendo observada marcação pra COX-2.

Figura 27: Avaliação da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcagem para COX-2 em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU



CN: Controle Negativo representa uma amostra do jejuno onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação pra COX. **DMSO:** Solução veículo de dimetilsulfóxido. **CLX:** Celecoxibe 7,5 mg/kg . **EPI:** Epiisopiloturina 10mg/kg. **CLX+ EPI:** Celecoxibe+Epiisopiloturina. Os valores foram expressos como média \pm EPM do percentual da área imunomarcada para COX-2. Para análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn, onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, & $p < 0,05$ vs grupo EPI 10.

Figura 28: Fotomicrografias de Imunohistoquímica para COX-2 do segmento jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com EPI



A: Controle Negativo; **B:** Grupo DMSO; **C:** Grupo 5-FU; **D:** CLX, grupo Celecoxibe (7,5 mg/kg); **E:** Grupo EPI (10 mg/kg); **F:** Grupo Celecoxibe+ Epiisopiloturine. O Controle negativo representa uma amostra do jejuno onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para COX-2. Os painéis foram obtidos na objetiva de 20x(100 µm). As setas vermelhas indicam a área marcada para COX-2.

5.13 Avaliação do envolvimento da COX-2 no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

O 5-FU provocou diminuição com diferença estatisticamente significativa na altura dos vilos ($66,17 \pm 4,72$) quando comparado ao grupo DMSO ($215,9 \pm 6,68$), além disso, o grupo 5-FU apresentou intenso infiltrado de células inflamatórias (Figura 30 B), vacuolização celular e destruição das criptas o que não foi observado no grupo DMSO.

Conforme observado na figura 29 A e visualizado na figura 30 D, este estudo evidenciou que o tratamento com EPI 10 ($162,2 \pm 11,40$) foi capaz de prevenir de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o encurtamento dos vilos provocados pelo 5-FU. Ressalta-se também que o tratamento com EPI diminuiu o infiltrado inflamatório e a vacuolização celular, quando comparado ao grupo 5-FU.

Verificou-se ainda que o tratamento com o anti-inflamatório Celecoxibe, um bloqueador de cicloxigenase-2 (COX-2) (Fig. 30 C), assim como, o tratamento combinado de Celecoxibe (CLX) + EPI 10 (Fig. 30 E), foram capazes de prevenir a vacuolização celular, diminuição do infiltrado inflamatório e formação de edemas, prevenção da perda da arquitetura celular. Além disso, morfometricamente tanto o CLX ($124,8 \pm 6,84$) quanto o grupo CLX+EPI 10 ($172,7 \pm 8,13$) preveniram o encurtamento das vilosidades, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do grupo 5-FU, conforme observado na Figura 29 A.

No que diz respeito à avaliação do envolvimento da COX-2 no efeito protetor da EPI, verificou-se que tanto o grupo que recebeu o tratamento com EPI 10 ($162,2 \pm 11,40$) quanto o que recebeu a associação de EPI 10 + CLX ($172,7 \pm 8,13$) apresentaram maior altura dos vilos com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao que recebeu apenas CLX. Por sua vez, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo EPI e EPI+CLX, muito embora a média das vilosidades tenha sido maior no grupo EPI+CLX (Figura 29 A).

Já com relação à profundidade das criptas (Figura 29 B), este estudo evidenciou que a EPI ($89,25 \pm 4,08 \mu\text{m}$) promoveu o aumento estatisticamente significativo da altura da profundidade da cripta, quando comparado ao grupo 5-FU ($p < 0,05$). O tratamento com o bloqueador da cicloxigenase-2 (COX-2), CLX ($69,29 \pm 4,42$), e a associação de EPI+ Celecoxibe ($73,81 \pm 5,00 \mu\text{m}$), não apresentaram diferença

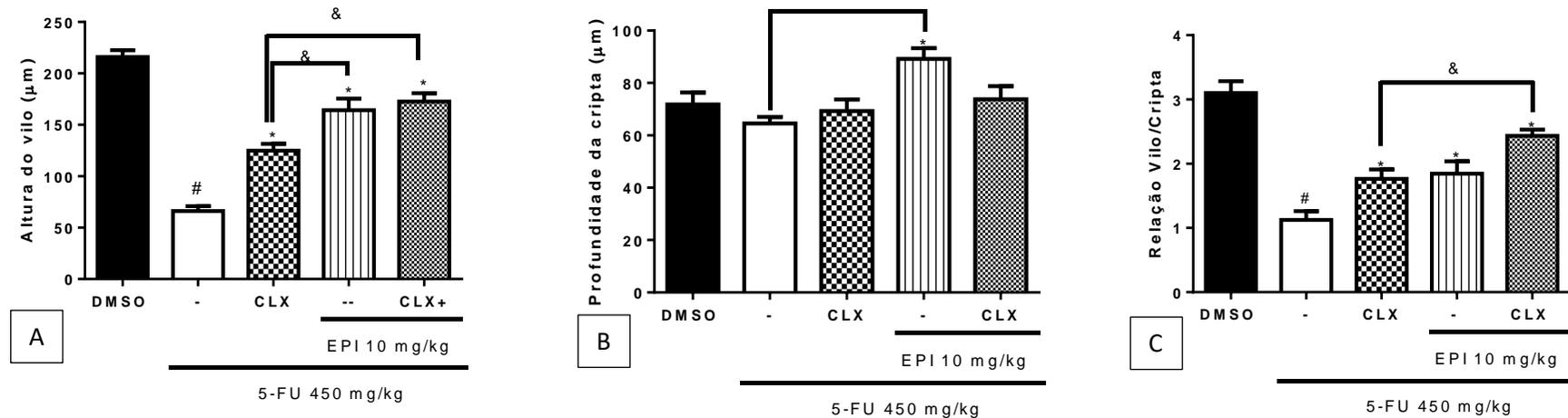
significativa ($p < 0,05$) em relação ao aprofundamento das criptas quando comparado ao grupo 5-FU.

Com relação a avaliação da relação vilosidade/cripta no segmento do jejuno, conforme a figura 29 C verificou-se que o grupo 5-FU promoveu redução da relação vilosidade/cripta ($1,13 \pm 0,18 \mu\text{m}$) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DMSO ($3,10 \pm 0,18 \mu\text{m}$). Ao passo, que os grupos tratados com EPI 10 ($1,84 \pm 0,19 \mu\text{m}$), CLX ($1,76 \pm 0,14 \mu\text{m}$), EPI + CLX ($2,43 \pm 0,09 \mu\text{m}$) apresentaram aumento estatisticamente significativo da relação vilosidade/cripta quando comparado ao grupo lesado com 5-FU ($p < 0,05$).

Observou-se também, que os animais tratados com a EPI+CLX (Figura 29 C) apresentaram estatisticamente maior relação vilosidade/cripta quando comparados com os animais tratados apenas com o CLX ($p < 0,05$).

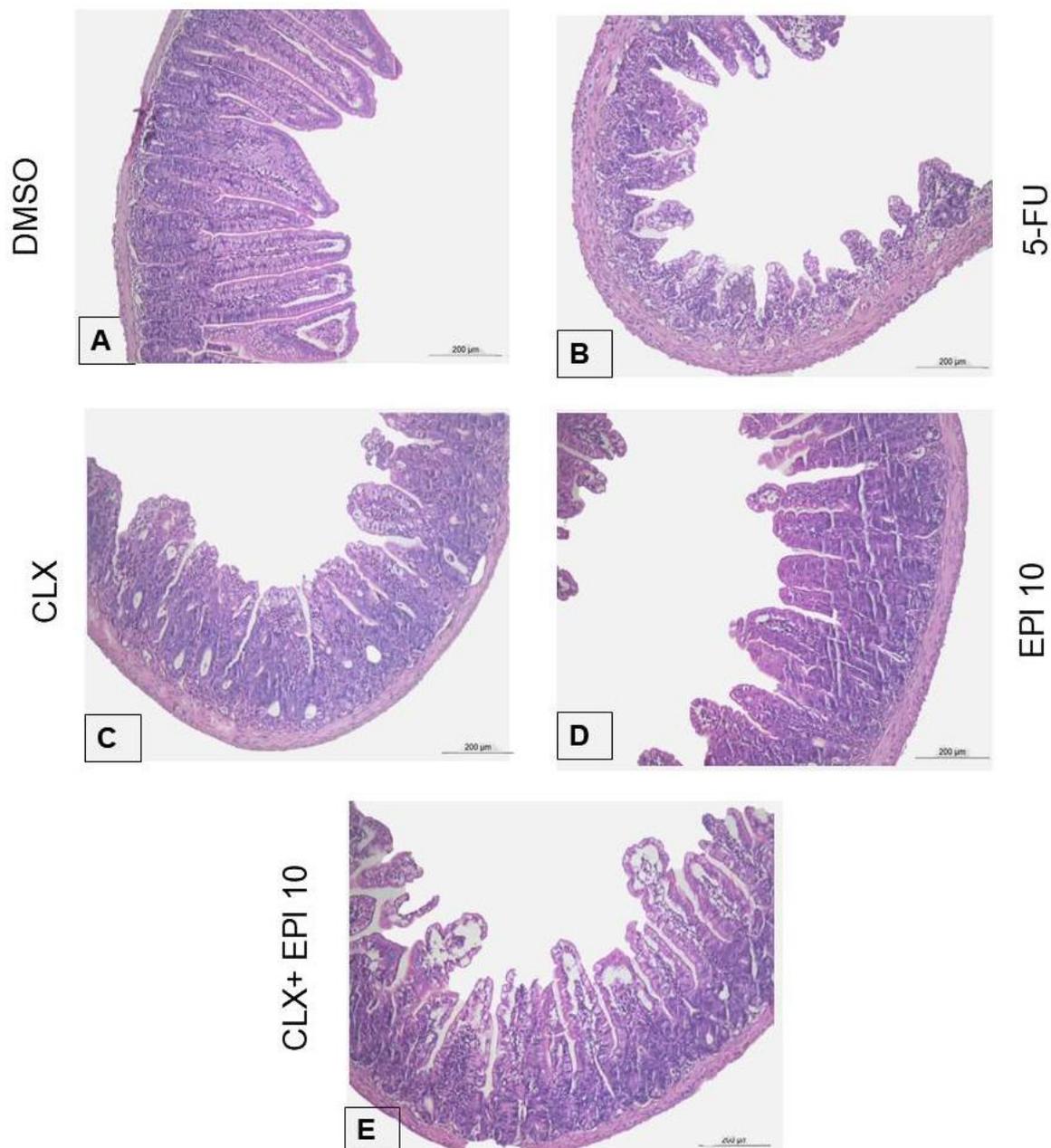
Baseado nessas premissas verificou-se que existe o envolvimento da COX-2 na mucosite intestinal.

Figura 29: Envolvimento da cicloxigenase2 (COX-2) no efeito protetor da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos



A: Altura do vilão; **B:** Profundidade da cripta; **C:** Relação Vilo/cripta; **DMSO:** Solução veículo (10mg/kg i.p), **CLX:** Celecoxibe (7,5 mg/kg, i.p.), **EPI:** Epiisopiloturina 10mg/kg ou Celecoxibe 7,5mg/kg + Epiisopiloturina. Os valores foram expressos como média \pm EPM para altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilão/cripta em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, & $p < 0,05$ vs grupo CLX.

Figura 30: Fotomicrografias do segmento jejuno de camundongos na avaliação do envolvimento da cicloxigenase (COX-2) no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfométricas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU



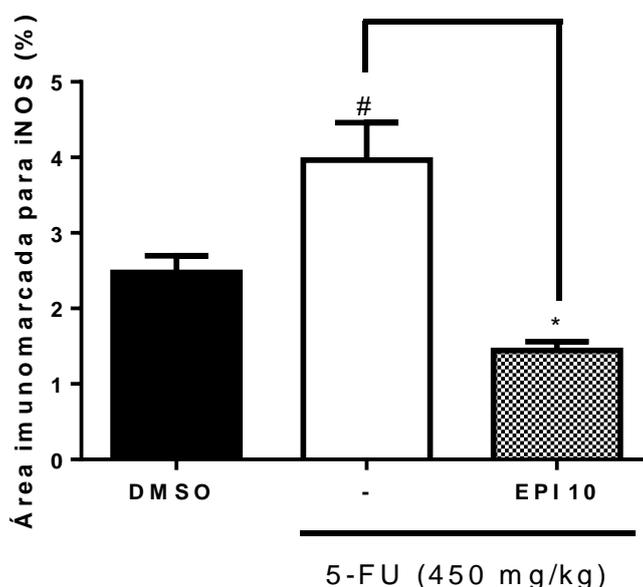
Todos os painéis foram obtidos na escala de 220 µm com aumento de 10x. **A:** Grupo DMSO, **B:** grupo 5-FU (450 mg/kg i.p), **C:** Grupo CLX (celecoxibe 7,5 mg/kg i.p), **D:** Grupo EPI 10 (10 mg/kg i.p), **E:** CLX+ EPI10 (celecoxibe 7,5 mg/kg i.p + EPI 10mg/kg i.p).

5.14 Avaliação do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcção para iNOS em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU

Verificou-se a existência de diferença estatisticamente significativa entre o grupo 5-FU e DMSO. Na Figura 30 B, observa-se que os animais tratados com DMSO apresentaram pouca marcação iNOS, quando comparado ao grupo lesivo 5-FU, na qual se observa maior intensidade para a imunomarcção de iNOS (Figura 32 C).

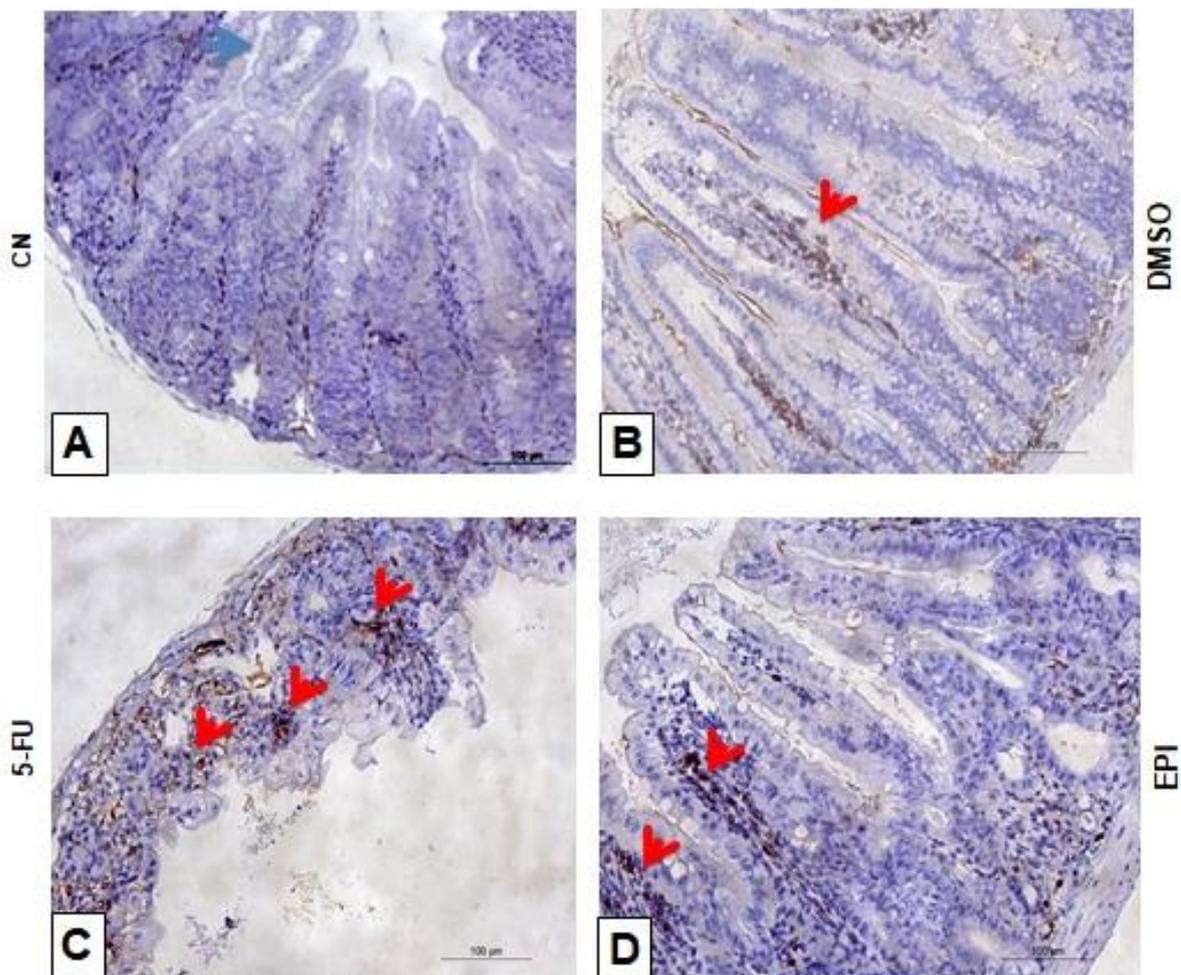
Observou-se ainda, que o grupo tratado com EPI 10 mg/kg (Figura 31) apresentou redução estatisticamente significativa da área imunomarcada para iNOS quando comparado com o grupo 5-FU.

Figura 31: Avaliação do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre a imunomarcção para INOS em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU



DMSO: Solução veículo de dimetilsulfóxido. **5-FU:** 5-Fluorouracil, **EPI 10:** Epiisopiloturina 10mg/kg. Os valores foram expressos como média \pm EPM do percentual da área imunomarcada para INOS. Para análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn, onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 32: Fotomicrografias de Imunohistoquímica para iNOS do segmento jejuno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com EPI



A: Controle Negativo; **B:** Grupo DMSO; **C:** Grupo 5-FU; **D:** Grupo EPI (10 mg/kg). O Controle negativo representa uma amostra do jejuno onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra marcação para iNOS. Os painéis foram obtidos na objetiva de 20x(100 µm). As setas vermelhas indicam a área marcada para iNOS.

5.15 Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfométricas e histopatológicas em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Pode-se observar na figura 33 A que com relação a altura do vilão, que quimioterápico 5-FU foi capaz de provocar diminuição estatisticamente significativa na altura dos vilos quando comparado ao grupo DMSO ($220,1 \pm 4,02$). Os danos provocados pelo 5-FU podem ser visualizados na Figura 34 B.

Verificou-se que os animais tratados com o inibidor de óxido nítrico L-NAME ($128,1 \pm 6,89$), bem como os tratados com EPI 10 mg/kg ($130,5 \pm 12,07$) e com a combinação EPI+ L-NAME ($163,8 \pm 5,27$) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo 5-FU ($67,35 \pm 1,44$). Contudo, os animais que foram tratados com L-Arginina ($90,24 \pm 3,08$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa na altura das vilosidades.

Vale a pena ressaltar que houve também diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados apenas com EPI 10 mg/kg e o grupo que recebeu EPI + L-NAME, onde os animais que receberam o tratamento combinado com o inibidor de óxido nítrico apresentaram maior altura do vilão.

No que diz respeito à profundidade da cripta (Figura 33 B) verificou-se que o grupo tratado com EPI 10 mg/kg ($59,39 \pm 2,86$) e o grupo tratado com EPI + L-NAME ($67,87 \pm 2,50$) diferiram estatisticamente do grupo 5-FU ($47,70 \pm 0,99$). Este por sua vez, apresentou menor profundidade da cripta, com diferença estatisticamente significativa do grupo DMSO ($87,14 \pm 4,65$).

Também se verificou diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado apenas com EPI ($59,39 \pm 2,86$) e o grupo que recebeu EPI + L-NAME ($67,87 \pm 2,50$).

Todavia, neste parâmetro o tratamento apenas com o inibidor de óxido nítrico L-NAME ($49,72 \pm 1,47$) não diferiu estatisticamente do grupo lesivo. De igual maneira o grupo L-Arginina ($41,51 \pm 1,30$) também não apresentou diferença estatística na profundidade da cripta quando comparados com o grupo 5-FU ($47,70 \pm 0,99$).

É possível observar ainda (Figura 33 B) a intensa destruição das criptas provocada pelo quimioterápico.

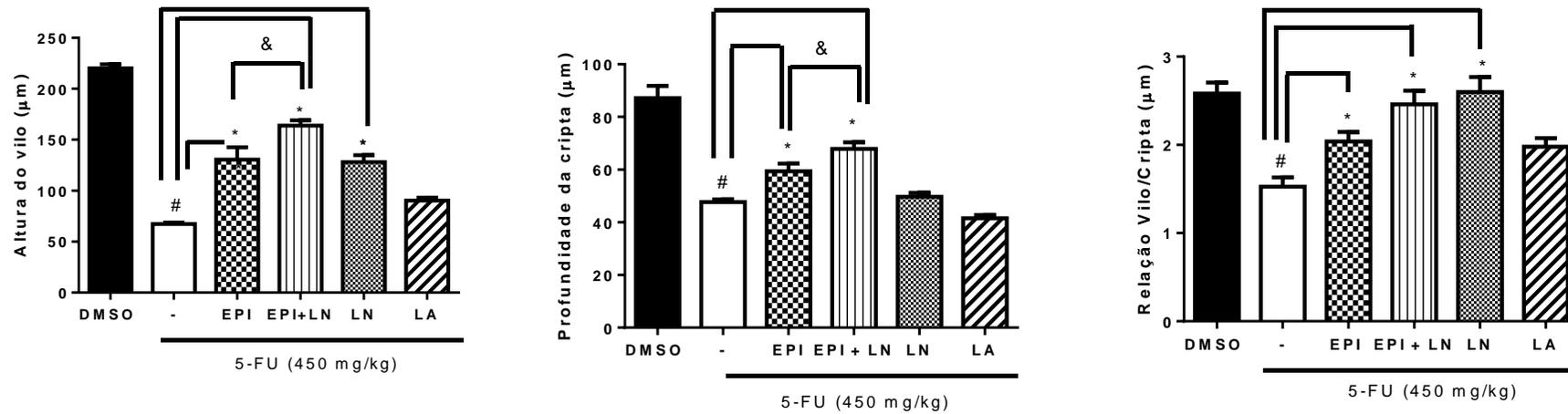
Já com relação à avaliação da relação vilão/cripta (Figura 33 C), este estudo evidenciou que o grupo 5-FU promoveu redução da relação vilão/cripta ($1,52 \pm 0,10$

μm) de maneira estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo DMSO ($2,58 \pm 0,12 \mu\text{m}$). Ao passo que a EPI ($2,03 \pm 0,10 \mu\text{m}$) promoveu o aumento estatisticamente significativo da relação vilos/criptas, quando comparado ao grupo 5-FU ($1,52 \pm 0,10 \mu\text{m}$). O tratamento com L-NAME ($2,59 \pm 0,17 \mu\text{m}$), e a associação de EPI+ L-NAME ($2,46 \pm 2,11 \mu\text{m}$) também apresentaram aumento estatisticamente significativo da relação vilos/criptas quando comparado ao grupo lesado com 5-FU.

Observou-se também que os animais tratados com o estimulador de óxido nítrico L-Arginina ($1,97 \pm 0,09 \mu\text{m}$) não apresentaram estatisticamente maior relação vilos/criptas quando comparados com o grupo 5-FU ($1,52 \pm 0,10 \mu\text{m}$).

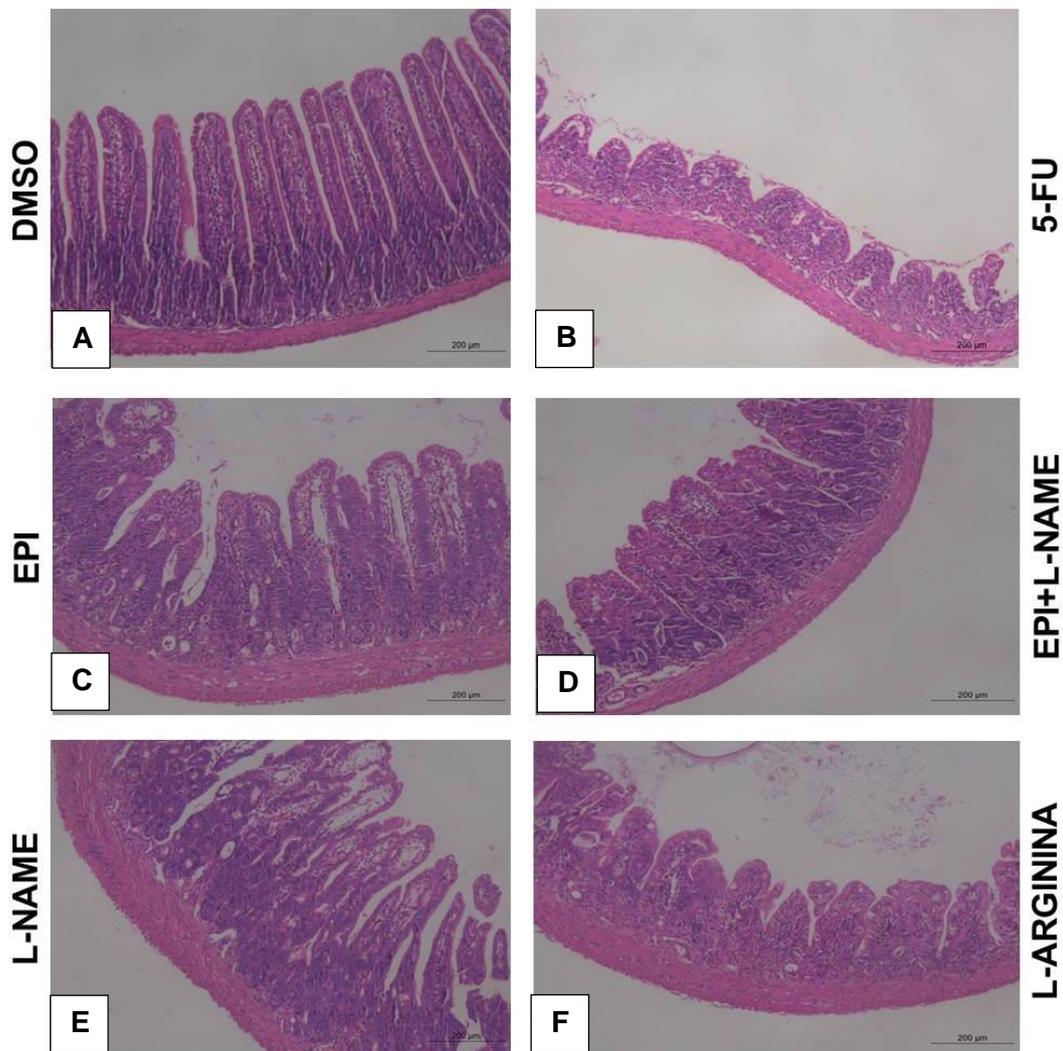
Tais resultados demonstram provável envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor do EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Figura 33: Envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos



A: Altura do vilão; **B:** Profundidade da cripta; **C:** Relação Vilão/cripta; **DMSO:** Solução veículo (10mg/kg i.p), **EPI:** Epiisopiloturina 10mg/kg, **EPI + LN:** Epiisopiloturina 10mg/kg + LNAME.; **LN:** LNAME 20 mg/kg. Os valores foram expressos como média \pm EPM para altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilão/cripta em μm . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Tukey, onde o # $p < 0,05$ vs grupo DMSO, * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU, & $p < 0,05$ vs grupo EPI + LNAME.

Figura 34: Fotomicrografias do segmento jejuno de camundongos na avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da EPI sobre as alterações morfológicas e histopatológicas na mucosite intestinal induzida por 5-FU



Todos os painéis foram obtidos na escala de 220 µm com aumento de 10x. **A:** DMSO, **B:** 5-FU (450 mg/kg i.p); **C:** EPI 10 (10 mg/kg i.p); **D:** EPI 1+ L-NAME; **E:** L-NAME; **F:** L-ARGININA.

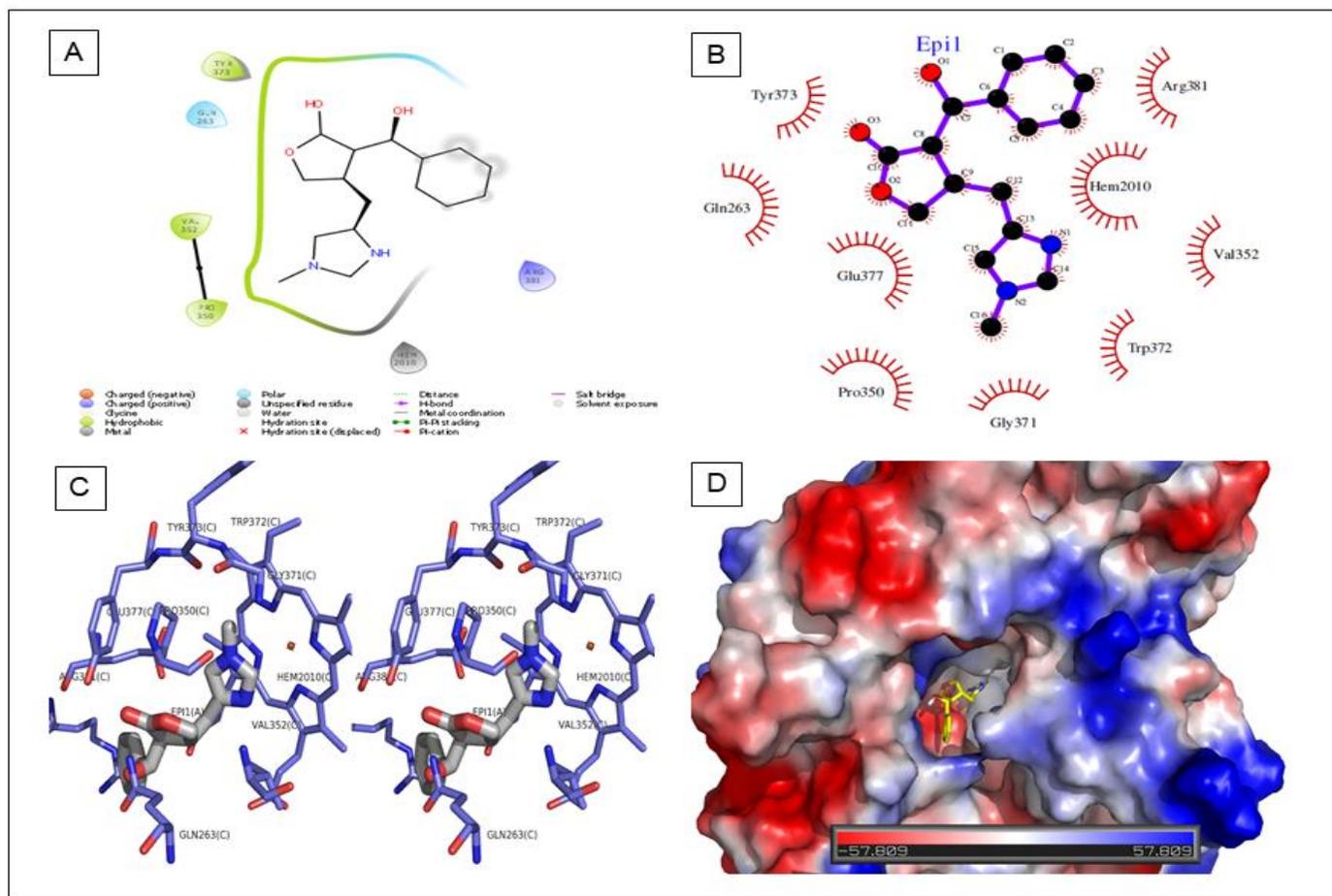
5.16 *Docking* molecular da EPI com iNOS

Os complexos proteína-ligante da EPI foram inseridas na cavidade da iNOS através do software Autodock 4.2, como mostrado na Figura 35 C. As interações entre a EPI e iNOS ocorreram em seis resíduos de aminoácidos no sítio ativo da iNOS, (TYR373, GLN263, VAL352, PRO350,HEM2010 e ARG381) (Figura 35 A).

Observou-se que houve interações hidrofóbicas, polares e carregadas positivamente entre a EPI e a iNOS, além disso, é preciso destacar que tais interações ocorreram no ferro do heme, que é o sítio ativo da iNOS.

A energia de ligação que resultou na interação EPI-iNOS foi negativa (-8,5 kcal / mol), em uma constante de inibição de 0,68 μ M. Utilizou-se rmsd <2Å. Os modelos de acoplamento molecular das interações são ilustrados na Figura 35.

Figura 35: Docking molecular da EPI com iNOS



A: Ilustração em 2-D dos tipos de interações entre a Epiisopiloturina e a iNOS, contendo uma legenda com os vários tipos de interação; **B:** Detalhes das interações entre a EPI e o sítio de ligação da iNOS; **C:** Visualização estéreo em 3D do encaixe da EPI no local de ativação, mostrando interações com resíduos vizinhos através de interações hidrofóbicas; **D:** Representação do potencial eletrostático da iNOS e da EPI fixada em seu sítio de interação.

6 DISCUSSÃO

Durante o ensaio de toxicidade da Episopiloturina (EPI), não foram observados quaisquer sintomas de toxicidade sobre os animais estudados. Também não houve diferença significativa do número de leucócitos circulantes, no peso, na ingestão de água, ração e nem diferença significativa do peso dos órgãos. Esses resultados propõem que a EPI é um composto com baixa toxicidade.

Guimarães (2018) realizou uma avaliação toxicológica e verificou que a EPI apresentou uma DL50 superior a 2000 mg/kg, não observou sinais de toxicidade e o tratamento não mostrou diferença significativa nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, corroborando com o encontrado neste estudo.

Sabe-se, que a avaliação toxicológica se constitui como um importante parâmetro para o aprofundamento em pesquisas com substâncias de origem natural, bem como, para o desenvolvimento de fármacos. Neste sentido, a EPI apresentou um perfil de segurança para realização e prosseguimento com testes *in vivo* na mucosite intestinal.

Neste estudo, reproduziu-se um modelo de mucosite intestinal elaborado por Carneiro-Filho (2004), que foi modificado para a mucosite induzida por 5-FU. Demonstrou-se, que a administração de 5-FU na dose única de 450 mg/kg em camundongos foi capaz de provocar alterações ponderais, histopatológicas, morfométricas, leucopenia, além de aumentar a peroxidação lipídica, e a inflamação.

A administração de EPI pode prevenir a mielosupressão e prevenir as alterações morfométricas, histopatológicas, bem como o aumento do peroxidação lipídica e da inflamação, contudo, não foi capaz de reverter a perda ponderal provocada pela administração de 5-FU.

Na mucosite intestinal a avaliação da perda de peso é crucial para a confirmação do modelo experimental de mucosite em camundongos, sendo este um dos primeiros parâmetros analisados nas pesquisas experimentais a respeito da patologia (AZEVEDO et al., 2012). Já é bem estabelecido que a perda de peso é considerada como uma grave complicação clínica que acomete os pacientes que estão em tratamento quimioterápico e eleva exponencialmente o risco de sepse e morte.

Desse modo, observou-se que o modelo de mucosite intestinal empregado nesse estudo foi estabelecido, pois em concordância com o esperado o 5-FU provocou significativa perda ponderal quando comparado com o grupo DMSO. Além disso, notou-se que tal decréscimo de massa corporal aumentou progressivamente no decorrer dos dias de protocolo, de maneira semelhante ao encontrado na pesquisa de Cheah; Howarth; Bastian (2016) em que os animais que receberam a indução da mucosite intestinal com 5-FU apresentaram redução estatisticamente significativa do peso corporal quando comparado ao grupo controle.

No presente modelo de mucosite intestinal foram testadas duas doses de EPI (1mg /kg e 10 mg/kg) corroborando com o estudo de Rocha, 2017. Nenhuma das doses foi capaz de reverter a perda de peso provocada pelo 5-FU. Santos-Filho et al. (2016) demonstrou em seu estudo com um protocolo experimental de 7 dias que o 5-FU provocou redução do peso corpóreo de maneira ainda mais efetiva a partir do 4 dia, corroborando com o encontrado neste estudo.

Vale a pena ressaltar, que no presente estudo observou-se a presença de diarreia nos animais tratados com 5-FU, o que pode ter também contribuído para a perda de peso. Entre as razões elucidadas para explicar a perda ponderal, está a diminuição na ingestão alimentar e da capacidade de absorção intestinal, uma vez que, a quimioterapia é capaz de provocar a apoptose dos enterócitos. Tais células epiteliais estão localizadas no intestino delgado, e são responsáveis pela absorção de nutrientes (LIU et al., 2013; ÁVILA et al., 2015).

Além das consequências ponderais, o 5-FU também é capaz de provocar mielossupressão, um efeito colateral marcante do tratamento quimioterápico e um forte indicador para verificar a indução do modelo de mucosite intestinal (ARAÚJO et al., 2015).

O presente estudo demonstrou que a EPI nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg foi capaz de prevenir a leucopenia provocada pelo 5-FU na mucosite intestinal. O 5-FU provoca a redução do número de leucócitos por meio da sua capacidade de provocar hipocelularidade na medula óssea, que é responsável pela regulação da distribuição das células hematopoiéticas em todo o corpo. A ação do antineoplásico sobre a divisão celular provoca uma redução na atividade do tecido hematopoiético e um declínio correspondente na produção de células (BARRETO, 2014).

No quadro de mucosite intestinal a redução dos leucócitos que são importantes células de defesas, pode acarretar sérios prejuízos, especialmente na

fase ulcerativa da mucosite, visto que, tal etapa é caracterizada pela perda da integridade da mucosa. Durante essa fase há maior probabilidade de infecção bacteriana e, por conseguinte elevado risco de complicações clínicas, como o maior risco de sepse e morte (SONIS, 2004; KIM et al., 2015). Dessa forma, o fato da EPI ter sido capaz de prevenir a leucopenia provocada pelo quimioterápico, pode representar um importante ponto sobre o qual se elenca positivamente o efeito protetor da EPI na mucosite intestinal.

Outro aspecto de suma importância no que diz respeito à mucosite intestinal é a manutenção da integridade das suas estruturas morfológicas das quais se incluem os vilos e as criptas, estas contribuem com o complexo mecanismo de absorção intestinal. As vilosidades se constituem como segundo grau de complexidade estrutural no intestino delgado, estas são dobras da mucosa (epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa). A arquitetura das vilosidades pode ser modificada por processos de adaptação em resposta à dieta e às demandas fisiológicas, ou condições patológicas (SANIOTO, 2016).

Observou-se neste estudo, que a EPI foi capaz de proteger as alterações provocadas pelo 5-FU sobre a altura das vilosidades, no duodeno e jejuno não tendo efeito, contudo sobre o íleo. Acredita-se que a ausência de efeito significativo da EPI no íleo, tenha ocorrido em virtude das diferenças fisiológicas existentes entre os segmentos intestinais.

Sabe-se, que o íleo contribui muito menos para a nutrição, possui níveis mais baixos de enzimas de borda em escova e vilosidades marcadamente mais curtas. Além disso, esse segmento intestinal é caracterizado por uma elevada carga microbiana por ml (10^3 - 10^5). Tal fato pode contribuir para a desregulação das células de Paneth, que são mais concentradas no íleo e desempenham um importante papel antibacteriano. Ressalta-se que dependendo da microbiota dos camundongos, as células de Paneth podem ativar genes que levam à sua autofagia prejudicada e esses defeitos funcionais tornam os camundongos mais suscetíveis à inflamação intestinal (MOWAT; AGACE, 2014; TIMON et al., 2013; VANDUSSEN et al., 2014).

Ao se tratar do efeito da EPI sobre as criptas intestinais, observou-se que no duodeno apenas a dose de 1mg/kg foi capaz de reverter o efeito do 5-FU. No segmento jejunal, tanto a dose de 1mg/kg quanto à de 10mg/kg foram efetivas na prevenção da diminuição da profundidade da cripta. No íleo por sua vez não foi

observada diferença entre o grupo 5-FU e o DMSO. Ciobano et al. (2016) descreveu que as lesões histológicas mais graves, em animais expostos ao 5-FU ocorrem no nível do jejuno e do duodeno.

É preciso ressaltar que existem controvérsias na literatura a respeito do efeito do 5-FU sobre a profundidade da cripta. O estudo de Yeung et al. (2015) demonstrou que o quimioterápico aumentou a profundidade da cripta, o que diverge dos achados no presente estudo. No entanto, outros estudos apontam que o 5-FU faz com que as criptas intestinais fiquem distorcidas, curtas, poucas, desorganizadas e com menor profundidade (GAWISH et al., 2013; AL-ASMARI et al., 2016; ÁVILA et al., 2015).

Outro indicador avaliado foi a relação vilo/cripta. Observou-se que a EPI na dose de 10mg/kg no jejuno foi capaz de aumentar a relação vilo/cripta, este é um parâmetro importante para verificar se existe equilíbrio entre as estruturas morfológicas do vilo e da cripta. Segundo Soares et al. (2013) o decréscimo da relação vilo/cripta é uma das alterações provocada pelo 5-FU durante o curso da mucosite intestinal.

Além disso, o 5-FU também é capaz de provocar descolamento e perda do epitélio de superfície, encurtamento e esfoliação acentuada, desnudação das vilosidades, desorganização da arquitetura celular de vilos e criptas, alargamento dos espaços intercelulares e vacuolizações citoplasmáticas (GAWISH et al., 2013).

Em virtude disso, buscou-se no presente estudo averiguar os escores histopatológicos dos tecidos de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Foi possível observar que a EPI na dose de 10mg/kg no jejuno foi capaz de atenuar as alterações histológicas provocadas pelo 5-FU. Notou-se que as criptas apresentaram menor presença de infiltrados inflamatórios e maior integridade dos vilos.

Compreende-se, que a avaliação de parâmetros inflamatórios é de suma importância em estudos que tratem da mucosite intestinal. Neste sentido, buscou-se por meio da coloração azul de toluidina avaliar microscopicamente o efeito da EPI sobre o número de mastócitos nos segmentos intestinais. Observou-se que a EPI nas duas doses testadas, tanto no duodeno quanto no jejuno, foi capaz de diminuir o número de mastócitos presentes no tecido.

Al-Asmari et al. (2016) avaliou o efeito da taurina sobre a infiltração de mastócitos na mucosite intestinal, e verificou que a mastocitose (aumento na contagem do número de mastócitos) foi maior no grupo tratado com 5-FU, ao passo que a taurina suprimiu o aumento de tais células.

Os mastócitos são residentes normais dos tecidos mucosos, porém o seu número pode mudar acentuadamente durante as respostas imunes, infecções e outros distúrbios, de modo que a infiltração de mastócitos reflete um importante sinal de inflamação e seu papel foi detectado na patogênese de vários distúrbios, incluindo mucosite e câncer (REBER et al., 2015; REDDY et al., 2012; KHAN et al., 2013).

Segundo Nogueira et al. (2017) a ativação de mastócitos contribui significativamente para os processos fisiopatológicos associados à mucosite, uma vez que, a produção de fatores quimiotáticos por mastócitos pode aumentar o recrutamento de múltiplas células inflamatórias, resultando na amplificação da reação inflamatória. O aumento da inflamação mediado por mastócitos pode induzir danos nos tecidos do hospedeiro como alterações na arquitetura intestinal e a altura das vilos.

A partir disso, acredita-se que a preservação das estruturas morfológica provocadas pela EPI no presente estudo, decorra ao menos em parte de sua natureza anti-inflamatória.

Silva et al. (2013) demonstrou as primeiras evidências sobre a ação anti-inflamatória da EPI, apontando a sua atividade no modelo de edema e de peritonite. Os autores demonstraram que a EPI reduziu a contagem total e diferencial de leucócitos peritoneais e na pata, diminuiu a atividade da mieloperoxidase (MPO) e dos níveis de TNF- α e IL-1 β na cavidade peritoneal, sugerindo que a atividade anti-inflamatória da EPI, seria dependente, da inibição da infiltração de neutrófilos e da liberação das citocinas pró-inflamatórias.

Além da atuação nos níveis de MPO, e sobre a redução de citocinas pró-inflamatórias, um estudo conduzido por Nicolau et al. (2017) também demonstrou que a o cloridrato de epiisopiloturina, um derivado semi-sintético da EPI, protege contra a lesão gástrica e intestinal induzida por naproxeno, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e reduzindo o estresse oxidativo.

Sabe-se que o 5-FU provoca um drástico estado de oxidação na mucosa intestinal, um dos parâmetros observados para a avaliação do estresse oxidativo é o

aumento da peroxidação lipídica, verificado essencialmente pela alta produção de MDA. Tais distúrbios provocados no estado redox normal das células, quando associados à instalação de estresse oxidativo podem causar efeitos tóxicos através da produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes da célula, incluindo proteínas e lipídios (RTIBI et al., 2018; SENER et al., 2012).

Neste sentido, o presente trabalho investigou o efeito da EPI sobre os níveis de MDA na mucosite intestinal induzida por 5-FU e se verificou que a EPI foi capaz de reverter o aumento da peroxidação lipídica provocado pelo 5-FU, o que elucida um provável potencial antioxidante desse alcaloide na mucosite intestinal.

O estudo de Carvalho et al. (2018) corrobora com os resultados aqui apresentados, uma vez que os autores demonstram que a EPI além de preservar os níveis de GSH também reduziu os níveis de MDA em um modelo de colite induzida por trinitrobenzenosulfônico.

Além das alterações a nível oxidativo, a mucosite intestinal também apresenta outro aspecto interessante em sua fisiopatologia, que é a redução do conteúdo de mucina em todas as partes do trato gastrointestinal (YAMAMOTO et al., 2013). O muco tem papel antimicrobiano, formando um gel de alta carga que atua como uma barreira física, além de ser composto de glicoproteínas da mucina que são diretamente tóxicas para muitas bactérias (MOWAT, AGACE, 2014).

As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco, estas reduzem acentuadamente 24-72 horas após a administração de 5-FU. Esse efeito é observado tanto nas vilosidades quanto nas criptas do jejuno. Os autores explicam que o quimioterápico afeta a secreção mucosa e que a diminuição do número de células caliciformes indica liberação rápida de muco, de modo que capacidade de proteção da barreira mucosa pode ser alterada após o esgotamento das células caliciformes armazenadas muco (STRINGER et al., 2009; GAWISH et al., 2013).

Neste estudo, observou-se que a EPI reverteu à redução do número de células caliciformes provocado pelo 5-FU, indicando renovação celular e migração de células caliciformes para as vilosidades. Assim, é provável que o muco desempenhe papel importante no mecanismo de proteção da EPI sobre a progressão da mucosite intestinal. Um trabalho realizado por Sano et al. (2017) demonstrou que a lafutidine por meio da ativação de neurônios aferentes sensoriais aumentou o número de células caliciformes protegidas contra lesão da mucosa induzida por 5-FU.

Estudos demonstram que na mucosite, o 5-FU mostrou diminuir significativamente o número de células caliciformes no jejuno e aumentar significativamente a porcentagem de células caliciformes cavitadas, isto é, células que já liberaram mucinas através de exocitose (STRINGER et al., 2009; GAWISH et al., 2013).

Os mecanismos de regulação da secreção de mucina são largamente desconhecidos. Vários neurotransmissores e produtos químicos podem estar envolvidos na regulação da secreção de mucina, incluindo: polipeptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico (NO) (neurotransmissores), receptor ativado por protease 2 e prostaglandina E2 (PGE²) e (THORPE, STRINGER, BUTLER, 2013).

A PGE² é o produto da metalização do ácido araquidônico pela cicloxigenase 2 (COX-2) (BEN-AV et al., 1995; GARG et al., 2018). Supõe-se que o aumento de COX-2 na submucosa pode resultar em um aumento na expressão de PGE² na mucosite e, por conseguinte menor número de células caliciformes. Desse modo, também se gerou a hipótese de que a EPI poderia exercer seu efeito protetor sobre a produção de muco por meio da redução da COX-2.

A COX-2 possui um papel importante fisiopatologia da mucosite, uma cascata de eventos é apontada na cinética do desenvolvimento dessa patologia, onde as 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 ativam a via COX-2, provocando lesão tecidual, apoptose e angiogênese, tais fatores tem sido associado à fase de sinalização e amplificação da mucosite intestinal (SONIS, 2004; SONIS et al., 2004; SONIS, 2009; LEE; RYAN; DOHERTY, 2014; AL-ASMARI et al., 2015).

Dessa forma, a avaliação da COX-2 se constitui como um importante marcador inflamatório na mucosite intestinal (AL-DASOOQI et al., 2013). A técnica de imunomarcagem é com frequência utilizada para a avaliação do efeito terapêutico de compostos sobre a MI, verificada por meio da redução de COX-2 (AL-ASMARI et al., 2015; MIRANDA, 2018; SILVA, 2018).

Neste sentido, verificou-se o envolvimento da COX-2 no efeito protetor da EPI na MI induzida por 5-FU. Durante a análise morfométrica foi possível verificar que a EPI associada ao CLX apresentaram maior altura do vilos e relação vilos/crypta quando comparada ao 5-FU. No entanto, como não se observou diferença estatística entre o grupo tratado com CLX+ EPI e apenas com EPI, buscou-se uma

investigação mais profunda por meio da análise de Imunohistoquímica para avaliar o papel da COX-2.

Assim, observou-se o 5-FU provocou maior expressão de COX-2 no jejuno de animais que receberam apenas 5-FU, quando comparado com animais tratados com veículo. A EPI por sua vez, foi capaz de reduzir a imunomarcagem para essa enzima. Tal efeito também foi observado no grupo tratado com CLX.

Todavia, o mais interessante dessa avaliação foi verificar que quando houve a associação entre CLX e EPI, ocorreu uma redução ainda maior do que os grupos que receberam o tratamento isoladamente com EPI ou CLX, demonstrando o envolvimento da COX-2 no efeito protetor da EPI na dose de 10mg/kg durante o processo inflamatório provocado pelo 5-FU na MI.

Um estudo realizado por Rocha (2017) apresentou dados que alicerçam essa hipótese, uma vez que, por meio do estudo de *docking*, verificou-se interação direta da EPI com a isoforma da enzima COX-2. Carvalho et al. (2018) também observou por imuno-histoquímica que a EPI inibiu os níveis de IL-1 β , COX-2 e iNOS mostrando um efeito benéfico contra a inflamação intestinal.

NO é um mediador gasoso que é sintetizado na presença de L-arginina com o oxigênio molecular, produzindo NO, e L-citrulina (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Tal reação é catalisada no corpo por uma família de três enzimas que sintetizam óxido nítrico (NOS), a saber, NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS), as mesmas são classificadas de acordo com seu local de atuação e expressão gênica (ICHINOSE; ZAPOL, 2017).

A iNOS é a mais importante proteína da família das óxido nítrico sintases, a mesma está envolvida em processos inflamatórios e é capaz de produzir grandes quantidades de NO, o qual participa de diferentes mecanismos de sinalização intracelular e na formação de espécies reativas durante o estresse oxidativo (LEONARD et al., 1998; SERVATO, 2016).

O NO possui papel multifacetado, e controverso, por exemplo, pode ser usado para tratar um espectro de condições cardiopulmonares por induzir o relaxamento das células musculares lisas na vasculatura (YU et al., 2019) . Contudo, por está envolvido tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, a depender do local e da concentração, o NO pode provocar uma série de efeitos prejudiciais ao organismo, podendo ser altamente reativo e tóxico (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009; OBRADOVIC, 2019).

No presente estudo, observou-se que a EPI foi capaz de suprimir a expressão de iNOS provocada pelo 5-FU no quadro de mucosite intestinal (MI). Esse fato elucida o envolvimento do NO na fisiopatologia da MI, bem como, demonstra a inibição da enzima pela EPI. Essa inibição é também sugerida no trabalho de Carvalho et al (2018) onde os autores utilizaram um modelo de doença de Cronh.

Com relação à avaliação morfométrica verificou-se que quando os animais foram tratados com o inibidor de NO (L-NAME), bem como na associação de L-NAME + EPI houve preservação da altura do vilo e da relação vilo/cripta, por sua vez, quando os animais foram tratados com o substrato natural da produção de NO a L-arginina verificou-se danos estruturais dos vilos e criptas muito semelhantes ao grupo 5-FU, tais evidências confirmam que o NO está envolvido na fisiopatologia da MI.

O envolvimento do NO na mucosite foi inicialmente postulado por Sonis (2002) que demonstrou a expressão do gene para iNOS na mucosite oral induzida por radiação. Posteriormente Leitão et al (2007) investigou o envolvimento do óxido nítrico na mucosite oral e intestinal induzida por quimioterápicos e por meio da inibição específica de NO (aminoguanidina) e inespecífica (L-NAME).

Em doenças inflamatórias como na mucosite intestinal, observa-se concentrações elevadas de NO sintetizadas pela iNOS, o NO gerado interage com numerosas substâncias, entre eles o superóxido para formar ONOO^- (peroxinitrito) que pode interagir com proteínas, lipídios, carboidratos, DNA, e com dióxido de carbono para formar nitrosoperoxocarbonato altamente reativo, que através de mecanismos de oxidação e nitração alteram a estrutura e a função desses compostos para levar a danos oxidativos nos tecidos (BLOODSWORTH et al., 2000; DARRAH et al., 2000).

Isso pode explicar ao menos em parte os danos claramente observados pelo 5-FU na mucosa do intestino, durante a avaliação histopatológica e morfométrica. Outro resultado muito interessante foi a maior preservação da altura dos vilos e da profundidade das criptas nos animais tratados com EPI+L-NAME do que nos animais tratados apenas com EPI. Este resultado propõe o NO está envolvido no efeito protetor da EPI e que a inibição dessa via pode ser um importante mecanismo minimizar os danos provocados pelo 5-FU.

Em virtude de tais resultados procurou-se também verificar de maneira inédita o acoplamento molecular da EPI com a enzima iNOS. No presente estudo se

observou que a EPI interagiu fortemente com o sítio ativo de ligação da iNOS, o que corrobora com os resultados anteriores que propõe que esse alcaloide é capaz de suprimir a expressão de óxido nítrico.

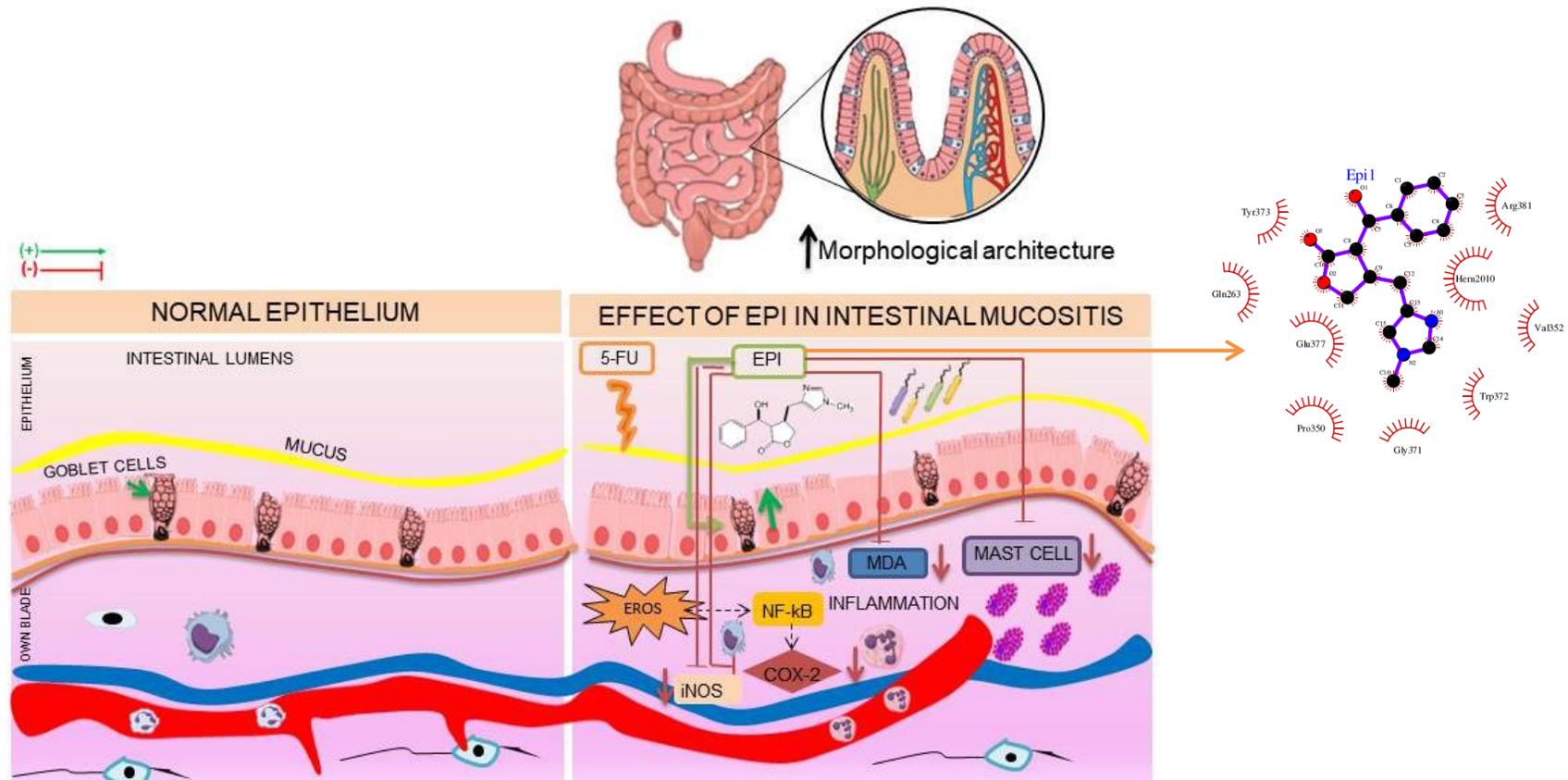
O *Docking* molecular é um método muito popular de desenho computacional utilizado para prever a orientação relativa preferida de uma molécula (chave) quando ligada em um sítio ativo de outra molécula (bloqueio) para formar um complexo estável, tipicamente essa interação ocorre entre uma molécula pequena e uma macromolécula, geralmente uma proteína ou um ácido nucleico (GIANTI; CARNEVALE, 2018).

A iNOS é uma proteína de domínio duplo na qual a metade C-terminal da NOS atua como um domínio de redutase e a metade N-terminal da enzima atua como um domínio da oxigenase que contém os locais de ligação para heme, H₄B e L-arginina. Análogos de L-arginina ou substrato ligam-se perto do heme no domínio da oxigenase (BARRETO; CORREIA.; MUSCARÁ, 2005). A interação da EPI com a iNOS se deu justamente no seu sítio ativo heme, o que confirma a hipótese de inibição da enzima.

Desse modo, compreende-se que a investigação sobre a EPI e seu efeito na mucosite intestinal induzida por 5-FU é atual e promissora, uma vez que, foi capaz de proteger a mucosa e prevenir alterações oxidativas e inflamatórias.

O efeito hipotético do tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU, encontra-se ilustrado na Figura 36.

Figura 36: Modelo hipotético da ação farmacológica da EPI na mucosite intestinal induzida por 5-FU



No modelo hipotético de ação farmacológica da Epiisopiloturina (EPI) na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Pode-se evidenciar que a EPI reverte a inflamação intestinal por meio inibição de MDA, COX-2, iNOS e mastocitose. A EPI também preveniu a destruição das vilosidades e preservou o número de células caliciformes (produtoras de muco) e interagiu molecularmente com a iNOS. EROS: Espécies Reativas de Oxigênio; NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa b; COX-2: Ciclooxigenase 2; MDA: Malondialdeído; iNOS: Óxido nítrico induzível. Seta verde (estimula/aumenta), setas vermelhas (inibe). Seta laranja (interage).

7 CONCLUSÕES

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

- A Epiisopiloturina (EPI) é pouco tóxica;
- A EPI previne a leucopenia, e as alterações histológicas em vilos e criptas no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- A EPI não atenua a perda ponderal na mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- A EPI diminui a peroxidação lipídica, através da prevenção do aumento do MDA na mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- A EPI atenua o processo inflamatório, por meio da diminuição da contagem de mastócitos teciduais, na mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- A EPI previne a diminuição da produção de muco na mucosite intestinal induzida por 5-FU, por meio da preservação do número de células caliciformes;
- A EPI 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.
- A EPI diminui a imunomarcação para enzima iNOS e interage molecularmente no sítio ativo da iNOS, demonstrando potencial anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.N., MAZZAFERA, P., EBERLIN, M.N., ZULLO, M.A.T., SAWAYA, A.C.H.F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** Campinas. v. 21, n. 7. p.1205–1213, 2007.
- AGBAN, Y.; LIAN, J.; PRABASKAR, S.; SEYFODDIN, A.; RUPERNTHAL, I.D.. Nanoparticle cross-linked collagen shields for sustained delivery of pilocarpine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, New Zealand, v. 501, n. 1-2, p. 96-101, 2016.
- AL-ASMARI, A. K.; ALI AL AMRI, M.; AL-SHAHRANI, H. M.; AL-ZAHRANI, A. M.; KHAN, A. Q. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 1, p. 10-20, 2016.
- AL-ASMARI, A. K.; AL-QASIM, A. M.; AL-YOUSEF, Y.; KHAN, A. Q. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology reports**, v. 2, n. [S.I], p. 908-916, 2015.
- AL-DASOOQI, N.; SONIS, S.T, BOWEN, J.M.; BATEMAN, E.; BLIJLEVENS, N.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M.; NAIR, R.G.; Stringer, A.M.; Yazbeck, R.; Elad, S.; Lalla, R.V. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. **Support. care cancer**. Adelaide, v. 21, n.7, p. 3233-3241, 2013.
- ALLEN, C.L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**. v. 4, n.6, p. 461-470, 2009.
- ALVARENGA, E.M.; ARAÚJO, A. R.; ARAÚJO, S.; BRITO, G.A.C.; ILLES, B.; JUNIOR, J.LP.; PACÍFICO, D.M.; SOUSA, D.P.; SOUSA, N.A.; SOUZA, E.P.; MEDEIROS, J.V.R. Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **J Pharm Pharmacol**, v.69, n.12, p. 1773-1785, 2017.
- ASSIS, M.A.; MORELLI-AMARAL, V.F.; PIMENTA, F.P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Fitos**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.1-72, 2015.
- ÁVILAA, P. H. M.; ÁVILAA, R.I.; BASTOS, C.C.B.; BATISTA, A.C.; CRUZ, A. F. C.; FILHO, E. X.S.; LIMA, E. M.; MARRETOC, R. N.; MENDONÇA, E. F.; SERPAC, R. C.; VALADARES, M.C. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Toxicology Reports**, v. 2, n. 1, p. 563–573, 2015.

ANDRADE, S. R. A. D. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcóolicos sobre cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri***. 2014. 19 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

ANDRADE-NETO, M.; MENDES, P.H.; SILVEIRA, S.C.; SILVEIRA, E.R.MENDES, P.H.; SILVEIRA, E.R. An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllophus*. **Phytochemistry**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p.885-887, 1996.

ARAÚJO, C. V. **Efeitos da alanil-glutamina na mucosite intestinal induzida pelo 5-fluorouracil em camundongos deficientes da apolipoproteína-e**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ARAÚJO, C.V.; LAZZAROTTO, C.R.; AQUINO, C.C.; FIGUEIREDO, I.L.; COSTA, T.B.; ALVES, L.A.; RIBEIRO, R.A.; BERTOLINI, L.R.; LIMA, A.A.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B. A alanil-glutamina atenua a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos com deficiência de apolipoproteína E. **Braz J Med Biol Res**. Fortaleza, v. 48, n.6, p. 493-501, 2015.

ARIFA, R.D.N.; LIMA, R.L.; MADEIRA, M.F.M.; PAULA, T.P.I. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through il-1b and il-18 in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 7, p. 2023-34. 2014.

AZEVEDO, O.G.R.; OLIVEIRA, R.A.; OLIVEIRA, B.C.; ZAJA-MILATOVIC, S.; ARAÚJO, C.V.; WONG, D.V.T.; COSTA, T.B.; LUCENA, H.B.M.L.; LIMA-JJUNIOR, R.C.P.; RIBEIRO, R.A.; WARREN, C.A.; LIMA, A.A.M.; VITEK, M.P.; GUERRANT, R.L.; ORIÁ, R. B. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **BMC Gastroenterology**, Fortaleza, v. 12, n. 35, p. 1-18. 2012.

BAJIC, J.E.; EDEN, G.L.; LAMPTON, L.S.; CHEAR, K.Y.; LYMN, K.A.; PEI, J.V.; YOOL, A.J.; HOWARTH, G.S. Rhubarb extract partially improves mucosal integrity in chemotherapy-induced intestinal mucositis. **World J Gastroenterol.**, Adelaide, v. 22, n.37, 2016.

BARRETO, R. L. CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Nitric oxide: properties and therapeutic use. **Quím. Nova**. v.28, n.6, p.1-6, 2005.

BARROS, P.A.V.; ANDRADE, M.E.R.; GENEROSO, S.V.; CASSALI, G. D.; FERNANDES, S.O.A.; GAMA, M.A.; LEITE, J.I.A.; LEOCÁDIO, P.C.L.; MARTINS, F.S.M.; MIRANDA, S.E.M.; REIS, D.C.; SOUZA, E.L.S. CARDOSO, V.N. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.103, n. 1, p. 1567-1576, 2018.

BASTOS, R.W.; ARANTES, R.M.S.; CARDOSO, V.N.; CARTELLE, C.T.; FRANÇA, C.S.; GENEROSO, S.V.; MOREIRA, L.M.C.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R.; PEDROSO, S.H.S.P.; VIEIRA, A.T.; MARTINS, F.S. *Saccharomyces cerevisiae*

UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v.2, n.5, p.1-10, 2016.

BEN-LULU, S.; BEJAR, J.; CORAN, A. G.; MOGILNER, J.; POLLAK, Y.; SUKHOTNIK, I. Dietary transforming growth factor-beta 2 (TGF- β 2) supplementation reduces methotrexate-induced intestinal mucosal injury in a rat. **PLoS One**, v.7, n.9, 2012.

BEM-AV, P.; CROFFORD, L.J.; WILDER, R.L.; HLA, T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. **FEBS Lett.**, Rockville, v.372, n.1, p.83-87, 1995.

BENTO, R.R.F.; SILVA, L.E.; FARIA, J.L.B. Espectros vibracionais comparativos de cristais de pilosina e epiisopilosina. **Braz J Phys**, Fortaleza, v.40, n. p. 217-223, 2010.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.20, n.7, p. 1707-1715, 2000.

BORGES, M.G.; MONTANHA, N.M.S.; NUNES, N.A. Revisão de literatura sobre mucosites e proposta de um protocolo para prevenção e tratamento das complicações bucais após tratamento antineoplásico. In: Jornada Acadêmica e TCCs, 2014, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: UNIMEP, p.49-50, 2014.

BOER, J.; COTINGTING, C. Medicinal plants for women's healthcare in southeast Asia: A meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology **Journal of ethnopharmacology**, Uppsala, v.151, n.2, p.7447-767, 2014.

BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; STRINGER, A.M.; SULTANI, M. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 12, n. [S.I], p. 1-11, 2012.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; PRIEBAT, D. A.; 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.

CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, I.P.; ARAUJO, D.H.; CAVALCANTE, M.C.; CARVALHO, G.H.; BRITO, G.A.; LIMA, V.; MONTEIRO, S.M.; SANTOS, F.N.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate induced rat intestinal mucositis, **Digestive Diseases and Sciences**, Fortaleza, v.49, n.1, p65-72, 2004.

CARVALHO, L.R.; BRITO, T.V.; JUNIOR, J.S..C.; DIAS-JUNIOR, G.J.; MAGALHÃES, D.A.; SOUSA, R.O.S.; SILVA, F.R.P.; VASCONCELOS, D.F.P.; VERAS, L.M.; LEITE, J.R. S. A.; MARTINS, D.S.; MARTINS, C.S.; OLIVEIRA, J.S.; BARBOSA, A.L.R. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and

lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Parnaíba, v.102, n. 1, p. 278–285. 2018.

CALDEIRA, C.F.; GIANNINI, T.G.; RAMOS, S.J.; VASCONCELOS, S.; MITRE, K.; PIRES, J.P.A.; FERREIRA, G. C. F.; OHASHI, S.; MOTA, J.A.; CASTILHO, A.; SIQUEIRA, O.J.; NETO, A. E.F. Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in Ecology and Conservation**, Belem, v.15, n.1, p.161–171. 2017.

CAMPELO, Y.D.M.; ARCANJO, D.D.R.; DE MORAES, J.; EATON, P.; GUIMARÃES, M.A.; KATO, M.J.; LIMA, D.F.; MAFUD, A.C.; MASCARENHAS, Y.P.; MENDONÇA, R.Z.; PINTO, P.L.S.; SILVA, M.P.N.; VÉRAS, L.M.C.; YAMAGUCHI, L.F. LEITE, J.R.S.A.; Synergistic effects of in vitro combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomed Pharmacother**, Parnaíba, v. 88, n. [S.I], p.488-499, 2017.

CARMO, G. **Phytochemical Analysis and Biological study of species *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire**. 2014. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

CERQUEIRA, N. F. YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.** v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CIOBANU, L.; TANTAU, M.; VALEAN, S.; PARAU, A.; BEDECEAN, I.; MÎRLENEANU, R.; BERCE, C.; CATOI, C.; TAULESCU, M. **EurRevMedPharmacolSci**. Cluj-Napoca, v.20, n. [S.I], p. 4993-5001. 2016.

COLLER, H.A. Is Cancer a metabolic disease?. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 4-17, 2014.

COLLINS, P.E.; CARMODY, R.J.; MITXITORENA, I. The ubiquitination of NF- κ B subunits in the control of transcription. **Cells**, v. 5, n. 23, 2016.

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. p. 155. Dissertação (Pós-graduação em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CHANG, C.T.; HO, T.Y.; HSIANG, C.Y.; HUANG, H. C.; HUANG, Y.F.; LIANG, J.A.; LI, C.C.; LIN, H.; LO, H.Y.; WU, S.L. 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. 1-8, 2012.

CHEAH, K.Y.; HOWARTH, G.S.; BASTIAN, S. E.P. Grape Seed Extract Dose-Responsively Decreases disease Severity in a Rat Model of Mucositis; Concomitantly Enhancing Chemotherapeutic Effectiveness in Colon Cancer Cells. **Plos One**, Adelaide, v.9, n.1, p. 1-11, 2014.

- DARRAH, P.A.; HONDALUS, M.K. CHEN, Q. ISCHIROPOULOS, H. MOSSER, D.M. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p. 3587-3593, 2000.
- DAUGHTON, C.G.; RUBOY, I.S. Lower-dose prescribing: Minimizing “side effects” of pharmaceuticals on society and the environment. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 324–337, 2013.
- DAVIDREEVE, S.; KESHISHYAN, S.; SIDHARTHA, D.; VIKASSEHDE, V. Cytostatic Agents. In: Side Effects of Drugs Annual. **Elsevier**, v. 37, p. 567-581, 2015.
- DECHAPHUNKUL, T.; MARTIN, L.; ALBERDA, C.; OLSON, K.; BARACOS, V.; GRAMLICH, L. Malnutrition assessment in patients with cancers of the head and neck: a call to action and consensus. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Songkhla, v.88, n.2, p.459-476, 2013.
- DEL RIO, A.; VARCHI, G. Molecular Design of Compounds Targeting Histone Methyltransferases. **Epi-Informatics**, p. 257–272. 2016.
- DEVITA, V.T.J.; CHU, E.; Principles of cancer management: chemotherapy. In: DEVITA, V.T.J.; HELLMANS, S.; ROSEMBER, S.A. **Cancer: principle and practice of oncology**. 6ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.289-306.
- DIASIO, R. B.; HARRIS, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clin.Pharmacokinet**, v. 16, n. 4, p.215–237, 1989.
- DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery Oxford**, v.36, n.3, p. 134-138, 2018.
- DINARELLO, C.A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. **European journal of immunology**, v. 41, n. 5, p. 1203-1217, 2011.
- DUTRA, I, K.A.; SAGRILLO, M. R. Terapia nutricional para pacientes oncológicos com caquexia. **Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 155-169, 2014.
- ICHINOSE, F. ZAPOL, W.M. Inhaled pulmonary vasodilators in cardiac surgery patients: correct answer is “NO”. **Anesth Analg**. v.125, n.2, p. 375–377, 2017.
- FILHO, E.X.S. **Efeitos da formulação mucoadesiva com extrato de Curcuma longa L. em animais portadores de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil**. 2014, p. 90. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- FOX, P.C.; VAN-DER-VEN, V.P.F.; BAUM, B.J.; MANDEL, I.D. Pilocarpine for the treatment of xerostomia associated with salivary gland dysfunction. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.** New York. v.61, n. 3, p. 243–248, 1986.
- FREITAS, A.P.; BITENCOURT, F.S.; BRITO, G.A.; ALECAR, N.M.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.; RAMOS, M.V.; VALE, R.M. Protein fraction of *Calotropis*

procera latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, p. 1-10, Jul, 2012.

FREITAS, C. CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M.A.Z.; CUBA, L.F. Antioxidant agents: A future alternative approach in the prevention and treatment of radiation-induced oral mucositis?. **Alter Ther In Heal And Med**, v.21, n.2, p. 36-41, 2015.

FU, C.; CHU, J.; SHEN, A.; LIU, L. CHEN, H.; JIANFENG, C.; JIUMAO, L.; LIYA, L.; THOMAS, J.; YOUQIN, C. Pien Tze Huang alleviates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in CT-26 tumor-bearing mice. **Exp Ther Med**, v.14, n.3, p.2291-2297, 2017.

GANZER, H.; ROTHPLETZ-PUGLIA, P.; BYHAM-GRAY, L.; MURPHY, B.A.; TOUGER-DECKER, R. The eating experience in long-term survivors of head and neck cancer: a mixed-methods study. **Supportive care in cancer**, Newark, v.23, n.11, p.3257-3268, 2015.

GARG, R.; BLANDO, J.M.; PEREZ, C.J.; MICHAEL, P. D.; EMER, F. M. S.; RICCIOTTI, E.; GROSSER, T.; BENAVIDES, F.; KAZANIETZ, M.G. COX-2 mediates pro-tumorigenic effects of PKC ϵ in prostate cancer. **Oncogene**, Philadelphia, p.1-11, 2018.

GAWISH, S.A.A.; NOSSEIR, D.A.; OMAR, N.M.; SARHAN, N.M.R. Histological and Ultra structural study of 5-fluorouracil-induced small intestinal mucosal damage in rats. **Asian Journal of Cell Biology**, Mansoura, v.8, p. 1-21, 2013.

GIANTI, E.; CARNEVALE, V. Chapter Two - Computational Approaches to Studying Voltage-Gated Ion Channel Modulation by General Anesthetics. **Methods in Enzymology**. v.602, p. 25-59, 2018.

GIL-MONTOYA, J. A. ; SILVESTRE, F.J.; BARRIOS, R.; SILVESTRE-RANQIL, J. Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: A systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, Valencia, v. 21, n. 3, p. 1-19, 2016.

GOUVEIA, K.; HURST, J.L. Handling method influences mouse performance. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. **Scientific Reports**, v.21, n.7, 2017.

GUIMARÃES, M.A.; DE OLIVEIRA, R.N.; VÉRAS, L.M.; LIMA, D.F.; CAMPELO, Y.D.; ALLEGRETTI, S.M.; CAMPOS, S.A.; DE MORAES, J.; EATON, P.; KUCKELHAUS, S.A.; LEITE, J.R.; LOLIĆ, A.; MAFUD, A.C.; MASCARENHAS, Y.P.; PINTO, P.L.; VERBIĆ, T. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n.3, p. 1-18, 2015.

GOLAN, D. E.; ARMSTRONG, A.W.; ARMSTRONG, E. J.; TASHJIAN, A. H. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. **Farmacoterapia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 1889.

GRABHER, C. **A governança e a sustentabilidade do extrativismo do jaborandi na Amazônia e transição para o Cerrado e a Caatinga**. 2015, p. 312. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento rural)-Faculdade de Ciências econômicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GREM, J.L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Semin Radiat Oncol**, v.7, n.4, p. 249-259, 1997.

GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; DE ALMEIDA, R. L.; MAFUD, A. C.; SARKIS, A. L.; GANASSIN, R.; SILVA, M.P.; ROQUINI, D.B.; VERAS, L.M.; SAWADA, T.C.H.; ROPKE, C.R.; Muehlmann, L.A.; JOANITTI, G.A.; LEITE, J.R.A. José R. S. A. Leite ROPKE, C. D. Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. **PloS one**, v.13, n.5, p. 1-8. 2018.

GUIMARÃES, M. A. **Avaliação terapêutica *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphyllus* para esquistossomose**. 2018, p.122. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal do Piauí. Parnaíba.

GUMIER-COSTA, F.; MCGRATH, D. G.; BRITO, J.C P.; HOMMA, A.K.O. Parcerias institucionais e evolução do extrativismo de jaborandi na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil, **Sustentabilidade em debate**, Belém, v. 7, n. 3, p. 1-21, 2016.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**, v. 26, p. 203–234, 2012.

HEIDELBERGER, C.; CHAUDHURI, N.K.; DANNEBERG, P.; DUSCHINSKY, R.; GRIESBACH, L.; MOOREN, D.; PLEVEN, E.; SCHEINER, J.; SCHNITZER, R.J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, v. 179, n. 4561, p.663-6, 1957.

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

HOMMA, A. K. O. Plant extractivism or plantations: what is the best option for the Amazon? **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 74, n. 26, p. 167-186, 2012.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p. 130. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 09 de Março de 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática-SIDRA: Produção da extração vegetal e da Silvicultura PEVS**. 2014. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/ipca15/brasil>> Acesso em: 15 de maio de 2018.

ISMAIL, S. ;CHAN, H-K. Side effects of chemotherapy among cancer patients in a malaysian general hospital: experiences, perceptions and informational needs from

clinical pharmacists. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 13, p. 5305-5309, 2014.

JORGE, L.L.R.; SILVA, S.R. Evaluation of the Quality of Life of Gynecological Cancer Patients Submitted to Antineoplastic Chemotherapy. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 5, p. 55-849, 2010.

JUAN, Y-S; LEE, Y-L; LONG, C-Y; WONG, J-H. Translocation of NF- κ B and expression of cyclooxygenase-2 are enhanced by ketamine-induced ulcerative cystitis in rat bladder. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2269-2285, 2015.

JUSTINO, P.F.C.; FENACO, A.X.; MELO, L.F.M.; MENDES, W.O.; MORAIS, C.M.; NOGUEIRA, A.F.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, E.P.; SOUZA, M.H.L.P. SOARES, P.M.G.; Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v.75, n.3, p.559-67, 2015.

KATO, S.; AMAGASE, K.; HAMOUDA, N.; KANO, Y.; MATSUMOTO, K.; OIKAWA, Y.; TANAKA, Y.; SHIMAKAWA, M. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Austrália, v.44, n.10, p.1017-1025, 2017.

KATO, S.; HAYASHI, S.; KITAHARA, Y.; NAGASAWA, K.; AONO, H.; SHIBATA, J.; UTSUMI, D.; AMAGASE, I.; MAKOTO, K. Saireito (TJ-114), a Japanese Traditional Herbal Medicine, Reduces 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice by Inhibiting Cytokine-Mediated Apoptosis in Intestinal Crypt Cells. **Plos One**, Kyoto, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2015.

KARBELKAR, S.A.; MAJUMDAR, A.S. Altered systemic bioavailability and organ distribution of azathioprine in methotrexate-induced intestinal mucositis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Mumbai, v. 48, n. 3, p. 241-247, 2016.

KHAN, R.; KHAN, A.Q.; LATEEF, A. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. **PLoS One**, New Delhi, v.8, n.2, p.1-12, 2013.

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

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

KUIKEN, N.S.S.; GROEN, A.K.; HAVINGA, R.; RINGS, E.H.H.M; TISSING, W.J.E. Effect of minimal enteral feeding on recovery in a methotrexate-induced gastrointestinal mucositis rat model. **Supportive Care in Cancer**, v.24, n.33, p.1357-1364, 2016.

KISSOW, H.; HARTMANN, B.; HOLST, J.J.; POULSEN, S.S.; VIBY, N.E.; TIMM, M.; THIM, L. Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) prevents chemotherapy-induced mucositis in rat small intestine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacotherapy**, v.70, n.1, p.39-48, 2012.

LALLA, R.V.; KEEFEE, D.M.; PETERSON, D.E.; PILBEAM, C.C.; SONIS, S.T.; WALSH, S.J. The role of cyclooxygenase in oral mucositis induced by chemotherapy: a pilot study. **Care Support Care**, v. 18, n.1, p. 95-103, 2010.

LEE, C.S.; DOHERTY, G.A.; RYAN, E.J. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. **World J Gastroenterol**, v. 20, p. 3751–3761, 2009.

LEE, C.S.; RYAN, E.J.; DOHERTY, G. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, Dublin, v. 20, n. 14, p. 3751–3761, 2014.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E.A.L.; MACÊDO, F.D.B.; SILVA, L.R.; ORIÁ, R.B.; BRITO, G.A.C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, p. 603-612, 2007.

LEONARD, N.A.; BISHOP, E.J.; POLAJ, M.; TALBOT, I. C. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. **J Clin Pathol** v. 51, p.750–753, 1998.

LIMA, D. F.; ANDRADE, I. M.; AZEVEDO, I.F.S.; BIASE, A. G.; COSTA, J.; LIMA, L. I.; GRAZINA, L. G.; MAFRA, I.; MEIRA, L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ROCHA, J.A.; VÉRAS, L. M. C.; VILLA, C.; LEITE, J. R. S. A Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-19, 2017.

LIMA, D, F.; SILVA, R.; MARQUES, L.G.; VERAZ, L.; SIMÕES, E.; LEITE, J.R.S.; SANTOS, M.R.M.C.; PESSOA, C. Prospecção tecnológica do jaborandi (*pilocarpus microphyllus*): espécie economicamente importante no norte e nordeste do brasil. **Geintec.**, São Cristóvão, v.5, n.1, p. 1626-1638, 2015.

LIMA, L. J. **Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide episopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral.** 2016, p. 61. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

LIMA, V. **Evidências de participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-Fluorouracil e metotrexato em animais.** 2004, p. 212. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIU, Z.; LIAN, X.; LI, M.; TEM, N.; WANG, X.; XIE, W.; YANG, Z.; ZHANG, Z. Oral Administration of Polaprezinc Attenuates Fluorouracil-induced Intestinal Mucositis in a Mouse Model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2017, 121, 480–486.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P.G. 5-fluorouracil mechanism of action and clinical strategies. **Nature review. Câncer**,v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.

LIU, Z.; LIU, Y., ZENG, G.; SHAO, B.; CHEN, M.; LI, Z.; JIANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHONG, H. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, Changsha, v.15, n. 1, p.1-53, 2018.

LOPES, L.D.; RODRIGUES, A.B.; BRASIL, D.R.M.; MOREIRA, M.M.C.; AMARAL, J.G, OLIVEIRA, P.P. prevenção e tratamento da mucosite em ambulatório de oncologia: uma construção coletiva. **Texto Contexto Enferm.** Fortaleza, v.25, n. 1, p. 1-9, 2016.

MANGUEIRA, M.V.; BATISTA, T.M.; BRITO, M.T.; SOUSA, T.K.G.; CRUZ, R.M.D.; ABRANTES, R.A.; VERAS, R.C.; MEDEIROS, K.K.P.; PEREIRA, A.L.C.; SERAFIM, V.L.; MOURA, R.O.; SOBRAL, M.V. A new derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Erlich ascites carcinoma model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.90, n.[s.n], p. 253-262, 2017.

MELO, C.M. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. 2015, p.112. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica)-Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2015.

MICHALANY J. **Técnica histológica los anatomia patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3ª ed. São Paulo: Michalany Ltda, 1998. p. 153-155.

MIHARA, M.;UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.**Anal Biochem**,v. 86, n. 1, p. 271-278, May. 1978.

MIRANDA, J. A. L. **Efeito da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil**.2018, p. 143. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba.

MIURA L.M.C.V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**.2009, p. 123. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

MOLDOVEANU, AI. C. DICULESCU, M.;BRATICEVICI, C. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Romanian Journal Of Internal Medicine**, v. 53, n. 2, p. 118-127, 2015.

MOURA, R. A. et al. **Estudos dos elementos figurados do sangue**. In:Técnicas de laboratório. 3ª ed, São Paulo: Atheneu, cap. 32, p. 343-374, 1998.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews**, Copenhagen, v.14, n.[s.i], p. 667-685, 2014.

MUQAKU, B.; BILECK, A.; KLEPEISZ, P.; KREUTZ, D.; MAYER, R. L.; TAHIR, A. GERNER, C. Coffee consumption modulates inflammatory processes in an individual fashion. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 12, p. 2529-2541, 2016.

NAIDU, M.U.; MOHAN, I.K.; RAMANA, G.V.; RANI, P.U.; ROY, P.; SUMAN, A. Chemotherapy- induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-- complicating the treatment of cancer. **Neoplasia**, v.6, n.5, p.423-31, 2004.

NICOLAU, L. A.D. CARVALHO, N. S.; PACÍFICO, D. M.; LUCETTI, L. T.; ARAGÃO, K. S. ; VÉRAS, L.M.C.; SOUZA, M..H.L.P.; MEDEIROS, J.V. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.87, p.188–195, 2017.

NASCIMENTO, F. S. M.; GÓIS, D.N.S.; ALMEIDA, D.S.; NASCIMENTO, A.L.; ALMEIDA, T.C.; GUEDES, V.R. A importância do acompanhamento nutricional no tratamento e na prevenção do câncer. **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v.2, n.3, p. 11-24, 2015.

NOGUEIRA, L.T.; COSTA, D.V.; GOMES, A.S.; MARTINS, C.S.; SILVA, A.M.H.; COELHO-AGUIAR, J.M.; CASTELUCCI, P.LIMA-JUNIOR, R.C.P.; LEITÃO, R.F.C.; NETO-MOURA, V.; BRITO, G.A.C. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, Fortaleza, v. 14, n.79, p. 1-13, 2017.

OBRADOVICA, M.; BOGDANOVICA, N.; STANIMIROVICA, J.; UNIC-STOJANOVICB, J.; RADAKB, D.J.; ISENOVICA, E.R. Hypothesis related to the regulation of inducible nitric oxide synthase during carotid endarterectomy. **Medical Hypotheses**. v.122, p.16-18, 2019.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development. **Acute oral toxicity, Guideline for Testing of Chemicals** n. 423, p. 1–14, 2001.

OH, N.S. ; KIM, Y.; LEE, J.M.; LEE, J.Y.; LEE, K.W.; KIM, Y.; Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Lett Appl Microbiol.**, v. 64, n. 6, p. 459-468, 2017.

OMS. **Cancer**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2014. Disponível em:< <http://www.who.int>.> Acesso em: 02 Maio 2018.

PACHALY, J.R. **Terapêutica por extrapolação alométrica**. In: CATÃO-DIAS, J.L.; CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. (Orgs.). Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2006. p. 480.

PERFEITO, M.L.G. **Extração e identificação de flavonoides das folhas de *Pilocarpus microphyllus* stapf ex. wardeworth e avaliação da atividade antioxidante e perfil neuroprotetor**. 2018. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Piauí. Parnaíba.

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

REBER, L.L.; SIBILANO, R.; MUKAI, K.; GALLI, S.J. Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. **Mucosal Immunol.**, California, v.8, n.3, p.444-63, 2015.

REDDY, D.S.; SIVAPATHASUNDHARAM, B.; SARASWATHI, T.R.; SRIRAM, G. Evaluation of mast cells, eosinophils, blood capillaries in oral lichen planus and oral lichenoid mucositis. **Indian J Dent Res**, Maharashtra, v.23, n.5, p.695-6, 2012.

REYES-GIBBY, C.C.; CHAMBERS, M.S.; GUNN, G.B.; HANNA, E.Y.; LU, C.; MELKONIAN S, C.; REYES- SHELBURNE, S.A.;SHETE, S.; WANG, J. Y.; YEUNG, S.J. Identifying novel genes and biological processes relevant to the development of cancer therapy-induced mucositis: An informative gene network analysis. **PLoS One**, v.12, n.7, 2017.

RIBEIRO, A. WANDERLEY ,C.W.; WONG, D.V.; MOTA, J.M.; LEITE, C.A.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemother Pharmacol.**, Fortaleza, v.78, n. 1, p.881-893,2016.

RIDER, P.; BRAIMAN, A.; CARMÍ, Y.; GUTTMAN, O.; APTE, R.B. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4835-4843, 2011

ROCHA, T.M. **Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo in vitro, in vivo e insilico.** 2017, p. 96. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RTIBI K.; SELMI, S.; GRAMI, D.; AMRI, M.; SEBAI, H.; MARZOUKI, L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. **Toxicol Mech Methods**.Béja, v.28, n.4, p.262-267,2018.

RUTMAN, R.J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K.E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. **Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. 119-23, 1954.

SANIOTO, S.M.L. Digestão e absorção de nutrientes orgânicos. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. S. (Org.). **Sistema digestório: Integração básico-clínica.** São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2016. p.606-641.

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

- SANTOS, A.P.; MORENO, P.R.H. *Pilocarpus* spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. **Rev Braz J Cienc Farm**, São Paulo, v. 40, n.2, p.115–137, 2004.
- SANTOS, B.; GOUVEIA, R.; RAMOS, S.; SILVA, A. Verhoeff & Tricrômio de Masson: Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado. **mícron – Revista Técnica de Anatomia Patológica**.v. 15, n. 16, p.23-27, 2012.
- SANTOS, R.A.D.; FELIX, J.D.;PORTUGAL, F.B.; SANTOS, P.M.D.O.; SIQUEIRA, M.M.D. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Espírito Santo, v. 58, n. 1, p. 21-29, 2012.
- SANTOS-FILHO, E.X. ÁVILA, P.H.M.; BASTOS, C.C.;BATISTA, A.C.; NAVES, L.N.; MARRETO, R.N.; LIMA, M.E.;MENDONÇA, E.F.; VALADARES, M.C. Curcuminoids from *Curcuma longa*L. reduced intestinal mucositisinduced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative,anti-inflammatory and antioxidant effects. **Toxicology Reports**, Goiania, v. 3, n. [S.I], p.55–62, 2016.
- SAWADA, N.O.; CARDOZO, F.M.C.;NICOLUSSI, A.C.; OKINO, L.; ZAGO, M.M.F. Quality of life evaluation in cancer patients to submitted to chemotherapy. **Revista da Escola de Enfermagem**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 581-587, 2009.
- SCARPINO, A. G.; FERENCZY, G.M. KESERU Comparative evaluation of covalent docking tools. **J. Chem. Inf. Model.**, v.58, n[s.i], p. 1441-1458, 2018.
- SCULLY, C. ;EPSTEIN, J.B.; Oral health care for the cancer patient. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, London, v. 32, n .5, p. 281-292, 1996.
- 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.
- SENER, M.T., SENER, E., TOK, A., POLAT, B., CINAR, I., POLAT H. Biochemical and histologic study of lethal cisplatin nephrotoxicity prevention by mirtazapine. **Pharmacol. Report.**, Erzurum, v. 64, n. 3, p. 594–602. 2012.
- SERVATO, J.P.S. **Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal experimental e humano**. 2016, p.122. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- SIDHU, P. Endangered jaborandi. **Br. Dent. J.**,Malaysiav, 217, n.1, p. 2-3, 2014.
- SHIH, R-H.; WANG, C-Y.; YANG, C-M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. **Frontiers in Molecular Neuroscience**,2015.

SILVA, R. R. **Papel do óxido nítrico e da COX-2 no efeito protetor do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.** 2018, p. 116. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) — Universidade Federal do Piauí, Parnaíba.

SILVA, V.G.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, R.B.S.; CARVALHO, S.C.; PRUDENCIO, R. S.; ARAGÃO, K.S.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPOS, S.A.; VERAZ, L.M.C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J.R.A.L.; BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.V.R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Natural products**, Parnaíba, v. 72, n. [S.I], p. 1071-1077, 2013.

SIMONSON, W. Developments in geriatric cancer chemotherapy. **Geriatric Nursing**, Corvallis, v. 36, n. 2, p. 142-143, 2015.

SOARES, P.M.G.; MOTA, J.M.S.S.C.; SOUZA, E.P.; JUSTINO, P.F.C.; FRANCO, A.X.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**. Fortaleza, v.61, n.1, p.46-9, 2013.

SOARES, P.M.G.; BRITO, R.A.; CUNHA, M.H.L.P.; JUNIOR, R.CP.; JUSTINO, G.A.C.; LIMA, J.M.S.C.; RIBEIRO, F.Q.;. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol**, v.68, n. 3, p. 713-720, 2011.

SONIS, S.T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral.Oncol.**, Boston, v.45, n.12,p.1015-20, 2009.

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

SONIS, S. T. The Pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, Boston, v. 4, n. 4, p. 277-284, 2004.

SONIS, S.T.; SCHERER, J.; PHELAN, S.; LUCEY, C. A.;BARRON, J. E.; O'DONNELL, K. E. BRENNAN, R. J.; PAN, H.; BUSSE, P.; HALEY, J. D. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. **Cell proliferation**.v.35, n.1, p.93-102,2002.

SONIS, S.T.; VILLA, A. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, p. 159-164, 2015.

SOTRIFER. C. Docking of covalent ligands: challenges and approaches **Mol. Inform.**, v.37, n. 9-10, 2018.

STAFEN , A.R.S.; SANTOS, R.S.; PEGORARO, C.; OLIVEIRA, A.C. O atual uso de técnicas de acoplamento molecular e seu uso na biologia de plantas Cássia Fernanda. In: 14ª JORNADA DA PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA-CONGREGA URCAMP, Campinas. **Anais**.Campinas: URCAMP, 2017. p.11.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M. Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, Adelaide, v.234, n.4, p.430 – 441, 2009.

STRINGER, A.; VANHOECKE, B.; VANLANCKER, E.; VAN, W.T. 5-Fluorouracil and irinotecan (SN-38) have limited impact on colon microbial functionality and composition in vitro. **PeerJ**, v. 16, n. 5, p. 40-47, 2017.

TAÏWE, G. S.; KUETE, V. Management of Inflammatory and Nociceptive. **Disorders in Africa**. Medicinal Spices and Vegetables from Africa. p. 73-92, 2017.

TIMON, A. E.; MICHAL, T.F.; Niederreiter, L.; Hyun-Jeong, K.; KASER, A.; BLUMBERG, R. S. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. **Nature**. Cambridge, v. 503, n.[s.i], p.272–276, 2013.

TODEA, M. X.P.S.; ENIU, D.; MOISESCU-GOIAS, C.; MURESAN-POP, M.; SIMÃO, S.; SIMÃO, V.; Investigation of new solid forms of 5-fluorouracil with piperazine. **Jornal da Estrutura Molecular**, v. 1165, p.120-125, 2018.

TOMCHINSKY, B. ; MING, L. C. ; HIDALGO, A.F. ; CARVALHO, I. ; KFURRO, C.W. Impactos da legislação na pesquisa etnobotânica no Brasil, com ênfase na região amazônica. **Amazônica: Antropologia**, São Paulo, v. 5, n.3, p. 736-761, 2013.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SALFELD, J.G.; SASSO, E.H.; TAK, P.P.; Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v. 117, n. 2, p. 244-79, 2008.

VALENZUELA, M. A.; NEIDIGH, J. W.; WALL, N. R. Antimetabolite Treatment for Pancreatic Cancer. **Chemotherapy**, Los Angeles, v. 3, n. 3, p. 1-16, 2014.

VANLANCKER, E.; PROPS, R.; VANHOECKE, B.; VAN, W.T.; SMET, R. 5-Fluorouracil sensitivity varies among oral micro-organisms. **J Med Microbiol**, v. 65, n. 8, p. 775-83, 2016.

VAN, S.Y.Z.; BATEMAN, E.; GIBSON, R.J.; KEEFE, D.M.; STANSBOROUGH, R.; WARDILL, H.R. Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. **Curr Oncol Rep**, Adelaide, v. 17, n. 11, p. 17:50, 2015.

VANDUSSEN, K.L.; LIU, T.; LI, D.; TOWFIC, F.; MODIANO, N.; INVERNO, R.; TALIN HARITUNIANS, T.; TAYLOR, K.D.; DHALL, D.; TARGAN, S. R.; XAVIER, R.J.; MCGOVERN, D. P.B.; STAPPENBECK, T. S. Genetic Variants Synthesize to Produce Paneth Cell Phenotypes That Define Subtypes of Crohn's Disease. **Gastroenterology**. St Louis, v.146, n.1, p. 200-209, 2014.

VERAS, L.M.; CUNHA, V.R. R.; LIMA, F.C.D.A.; GUIMARÃES, M.A.; VIEIRA, M.M.; CAMPELO, Y.D.M.; SAKAI, V.Y.; LIMA, D.F.; CARVALHO, P. S.; ELLENA,

J.A.; SILVA, P.R.P.; VASCONCELOS, L.C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M. VERA, R.L.; CONSTANTINO, Y. P. MASCARENHAS, LEITE, J.R.S. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PlosOne**, Parnaíba, v. 8, n.6, p.1-11, 2013.

VERAS, L.M.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPELO, Y.D.; VIEIRA, M.M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D.F.; VASCONCELOS, L.; NAKANOS, E.; KUCKELHAUS, M.C.; LEITE J.R. ; MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, Parnaíba, v. 19, n. 13, p. 2051-2058. 2012.

VERDE, S.M.M.L. **Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas consequências na qualidade de vida**. 2007, p. 138. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde Pública) — Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.

VOIGTLANDER, H.W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M.; POHL, L. Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. **Arch Pharmacol**, Barcelona, v.311, n.11 , p. 927–935. 1978.

WOO, P. C. Y.; LEUNG, H. C. H.; NG, W. F.; TSOI, H. W.; YUEN, K. Y. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacological research**, v.41, n.5, p.527-532, 2000.

WORTHINGTON, H.V.; BRYAN, G.; CLARKSON, J.E.; GLENNY, A.M.; LITTLEWOOD, A.; MCCABE, M.G.; MEYER, S.; KHALID, T. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Manchester, v. 12, n. 4, p. 357-379, 2011.

WU, Z.Q.; DI, J.Z.; HAN, X.D.; HUANG, X.Y.; JIN, Z.M.; PAN, Y.; WANG, Y.; YAN, J.; YUAN, K.L.; ZHANG, P. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 68, p. 87-96, 2011.

YASUDA, M. ; AMAGASE, K.; IMORI, M.; IWATA, K.; KATO, S.; KITAHARA, Y.; MATSUNO, K.; UTSUMI, D.; YABE-NISHIMURA, C.; YAMANAKA, N.; TAKEUCHI, K. Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** , Kyoto,. v. 302, n.10, p.1133-43, 2012.

YU, B., FUMITO, I.; BLOCH, D.B.; ZAPOL, W.M.; **Inhaled nitric oxide**.v. 176, n.2, p.246-255, 2019.

ZHU, X.X.; HAI-YUE, L.; HONG-WEI, Z.; HUA-FANG, S.; HUI-MIN, Z.; XIAO-JUN, Y.; YAN, H.; YI-LAN, C. The Potential Effect of Oral Microbiota in the Prediction of Mucositis During Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. **EBioMedicine**, v. 12, n. 7, p. 23-31, 2017.

APÊNDICE A – FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS NO ESTUDO E FABRICANTES

Fármacos	Fabricante
5-FU	Eurofarma
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec
Xilazina 2% (Calmin®)	Agener União
Hematoxilina e Eosina	Sigma Aldrich
Líquido de Turk	Merk millipore
Ácido tiobarbitúrico – TBARS	Sigma Aldrich
Ácido perclórico	Merk millipore
1,1,3,3-tetraetoxipropane	Sigma Aldrich
Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)	Sigma Aldrich
Azul de toluidina	Meta química
Xilol	Control-lab
Hematoxilina férrica de Weigert-Sol A	Merk millipore
Hematoxilina de Mayer	Control-lab
Fucsina	Control-lab
Acido fosfomolídbico	Química
Azul de anilina	Interlab
Solução de H ₂ O ₂ a 3%	Abcam
Anticorpo primário rabbit anti-iNOS	Abcam
Goat anti- COX-2	Abcam
Complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®)	Sigma Aldrich
Cromógeno 3,3` diaminobenzidina-peróxido (DAB, DAKO®)	Sigma Aldrich

APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose DMSO DIA 01 1. SNC	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
	30 min	1h	2h	3h
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro _____	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros _____	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarra	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 50 mg DIA 01	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
1. SNC	30 min	1h	2h	3h
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarra	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 300 mg DIA 01	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
2. SNC	30 min	1h	2h	3h
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro _____	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros _____	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarra	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 2000 mg DIA 01 2. SNC	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
	30 min	1h	2h	3h
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro_____	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros_____	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarra	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 300 mg DIA 02 1. SNC	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
	DIA 2	DIA 3	DIA 3	DIA 4
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarrar	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 300 mg	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
1. SNC				
a. Estimulante	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarra	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 300 mg DIA 01	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
1. SNC	DIA 09	DIA 10	DIA 11	DIA 12
a. Estimulante				
Hiperatividade	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0
Movimento intenso das vibrissas	0	0	0	0
Outro	0	0	0	0
b. Depressora				
Hipnose	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0
Reflexo do endireitamento	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0
Resposta ao toque diminuído	0	0	0	0
Perda do reflexo corneal	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0	0	0
Bocejo excessivo	0	0	0	0
Limpeza	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0
Escalar	-	0	0	0
Vocalizar	0	0	0	0
Sacudir a cabeça	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0
Respiração forçada	0	0	0	0
Lacrimagem	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0
Força para agarrar	0	0	0	0
3. MORTE	0	0	0	0

TABULAÇÃO DOS DADOS- Atividade Toxicológica				
CAIXA Nº 01 Dose 300 mg DIA 01	QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS 0 (Sem efeito) - (Efeito diminuído) + (Efeito aumentado) ++ (Efeito intenso)			
1. SNC				
a. Estimulante	DIA 13	DIA 14		
Hiperatividade	0	0		
Irritabilidade	0	0		
Agressividade	0	0		
Tremores	0	0		
Convulsões	0	0		
Piloereção	0	0		
Movimento intenso das vibrissas	0	0		
Outro	0	0		
b. Depressora				
Hipnose	0	0		
Ptose palpebral	0	0		
Sedação	0	0		
Anestesia	0	0		
Ataxia	0	0		
Reflexo do endireitamento	0	0		
Catatonía	0	0		
Analgesia	0	0		
Resposta ao toque diminuído	0	0		
Perda do reflexo corneal	0	0		
Perda do reflexo auricular	0	0		
c. Outros comportamentos				
Ambulação	0	0		
Bocejo excessivo	0	0		
Limpeza	0	0		
Levantar	-	-		
Escalar	0	0		
Vocalizar	0	0		
Sacudir a cabeça	0	0		
Contorções abdominais	0	0		
Pedalar	0	0		
Outros	0	0		
2. SN AUTÔNOMO				
Diarreia	0	0		
Constipação	0	0		
Defecação	0	0		
Respiração forçada	0	0		
Lacrimejamento	0	0		
Micção	0	0		
Salivação	0	0		
Cianose	0	0		
Força para agarra	0	0		
3. MORTE	0	0		

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFC



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EPIIOPHILOTURINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5 FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS PAPEL DA VIA NO/GMPc/PKG/COX", protocolada sob o CEUA nº 9835020518 (ID 000335), sob a responsabilidade de **Gilberto Santos Cerqueira** e equipe; **MARIA LUCIANNY LIMA BARBOSA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 28/06/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF EPIIOPHILOTURIN IN EXPERIMENTAL MODEL OF INTESTINAL MUCOSITE INDUCED BY 5 FLUOROURACIL IN MICE. ROLE OF THE VIA NO / GMPc / PKG / COX", utilizing 66 Heterogenics mice (66 males), protocol number CEUA 9835020518 (ID 000335), under the responsibility of **Gilberto Santos Cerqueira** and team; **MARIA LUCIANNY LIMA BARBOSA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 06/28/2018.

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

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 02/2019 Área: Departamento de Morfologia

Origem: Biotério Central da UFC

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 5 semanas

N: 66

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

Local do experimento: Biotério do Departamento de Morfologia UFC

Fortaleza, 28 de junho de 2018

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

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

ANEXO B- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFPI

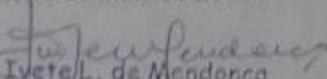
	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> <p><small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550 Telefone: (86) 3215-5734, e-mail: ceuap@ufpi.edu.br</small></p>	
---	--	---

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Avaliação do efeito da epilsopiloturina em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos papel da via NO/GMPc/PKG/COX*", registrada nº 471/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. GILBERTO SANTOS CERQUEIRA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - CMRV/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 **18/05/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Junho/2018 à Abril/2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	47
Peso/ Idade	20 - 25g / 1 mês
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Piauí - CCA/UFPI

Teresina, 18 de Maio de 2018.


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