



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

KHETYMA MOREIRA FONSECA

**EFEITO PROTETOR DA L-CISTEÍNA EXÓGENA NO MODELO DE
MUCOSITE ORAL INDUZIDO POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS
GOLDEN SYRIAN (*Mesocricetus auratus*)**

**PARNAÍBA
2019**

KHETYMA MOREIRA FONSECA

**EFEITO PROTETOR DA L-CISTEÍNA EXÓGENA NO MODELO DE
MUCOSITE ORAL INDUZIDO POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS
GOLDEN SYRIAN (*Mesocricetus auratus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular Aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

PARNAÍBA
2019

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

F676e Fonseca, Khetyma Moreira
Efeito protetor da l-cisteína exógena no modelo de mucosite oral induzido por 5-fluorouracil em hamsters golden syrian (*Mesocricetus auratus*) [manuscrito] / Khetyma Moreira Fonseca. – 2019.
103 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

1. 5-Fluorouracil. 2. Mucosite Oral. 3. L-Cisteína. 4. Inflamação. I.
Titulo.

CDD: 616.3

KHETYMA MOREIRA FONSECA

**EFEITO PROTETOR DA L-CISTEÍNA EXÓGENA NO MODELO DE
MUCOSITE ORAL INDUZIDO POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS
GOLDEN SYRIAN (*Mesocricetus auratus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros -UFPI (Presidente)

Prof.Dr.Marcelo de Carvalho Filgueiras-UFPI (Membro interno)

Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau (Membro externo)

Dedico,

A DEUS acima de tudo. Pois, graças a ELE e sua grandiosa misericórdia estou conseguindo trilhar meu caminho rumo aos meus objetivos de vida!

Aos meus pais, **Maria do Socorro** (*In memoriam*) e **Edmar Fonseca**, que sempre serão meus modelos de resiliência!!!

AGRADECIMENTOS

A DEUS acima de tudo, por sempre se fazer presente em minha vida, por me dar força, coragem e determinação nesta caminhada tão árdua rumo aos meus objetivos de vida!!!

Ao meu pai Edmar Alves, meus irmãos, a minha madrinha (Pedrina Braz) que eu tanto amo, e a considero como minha mãe, pelo carinho, afeto, momentos de ternuras, pela torcida, pelos puxões de orelha necessários. E conselhos como: “SEJA PERSISTENTE JAMAIS DESISTA DOS SEUS SONHOS”! Por entenderem o motivo da minha ausência, enfim por vocês existirem na minha vida!

Aos meus tios pelo apoio financeiro em especial Zé Filho, Marinete, Albetiza e Wilson , por me passarem tranquilidade e serenidade nos momentos mais críticos em que passei, principalmente nos primeiros passos rumo ao início desta pesquisa!

Ao meu pai científico e hoje meu grande amigo Wellington Santos, por me mostrar este caminho fascinante da pesquisa, por sempre me incentivar, aconselhar, mostrar as soluções quando eu não as enxergava, por me fazer despertar a curiosidade e aprender a ser independente. Se hoje eu sou assim, é graças ao senhor! Eu o admiro e respeito muito!

A Universidade Federal Piauí por meio da pós-graduação em Biotecnologia em especialmente a Professora Doutora Durcilene e a secretária Selmira por esclarecer minhas dúvidas e inquietações sobre o programa de pós-graduação.

Aos IC's Mac Dionis (meu braço direito), Beatriz Moreira, Delon Freitas, Matheus e, Bernardo por me ajudarem nos momentos difíceis e por sempre me incentivarem .ADORO VOCÊS SEM VOCÊS EU NÃO TINHA CONSEGUIDO CHEGAR AQUI!!!

Aos professores Paulo Humberto e Renata Leitão pelas dicas e por tirarem minhas dúvidas quanto a escrita e delineamento desta pesquisa.

Ao muito querido e estimado por mim, professor Doutor Jand Venes Rolim Medeiros, meu orientador, por ter sido solidário comigo, perante algumas situações, por tirar minhas dúvidas, por me instigar a estudar, por me incentivar e como o senhor diz: “JAMAIS SE DEIXE ABATER PELAS ADVERSIDADES”, obrigada por fazer parte da minha construção quanto pesquisadora!

Aos meus amigos e colegas do LAFIDG, Gaby, André, Esley, Kerolayne Thiago e Bruno Iles por terem me acolhido e recebido tão prontamente, além disso por me proporcionarem momentos de descontração e muita alegria!!Obrigada Bia e Paty por serem minhas amigas, me passarem tranquilidade e serenidade.

Ao Professor Doutor Marcelo Filgueiras pelos momentos de muita descontração, aprendizado e lições que eu sempre levarei comigo o seu princípio: “PACIÊNCIA, PERSISTÊNCIA E PERSEVERANÇA”!

Aos meus colegas da pós-graduação: Zé Carlos, Loyola, Isabela Braúna, Saul, Kessya, Flaviana, João Antônio, pelos momentos de descontração, conversa e muita brincadeira também!

Ao Laboratório NEMPI em nome da Dr^a Gerly Anne, Conceição Martins, Deiziane Viana, Junior e Flávia por me ajudarem no laboratório e me ensinarem as técnicas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao seu Bento por cuidar dos animais, por ceder o espaço para desenvolver os experimentos, pelos conselhos e momentos de muita descontração.

Aos amigos que fiz durante esta caminhada :Jonas, Hawoard, Helson, Roberto, Alceu, Luana, Luciana, pelos momentos de bastante brincadeira! Além disso, por me apoiarem nos momentos mais críticos que passei durante o término desta pesquisa!

A professora doutora Delane Godim por me encorajar a não desistir e me proteger diante de algumas situações que passei ao longo desta pesquisa, costumo dizer que “Deus sempre mostra os seus anjos aqui na Terra”, e acredito que a senhora foi e ainda será um na minha vida.

Aos meus grandes amigos Daccione e Jose Lopes Junior (J.J) que estenderam as mãos para mim e que sonharam junto comigo, com este mestrado. Daccione estamos separadas fisicamente mas sempre lembrarei de você por tudo que você fez por mim! J.J você é como um irmão pra mim e agradeço a Deus por você fazer parte da minha vida!

Aos meus amigos irmãos Henrique Cauper e Neilton Carvalho pelo aponho e carinho.

A agência de fomento CAPES/CNPQ pelo consentimento da bolsa.

A todos que me ajudaram de forma direta ou indiretamente...

Muito obrigada!!!!

... “Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro”.

(Jeremias 29:11)

RESUMO

A mucosite é uma inflamação que ocorre na mucosa de revestimento da cavidade oral, resultante do efeito citotóxico ao tratamento com 5-Fluorouracil (5-FU). Há estudos que mostram que, por meio da administração da L-Cisteína, ocorre a produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S), tendo ação gastroprotetora, anti-inflamatória e cicatricial. Tendo em vista estas propriedades, o objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito protetor da L-Cisteína no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. Foram selecionados 30 hamsters divididos em 5 grupos (n=6) : (Normal, recebeu solução salina a 0,9%, i.p) ;(Trauma Mecânico); (5-FU)) ;(L-cisteína 10mg); (L-cisteína 40mg) e NaHS (27 μ g) (esses receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-FU nos dias 1 e 2, e no 4º dia foi feito escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais, no 5º e 6º receberam por via intraperitoneal a L-cisteína nas concentrações de 10, 40, 27 mg; μ g/Kg, respectivamente). Para análise dos dados foi feita avaliação macroscópica, histológica, sobrevida, ponderal, espessura da derme, contagem de mastócitos, dosagem de MDA, GSH, MPO, Nitrito/Nitrato, porcentagem de colágeno, imunohistoquímica para Cox₂ e dosagem dos níveis de H_2S . Observou-se que a L-cisteína nas doses de 10 e 40 mg/Kg foram capazes de prevenir e reverter as alterações promovidas por 5-FU. Por conseguinte a dose eletiva de L-Cisteína foi a de 40 mg/kg pois apresentou aumento significativo na espessura da derme, porcentagem de colágeno, diminui os níveis de:MDA, GSH, MPO e aumentou os níveis de GSH e H_2S quando comparado ao grupo 5-FU (p<0,005). Quanto aos níveis de Cox₂ no grupo de L-Cisteína 40 mg/Kg, observou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, (p<0,005) na imunomarcção para Cox₂ quando comparado com o grupo 5-FU, assim como a diminuição no número de mastócitos(p<0,005). Então, conclui-se que a L-Cisteína na dose de 40 mg/kg teve efeito protetor aumentando a espessura na derme, porcentagem de fibras de colágeno, diminuindo os níveis de MDA, GSH, MPO, Nitrito/Nitrato e imunomarcção para Cox₂. Assim, nossos resultados sugerem que a L-cisteína pode ser provavelmente um substrato enzimático, que aumenta a produção endogenamente do H_2S que tem ação anti-inflamatória e antioxidante perante a lesão por 5-FU.

Palavras-Chave: 5-Fluorouracil, Mucosite oral, L-Cisteína, Inflamação.

ABSTRACT

Mucositis is an inflammation that occurs in the lining of the oral cavity resulting from the cytotoxic effect of 5-Fluorouracil (5-FU) treatment. There are studies that show that, through the administration of L-Cysteine, the production of Hydrogen Sulphide (H₂S) occurs, having gastroprotective, anti-inflammatory and cicatricial action. In view of these properties, the objective of this research was to investigate the protective effect of L-cysteine on the oral mucositis model induced by 5-FU in hamsters. We selected 30 hamsters divided into 5 groups (n = 6): (Normal, received 0.9% saline solution, i.p), (Mechanical Trauma); (5- (FU)); (L-cysteine 10mg); (L-cysteine 40mg) and NaHS (27µg) (these received doses of 60 and 40 mg / kg of 5-FU on days 1 and 2, and on the 4th day the right oral mucosa was excoriated in the 5th and 6th animals received L-cysteine intraperitoneally at concentrations of 10, 40, 27 mg, µg / kg, respectively). Macroscopic, histological, survival, weight, dermal thickness, mast cell counts, MDA, GSH, MPO, Nitrite / Nitrate, collagen percentage, Cox₂ immunohistochemistry and H₂S levels were evaluated. It was observed that L-cysteine at doses of 10 and 40 mg / kg were able to prevent and reverse the changes promoted by 5-FU. Therefore, the elective L-cysteine dose was 40 mg / kg because it showed a significant increase in the thickness of the dermis, collagen percentage, decreased levels of: MDA, GSH, MPO and increased levels of GSH and H₂S when compared to 5-FU group (p <0.005). Concerning Cox₂ levels in the 40 mg / kg L-cysteine group, a statistically significant (p <0.005) decrease in Cox₂ immunolabeling was observed when compared to the 5-FU group, as well as the decrease in the number of mast cells (p <0.005). Thus, our results suggest that L-cysteine may probably be an enzymatic substrate, which increases the endogenous production of H₂S that has anti-inflammatory and antioxidant action against 5-FU injury.

Keywords: 5-Fluorouracil, Oral mucositis, L-cysteine, Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos histológicos da mucosa.....	20
Figura 2	Estrutura de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.....	23
Figura 3	Metabolismo do 5-FU.....	24
Figura 4	Fases de estadiamento da mucosite oral.....	27
Figura 5	Produção de H ₂ S nas células de mamíferos.....	35
Figura 6	Fluxograma do delineamento experimental.....	39
Figura 7	Desenho esquemático do modelo de mucosite oral por 5-FU em hamsters.....	42
Figura 8	Fotomicrografia representativa da medida derme da mucosa jugal dos hamsters (para quantificação do percentual)	45
Figura 9	Fotomicrografia representativa da medida derme da mucosa jugal dos hamsters (para quantificação do percentual)	46
Figura 10	Efeito da L-cisteína nas doses de 10 e 40 mg na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	54
Figura 11	Efeito da L-cisteína nas doses de 10 e 40 mg sobre a evolução ponderal na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	55
Figura 12	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.....	56
Figura 13	Efeito das doses de L-cisteína (L-cis) nas alterações microscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	58
Figura 14	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	59
Figura 15	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	60

Figura 16	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a síntese de colageno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	60
Figura 17	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a porcentagem de colageno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	61
Figura 18	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MDA na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	62
Figura 19	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de GSH na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	63
Figura 20	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	64
Figura 21	Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de Nitrito/Nitrato na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	65
Figura 22	Determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio no Tecido da Mucosa Oral.....	67
Figura 23	Efeito da L-cis (40mg/kg) e da CLX(7,5mg/kg) no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	69
Figura 24	Efeito da L-cis (40mg/kg) associada a Clx(7,5mg/kg) no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	69
Figura 25	Aumento da expressão para Cox ₂ no tecido da mucosa jugal de hamisteres a mucosite oral por 5-FU.....	70
Figura 26	Imunomarcção de COX ₂ em amostras da mucosa jugal de hamisteres a mucosite oral por 5-FU.....	71
Figura 27	Esquematização do Efeito protetor da L-Cisteína no modelo de mucosite oral induzido por 5-FU.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistema de Escores Macroscópicos de Sonis et al., (2004)	43
Tabela 2	Sistema de Escores Microscópicos de Lima et al., (2005)	44
Tabela 3	Taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com L-Cisteína nas doses de 10 e 40 mg.....	53
Tabela 4	Escores macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental, tratados com L-cis.....	57
Tabela 5	Escores macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental, tratados com L-cis e CLX....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CAT	Cisteína Amino-Transferase
CBS	Cistationa β -Sintase
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CLX	Celecoxibe
CPMs	Múltiplos Carcinomas Primários
CSE	Cistationa γ -Liase
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
duMP	Monofosfato de desoxiuridina
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGFs	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GSH	Glutathione
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
ICAMs	Moléculas de Adesão intracelular
IL-8	Interleucina 8
IL- β	Interleucina-beta
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase induzível
iNOS	Oxido Nítrico induzível
JNK	Kinase aminoterminal
KCL	Cloreto de Potássio
L-cis	L-cisteína
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMP-1	Metaloproteinase -1
MMP-3	Metaloproteinase-3
MO	Mucosite Oral
MPO	Mieloperoxidase

NaHs	Hidrossulfeto de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear- κB
NO	Oxido Nitrico
NOS	Oxido Nitrico Sintetase
OPTR	Orotato Fosforibosiltransferase
PGs	Prostaglandinas
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
TBARS	Ácido Tiobarbiturico
TCTH	Células-Tronco Hematopoiéticas
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante beta
TK	Timidina Kinase
TNF-α	Fator Necrose Tumoral –alfa
TP	Timidina Fosfolipase
5-FduMP	5-Fluorodeoxioridina monofosfato
5-FU	5-Fluorouracil
5-FUDP	5-Fluorouridina Difosfato
5-FUMP	5-Fluorodina Monofosfato
5-FUTP	5-Fluorouridina Trifosfato

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.REFERENCIAL TÉORICO	20
2.1 Aspectos Morfológicos da mucosa oral	20
2.2 Principais estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer	21
2.3 Efeitos adversos no uso de terapia antineoplásica.....	24
2.4 Mucosite :efeito adverso da terapia oncológica	25
2.5 Fisiopatologia da Mucosite oral	26
2.6 Mediadores Inflamatórios na mucosite	29
2.7 Biomarcadores na Mucosite	32
2.9 Aminoácidos como terapia.....	33
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4.METODOLOGIA	39
4.1.Drogas e Reagentes	40
4.2 Animais	40
4.2.1Considerações éticas	40
4.3 Delineamento Experimental.....	40
4.3.1 Grupos Experimentais	40
4.3.2 Indução da Mucosite Oral por 5-Fluoracil (5-FU)	41
4.3.3 Tratamentos com L-cisteína	42
4.4.1Análise da variação da Evolução Ponderal	43
4.4.2 Avaliação da taxa de sobrevida.....	43
4.4.3 Análises macroscópica da mucosa jugal	43
4.4.5 Análise Morfométrica das mucosas jugais.....	45
4.4.5.1Avaliação da Colagênese	45
4.4.5.1.1 Espessura da derme	45
4.4.5.1.2 Quantificação do percentual de colágeno.....	46
4. 5 Testes de Estresse Oxidativo.....	47
4.5.1 Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	47
4.5.2 Dosagem dos níveis de GSH.....	47
4.5.3 Dosagem dos níveis de MPO	48
4.5.4 Dosagem dos níveis de Nitrito/Nitrato	48
4.6 Teste do efeito anti-inflamatório	49
4.6.1 Determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio no Tecido da Mucosa Oral..	49

4.6.2 Avaliação do papel cicloxigenase 2 (COX-2) na mucosite oral induzida por 5-FU.	50
4.6.2.1Análise da concentração de mastócitos	50
4.6.2.2 Imunohistoquímica para detecção de COX-2	51
4.7 Analise estatística.....	52
5.RESULTADOS	53
5.1 Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	53
5.1.2 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a evolução ponderal na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	54
5.1.3 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-Cisteína (L-cis) nas alterações macroscópicas e microscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.....	55
5.1.3.1Alterações Macroscópicas das doses de 10 e 40 mg/kg da L-Cisteína (L-cis).....	55
5.1.3.2Alterações Microscópicas das doses de 10e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis).	57
5.1.4. Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	59
5.1.5. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a porcentagem de colágeno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	61
5.1.7 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de GSH na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	63
5.1.8 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	64
5.1.9 Efeito da dose de 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de Nitrito/Nitrato na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.	65
5.3 Efeito da dose de L-cisteína (L-cis40mg) e da Celecoxibe (Clx) 7,5 mg/kg nas alterações macroscópicas e microscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.....	67
5.3.1 Efeitos da L-cisteína (L-cis) na dose de 40mg/kg e da Celecoxibe (Clx) 7,5 mg/kg no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	68
5.3.1.1 Avaliação do envolvimento da Cicloxigenase 2 (COX ₂) no efeito protetor da L-cisteína no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.....	70
6.DISSCUSSÃO	72
7.CONCLUSÕES	79
REFERENCIAS	80
ANEXOS	100

1.INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônico-degenerativa que ao longo dos anos vem apresentando maior incidência. Representa a segunda causa de morte nos países latinos e caracteriza-se pelo crescimento anárquico das células, que dá origem a tumores com capacidade de propagação, principalmente através de rotas linfáticas e hematógenas (GOYRI et al.,2014).

Sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública no país, particularmente por dois aspectos: o primeiro é o aumento da incidência e da mortalidade, proporcional ao envelhecimento populacional, ao crescimento demográfico e ao desenvolvimento socioeconômico. Necessitando de grandes investimentos financeiros e acarretando ônus institucional e social para o país (DE SOUZA et al., 2013). O segundo é a dificuldade que o sistema de saúde enfrenta para garantir o acesso efetivo e igualitário para população ao diagnóstico e tratamento dessa doença (DE AQUINO et al., 2015).

Onde o tratamento para estes pacientes oncológicos é a base de quimioterápicos, que são comumente usados com o objetivo de inibir as metástases e melhorar a taxa de sobrevivência destes indivíduos (DE PAULA; SAWADA, 2015). Dentre os quimioterápicos utilizados nesta terapêutica, destaca-se o 5-FU, que pertence à classe dos antimetabolitos e atua principalmente nas células com alta proliferação celular, neste caso, no epitélio do trato digestório (DE SOUZA et al., 2013).

Este quimioterápico atua, adentrando na célula por meio de difusão facilitada, inibindo de forma irreversível a enzima timidilato-sintase, que está envolvida na replicação e reparação do DNA (JONES *et al.*, 2015), além de incorporar os seus metabolitos tóxicos ao DNA e RNA, levando ao bloqueio do ciclo celular e apoptose das células do trato digestório (TAKANO et al., 2015).

No entanto, esta estratégia medicamentosa provoca diversos efeitos colaterais como: a mucosite, xerostomia, mielossupressão, dores de cabeça, dermatite, fotofobia, diarreia e cardiotoxicidade que alteram qualidade de vida dos pacientes (CHANG et al., 2015; PAIVA et al., 2016). E influencia na condução e adesão ao tratamento oncológico (CICHELLI et al.,2017; DE PAULA; SAWADA, 2015; DE SOUZA et al., 2013).

Dentre os efeitos colaterais da terapia antineoplásica, o quadro da mucosite oral é um dos efeitos colaterais mais observado no tratamento à base de quimioterápicos para diversas neoplasias (TAKANO et al., 2015; GOODMAN et al., 2017; ZOU; WANG; ZHANG, 2017), sendo detalhado na literatura, em quatro fases (inflamatória/vascular, epitelial, ulcerativa/microbiológica e cicatrizadora) (LEITÃO et al., 2014; SHIMAMURA et al., 2018;

RIBEIRO et al., 2017). Onde a fase ulcerativa é o período mais crítico (LEITÃO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016), desencadeada pela quimioterapia, que leva a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez, ativa várias vias de sinalização na submucosa e epitélio, por meio do aumento na expressão de genes como, c-jun, c-fos e Erg-1, e pela ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear- κ B (YOSHINO et al., 2013; MANCHANDA; IYENGAR; PATIL, 2016; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006).

Alguns autores sugeriram que a geração destas ROS, resultante do uso de quimioterápicos, resultantes da lesão celular, é pela via da Ciclooxigenase e Oxido Nítrico (NOS), através Ciclooxigenase-2 (COX₂), (LOGAN et al., 2007; SILVA et al., 2017), produção do Oxido Nítrico Induzido (iNOs), respectivamente, (BASTOS et al., 2015) desenvolvendo o quadro de mucosite oral (LOGAN et al., 2007; MARCUSSEN et al., 2017).

Subsequentemente, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina-1 β (IL- β), são aumentadas significativamente (SONIS, 2009; SKEFF et al., 2014), potencializando os danos no epitélio basal da mucosa oral, configurando o quadro da mucosite (MORAIS et al., 2014). Pois, a principal estratégia no combate a este efeito colateral baseia-se apenas, em alguns tratamentos paliativos como por exemplo, o uso de suspensões com magnésio e com hidróxido de alumínio, a utilização de laser de baixa potência, crioterapia, uso de agentes antimicrobianos, geléia real, pastilhas *L. brevis*, suplementação de Zinco e Benzidamina (DAUGÉLAITÉ et al., 2019; SHARMA et al., 2012; GAUTAM et al., 2012; VOKURKA et al., 2011). Sendo assim, faz-se importante a investigação destes mediadores inflamatórios e de prováveis substâncias que sejam capazes de inibir o desenvolvimento da mucosite oral.

Assim baseado em pesquisas anteriores, observou-se que a L-cisteína é um aminoácido semiessencial, que participa principalmente do metabolismo de proteínas usado rotineiramente como suplemento alimentar (SALMAN et al., 2013). Além disso, há estudos que descrevem outras finalidades não nutricionais como por exemplo, a gastroproteção (LEE et al., 2013; KANIKARLA et al., 2014). Este aminoácido semiessencial pode ter como produto da reação da transulfatação reversa e como resposta terapêutica, a liberação de Sulfeto de hidrogênio (H₂S) intracelularmente, ativação da Glutathione peroxidase (potente antioxidante) e controle peroxidação lipídica, respectivamente (KABIL; BANERJEE, 2010; POWELL; DILLON; MATSON, 2017; HAMZA; EL-SHENAWY, 2017).

O H₂S é considerado um importante mediador gasoso, com ação antiinflamatória, que age inibindo a diapedese de leucócitos (GEMICI et al., 2015), atividade da Mieloperoxidase, promovendo a apoptose e reduzindo citotoxicidade neutrofílica (PÁLINKÁS

et al., 2015; DUFTON, et al.,2012). Além de modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias como NF- κ B, IL-1 β (LOBB et al.,2015; CHEN; LIU, 2016).

Tendo em vista os produtos resultantes da transulfatação reversa da L-cisteína exógena, neste caso, o sulfeto de hidrogênio que possui ação anti-inflamatória em modelos de lesão gástrica, estudados pelo nosso grupo de pesquisa (MEDEIROS et al.,2013; SOUSA et al.,2018; DE ARAUJO et al.,2018). E observando que com o desenvolvimento do quadro de mucosite oral, resultante do esquema quimioterápico da terapia antineoplásica, os pacientes desenvolvem além deste quadro inflamatório, a caquexia e infecção, que interfere na qualidade de vida dos pacientes e em último caso, os levam a morte (INCA,2015). Além disso, tendo apenas como terapêutica os cuidados paliativos, baseado em tais fatos, faz-se necessário conduzir novos manejos para este efeito adverso, visando a ação anti-inflamatória e melhora na qualidade de vida dos pacientes oncológicos. Portanto, o alvo da nossa pesquisa foi estudar a ação anti-inflamatória da L-cisteína exógena como terapia na mucosite oral experimental.

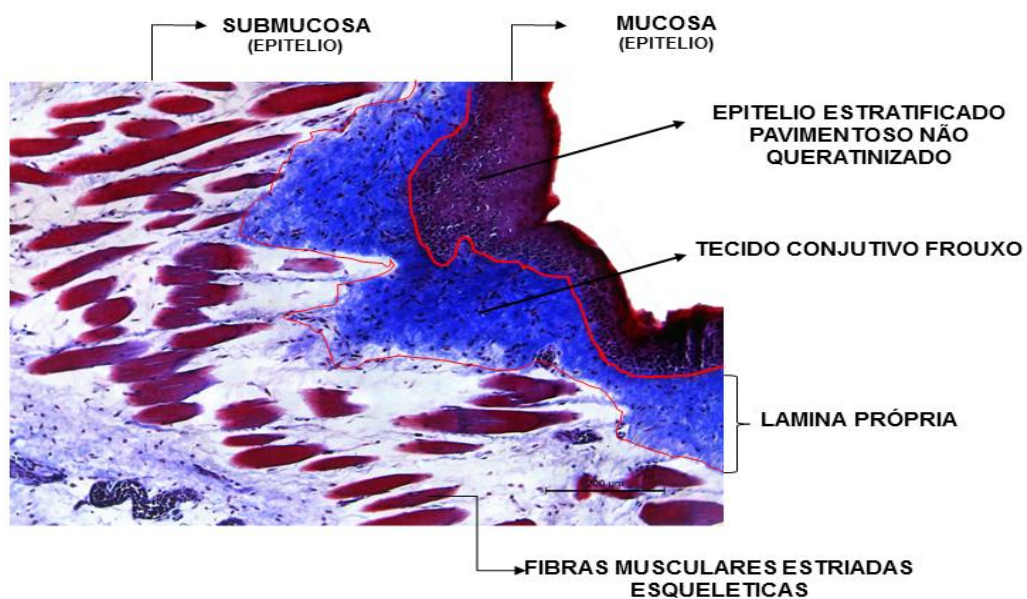
2.REFERENCIAL TÉORICO

2.1 Aspectos Morfológicos da mucosa oral

A cavidade bucal é a parte inicial do sistema digestório. Localiza-se no terço inferior da face e comunica-se com o exterior pela abertura oral, uma cavidade virtual que contorna as arcadas dentárias e a gengiva, e com a parte oral da faringe (orofaringe) através de uma abertura ampla denominada istmo da garganta (das fauces) (MOORE, PERSAUD, 2016; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017). Onde é revestida por uma mucosa oral que serve como proteção e barreira contra vários estímulos externos, como microrganismo e tensão de cisalhamento. Sendo relacionada a algumas funcionalidades básicas e essenciais para o bem-estar do indivíduo como mastigação, fonação e deglutição (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2004; PAIVA et al., 2016).

Esta região da cavidade bucal é revestida por epitélio estratificado escamoso não queratinizado em algumas áreas como, mucosa labial e bucal, tais características histológicas podem ser observadas também no epitélio da mucosa jugal de hamsters (MOLINA et al., 2017; SILVA et al., 2017) (Figura 1). Apresentando também outras regiões com áreas queratinizadas como: gengiva, palato duro, região dorsal e lateral da língua (ASIKAINEN et al., 2017).

Figura 1.Aspectos histológicos da mucosa.



Fonte :Elaborado pela autora.

Legenda: Características do epitélio da mucosa jugal de hamsters. Coloração Tricômio de Massom ,200x.

Além destas características histológicas, supracitadas, a cavidade bucal possui o seu próprio mecanismo de defesa superficial, em conjunto com a saliva e seus componentes, formando um complexo estrutural, que compreende a primeira linha de defesa para a cavidade oral. Este complexo é altamente adaptado para proteger os tecidos mais profundos quando ocorre diferentes danos, bloqueando a entrada de microrganismos e agentes tóxicos (ASIKAINEN et al., 2017). Assim quando ocorre a inativação deste complexo, como por exemplo: na imunossupressão resultante da quimioterapia para o câncer, que pode levar a perda desta barreira desenvolvendo o quadro de mucosite oral (BARKOKEBAS et al.,2015; LALLA et al.,2014).

2.2 Principais estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer

As principais estratégias terapêuticas para tratamento de pacientes oncológicos basea-se no uso de quimioterápicos, que são comumente usados com o objetivo de inibir as metástases e melhorar a taxa de sobrevivência destes indivíduos (PAULA; SAWADA, 2015).

A quimioterapia é uma forma de tratamento para as neoplasias de região de cabeça e pescoço, sendo considerada a modalidade mais comum no tratamento antineoplásico, e sua ação se dá por meio da utilização de compostos químicos, chamados de quimioterápicos (JESUS et al., 2016; ZANG et al., 2014). Cujas finalidades são curar a doença ou diminuir a apoptose das células neoplásicas (TOJAL; PINTO-DE-SOUSA, 2014) e impedir a disseminação da neoplasia antes ou após a ressecção da lesão primária (terapêutica neoadjuvante e adjuvante) ou sendo utilizada como estratégia terapêutica paliativa (BREDA et al., 2016; RONDINELLI et al., 2017;). Tais quimioterápicos podem ser classificados como agentes alquilantes, esteróides, alcalóides e antimetabólitos (MALHI et al., 2012; MARTINEZ et al., 2017), que agem por meio da mediação dos processos de crescimento e divisão celular (SINGLETERRY; SREEDHAR; ZHAO, 2014).

O mecanismo de ação, dos quimioterápicos classificados como agentes alquilantes, como por exemplo, a cisplatina e a ciclofosfamida (GUERREIRO et al., 2014). Dá-se por meio da sua capacidade de ligação com as bases purinas no DNA das células cancerosas, interferindo nos mecanismos de reparo, causando danos e, posteriormente, induzindo a apoptose destas células malignas (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Já para terapia a base de esteróides, se dá por meio da atuação desses esteróides como agentes anti-proliferativos, inibindo uma determinada enzima e assim reduzindo a

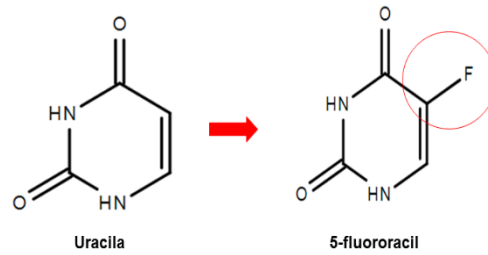
biossíntese de hormônios endógenos, ou por atuarem como ligantes com maior afinidade para o receptor em relação ao hormônio endógeno, bloqueando a ação deste hormônio (MAMOUNI et al., 2015). Dentro do grupo de esteroides inibidores enzimáticos pode-se citar: a sulfatase (Lee et al., 2016), a aromatase (Kanomata et al., 2017) e a enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (CASTRO et al., 2012).

Por outro lado, a estratégia terapêutica a base de alcalóides como os encontrados na Vinca, que são isolados a partir dos fungos encontrados nas folhas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae), vimblastina e vincristina (KUMAR et al., 2018). Dá-se por meio de sua ligação as β -tubulinas que inibem a polimerização dos microtubulos durante a mitose celular nas células, desencadeando a apoptose celular das células neoplásicas (PARKER et al., 2018).

Além destas estratégias terapêuticas, pode-se destacar a terapia a base de agentes antimetabólitos que tem forte semelhança estrutural com o ácido fólico e as bases purina e pirimidina envolvidas na síntese de DNA, RNA e de determinadas enzimas (OCHIAI et al., 2014). Mudando apenas, quanto ao arranjo molecular do metabólito correspondente, ao ponto de atuarem como substratos falsos em reações bioquímicas (KODA et al., 2016), inibindo etapas de síntese ou incorporando-se em moléculas e interferindo na função ou replicação celular (SASAKO et al., 2015). De modo exclusivo, estes agentes atuam principalmente durante a fase S (síntese de DNA) no ciclo celular (YOSHIDA et al., 2014). Assim, interferindo no crescimento das células de alta proliferação celular em todo o organismo como as células germinativas e o epitélio que reveste o trato gastrointestinal (GUERREIRO et al., 2015; FOCACCETTI et al., 2015).

Dentro dessa classe farmacêutica, os agentes antimetabólitos, dá-se ênfase ao 5-fluorouracil (5-FU), análogo a pirimidina que foi desenvolvido a partir da década de 50, preparado a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por outro mais estável de Flúor na posição 5 da molécula de uracila (Figura 2). Com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de um fluoronucleotídeo na molécula de DNA e/ou RNA, processo essencial para a proliferação e metabolismo celular (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954). Este fármaco é um análogo da pirimidina uracil que ocorre naturalmente, sendo assim, metabolizado por meio das mesmas vias metabólicas do uracil (FOCACCETTI et al., 2015).

Figura 2. Estrutura de Bases Nitrogenadas Pirimidinas.

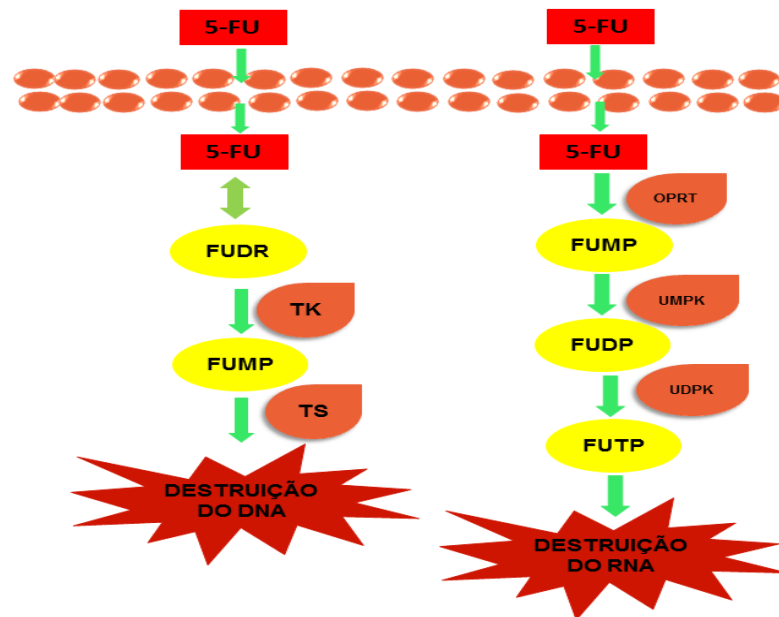


Fonte: Adaptado de Focaccetti et al., 2015.

Este fármaco, rotineiramente prescrito na clínica oncológica, é ativado preferencialmente nos tumores onde a distribuição tecidual de enzimas, que são chaves no metabolismo, em particular a Timidina Fosforilase (TP) (STASHKEVYCH et al., 2014). O 5-FU atua durante a fase S do ciclo celular inibindo a síntese de DNA e RNA reduzindo a disponibilidade de timidilato. Isto acontece, devido a conversão do 5-FU em 5-fluorourodeoxiuridina (5-FUdR) pela ação da timidina fosforilase (TP). O 5-FUdR é então convertido pela timidina quinase (TK) em 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (5-FdUMP). O 5-FdUMP inibe a síntese de DNA competindo com o monofosfato de desoxiuridina (dUMP) pela ligação à timidilato sintase (TS). O 5-FU inibe a síntese de RNA, por meio do metabolismo do orotato fosforibosiltransferase (OPRT) para 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP) e subsequente conversão para 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP) via 5-fluorouridina difosfato (5-FUDP) (AKPINAR et al., 2015; FOCACCETTI et al., 2015).

O efeito inibidor deste quimioterápico não se limita somente às células neoplásicas, já que se ligam também em células normais, tendo importantes efeitos colaterais, que em determinadas situações predizem desde a redução do esquema terapêutico até a sua total interrupção, assim, podendo trazer grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico (JUSTINO et al., 2014). Tais efeitos adversos, variam consideravelmente de acordo com o tratamento, dose utilizada e via de administração e são mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação (VANLANCKER et al., 2016).

Figura 3. Metabolismo do 5-FU.



Fonte: Adaptado de FOCACCETTI et al., 2015.

Legenda: O 5-FU entra nas células por meio de transporte facilitado. No meio intracelular, é convertido em três metabólitos ativos principais: (monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP)).

Como por exemplo, o 5-FU devido a sua toxicidade desenvolve inúmeros efeitos adversos como a neurotoxicidade, através da redução da neurogênese e conseqüentemente problemas cognitivos (ELBELTAGY et al., 2012), cardiotoxicidade, isquemia, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatia (FOCACCETTI et al., 2015), hepatotoxicidade, mielosupressão (KUMAR et al., 2010; KOBUCHI et al., 2017), alopecia, fadiga, reações cutâneas que incluem eritema, bolhas, prurido, necrose (HADDOCK; COHEN, 2016), Na medula óssea resulta em granulocitopenia e trombocitopenia além de distúrbios gastrointestinais como lesão da mucosa intestinal e oral, faringite, esofagite e colite (KAWASHIMA et al., 2015).

2.3 Efeitos adversos no uso de terapia antineoplásica.

As modalidades de tratamento das neoplasias frequentemente utilizadas são três: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (TERRA et al., 2016; CAMPOLINA et al., 2015; ESPINOSA et al., 2015). A estratégia cirúrgica do câncer tem dois objetivos principais: ressecção da massa cancerosa e de outros tecidos envolvidos, como os linfonodos e a remoção de órgãos endócrinos que podem modificar a disseminação da doença, evitando metástase (TERRA et al., 2016). Diferentemente do tratamento cirúrgico, a radioterapia e a quimioterapia

não são específicos para o tecido neoplásico, atuando pela inibição do crescimento de células que se dividem rapidamente, interferindo na divisão celular (ESPINOSA et al., 2015).

O sucesso exponencial da quimioterapia antineoplásica pode ser atribuído ao uso de terapias imunossupressoras, por meio da combinação de agentes quimioterápicos como: Oxaliplatina, cisplatina, doxorrubicina e ifosfamida com 5-Fluorouracil (5-FU) (PANGENI et al., 2016; CARDANI et al., 2014; ALENCAR et al., 2017).

Entretanto, como descrito anteriormente, os quimioterápicos não atuam apenas nas células neoplásicas, que tem alta capacidade mitótica, mas também atuam nas células normais que também possuem essa característica. Assim, esta terapêutica acaba desencadeando toxicidade celular e efeitos colaterais como: a mucosite, xerostomia, disgeusia, cardiotoxicidade, infecções fúngicas, bacterianas, virais, as cáries de radiação, trismo, osteorradiocrose e a neurotoxicidade que alteram a sua qualidade de vida (YAYLALI et al., 2016; YI-SHING et al., 2014; PAIVA et al., 2016).

Pois, sabe-se que a cada ano em todo o mundo, mais de 10 milhões de pessoas submetem-se à quimioterapia isolada ou combinada com radioterapia, para tratamento de câncer. Infelizmente, este tipo de terapia é frequentemente complicado pois há dano tóxico nas mucosas do trato gastrointestinal, também conhecido como mucosite oral e intestinal (MORAIS et al., 2014; YOSHIDA et al., 2014). Embora a mucosite possa ocorrer em todo o trato digestivo, a mucosite na cavidade oral é particularmente angustiante e dolorosa (SONIS, 2013).

2.4 Mucosite :efeito adverso da terapia oncológica

A mucosite é um processo inflamatório que pode envolver as células epiteliais da cavidade oral e do trato gastrointestinal (LALLA et al., 2014). Tal condição é caracterizada pela quebra da barreira mucosa, resultante do dano ao DNA nas células com alto *turnover*, como as células da cavidade oral e gastrointestinal, decorrente da toxicidade celular (SEBILLE et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015).

Esta toxicidade, que afeta o trato gastrointestinal é comum na terapia antineoplásica. A lesão da boca, mucosite oral (MO), está entre um dos efeitos colaterais mais estudados da terapia do câncer. As ulcerações associadas à MO resultam em dor significativa, que afeta a capacidade do paciente de comer, impactando negativamente na qualidade de vida e reduzindo a tolerabilidade do tratamento do câncer (BARKOKEBAS et al., 2015).

A mucosite pode, portanto, ter um efeito profundamente negativo sobre o estado nutricional, ingestão oral de alimentos e medicamentos e manutenção da saúde bucal em pacientes. Clinicamente, a manifestação da MO afeta o epitélio de modo contínuo, onde, em

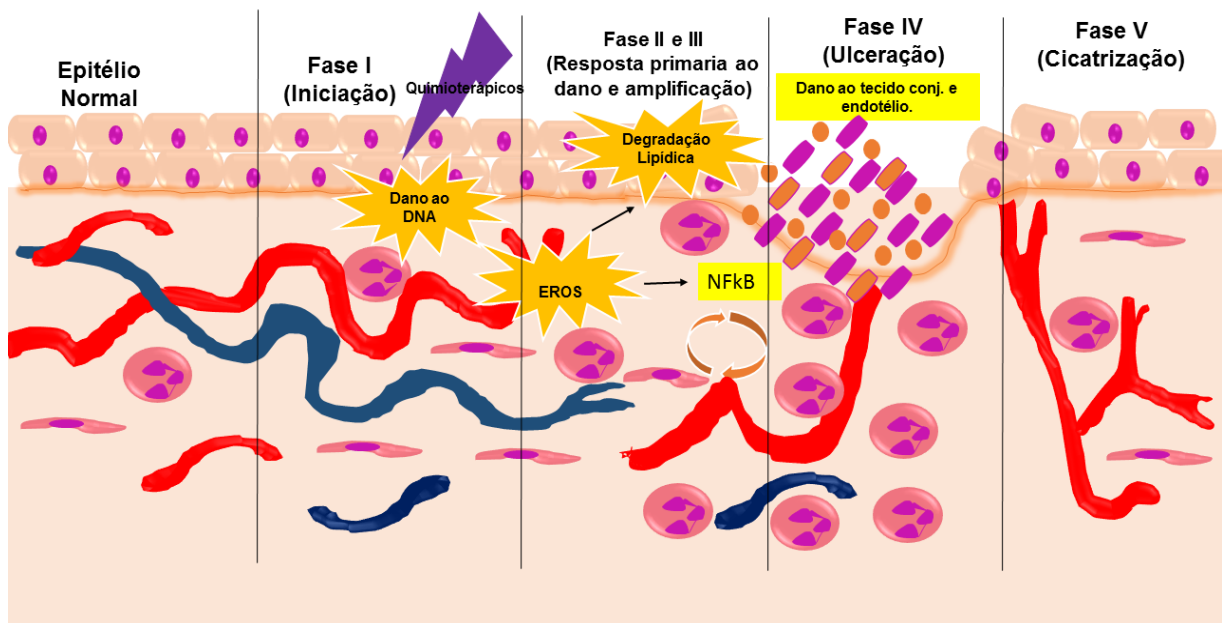
sua forma branda, apresenta-se como lesões atróficas eritematosas e, em sua forma grave, como lesões ulcerativas que penetram a submucosa (LAHEIJ; DE SOET, 2014). Assim como na mucosite intestinal causando atrofia das vilosidades, dificultando a absorção de nutrientes necessários para o funcionamento normal do corpo associado aos quadros de vômito e diarreia (KARBELKAR; MAJUMDAR, 2016).

Além disso, a perda da integridade do epitélio oral e gastrointestinal aumenta a predisposição a infecções por bactérias e agentes infecciosos para sistema circulatório (MENDONÇA et al., 2015). Desse modo, com essa perda da histoarquitetura do trato gastrointestinal propicia a invasão de cepas bacterianas que estimulam a liberação de citocinas pró inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que ativam indiretamente genes pró-apoptóticos, sobretudo NF κ B, que amplificam os danos já instaurados (VILLA, SONIS 2015; MORAIS et al., 2014).

2.5 Fisiopatologia da Mucosite oral

A mucosite oral (MO) que é uma condição, resultante da inflamação da mucosa, decorrente ao uso de radioquimioterápicos, que se manifesta por meio de eritema, ulceração, hemorragia e edema associado na maioria dos casos ao quadro de dor. (RODRIGUEZ-CABALLERO et al., 2012; SAIF et al., 2014). Este quadro inflamatório pode ser estratificado em cinco fases: fase de iniciação, resposta primária ao dano, amplificação, ulceração e cicatrização (vide figura 4), dependendo da dose de radiação recebida, do tipo de droga quimioterápica adotada e ao regime de administração (SONIS et al., 2004).

Figura 4. Fases de estadiamento da mucosite oral.



Fonte: Adaptado de Sonis 2004.

Na fase de iniciação (figura 4(Fase I)), o DNA das células epiteliais basais é lesado e, concomitantemente, há formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são mediadores cruciais nos eventos biológicos subsequentes. Nessa fase não há alteração visível na camada mucosa, porém há o início de uma cascata de eventos na camada submucosa (SONIS et al., 2004; MUHAMMAD; ELIOPOULOS; MUANZA, 2017).

Na fase seguinte, que é denominada de fase de resposta ao dano (figura 4 (fase II)), o DNA lesado e as EROs iniciam uma cascata de eventos complexos ainda não compreendidos. Porém sabe-se com clareza que o dano no DNA resulta na estimulação de várias vias de transdução que ativam fatores de transcrição como p53 e fator de transcrição nuclear κB (NFκB). Dentre os fatores transcripcionais que são ativados pelas EROs, o NFκB é considerado um dos mais importantes pois, há correlação entre a toxicidade e resistência a terapia antitumoral (SONIS et al., 2004; GEORGIU et al., 2012; VEENA et al., 2014).

O NFκB pode ser estimulado em resposta às EROs (SONIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2012; VEENA et al., 2014). Que por sua vez, causa a peroxidação da membrana celular gerando produtos que suprarregulam genes de resposta imediata, como os codificados por C-JUN e C-JUN kinase aminoterminal (JNK) (SUI et al., 2014). Nessa fase, ocorrem mudanças em grande parte das células da mucosa, não se limitando às células epiteliais da mucosa oral.

Dentre os genes transcritos que são ativados pelas EROs, NF κ B e ERG-I com grande relevância clínica pois há correlação destes transcritos com a resistência a terapia antitumoral (SONIS, 2004; KANG et al., 2016).

A fase de amplificação (figura 4 (fase III)) ocorre como consequência da *up-regulation* de fatores transcricionais. Onde há uma grande quantidade de moléculas biologicamente ativas que se acumula e atinge o tecido da submucosa. Algumas dessas, como as citocinas pró-inflamatória, TNF- α , ativam NF κ B, gerando um *feedback* positivo (WU et al., 2017). Uma vez ativado, o NF- κ B, aumenta a transcrição de genes envolvidos na produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Subsequentemente, essas citocinas promovem ativação da via da Ciclooxigenase 2, angiogênese e aumento da transcrição de moléculas de adesão e desintegração de ceramidas (SONIS et al., 2004; SMITH et al., 2014). Como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) levando a ativação de C-JUN quinase aminoterminal (JNK), que por sua vez regula a ativação transcripcional de AP-1, resultando na ativação de caspase-3 e morte celular (GAO et al., 2016). Além disso, TNF- α e IL-1 β induzem a ativação de MMP-1 e MMP-3 (HAVERMAN et al., 2014; SETRERRAHMANE; XU, 2017). Esses eventos em conjunto contribuem para as alterações na camada submucosa e no epitélio oral.

A fase ulcerativa normalmente é dolorosa e compromete a nutrição e a qualidade de vida do paciente, bem como aumenta o risco para o paciente desenvolver infecção local e sistêmica. A injúria e apoptose das células epiteliais basais resultam em perda da integridade do epitélio. Observa-se um intenso infiltrado de células inflamatórias, notadamente polimorfonucleares. Adicionalmente, nessa fase é comum infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microrganismos (VILLA, SONIS, 2015; LIMA et al., 2014).

Por último a fase de cicatrização (figura 4. (Fase V) com o início de um sinal advindo da matriz extracelular. O que leva a uma renovação do epitélio, diferenciação e restabelecimento da microflora. Isto pode acontecer simultaneamente a recuperação da medula óssea com aumento de leucócitos. Após esta fase de cicatrização a mucosa oral parece se normalizar (VILLA, SONIS, 2015).

Dentre as cinco fases da mucosite, a fase ulcerativa é considerada a mais significativa em pacientes e modelos experimentais (YAO et al., 2017; SHIMAMURA et al., 2018). Pois, a perda da integridade da mucosa propicia a invasão de produtos na parede celular de bactérias que colonizaram a cavidade oral, os quais estimulam células mononucleares a produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias que promovem indiretamente a transcrição de

genes pró-apoptóticos e potencializam os danos no epitélio basal (VILLA, SONIS, 2015; MORAIS et al., 2014).

Isto é, a gravidade durante a fase ulcerativa é um dos quadros clínicos mais descritos, por ser advindo da mielossupressão resultante da destruição da barreira epitelial tornando assim, a cavidade oral uma importante porta de entrada para microrganismos patogênicos (SONIS et al., 1990; VILLA, SONIS, 2015; FOCACCETTI et al., 2015). Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria microbiota oral como bactérias gram negativas, além de fungos como a *Candida albicans* (GARDIZANI et al., 2017).

Ainda nesta fase, há intensa migração de células inflamatórias para a base da lesão mediada por fatores quimiotáticos. Assim, o papel dos mediadores inflamatórios e o desenvolvimento de fármacos que sejam capazes de inibir este efeito colateral, a mucosite oral, são alvos de muitos estudos.

2.6 Mediadores Inflamatórios na mucosite

Estudos apontam que durante os processos inflamatórios ocorre intensa participação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e citocinas anti-inflamatórias, tais como Interleucina-10 (IL-10), as quais estão envolvidas neste processo inflamatório (BARBOSA et al., 2019; HARADA et al., 2018; SILVA et al., 2017).

O TNF- α produzido principalmente por macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória que interage com uma variedade de sinais resultando em uma estimulação indireta de inflamação e agindo em diferentes partes do corpo promovendo uma resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (LIMA et al., 2005; GLASER et al., 2016). O TNF- α influencia a viabilidade das células endoteliais alterando as moléculas reguladoras envolvidas na indução ou supressão do apoptose (GUO et al., 2013). Como visto no estudo realizado por Zbinden e pesquisadores (2015) onde observou-se que com a presença de bactérias como estreptococos viridans, que induzem a produção de TNF por macrófagos na mucosa oral. Além disso, esta citocina induz o *priming* dos neutrófilos, levando a um aumento da resposta inflamatória dessas células e outros mediadores como observado na saliva de pacientes oncológicos sob esquema quimioterápico, desenvolvendo a mucosite oral (CHAUDHURI; NAIR; ASHOK, 2018).

Para este quadro inflamatório, mucosite oral, as interleucinas são citocinas responsáveis pela amplificação da resposta imunológica a agentes infecciosas. No estudo realizado por LEGERT e seus colaboradores (2015), notaram aumento significativo nos níveis de IL-6 no fluido gengival pacientes com transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) com aumento da severidade da mucosite oral. A interleucina-1 (IL-1 β) é um mediador pró-inflamatório presente na inflamação aguda e crônica e um poderoso indutor da resposta imune inata. A IL-1 β é produzida por células hematopoiéticas tais como monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e células dendríticas em respostas aos diversos estímulos (HENGARTNER, et al.,2015). A produção de IL-1 β pode ser estimulada por fatores microbiológicos e não microbiológicos, tais como outras citocinas, irradiação e quimioterapia. A mesma pode ainda induzir sua própria produção e processamento, sendo este um passo fundamental na patogênese de muitas doenças inflamatórias (KEYEL, 2014).

Como descrito na pesquisa realizada por SKEFF e demais pesquisadores (2014), que observaram que houve aumento de interleucinas como IL-1 β , IL-6, em hamsteres submetidos a esquema quimioterápicos exacerbando o quadro da mucosite oral induzida por 5-FU. A IL-1 β e TNF- α apresentam efeito sinérgico, causando indução de moléculas de adesão endotelial, tais como as I-CAMs (moléculas de adesão intracelular) que são essenciais nas fases iniciais da resposta inflamatória, como na fase inicial da mucosite oral (Figura 4 (I)) (BARRACH et al.,2015; CASTILLA, MATEOS, MARTINEZ, 2000; LOGAN et al., 2009). A *up-regulation* da IL-1 β após dano ao DNA é observada em pacientes com câncer com mucosite e que o tratamento com anti-IL-1 β pode melhorar a mucosite assim como os múltiplos distúrbios associados à permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal (KANAREK et al., 2014).

Além disso, há a ativação da transcrição do gene NF-kB que é induzida por uma variedade de agentes, incluindo bactérias, vírus, citocinas, estresse oxidativo, além de radiação ionizante e quimioterapia. Uma vez ativado, NF-kB regula positivamente cerca de 200 de genes, muitos dos quais são potencialmente importantes em doenças e lesões da mucosa, além de genes associados à expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão. (CURRA et al., 2015). Tanto o TNF- α , quanto a IL-1 β , induzem vias de sinais que levam a ativação de fator de transcrição NF- kB é responsável por controlar a expressão da IL-1 β e do TNF- α em modelos inflamatórios (LIN et al., 2013).

Corroborando com tais informações, Pugazhenthii et al., (2013) por meio de um ensaio *in vitro* observou que, através da análise de PCR real time, há uma sinergia entre IL-1 β e do TNF - α na indução da maioria dos genes inflamatórios por um mecanismo envolvendo NF-

kB no modelo de alça intestinal. Já no modelo experimental de mucosite oral induzido por 5-FU, realizado por Ribeiro et al., (2015) descreve que, com a diminuição dos níveis de TNF- α e a IL-1 β havia atenuação do quadro inflamatório na mucosa jugal dos hamsters por meio da ativação da transcrição do NF-kB.

Outra citocina bastante estudada é a IL-10 que é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, por meio da inativação de macrófagos, que atua prevenindo os danos ao tecido celular, ocasionados na mucosite oral. Esta citocina é ativada por meio da via das MAPKs e NF-kB (YANG et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Além disso, outros genes também são ativados pela expressão positiva de NF-kB como por exemplo, as ciclooxigenases (CASTRI et al., 2014). A Ciclooxigenase (COX) ou prostaglandina H₂ sintetase é uma enzima chave na biossíntese das prostaglandinas (PGs). Existem 3 isoformas de COX, a tipo 1 (COX-1), a tipo 2 (COX-2) e a COX -3 (compartilha todas as características catalíticas e estruturais tanto da COX-1 como da COX-2) (GUNTER et al., 2016; BELLÓ et al., 2015).

Pois, acredita-se que a COX-2 esteja envolvida em processos inflamatórios e mitóticos sendo regulada positivamente em resposta a diferentes fatores de crescimento, promotores de tumor e citocinas (WOO et al., 2015). Além de resultar na persistência da inflamação devido a prevenção da síntese de prostanoídes anti-inflamatórios (URBANSKA; ZHANG, 2015; RIBEIRO et al., 2015). Estudos indicam que a COX-2 tem um papel importante na patogênese da mucosite. Descobriu-se que ao modular positivamente a COX-2 houve desenvolvimento acentuado de mucosite ulcerativa, contribuindo com o aumento na duração do quadro inflamatório e/ou aumentando a gravidade das úlceras formadas (SONIS et al., 2009).

Nos modelos de mucosite oral e intestinal por 5-FU e irinotecano apresentaram forte marcação imunohistoquímica para COX-2 evidenciando severidade significativa no curso da mucosite quando comparado ao grupo controle (RIBEIRO et al., 2015; WONG et al., 2015; ALVARENGA et al., 2016; ALENCAR et al., 2017).

Assim, em resposta ao aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, durante o desenvolvimento da mucosite oral, ocorre a transcrição e ativação da enzima iNOs (Oxido Nítrico Sintetase induzida) resultando em maior produção de óxido nítrico (NO), sendo este um dos mediadores tóxicos durante a patogênese da mucosite (BASTOS et al., 2015).

O NO por sua vez, apresenta efeitos biológicos complexos, desempenhando papéis benéficos ou prejudiciais dependendo do tecido. Os efeitos prejudiciais podem incluir uma ação citotóxica para tecidos hospedeiros adjacentes, resultando em dor e lesões nos tecidos. A produção de grandes quantidades de NO pela iNOs foi evidenciada por desempenhar um papel importante nas reações imunes e em muitos processos inflamatórios, incluindo a mucosite

(SKEFF et al., 2014). Bastos et al., (2015) e Leitão et al., (2007). Visto que, a iNOS não é expressa em condições normais, mas é induzido em níveis elevados durante processos inflamatórios, estimulados por citocinas (IL-1 β e TNF- α) e micro-organismos como visto na mucosite oral (KANAREK et al.,2014; BASTOS et al.,2015).

2.7 Biomarcadores na Mucosite

A mucosite oral (MO) é uma complicação inflamatória comum entre pacientes com câncer como efeito adverso da terapia a base quimioterápicos. Onde a inflamação é uma resposta fisiológica do corpo, especialmente dos tecidos vasculares, a estímulos nocivos, incluindo infecções e lesões teciduais. Como principal interface entre o corpo e o ambiente externo, a pele fornece a primeira linha de defesa contra lesões traumáticas e invasão por patógenos microbianos (CHEN; LYGA, 2014). Por outro lado, para agentes químicos e microbiota oralmente digeridos, a mucosa oral é a primeira linha de defesa e, aproximadamente em todos os casos, sofre lesões histopatológicas e inflamatórias (TANIDEH et al., 2014).

Diversos são os biomarcadores capazes de quantificar e prever sobre o sucesso terapêutico de substâncias na proteção ou diminuição do quadro da mucosite oral. Pois, a toxicidade causada por radicais livres de oxigênio contribui para a peroxidação lipídica, danos no DNA, desnaturação de proteínas e lesão oxidativo nos tecidos, como ferramenta de investigação de novas drogas testadas no âmbito científico (LIU et al., 2017). Para evidenciar a eficácia terapêutica, rotineiramente quantifica-se níveis de malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), glutathione (GSH), nitrito/nitrato, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em modelos de experimentais inflamatórios como na mucosite (SKEFF et al., 2014; AHMED; SELIM; EL-SAYED,2017; DO NASCIMENTO et al.,2018; MEDEIROS,2010).

O MDA é um dos mais importantes produtos da oxidação produzidos durante o estresse oxidativo, sendo considerado um grande marcador de peroxidação lipídica e, portanto, um marcador indireto de estresse oxidativo (ZEB; ULLAH, 2016). Além do aumento nos níveis de MDA, pesquisas descrevem uma redução nos níveis plasmáticos de glutathione reduzida (GSH) em células mononucleares e em amostras de tecidos da mucosa jugal no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU (BAGAN et al.,2014; LIMA et al., 2015). A diminuição dos níveis intracelulares de GSH, que é uma importante enzima antioxidante endógena, associada a quantificação de MDA, constitui um importante indicador do perfil oxidativo durante a inflamação (TRAVERSO et al., 2013).

Outro método de investigação de lesões inflamatórias é por meio da expressão de iNOs, assim como a dosagem de nitrito/nitrato, constituem métodos de verificação da produção e quantificação indireta de óxido nítrico, respectivamente, o qual constitui um dos mais importantes mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da inflamação (CASSINI-VIEIRA et al., 2015). Além desse, outro importante biomarcador também de inflamação consiste no ensaio da avaliação da atividade da MPO, que é uma das enzimas inflamatórias mais abundantes presentes nos grânulos azurofílicos de células de defesa granulocíticas encontrados na mucosa jugal de hamsters no modelo de mucosite induzido por 5-FU, sendo determinante para o entendimento dos efeitos da inflamação (ARAÚJO et al., 2015; PULLI et al., 2013).

Durante o processo inflamatório instaurado nas mucosas (oral e intestinal), mucosite, há geração de EROS que por sua vez, desencadeiam uma cascata de eventos biológicos, dentre eles, a ativação de NF- κ B e expressão de citocinas pró-inflamatórias. Este processo potencializa o estresse oxidativo e os tecidos lesionados são estimulados a expressar enzimas antioxidantes como CAT e SOD por exemplo, (KWON, 2016). Onde a CAT e o SOD atuam na primeira linha de defesa como uma enzima antioxidante primária, modulando a expressão e distribuição de fatores angiogênicos e mediadores inflamatórios, sendo capaz de diminuir a fosforilação da proteína quinase C (PKC) e a expressão de NF-KB, COX₂ e iNOS. Além disso, bloqueia a diapedese neutrofilica (QUÉRÉ et al., 2014).

2.9 Aminoácidos como terapia.

Aminoácidos são as unidades básicas da composição de uma proteína. Em humanos saudáveis, há nove aminoácidos que são considerados essenciais (triptofano, valina, fenilalanina, treonina, lisina, isoleucina, leucina, histidina e metionina), uma vez que não podem ser sintetizados endogenamente e, portanto, devem ser ingeridos por meio da dieta. Existem ainda os aminoácidos essenciais ocasionais, o que significa que são produzidos por organismos saudáveis, mas em determinadas situações, nosso corpo pode não produzi-los. São eles: cisteína, glicina, prolina e tirosina. (JUNIOR, 2013; ROGERO et al., 2008).

A Cisteína é um aminoácido semiessencial e está presente principalmente na forma de L- cistina no espaço extracelular. Com a ajuda de um sistema de transporte, a L- cistina extracelular atravessa a membrana plasmática e é reduzida a L-cisteína dentro das células pela tioredoxina e pela glutathione reduzida (GSH). A L- cisteína intracelular desempenha um papel importante na homeostase celular como um

precursor para a síntese proteica e para a produção de GSH, sulfeto de hidrogênio (H_2S) e taurina (YIN et al., 2016).

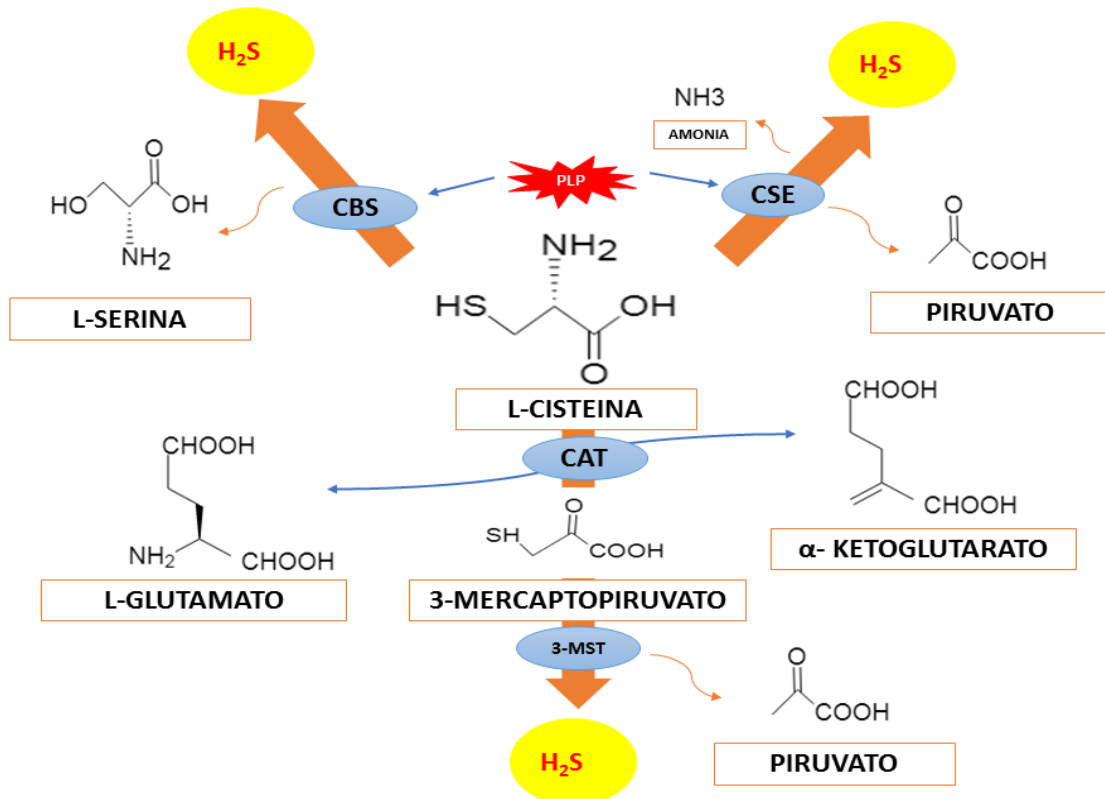
Vários aminoácidos, como a L-cisteína e L-arginina, modulam varias vias de sinalização em *in vitro* e *in vivo* como aminoácidos essenciais, além de seus papéis como componentes de peptídeos / proteínas (SILVA et al., 2014; LEBEAUX et al., 2015; WANG; CHENG; ZHU, 2015). Por exemplo, a L-arginina é conhecida por regular a expressão genica e a sinalização intracelular da enzima precursora na síntese de oxido nitrico em modelos de lesão inflamatória, tendo ação antiinflamatória ,antioxidante e cicatricial assim como, a L-Cisteína (JERÔNIMO et al., 2016; KANIKA; KHAN; JENA, 2015).

A L-Cisteína possui ação antioxidante, reduzindo os níveis de MDA, nitrito/nitrato e aumentando os níveis de GSH no tecido pancreático no modelo de diabetes (SALMAN et al., 2013). Diminuindo a expressão de genes e proteínas pró apoptóticos dentre eles, a caspase-3 e Citocromo C nas mitocôndrias (CHOUDHARY; AL-HARBI; ALMASAN, 2015). Ativando a sinalização de AKT (Proteina Kinase Transportadora) responsavel pela proliferação celular e diminuição de estresse oxidativo(TANIGUCHI et al., 2011).

Ha estudos que descrevem que a L-cisteína regula diretamente a síntese , função ,ligação e transporte de enxofre em proteínas .De modo indireto regula também as respostas celulares quanto aos niveis de glutathiona e formação sulfeto de hidrogênio (H_2S) (INGENBLEEK e KIMURA, 2013). Além disso, o H_2S está envolvido em inúmeras funções fisiológicas, como a resposta imune, inflamatória, percepção e mediação da dor, sendo produzido em muitos tecidos de mamíferos (POWELL; DILLON; MATSON, 2017). Os principais compostos doadores de enxofre nos tecidos são a metionina, taurina e cisteína nas células de mamíferos (VICENTE et al., 2016; ROSA et al., 2015).

Nessas celulas, a produção endógena de H_2S é realizada principalmente por meio da reação de transulfatação reversa na L-cisteína que é catalisada, por duas enzimas dependentes do co-fator piridoxal-5'-fosfato (Vitamina B6) (PLP): cistationina β -sintase (CBS) e cistationina γ -liase (CSE). Alternativamente, a L-cisteína pode ser convertida em 3-mercaptopiruvato pela enzima cisteína amino-transferase (CAT), e em seguida, em H_2S através da enzima 3 mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (DUNN et al., 2016) (vide Figura 5).

Figura 5. Produção de H₂S nas células de mamíferos



Fonte: Adaptado de Powell; Dillon; Matson, 2017.

Legenda: A L-cisteína sendo catalisada, por duas enzimas dependentes do co-fator piridoxal-5'-fosfato (PLP): cistationina β-sintase (CBS) e cistationina γ-liase (CSE). Alternativamente, a L-cisteína pode ser convertida em 3-mercaptopiruvato pela enzima cisteína amino-transferase (CAT), e em seguida, em H₂S através da enzima 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase.

Assim como outros mediadores gasosos, o H₂S é considerado uma potente molécula anti-inflamatória. Pesquisas mostram que o H₂S é capaz de inibir o rolamento e adesão firme dos leucócitos ao endotélio, assim como suprimir a expressão de moléculas de adesão nestas células no modelo de colite (GEMICI et al., 2015).

No modelo de ulcera gástrica denotou que o H₂S inibe a atividade da enzima mieloperoxidase promovendo uma redução dos efeitos citotóxicos nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos (PÁLINKÁS et al., 2015). Ele também pode atenuar a inflamação gástrica induzida por AINES diminuindo, a secreção de ácido gástrico, a redução no fluxo sanguíneo, e aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular na microcirculação na fase inicial desse processo inflamatório (WALLACE; WANG, 2015).

Além disso, o H₂S promoveu a apoptose de neutrófilos e aumentou a fagocitose de bactérias por macrófagos, fatores fundamentais na resolução do processo inflamatório (ZHAO et al., 2017; DUFTON et al., 2012). Sua ação antiinflamatória é decorrente da *down-regulation* de

citocinas pró-inflamatórias, como (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1, IL-8 e o interferon- γ (FIORUCCI et al., 2007). E a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias se dá pela inibição do gene que codifica o fator nuclear NF κ B (CHEN; LIU, 2016; SEN et al., 2012). Além de inibir também os genes para COX-1 e COX-2 tendo ação gastroprotetora devido as suas propriedades antioxidantes, por meio da expressão da proteína antioxidante GPx-1 e do restabelecimento microcirculação em neurônios aferentes em modelo de isquemia gástrica (MAGIEROWSKI et al., 2017a; 2018b).

Entretanto, sabe-se que os mecanismos e vias de sinalização do H₂S, como alvo a ação antiinflamatória, ainda não estão completamente compreendidos. Mas já foram descritos alguns mecanismos, dentre eles, a ação seletiva do H₂S no canal de KATP, ativação dos canais de cálcio do tipo T, envolvidos nos estímulos nociceptivos viscerais e hiperalgesia somática em camundongos, por meio da estimulação dos receptores TRPV1 e TRPA1, sendo primordiais nas investigações nos processos inflamatórios (SCHICHO et al., 2006; MATSUNAMI et al., 2011; SZABÓ et al., 2011; MIYAMOTO et al., 2011; GUO; CHENG; ZHU 2013).

Sendo observado pelo nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores, como os conduzidos por Medeiros e colaboradores (2013) a ação gastroprotetora da L-cisteína e doadores de H₂S na lesão gástrica induzido por etanol, por meio da ativação de canais KATP e receptores TRPV1 em neurônios aferentes. Ainda neste modelo, Araújo e seus colaboradores (2018), observaram o efeito protetor do H₂S através da ativação de AMPK (Proteína Quinase Ativada) que estimula a produção de outros mediadores gasosos como o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), sendo fundamentais no controle da secreção de muco, fluxo sanguíneo, defesa da mucosa e motilidade gástrica, (LUCETTI et al., 2017).

Embora, SOUSA e seus colaboradores (2018), notaram que, no modelo de secreção de fluido em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com a toxina da cólera. O H₂S por meio da L-cisteína, apresentaram atividade protetora, tendo ação antidiarreica, independente da via AC/AMPc/PKA e AMPK.

Em outro modelo de lesão inflamatória, induzida por LPS (*Escherichia coli*) em porcos, investigou-se a ação da L-cisteína na via de sinalização NF- κ B (p65) e fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). Constatando sua ação antiinflamatória nos segmentos de jejuno íleo, atuando na diminuição da transcrição de NF- κ B e (Nrf2) que desencadearam a *down-regulation* de TNF- α , IL-6 e IL-8, aumentando os níveis de CAT, SOD, GSH (SONG et al., 2016).

Já em pesquisas *in vitro*, viu-se que a L-cisteína atua na via AMPK / PPAR γ . Diminuindo a produção intracelular de EROS, aumentando os níveis PIP₃ (Fosfatidilinositol-3,4,5), regulando positivamente a fosforilação de AMPK e a expressão de PPAR γ (Receptor

ativado por proliferadores de Peroxissoma Gama), reduzindo a fosforilação de NFkB, secreção de TNF- α , IL-8,IL-1 β ,durante o processo inflamatório (MANNA ;JAIN, 2013; SALVADÓ et al., 2014) .

Noutro estudo *in vitro*, descreveu a relação da superexpressão de CSE com a diminuição da geração do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e proteínas como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), durante a peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade em macrófagos, levando ao bloqueio da sinalização JNK / NF-kB na via CSE/H₂S, alvo terapêutico para muitas doenças (WANG et al., 2013).

No estudo experimental, com modelo de lesão gástrica por etanol, realizado por Medeiros e seus pesquisadores (2013), observaram também este aumento da expressão de CSE, como mecanismo de defesa contra o dano gástrico por etanol, por meio da imunohistoquímica.

Conforme visto na literatura a L-Cisteína possui propriedades anti-inflamatórias por ser um substrato para síntese de sulfeto de hidrogênio por meio de algumas vias. Sendo assim, um possível fármaco a ser usado como um provável agente anti-inflamatório na mucosite oral. Pois, o tratamento para a mucosite é apenas paliativo, e não há estudos na literatura que investiguem a ação deste aminoácido no tratamento para a mucosite oral.Então faz-se necessário conduzir estudos que descrevam a ação da L-cisteína como tratamento no modelo experimental de mucosite oral induzida por 5-FU.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

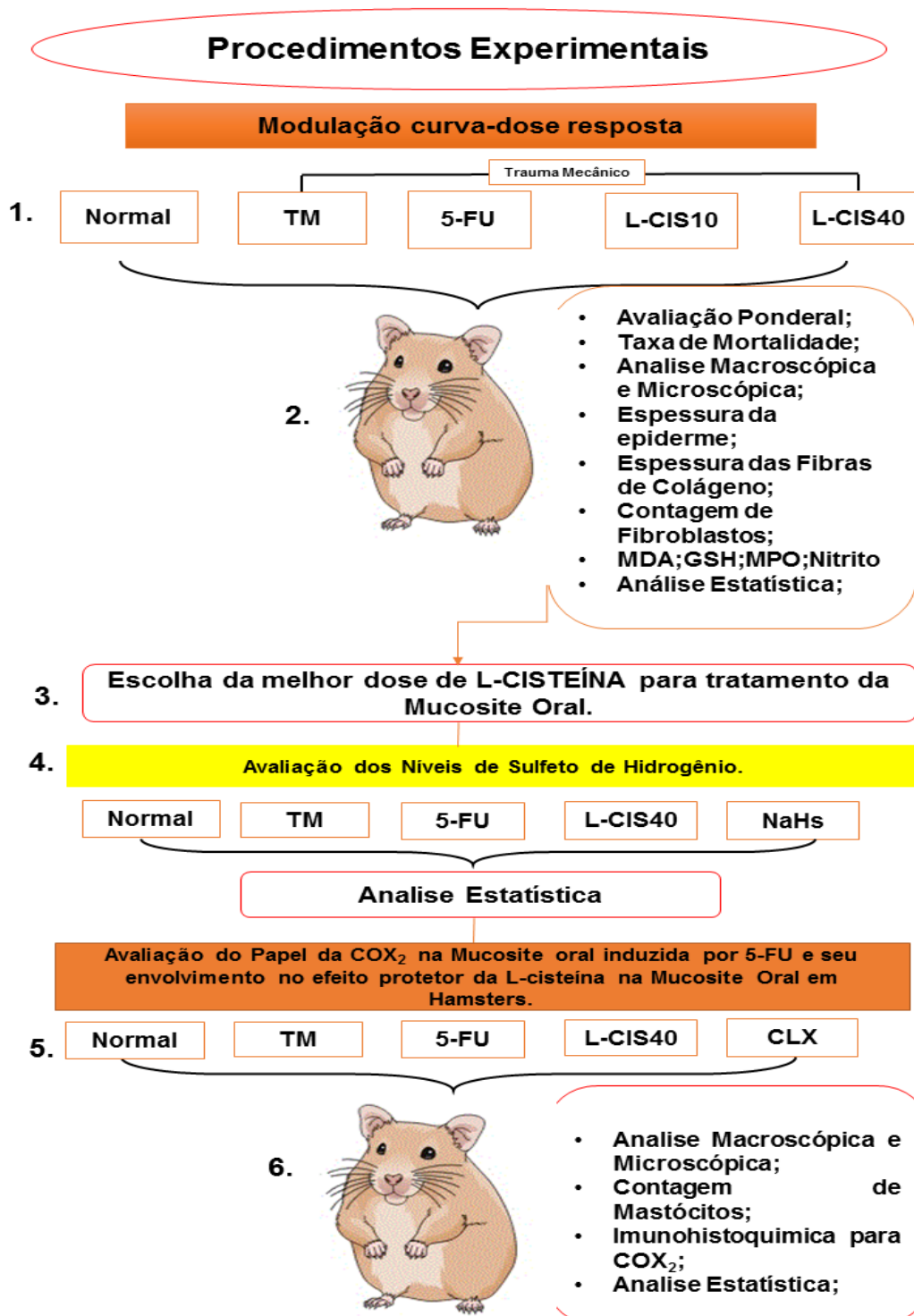
Avaliar o efeito antiinflamatório da L-cisteína exógena no modelo de mucosite oral induzida pelo 5-Fluororacil (5-FU) em hamsters Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*).

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da L-cisteína sobre as alterações macroscópica e histopatológica associados ao aumento da mucosite oral induzida por 5-FU;
- Avaliar os efeitos da L-cisteína sobre o estresse oxidativo no modelo de mucosite oral por meio da dosagem dos níveis de Glutathione (GSH), Malondialdeído (MDA), Nitrito/Nitrato e MPO;
- Determinar os efeitos da L-cisteína sobre o número de mastócitos encontrados na mucosa jugal no modelo de mucosite oral;
- Analisar a espessura das fibras de colágeno no modelo de mucosite oral;
- Estudar o envolvimento do sulfeto de hidrogênio no modelo de mucosite oral por 5-FU;
- Investigar o efeito da L-cisteína sobre os níveis de Ciclooxygenase 2;

4.METODOLOGIA

Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental.



Fonte: Própria Autora.5-FU(5-Fluorouracil:antineoplásico); LCIS (L-Cisteína :aminoácido); MDA (Malondialdeído: produto da peroxidação lipídica); CO₂ (Ciclooxigenase 2 :prostanoides inflamatórios); CLX (Celecoxibe: inibidor da CO₂);NaHs(.Hidrossulfeto de Sódio).

4.1.Drogas e Reagentes

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

4.2 Animais

No presente trabalho foram utilizados no total 60 hamsters da linhagem Golden, com peso variando entre 80 a 140g, que foram randomicamente distribuídos em grupos com n=6, onde para cada *set* de experimento foram utilizados 30 hamsters, procedentes do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará (UFC) – Fortaleza. Os animais foram acondicionados numa sala especial (apenas para habitação dos mesmos) em gaiolas metabólicas, em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água, ração padrão e jerimum jacaré.

4.2.1 Considerações éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí sob número 002/18.

4.3 Delineamento Experimental

4.3.1 Grupos Experimentais

Inicialmente, os hamsters foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, sendo cada grupo constituído por 6 animais, conforme descritos a seguir:

- Grupo Controle (Normal): animais que receberam apenas injeções de salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental

- Grupo TM: animais submetidos ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal, no 4º dia e receberam salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- Grupo 5-FU: animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam salina (0,9%, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo L-cis 10mg + 5-FU (Lcis10): animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam L-cisteína (10mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo L-cis 40mg + 5-FU(Lcis40): animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam L-cisteína (40mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental. (Vide figura 6.item 1).

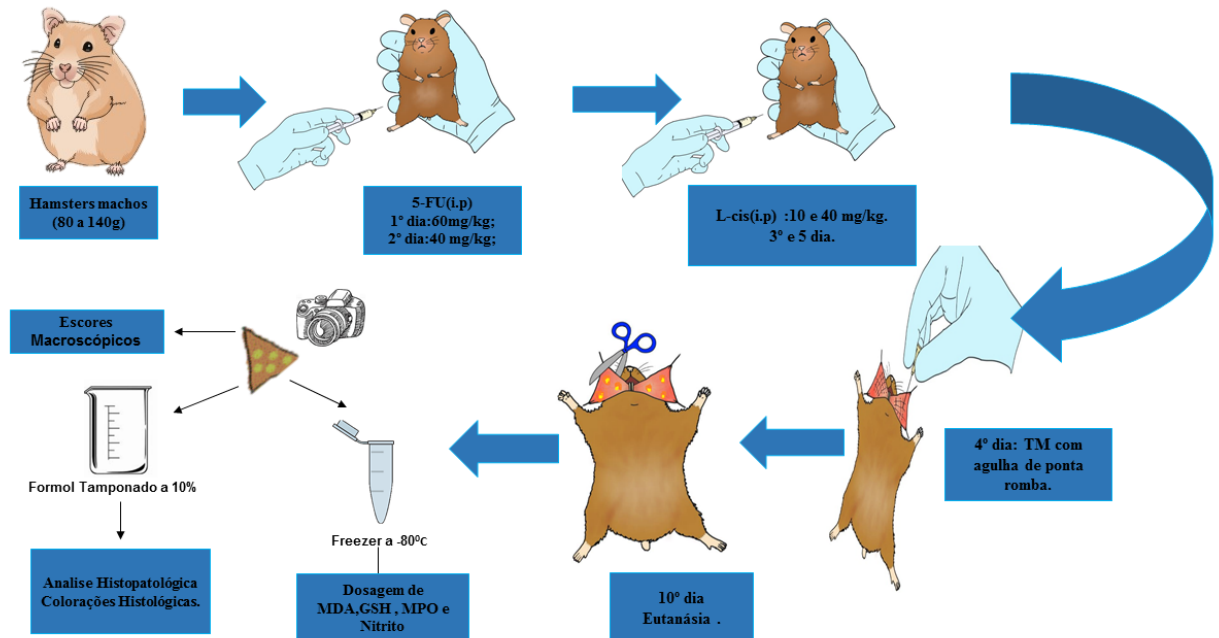
A dose inicial da L-CISTEINA utilizada neste estudo foi estabelecida com base na pesquisa Magierowski e colaboradores (2017) para o modelo de lesão de lesão gastrica.

O protocolo experimental de indução da mucosite e tratamento com o L-cisteína encontra-se ilustrado na figura 7.

4.3.2 Indução da Mucosite Oral por 5-Fluoracil (5-FU)

Foi utilizado o modelo desenvolvido por Sones et al.,1990), e reproduzido com modificações no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC, conforme descrito anteriormente (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005)., onde o grupo TM ,5-FU ,Lcis10 e Lcis40 receberam as doses de 60 e 40 mg/kg de 5-FU no 1º e 2º dia e o grupo Controle recebeu solução salina a 0,9% por via intraperitoneal (i.p),respectivamente. No 4ºdia foram feitas escoriações na mucosa jugal direita dos animais, previamente anestesiados com ketamina (200 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip), com auxílio de uma agulha com ponta romba como fator potencializador para mucosite. As escoriações foram padronizadas sendo distribuídas em número de 4 no sentido horizontal e cruzadas por mais 4 nas faces das mucosas.

Figura 7. Desenho esquemático do modelo de mucosite oral por 5-FU em hamsters.



Fonte: Adaptado de Sonis et al., (1990).

4.3.3 Tratamentos com L-cisteína

Nos grupos L-cisteína 10 e 40 foram administrados L-Cisteína (10 e 40 mg / kg, ip respectivamente) e no grupo normal (solução salina a 0,9%) via intraperitoneal, no 3º e 5º dia do experimento. No 10º dia do protocolo experimental, foi observado a mucosa jugal e classificadas com base no grau da lesão. No 10º dia, após a aplicação da anestesia contendo Ketamina (200 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip) e verificando o seu efeito, os animais foram eutanasiados com um sobredosagem de Pentobarbital sódico (150 mg/kg).

4.4. Parâmetros Avaliados

4.4.1 Análise da variação da Evolução Ponderal

Todos os grupos de animais tiveram suas massas corporais medida diariamente durante os 10 dias do experimento. Os valores encontrados serão expressos com a variação de massa corpórea (g) em relação a massa inicial (Vide figura 6.item 2).

4.4.2 Avaliação da taxa de sobrevida

Até o 10º dia do protocolo experimental registrou-se a mortalidade dos animais para avaliar a taxa de sobrevida dos hamsters submetidos ao modelo experimental. Os dados foram expressos como percentual (%) de sobreviventes.

4.4.3 Análises macroscópica da mucosa jugal

No 10º dia, os hamsters foram eutanasiados, e suas mucosas jugais direitas foram fotografadas e observadas. Para análise macroscópica foram considerados os aspectos como presença, intensidade e extensão de eritema, vasodilatação, erosão, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados por Sonis et al. (2004).

Tabela 1. Sistema de Escores Macroscópicos de Sonis et al., (2004).

Escores	Características
0	Mucosa Completamente saudável; Sem erosão ou vasodilatação;
1	Presença de eritema; Sem erosão ou vasodilatação;
2	Eritema severo; Vasodilatação e erosão superficial;
3	Formação de Úlceras em uma ou mais faces mas, não afetando mais de 25% da área da superfície da mucosa;
4	Formação acumulativa de úlceras de cerca de 50% da área da superfície da mucosa;
5	Completa ulceração da mucosa, sendo impossível a sua exposição;

Legenda: Adaptado de Sonis et al., (2004).

4.4.4 Análises histopatológica das mucosas jugais

O estudo histopatológico das mucosas jugais foi realizado em cortes seriados de 5µm de espessura. No 10º dia do protocolo experimental, após a observação das mucosas e realização das fotos, as mesmas foram removidas e fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24h. Decorridas 24 horas, os segmentos das mucosas jugais foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Na etapa seguinte, os segmentos das mucosas jugais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo para obter cortes histológicos de 5 µm de espessura, as lâminas contendo os cortes dos segmentos de mucosa jugal foram adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Para análise microscópica foram avaliados presença e intensidade do infiltrado inflamatório celular, reepitelização, vacuolização, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados de 0 a 3 (LIMA et al., 2005), como visto na tabela 2.

Tabela 2. Sistema de Escores Microscópicos de Lima et al., (2005).

Escores	Características
0	Epitélio e conjuntivo sem vasodilatação; Infiltrado inflamatório ausente ou discreto, ausência de hemorragias e edema;
1	Ingurgitamento vascular discreto, áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, às custas de leucócitos monocelulares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras ou de abscessos.
2	Ingurgitamento vascular moderado, degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas de hemorragia, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
3	Ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuado, predominando polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

Legenda: Adaptado de Lima et al., (2005).

4.4.5 Análise Morfométrica das mucosas jugais

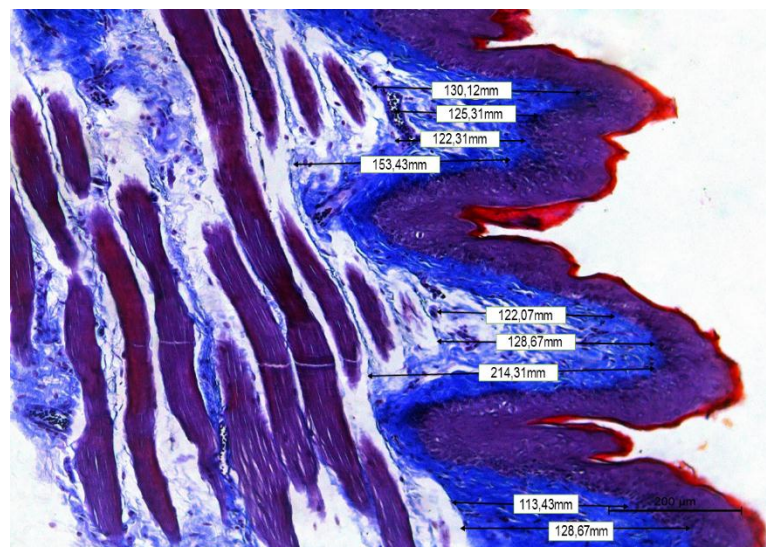
4.4.5.1 Avaliação da Colagênese

Foi realizado a análise da espessura da derme com quantificação do percentual de fibras de colágeno e densidade de colágeno visando, avaliar o efeito reparatório da mucosa oral após a administração da L-cisteína exógena.

4.4.5.1.1 Espessura da derme

A espessura da derme é uma forma segura de estimar a produção de colágeno durante a fase de reparação do processo inflamatório (Parapuram et al.,2011) .Desta forma foram avaliadas Fotomicrografia no aumento de 200x da região do subeptelio e tecido conjuntivo da bolsa da mucosa jugal dos hamsters ,capturados pelo microscópio Leica DMD1000 com câmera Leica DFC 295(Leica,Wetzlar,Germany).A espessura da derme foi mensurada através do programa LAS-(Leica Application Suite Leica,Wetzlar,Germany).Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 10 mensurações derme no mínimo 5 laminas por grupo.

Figura 8.Fotomicrografia representativa da medida na derme quanto as fibras de colageno da mucosa jugal dos hamsters.



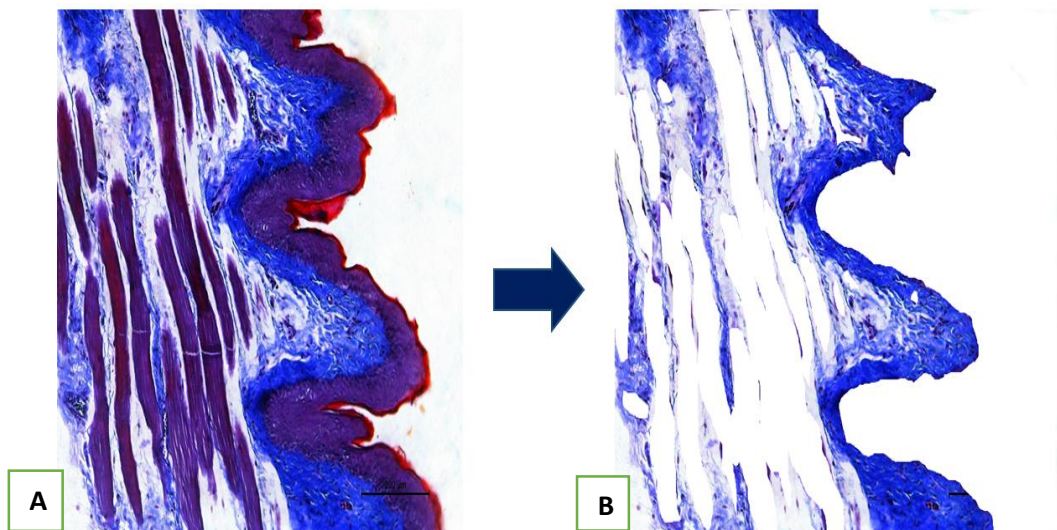
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Coloração Tricômio de Massom, evidenciando o colágeno pela cor azu claral.200x.

4.4.5.1.2 Quantificação do percentual de colágeno

Para a avaliação da densidade de colágeno na derme do epitélio jugal foi usado o protocolo adaptado de Andrade et al. (2011), onde foram feitas fotomicrografias no aumento de 100x com auxílio do microscópio Leica DM2000 com câmera Leica DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany). Após isto, as fotomicrografias foram editadas no programa photoshop, versão 12.1 (Adobe Systems; Mountain View, CA) foi usada a opção “magnetic lasso tool” para selecionar as demais camadas (estruturas anexas da mucosa) preenchendo essa seleção por cor branca utilizando a ferramenta “brush tool”, mantendo somente a camada de colágeno na derme do epitélio jugal em seu formato original (figura.9). Com a imagem isolada da derme foi quantificada a distribuição da cor azul, que se refere a deposição de colágeno, por meio do programa ImageJ 1.46r (National Institute Health, Bethesda, Maryland, USA) com o plugin “colour deconvolution”, que decompõe a imagem nas cores do Tricômio de Masson, neste caso somente a azul formada foi selecionada, as demais foram descartadas. Em seguida foi utilizada a ferramenta “Threshold”, que marca as áreas em azul. O programa quantificou o percentual do número de pixels azuis selecionados da fotomicrografias. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) da porcentagem dos pixels dessas fotos de no mínimo 5 lâminas por grupo.

Figura 9. Fotomicrografia representativa da medida na camada de colágeno na derme da mucosa jugal dos hamsters (para quantificação do percentual).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Imagem original (A); imagem após a edição pelo programa Photoshop (B). Coloração por Tricômio de Masson, evidenciando o colágeno pela cor azul. 200x.

4. 5 Testes de Estresse Oxidativo

4.5.1 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

O Malondialdeído (MDA) constitui um indicador de peroxidação lipídica, e sua dosagem permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico- TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo (UCHIYAMA; MIHARA, 1977). Inicialmente foi preparado um homogenato a 10% do tecido macerado em cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 µL foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375µL de ácido fosfórico (1%) e 125µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Em seguida, as amostras foram imersas em banho maria por 45 min a 100°C. Decorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 500 µL de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL da fase superior foram inseridas em placa de 96 poços e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535nm.

4.5.2 Dosagem dos níveis de GSH

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

A concentração de GSH no segmento da mucosa jugal foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH), uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa jugal dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA 0,02M para cada 100mg de tecido. Aliquotas de 100µL do homogeneizado foram misturadas a 80µL de água destilada e a 20µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 100µL do sobrenadante foi adicionado a 200µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma Aldrich, EUA) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/mg de tecido a partir da curva padrão.

4.5.3 Dosagem dos níveis de MPO

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal.

A MPO, ao reagir com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), forma radicais livres e substâncias oxidantes que causam processo inflamatório e lesão tecidual (ÁVILA, 2013; BASTOS, 2015; REINALDO, 2015; QUARESMA, 2016). A avaliação da atividade da MPO procedeu-se da seguinte maneira, 50-100 mg de tecido do segmento jugal foram homogeneizados em 1ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a cada 50mg de tecido, em seguida, centrifugado a 4.000 rpm durante 7 minutos a 4°C. A atividade de MPO no sedimento ressuspenso foi analisada através da medição da alteração na absorvância a 450 nm utilizando dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram registrados como unidades de MPO por mg de tecido. A atividade da MPO por mg de tecido foi determinada através da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982).

4.5.4 Dosagem dos níveis de Nitrito/Nitrato

Para determinar os teores de nitrito/nitrato nos grupos experimentais foi utilizado 7 mg de $NaNO_2$ que foram dissolvidos em 10 mL de água bidestilada. Foram feitas diluições em série, ficando 1mM, 100 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, 0,312 mM. Em seguida foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações (GREEN et al., 1981).

Em um tubo branco foi adicionado 500 μ L do reagente mais 500 μ L de água destilada, em outro tubo teste será adicionado 500 μ L do reagente mais 500 μ l do homogenato a 10% provenientes da mucosa jugal. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de nitrito/nitrato será determinada a partir de uma curva padrão de nitrito produzido usando $NaNO_2$ e os resultados foram expressos em μ M.

4.6 Teste do efeito anti-inflamatório

4.6.1 Determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio no Tecido da Mucosa Oral.

Nesta segunda investigação, objetivou-se investigar se a L-cisteína aumenta os níveis de Sulfeto de Hidrogênio na mucosite oral induzida por 5-FU hamsters, e avaliação do envolvimento do seu efeito protetor (já determinado na primeira parte da investigação) da L-Cisteína(40mg/kg) na mucosite. Foi realizado o mesmo protocolo de indução à mucosite oral mudando apenas alguns grupos experimentais (n=6).

- Grupo Controle (Normal): animais que receberam apenas injeções de salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- Grupo TM: animais submetidos ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal, no 4º dia e receberam salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- Grupo 5-FU: animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam salina (0,9%, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo L-cis 40mg + 5-FU (Lcis40): animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam L-cisteína (40mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo NaHs+5-FU (NaHs): animais receberam previamente NaHs e após 1 hora foi administrado 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam NaHs (27 µM/Kg, v.o) no 3º e 5º dia do protocolo experimental (Vide figura 6.item 4).

Amostras do tecido jugal foram obtidas por meio do procedimento previamente descrito no item 4.33 e foram utilizadas para determinar os níveis de H₂S de acordo com o método descrito por Gu e colaboradores (2013). Este método permite quantificar indiretamente os níveis de H₂S teciduais por meio da utilização de um tampão antioxidante diluído na amostra de interesse. Esse tampão contém salicilato de sódio, ácido ascórbico e NaOH, que convertem todo o H₂S no íon S₂⁻, que é então mensurado por um microeletrodo de íon sulfeto.

Segundo esse protocolo, inicialmente, as amostras de tecido jugal foram pesadas e homogeneizadas no tampão antioxidante diluído para se obter um homogenato a 10%. No homogenato de cada amostra foi então inserido o microelétrodo de íon sulfeto (*Lazar Research Laboratories*, Los Angeles, CA, EUA) ligado a um medidor de pH modelo 6230M (Jenco

Instruments), seguindo as especificações do fabricante. As soluções padrões para a curva de calibração foram preparadas usando-se o NaHS como doador de sulfeto.

4.6.2 Avaliação do papel cicloxigenase 2 (COX-2) na mucosite oral induzida por 5-FU.

Nesta terceira investigação, objetivou-se observar o efeito da expressão de COX₂ por meio da via da cicloxigenase na mucosite oral induzida por 5-FU hamsters, avaliando se a L-cisteína que tem ação protetora (já determinado na primeira parte da investigação) da L-Cisteína(40mg/kg) na mucosite modulando a expressão de COX₂. Foi realizado o mesmo protocolo de indução à mucosite oral mudando apenas alguns grupos experimentais (n=6).

- Grupo Controle (Normal): animais que receberam apenas injeções de salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- Grupo TM: animais submetidos ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal, no 4º dia e receberam salina (0,9%, i.p.) no 1º, 2º, 3º e 5º dia do protocolo experimental
- Grupo 5-FU: animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam salina (0,9%, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo L-cis 40mg + 5-FU (Lcis40): animais receberam 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam L-cisteína (40mg/kg, i.p.) no 3º e 5º dia do protocolo experimental.
- Grupo Celecoxibe + 5-FU(CLX): animais receberam 1 hora antes CLX (7,5 mg/kg,s.c) e após 5-FU, i.p., no 1º e 2º dias do protocolo experimental, tendo suas mucosas jugais expostas e submetidas ao trauma mecânico no 4º dia. Estes receberam CLX (7,5 mg/kg, s. c.) em todos os dias do protocolo experimental (Vide figura 6.item 6).

4.6.2.1Análise da concentração de mastócitos

Para evidenciar a presença e contagem de mastócitos, os blocos de parafina com amostras de mucosa jugal dos hamsters foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany (2008). A coloração de azul de toluidina foi realizada após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70% em seguidas as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada e

colocadas em estufa a 60° C por uma hora para secar. Após a secagem as lâminas clareadas com uma série de xilol são montadas. Para a contagem de mastócitos presentes nas lâminas, com o auxílio de um microscópio óptico ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), realizou-se a captura das imagens digitais, para contagem posterior de no mínimo 10 campos, com auxílio de software ImageJ. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de 10 campos de cada grupo (Vide figura 6.item 6).

4.6.2.2 Imunohistoquímica para detecção de COX-2

A imunohistoquímica para COX-2 foi realizada de acordo com o método estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Para a realização da imunohistoquímica realizou-se cortes histológicos da mucosa jugal partir dos cassetes obtidos no experimento de modulação da via da COX.

Os cortes (com espessura de 4 μ m) foram colocados em lâminas recobertas com poli-Llisina, apropriadas para a realização da imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados com inserção em estufa (60°C) e três ciclos de imersão em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em álcool com concentrações decrescente (absoluto, 90, 80 e 70%). Os cortes histológicos foram então lavados com água destilada por 10 minutos e realizados a recuperação antigênica em tampão citrato (DAKO, pH 7,0), por 20 minutos em Banho-Maria (95°C). Em seguida, aos cortes foram lavados com solução tamponada de fosfato-salino (PBS) por 5 minutos em temperatura ambiente. Dando continuidade ao protocolo, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 30 minutos. Os cortes foram então, incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário goat anti-COX-2 (SantaCruz®), diluídos em 1:1000, em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem em 3 ciclos com PBS, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho (GBI Labs®), diluído 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado com PBS, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se a revelação por meio da coloração com o cromógeno 3,3' diaminobenzidine-peróxido, o DAB (DAKO®, uma gota de DAB para um μ L de diluente), seguida por contra-coloração com hematoxilina (DAKO®) por 10 minutos. O DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Por fim, realizou-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas com entelan. Controles negativos serão processados simultaneamente como descrito acima,

sendo que o anticorpo primário será substituído por PBS-BSA 5%. Os procedimentos aqui mencionados foram realizados de maneira automatizada com a Autostainer Plus (DAKO®).

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio do microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição (LEICA DMD1000 com câmera DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany)).

Para quantificar a área imunomarcada para COX-2 presentes nas lâminas, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ da área imunomarcada} = \frac{\text{Área Imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

4.7 Análise estatística

Foi realizado teste de normalidade Shapiro Wilk foi observado que os resultados obedeciam a uma distribuição normalmente, os mesmos, foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) one way e pelo teste de Tukey como *post hoc*. Para os dados não-paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (comparações múltiplas). Para todas as análises foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Para análise estatística da curva de sobrevivência e análise da evolução ponderal dos animais, foi utilizado o teste Two way. Todos estes testes foram realizados através do programa GraphPad Prism versão 5.0.

5.RESULTADOS

5.1 Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) na taxa de sobrevivência de Hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

O primeiro passo dado no estudo do efeito protetor da L-Cisteína (L-cis) foi a investigação quanto a sobrevivência dos hamsters submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU. Conforme apresentado na tabela 1, as doses de 10 e 40mg de L-cis aumentaram a sobrevivência dos hamsters para 74 e 90%, respectivamente. Como esperado para este modelo de lesão, no grupo 5-FU, houve uma diminuição na sobrevivência (45%) dos hamsters quando comparado com a estabilidade da sobrevivência no grupo normal (100%) e a constância deste efeito nos animais do grupo trauma mecânico.

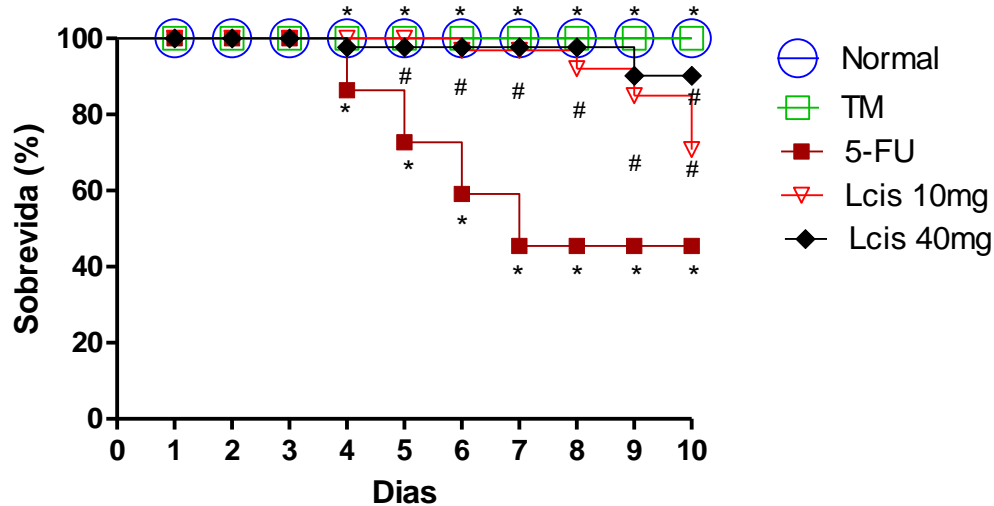
Dentre as 2 doses supracitadas, notou-se também que nas doses de 10 e 40mg da L-cis houve um aumento estatisticamente significativo, na sobrevivência a partir do 4º dia (dia de potencialização da mucosite oral com trauma mecânico), quando comparado com o grupo 5-FU ($p < 0,05$), durante o protocolo experimental (figura 10), sendo mais expressivo este efeito na dose de 40mg de L-cis (tabela 3).

Tabela 3- Taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com L-Cisteína nas doses de 10 e 40 mg.

Grupo Experimental	Taxa de sobrevivência (%)
Normal	100
TM	100
5-FU	45 [#]
L-Cisteína 10mg + 5-FU	74 [*]
L-Cisteína 40mg+ 5-FU	90 [*]

Legenda: P Onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 10. Efeito da L-cisteína nas doses de 10 e 40 mg na taxa de sobrevivência de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



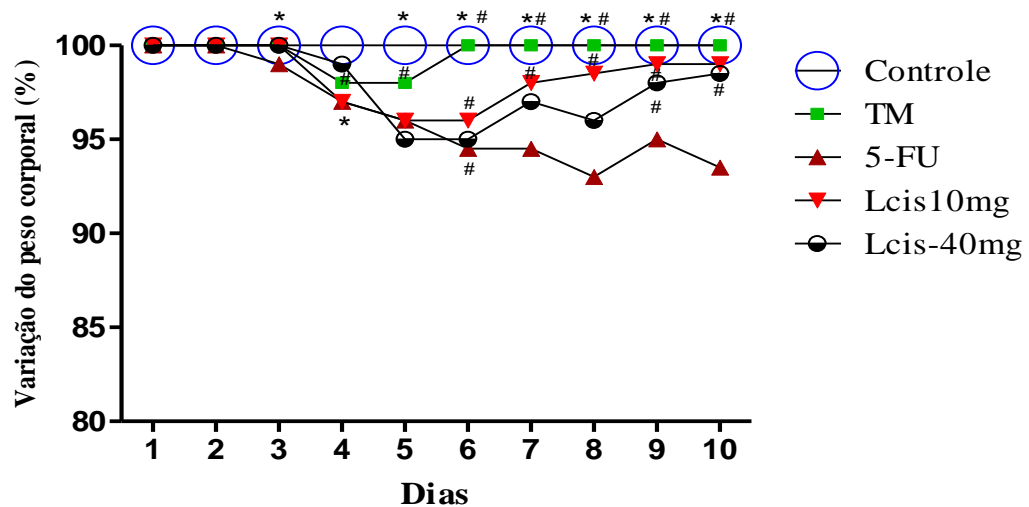
Os pontos representam o percentual (%) de sobreviventes. Para análise estatística foi utilizado o teste two way para curva de sobrevivência. Onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.1.2 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a evolução ponderal na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.

Durante todo o período experimental, todos os animais foram pesados diariamente. Com isso, foi observado a reversão significativa da perda ponderal por meio da administração de L-cis nas doses de 10 mg e 40mg, a partir do 6º dia do protocolo experimental quando comparados com o grupo 5-FU.

Além disso, no grupo que foi submetido apenas ao trauma mecânico, houve também perda de peso significativamente considerável ($p < 0,05$) no 4º e 5º dias de protocolo experimental, quando comparado ao grupo controle (Figura 11). Assim como, foi observado também uma diminuição expressiva da perda de peso no grupo 5-FU a partir do 3º dia de protocolo experimental ($p < 0,05$).

Figura 11. Efeito da L-Cisteína nas doses de 10 e 40 mg sobre a evolução ponderal na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



Os pontos representam a média \pm EPM do percentual de variação do peso inicial. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e * $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

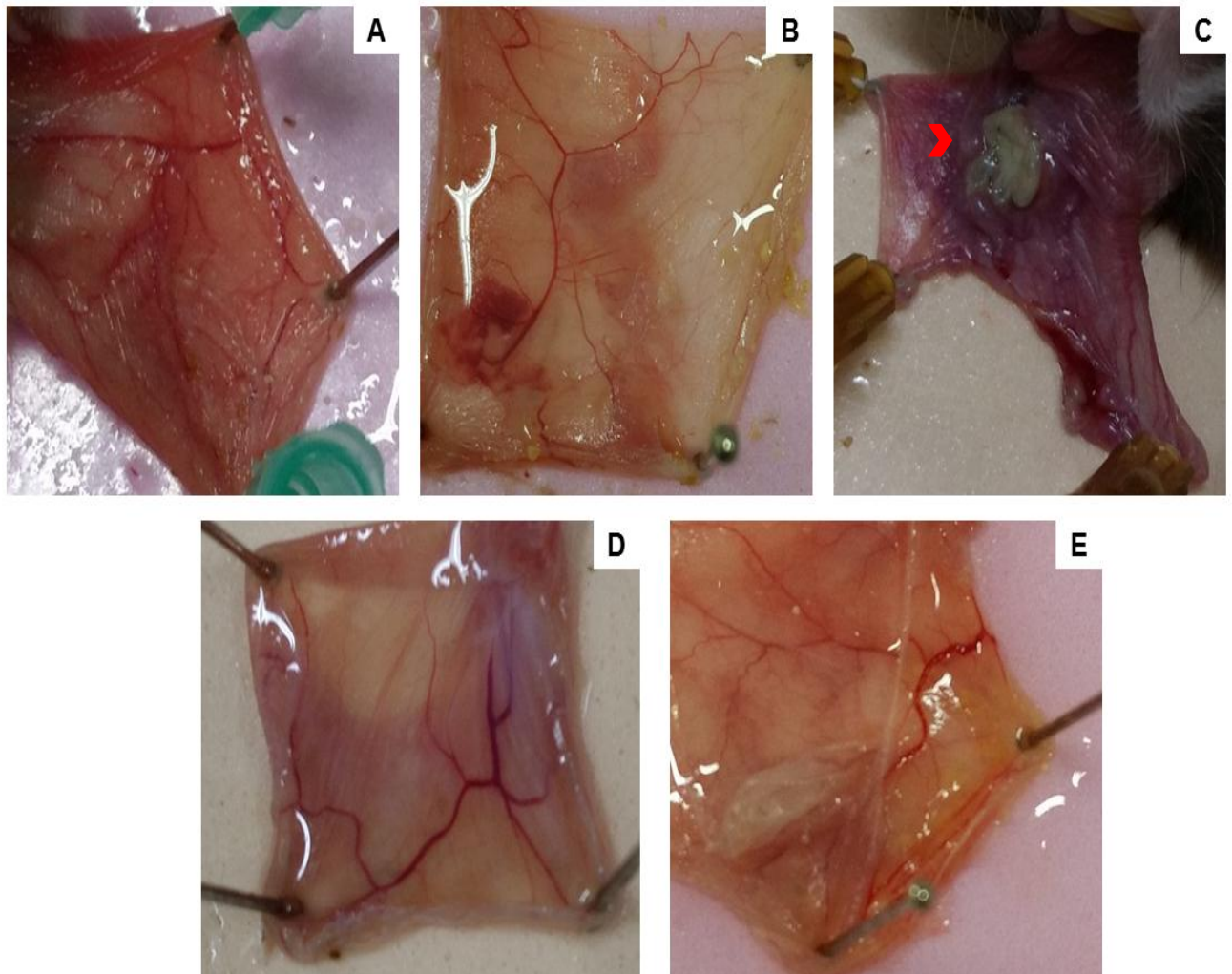
5.1.3 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-Cisteína (L-cis) nas alterações macroscópicas e microscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.

5.1.3.1 Alterações Macroscópicas das doses de 10 e 40 mg/kg da L-Cisteína (L-cis)

Para a análise macroscópica da mucosa jugal, pôde-se observar que as mucosas jugais do grupo normal e dos animais submetidos apenas ao trauma mecânico, encontravam-se preservadas, com escores macroscópicos de 0 para ambos (figura 12A e 12B; tabela 4). Observando-se o grupo 5-FU, verificou-se a formação de úlceras extensas em uma ou mais faces da mucosa jugal, afetando mais de 50% da área de superfície da bolsa. Além disto, foi identificado, também, que o 5-FU levou ao desenvolvimento de abscessos, eritema acentuado, hemorragia e edema, resultando nos escores macroscópicos de 5 (figura 12C; tabela 4).

Entretanto, para o tratamento dos animais submetidos à mucosite oral com a dose de 10mg/Kg e 40 mg/Kg de L-Cisteína (figura 12.D, E, H), notou-se a prevenção significativa ($p < 0,05$) dessas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU, resultando no escore 1 para ambos os grupos avaliados (tabela 4).

Figura 12. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nas alterações macroscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.



No 10º dia do protocolo experimental, os animais foram anestesiados e suas mucosas jugais foram expostas e fotografadas para a análise das alterações macroscópicas. A mucosa jugal de animais normais (painel A) e a mucosa jugal de animais submetidos apenas ao trauma mecânico (painel B) apresentam-se íntegras. O 5-FU induz formação de úlceras, abscessos (seta vermelha), edema, hemorragia e necrose da mucosa jugal (painel C). O tratamento com L-cis nas doses de 10 e 40mg/kg (painel D e E) protege a mucosa jugal da lesão induzida por 5-FU.

5.1.3.2 Alterações Microscópicas das doses de 10e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis).

Quanto a análise histológica, no grupo normal, notou-se a integridade da mucosa jugal dos hamsters, estando revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado sem presença de sinais flogísticos, recebendo o escore 0 (Figura 13A; Tabela 4). Além disso, no grupo trauma mecânico, notou-se a presença de leve infiltrado celular que resultou no escore e variação 1(0±1) (figura 13B; tabela 4).

Já para o grupo 5-FU, observou-se um aumento no infiltrado celular inflamatório, ingurgitamento vascular acentuado, abscessos e úlceras, resultando na perda da integridade do epitélio jugal, e, conseqüentemente, no aumento estatisticamente significativo destes escores microscópicos quando comparados ao grupo normal [2,5(2±3) vs 0 (0 ±0), normal p<0,05)] (Figura 13C; tabela 4).

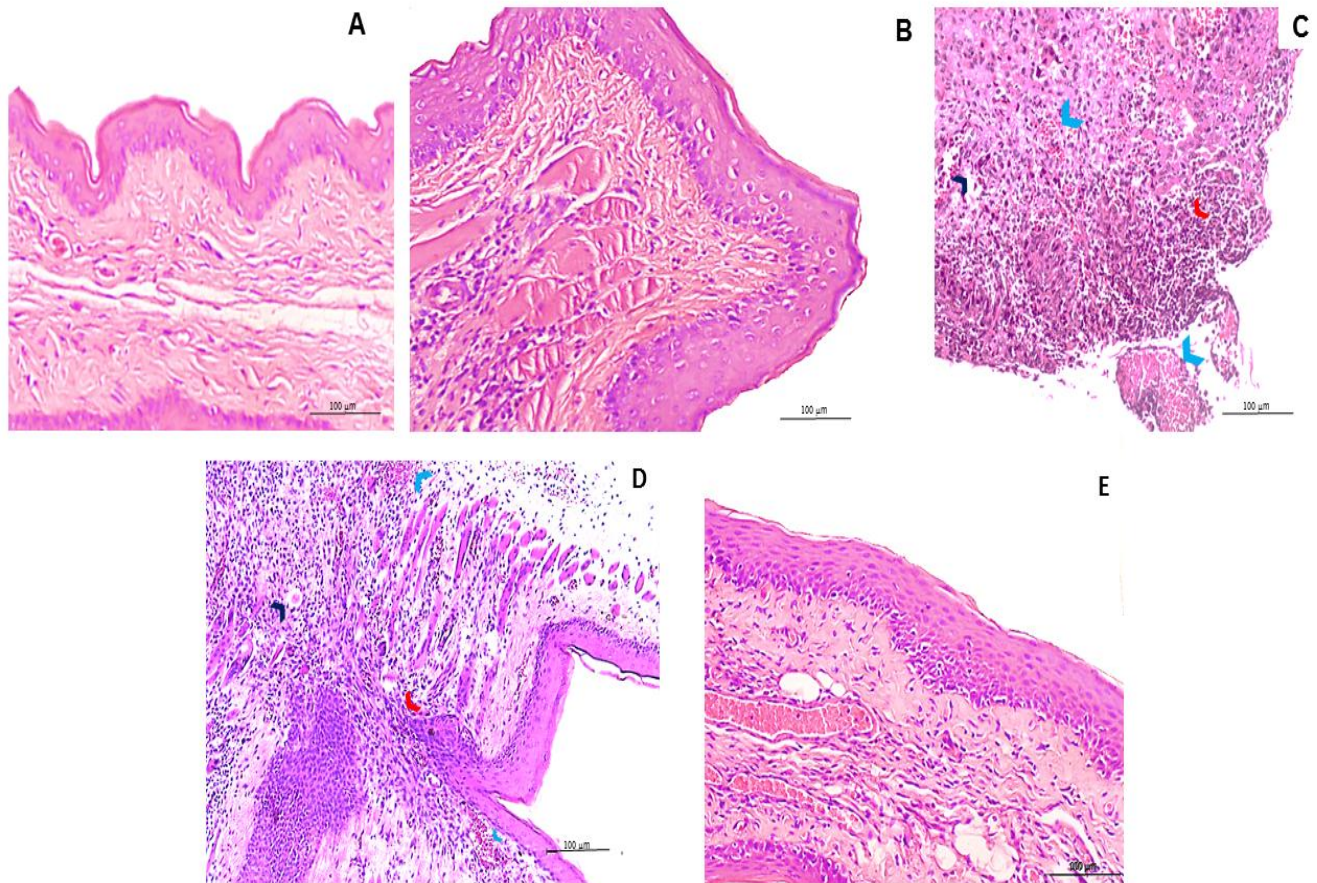
Contudo, observou-se que a dose de 40mg/kg da L-cisteína preveniu a formação de úlceras, abscessos e reduziu o infiltrado de células inflamatórias identificadas no grupo 5-FU [0,5(0±1) vs 2,5((2±3), 5-FU p=0,014)] (Figura 13F), enquanto que a dose de 10 /kg da L-cisteína reduziu também todas as alterações histológicas induzidas no grupo 5-FU, porém, não foi observado uma diferença estatisticamente significativa [0,5(0±3) vs 2,5(2±3), Lcis 40 p<0,05, respectivamente](Figura 13D e E ; tabela 4).

Tabela 4 - Escores macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental, tratados com L-cis.

Grupo Experimental	N	TM	5 FU		
			-	LC10	LC 40
Escores Macroscópicos	0(0-0)	1(0-1)	5(4-5)**	1(1-1)	0,5(0-1)*
Escores Microscópicos	0(0-0)	0,5(0-1)	2,5(2-3)	0,5(0-3)	0,5(0-3) *

Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e * p<0,05 vs grupo 5-FU.

Figura 13. Efeito das doses de L-cisteína (L-cis) nas alterações microscópicas da mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



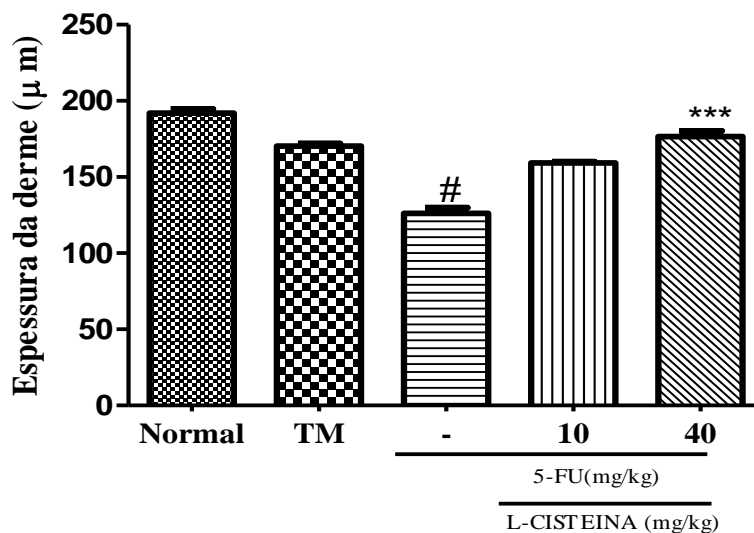
Segmentos da mucosa jugal dos hamsters foram removidos e corados pelo método de H&E para análise histopatológica. A mucosa normal (grupo controle painel (A)) é revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado que se encontra sob a lamina própria de tecido conjuntivo que está em continuidade com o tecido muscular estriado esquelético. No grupo trauma (TM), após realização das escoriações, observou-se a presença de leve infiltrado de células inflamatórias (grupo TM painel (B)). O 5-FU induz formação de úlceras, abscessos (seta azul), infiltrado acentuado de células inflamatórias (seta vermelha) e ingurgitamento vascular (seta azul clara). Nas doses de L-cis 10mg (painel D) observaram-se estas características não prevenindo tais alterações microscópicas. No entanto, na dose de L-cis 40 mg (painel E) diminuiu essas lesões provocadas pelo 5-FU (painel C) na mucosa jugal avaliada. Todos os painéis foram obtidos na escala de 100µ.

5.1.4. Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.

Com base nos aspectos histológicos, observou-se que a derme das mucosas jugais nos animais no grupo normal encontraram-se preservadas e, no grupo trauma mecânico, foi apresentada uma discreta diminuição na sua espessura, contudo, não foi observado uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo normal [(171,5± 1,715) vs (193,3±2,724), (Normal $p>0,05$)]. No grupo 5-FU foi identificada uma diminuição estatisticamente significativa na espessura da derme [(193,3±2,724) vs (126,6± 3,876), (Normal $p<0,05$)], em comparação com o grupo normal.

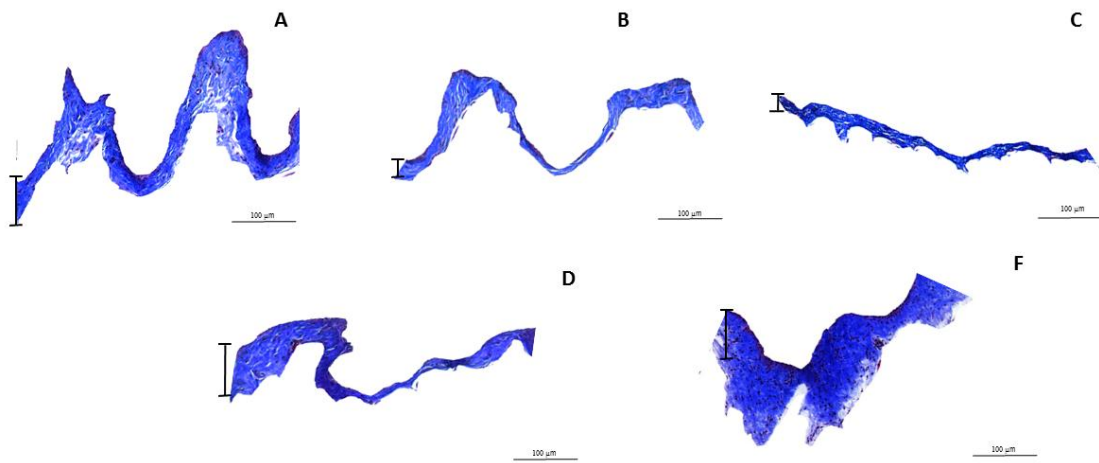
Contudo, quando observou-se o grupo tratado com a dose de 40 mg/kg de L-cis, verificou-se que houve um aumento estatisticamente significativo na espessura da derme, em resposta ao dano causado pelo 5-FU, quando comparado com o grupo 5-FU [(179,3 ± 3,597) vs (126,6± 3,876), (5-FU, $p=0,0022$)]. Na dose de (10 mg/kg) houve este aumento na espessura, entretanto, não foi observado uma diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo 5-FU ($p>0,05$).

Figura 14. Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-Cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



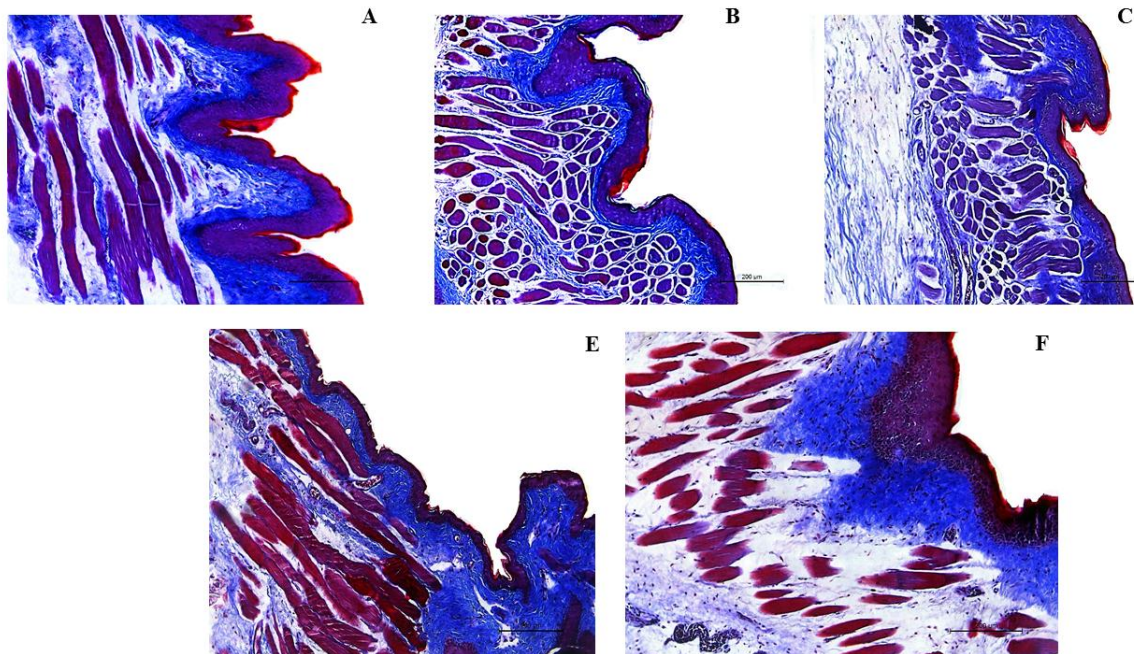
Os dados foram representados $\text{media} \pm \text{EPM}$ e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # $p<0,05$ vs grupo controle e *** $p<0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 15. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-Cisteína (L-cis) sobre a espessura da derme na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



Segmentos da mucosa jugal dos hamsters foram removidos e corados pelo metodo de Tricomio de Massom, para analise da espessura da derme por meio do software LAS (Leica Application Suite Leica, Wetzlar, Germany). Fotomicrografias representativas dos seguintes grupos : Controle (painel A); Trauma Mecanico [(TM) ,painel B]; 5-FU (painel C); Lcis10mg (painel D); Lcis40mg (painel E). Todos os paineis foram obtidos na escala de 100 μ m.

Figura 16. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a síntese de colágeno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



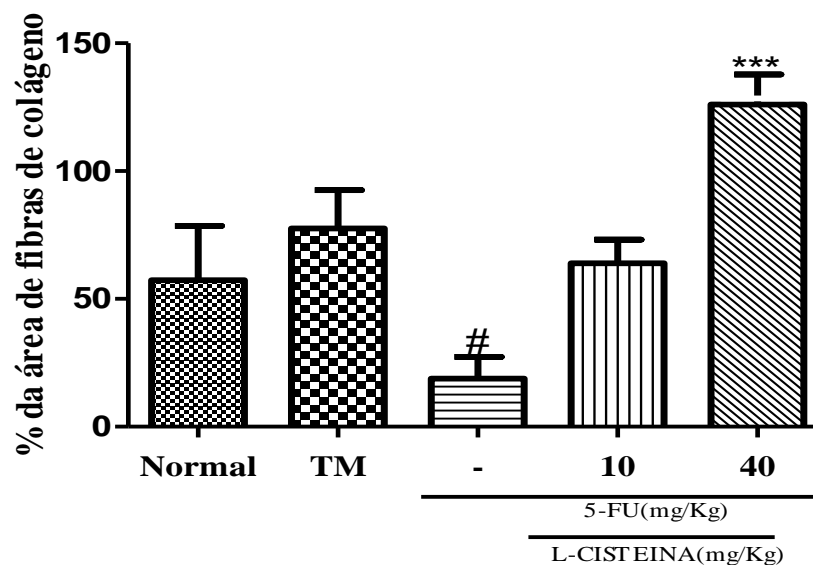
Segmentos da mucosa jugal dos hamsters foram removidos e corados pelo metodo Tricomio de Massom para analise da quantificação da espessura de colágeno por meio do software ImageJ. Fotomicrografias representativas dos seguintes grupos : Controle (painel A); Trauma Mecanico [(TM) ,painel B]; 5-FU (painel C); Lcis10mg (painel D); Lcis40mg (painel E). Todos os paineis foram obtidos na escala de 200 μ .

5.1.5. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a porcentagem de colágeno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.

Com base nos aspectos histológicos observados na derme da mucosa jugal nos grupos normal e trauma mecânico, observou-se que havia manutenção da arquitetura tecidual em ambos. Já para o grupo 5-FU, notou-se uma diminuição estatisticamente significativa, no percentual das fibras de colágeno, associada a destruição da arquitetura tecidual encontradas na derme, quando comparado ao grupo normal [(33,50±21,29) vs (9,80±8,50), (Normal $p < 0,05$)].

Entretanto, quando observou-se as doses de 10 e 40mg/kg de L-cis, notou-se o restabelecimento da arquitetura tecidual, com aumento estatisticamente significativo na porcentagem das fibras de colágeno, somente, na dose de 40 mg/kg quando comparado com o grupo 5-FU [(120,6±11,74) vs (9,80±8,50), 5-FU ($p = 0,0159$)] (figura 16 e 17F).

Figura 17. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) sobre a porcentagem colágeno na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



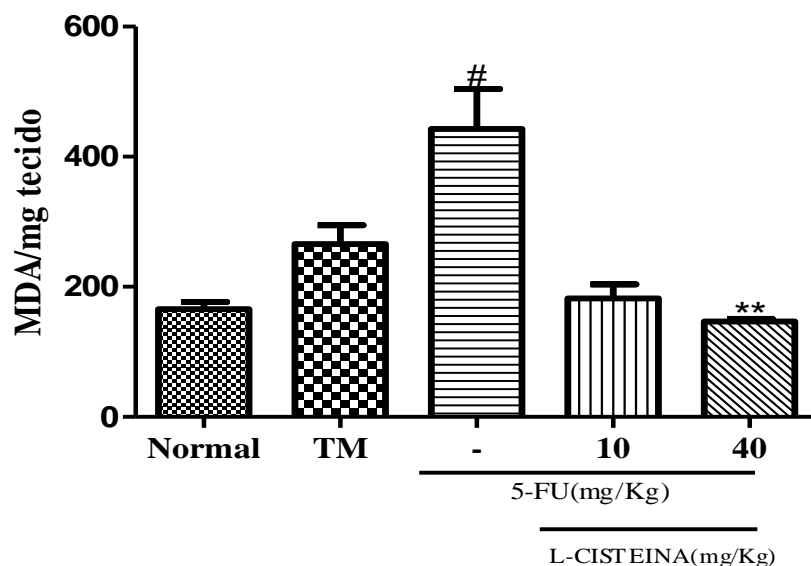
Os dados foram representados $\text{media} \pm \text{EPM}$ e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e *** $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

5.1.6 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MDA na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

Durante o processo inflamatório há o aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) como produto final da peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo. Assim, de acordo com a figura 18, observou-se que no grupo 5-FU houve um aumento estatisticamente significativo nestes níveis de MDA na mucosa jugal quando comparado com o grupo normal [(442,5±61,86) vs (165,8±11,03)], Normal (p=0,0119)].

No entanto, quando observou-se os níveis de MDA nas doses de 10 e 40mg/Kg de L-cis, notou-se uma diminuição estatisticamente significativa, somente, na dose de 40 mg/Kg quando comparado ao grupo 5-FU[(442,5±61,86) vs (146,9±3,814), 5-FU (p=0,0022)]. Para a dose de 10 mg/Kg observou-se, uma diminuição também embora, não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 5-FU (p>0,05).

Figura 18. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MDA na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.



Os valores foram apresentados como média ± EPM dos níveis de MDA expressos em μg/mg de tecido. Os dados foram representados média ± EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e *** p<0,05 vs grupo 5-FU.

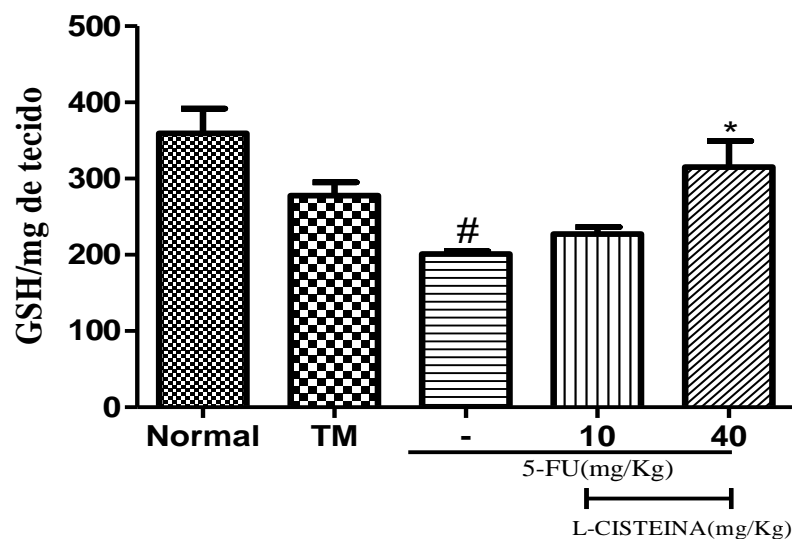
5.1.7 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de GSH na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A enzima glutatona (GSH) é um antioxidante fisiológico, o qual é armazenado nas células e consumido durante processos inflamatórios, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio, tendo o papel de neutralizar a ação de tais agentes.

Sendo assim, de acordo com a figura 19, observou-se que no grupo 5-FU houve uma diminuição estatisticamente significativo nestes níveis de GSH na mucosa jugal quando comparado com o grupo normal [(340,8±32,38) vs (197,0±3,618)], Normal (p=0,0079)].

No entanto, quando observou-se os níveis de GSH nas doses de 10 e 40mg/Kg de L-cis, notou-se um aumento estatisticamente significativo, somente, na dose de 40 mg/Kg quando comparado ao grupo 5-FU[(227,3±9,009) vs (197,0±3,618)], 5-FU (p=0,0022)]. Para a dose de 10 mg/Kg observou-se, um aumento também embora, não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 5-FU (p>0,05).

Figura 19. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de GSH na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5FU.



Os valores foram apresentados como média± EPM dos níveis de GSH expressos em µg/mg de tecido. Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e *** p<0,05 vs grupo 5-FU.

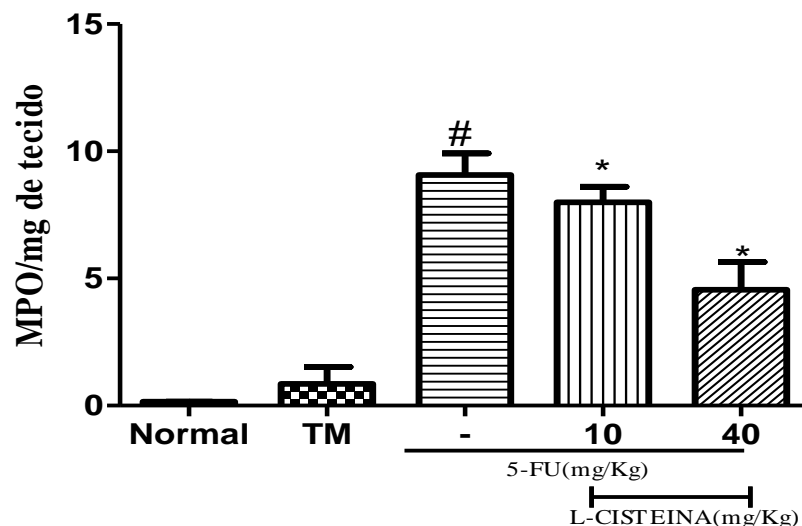
5.1.8 Efeito das doses de 10 e 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles a mucosa oral.

Baseado nisto, como visto na figura 20, pode-se observar que no grupo 5-FU há um aumento expressivo dos níveis de MPO quando comparado com o grupo normal [(9,543±0,8486) vs (0,1500±0,003251)), Normal (p=0,0001)].

No entanto, quando observou-se os níveis de MPO nas doses de 10 e 40mg/Kg de L-cis, notou-se uma diminuição estatisticamente significativo, para as doses de 10 e 40 mg/Kg quando comparado ao grupo 5-FU[(7,859±0,6199); (5,236±1,088), respectivamente, vs (197,0±3,618)), 5-FU (p=0,0022)]. Observando assim, a possível reversão do processo inflamatório, causado pelo 5-FU. Principalmente na dose de 40 mg/Kg, onde esta diminuição é mais expressiva do que na dose de 10mg/Kg, como vista na figura 20.

Figura 20. Efeito das doses de 10 e 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5FU.



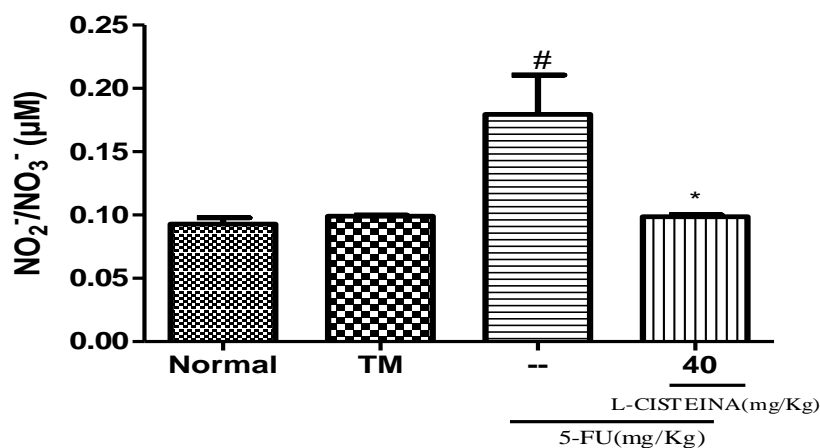
Os valores foram apresentados como média± EPM dos níveis de MPO expressos em µg/mg de tecido. Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e *** p<0,05 vs grupo 5-FU.

5.1.9 Efeito da dose de 40mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de Nitrito/Nitrato na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

A rota metabólica do Oxido Nítrico (NO) é a oxidação gradual para nitrito e nitrato. Estes metabólitos do óxido nítrico são moléculas homeostáticas centrais na biologia do NO. Devido ao vínculo intrínseco entre o nitrito e NO, a detecção e quantificação precisa do nitrito em amostras biológicas tornou-se método confiável para avaliação da atividade da NOS. Tendo em vista, os resultados previamente descritos, para esta análise foi escolhida a dose de 40mg/Kg de L-cisteína para avaliar a atividade da NOS.

Assim, conforme a figura 21, nota-se que há um aumento estatisticamente significativo no grupo 5-FU nos níveis de Nitrito/Nitrato, com o esperado, quando comparado com o grupo Normal [(0,2026±0,03056) vs (0,09683±0,005067)), Normal (p=0,0002)]. No entanto, quando observou-se os níveis de Nitrito/Nitrato na dose de 40mg/Kg de L-cis, notou-se uma diminuição estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo 5-FU[(0,09973 ± 0,001016), vs (0,2026±0,03056)), 5-FU (p=0,0002)]. Observando assim, a possível diminuição da atividade da NOS no processo inflamatório, por meio da administração de 40 mg/Kg de L-cisteína, causado pelo 5-FU.

Figura 21. Efeito da dose de 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) nos níveis teciduais de Nitrito/Nitrato na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5FU.



Os valores foram apresentados como média± EPM dos níveis de Nitrito/Nitrato expressos em µg/mg de tecido. Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e *** p<0,05 vs grupo 5-FU.

5.2 Avaliação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio (H₂S), na dose de 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5FU.

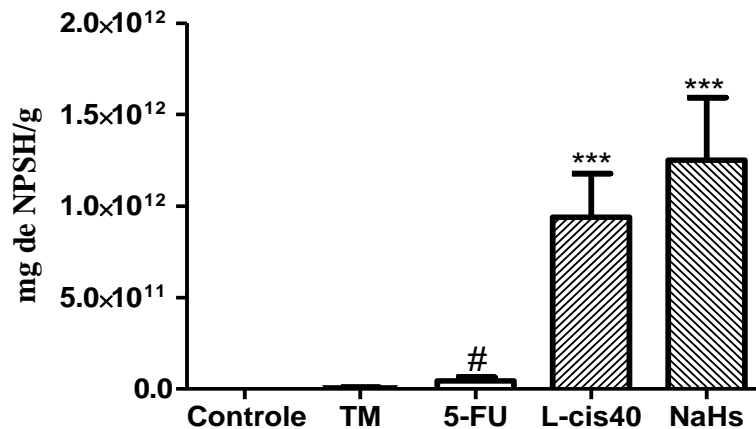
A determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio por meio da detecção de grupos sulfídricos não proteicos na mucosa oral de hamsters, visou avaliar o efeito antioxidante da L-cisteína como provável substrato, aumentando a produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S), em resposta ao dano causado pelo 5-FU, que tem ação antioxidante e anti-inflamatória.

Baseado nisto, conforme a figura 22, nota-se que há um aumento estatisticamente significativo no grupo 5-FU, quanto aos níveis de H₂S, quando comparado ao grupo Normal [(2,990¹²±2,059¹²) vs (0,09683±0,005067)), Normal (p=0,0004)]. Pois, como o esperado, para o grupo 5-FU, há um aumento do estresse oxidativo, resultante do processo inflamatório, provavelmente, em resposta disso, há o aumento na produção de H₂S na mucosa oral de Hamsters.

Além disso, como o esperado também, para grupo NaHs houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de H₂S quando comparado ao grupo 5-FU[(3,888¹² ± 2,047¹²), vs (4,403¹²±2,059¹²)), 5-FU (p=0,0006)]. Pois, sabe-se que o NaHs é um agonista para o H₂S, aumentando os níveis de H₂S no organismo, em resposta ao processo inflamatório, visando ação anti-inflamatória e antioxidante.

Assim, quando observou-se os níveis de H₂S na dose de 40mg/Kg de L-cis, notou-se, um aumento estatisticamente significativo para os níveis de H₂S, quando comparado ao grupo 5-FU [(9,392¹²± 2,391¹²), vs (4,403¹²±2,059¹²)), 5-FU (p=0,0006)]. Podendo atuar, provavelmente como um substrato, aumentando os níveis de H₂S na mucosa oral em resposta a lesão causada pelo 5-FU.

Figura 22. Avaliação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio (H₂S), na dose de 40 mg/kg da L-cisteína (L-cis) na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5FU.



Os valores foram apresentados como média ± EPM dos níveis de NPSH/g em µg/mg de tecido. Os dados foram representados média ± EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p < 0,05 vs grupo controle e *** p < 0,05 vs grupo 5-FU.

5.3 Efeito da dose de L-cisteína (L-cis40mg) e da Celecoxibe (Clx) 7,5 mg/kg nas alterações macroscópicas e microscópicas induzidas por 5-FU na mucosa oral de hamsters.

Pode-se notar que no grupo normal a mucosa jugal encontrou-se integra configurando um escore e variações macro e micro 0 (vide tabela 5). Já no grupo 5-FU notou-se um aumento no infiltrado celular inflamatório, ingurgitamento vascular acentuado, abscessos e úlceras no epitélio jugal, observando o aumento estatisticamente significativo nos escores macro e microscópicos, quando comparado com o grupo normal [5(4±5); 2,5(2±3) vs 0 (0 ± 0), (normal , p < 0,05), respectivamente)] (tabela 5).

Entretanto , quando observou-se a dose de 40 mg/kg de L-cisteína notou-se que esta dose preveniu de forma significativa, os danos causados pelo 5-FU, por meio da diminuição, estatisticamente significativa, nos escores macro e microscópicos , quando comparado com o grupo 5-FU [0,5(0±1); 5(4±5) vs 2(2±3); 0,5(0±3), (5-FU, p = 0,014, respectivamente)] (tabela 5). Assim como, quando houve a associação entre a dose de 40 mg/kg com a Celecoxibe, observou-se também uma diminuição estatisticamente significativa , quando comparado com o grupo 5-FU [1(0±1); 0,5(0±1) vs 5(4±5); 2,5(2±3)], (5-FU, p = 0,0109, respectivamente)].

Tabela 5- Escores macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental, tratados com L-Cis e CLX.

Grupos Experimentais	Controle	TM	5 FU		
			--	LC 40	CLX
Escores Macroscópicos	0(0-0)	1(0-1)	5(4-5) [#]	0,5(0-1)*	1(1-1)
Escores Microscópicos	0(0-0)	0,5(0-1)	2,5(2-3) [#]	0,5(0-3)*	0,5(0-1)

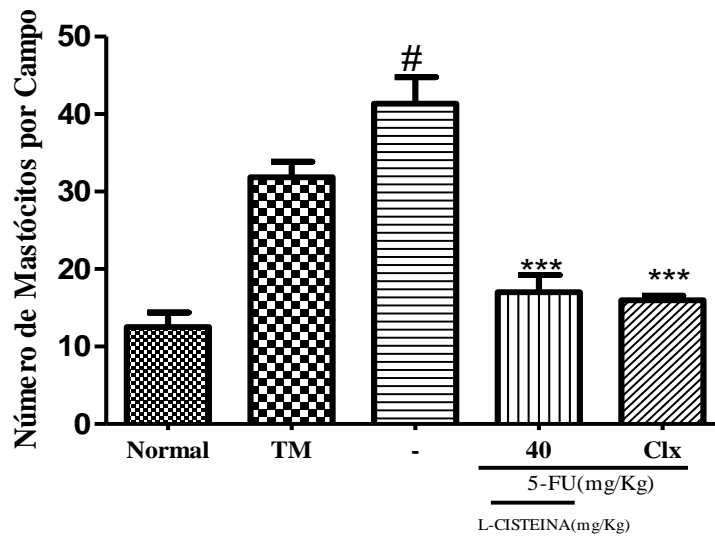
Os dados representam a mediana e as variações máximas e mínimas dos escores macroscópicos em seis animais por grupo (n=6). Os dados foram representados mediana±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e * p<0,05 vs grupo 5-FU.

5.3.1 Efeitos da L-cisteína (L-cis) na dose de 40mg/kg e da Celecoxibe (Clx) 7,5 mg/kg no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.

Os mastócitos são células encontradas, no infiltrado celular, na exarcebação do processo inflamatório. Baseado nisto, pode-se observar que no grupo 5-FU houve um aumento estatisticamente significativo, no número de mastócitos encontrados na mucosa oral, quando comparado com o grupo normal [(41,70± 3,410) vs (13,20±1,909), Normal, (p= 0,0022)].

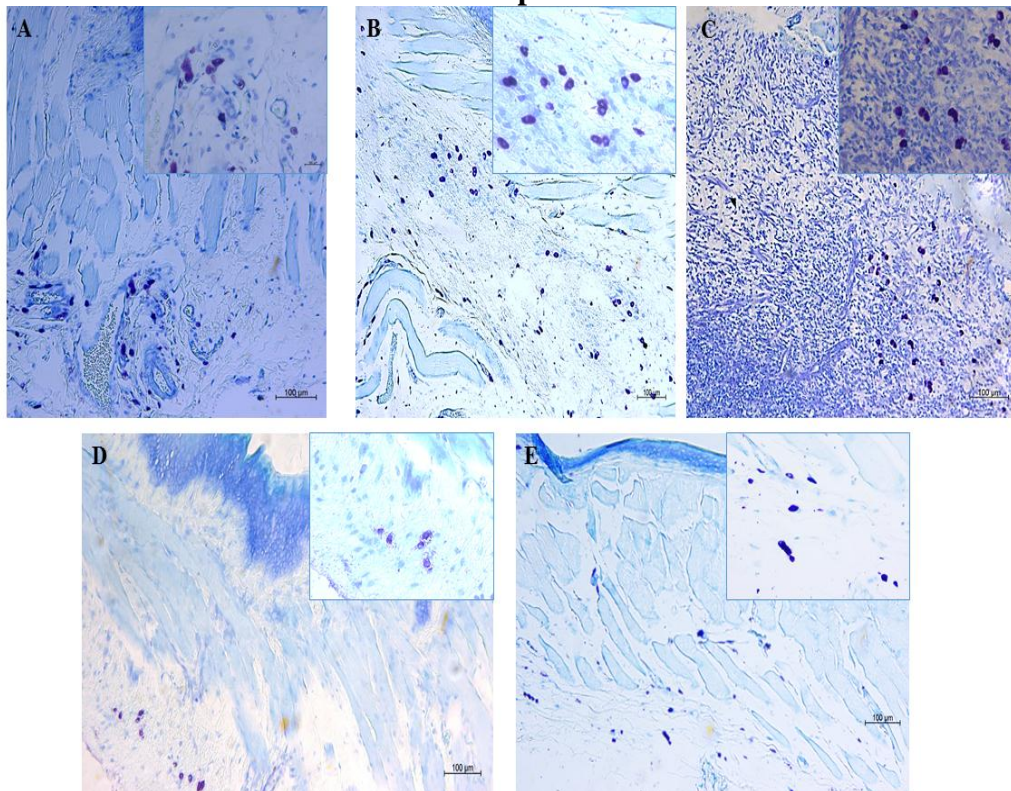
Entretanto, quando administrou-se a dose de 40mg/kg de L-Cisteína, pode-se notar uma diminuição estatisticamente significativa, no número de mastócitos encontrados na mucosa oral, quando comparado com o grupo 5-FU [(41,70± 3,410) vs (15,30±2,213), FU, (p= 0,0022)] (Figura 23 e 24).

Figura 23. Efeito da L-cis (40mg/kg) associada a Clx(7,5mg/kg) no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



Os dados foram representados $\text{media} \pm \text{EPM}$ e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # $p < 0,05$ vs grupo controle e *** $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

Figura 24. Efeito da L-cis (40mg/kg) associada a Clx(7,5mg/kg) no número de mastócitos encontrados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.



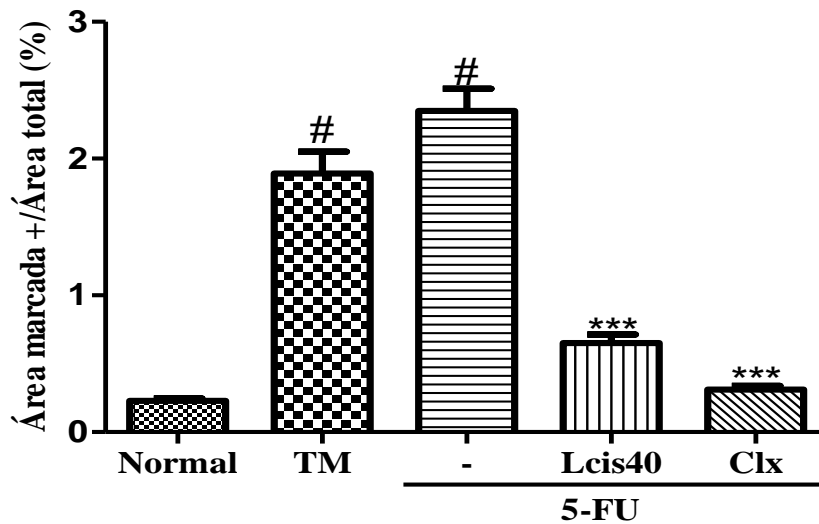
Segmentos da mucosa jugal dos hamsters foram removidos e corados pelo método Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos encontrados no tecido epitelial conjuntivo (seta vermelha). Fotomicrografias representativas dos seguintes grupos: Controle (painel A); Trauma Mecânico [(TM) ,painel B]; 5-FU (painel C); Lcis40mg (painel D); CLX(painel E). Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μ .

5.3.1.1 Avaliação do envolvimento da Cicloxigenase 2 (COX₂) no efeito protetor da L-cisteína no modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters.

Quando realizou-se a análise quantitativa da imunomarcção de COX₂, pôde-se notar, de acordo com os dados apresentados na figura 24, que para o grupo 5-FU houve um aumento estatisticamente significativo na expressão de COX₂ quando comparado com grupo normal [(2,15±0,163) vs (0,20±0,017), Normal(p=0,0001)], sendo observado também o aumento estatisticamente significativo na expressão de COX₂ no grupo Trauma Mecânico quando comparado com grupo normal [(1,7±0,160) Vs (0,20±0,017)), Normal (p<0,05)].

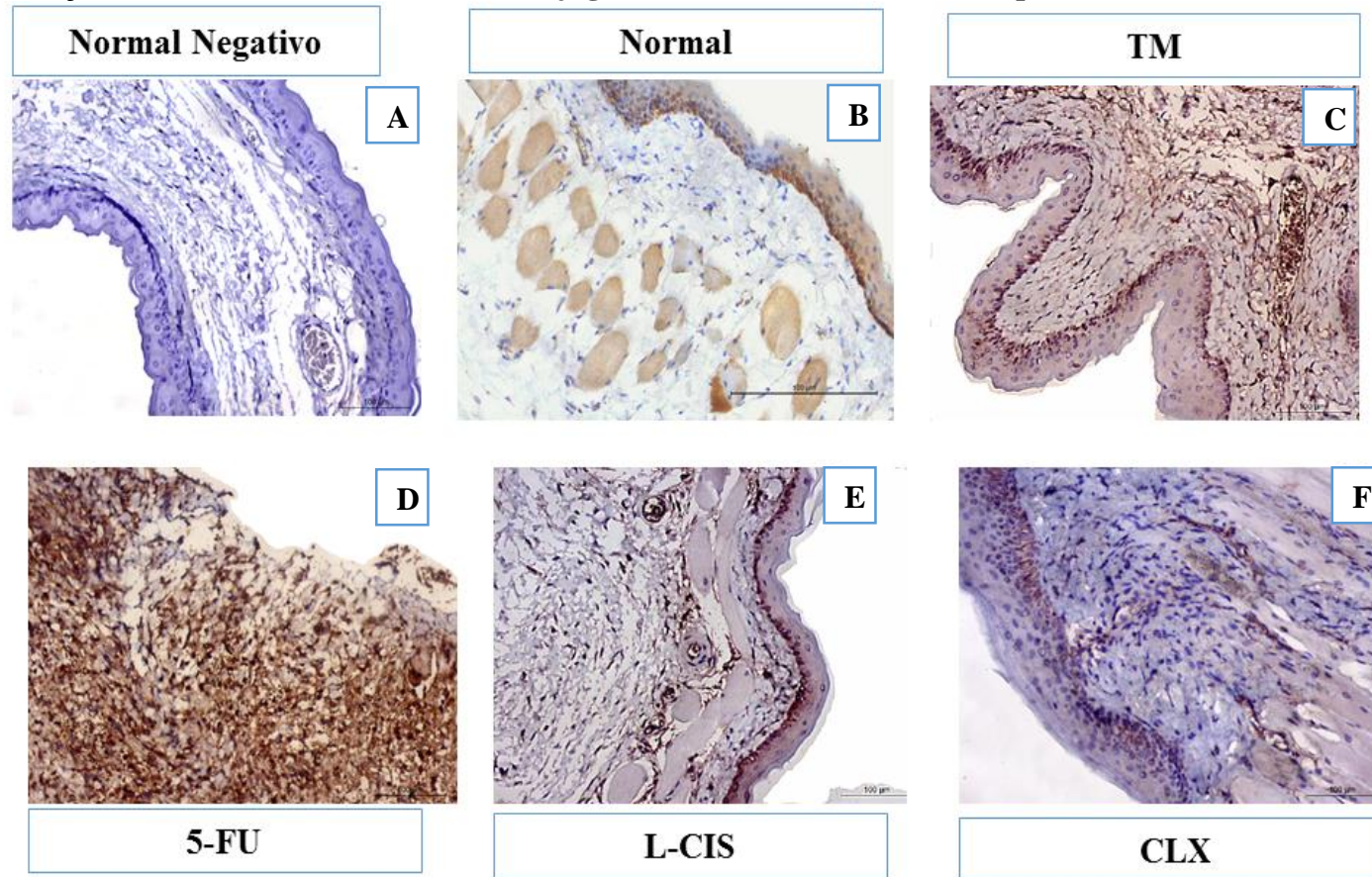
Em contrapartida, observou-se que nas doses de 40mg/Kg de L-Cis e de CLX houve uma redução estatisticamente significativa na expressão de COX₂ quando comparadas com o grupo 5-FU [(0,30±0,026); (0,50±0,064) vs (2,15±0,163),5-FU(p=0,0001), respectivamente], (figura 25 e 26).

Figura 25. Aumento da área de expressão para COX₂ no tecido da mucosa jugal de hamisteres a mucosite oral por 5-FU.



Os dados foram representados através da média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo controle e *** p<0,05 vs grupo 5-FU.

Figura 26. Imunomarcção de COX₂ em amostras da mucosa jugal de hamsteres a mucosite oral por 5-FU.



Segmentos da mucosa jugal foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para Ciclooxigenase 2 (Cox₂), induzida e expressada predominantemente durante o processo inflamatório (na biossíntese de prostaglandinas). Nota-se o aumento da imunomarcção para Cox₂ nos segmentos da mucosa jugal submetidos a mucosite oral induzida por 5-FU (painel D) quando comparado ao grupo controle (painel B). Enquanto que no grupo l-cis40mg (painel E) pode-se observar uma diminuição na imunomarcção quando comparado com o grupo 5-FU (painel C). Nos demais grupos nota-se uma diminuição mais discreta na imunomarcção para Cox₂ (painéis F). Todos os painéis foram obtidos na escala de 200µ.

6.DISCUSSÃO

A cada ano, em todo o mundo, mais de 10 milhões de pessoas submetem-se à quimioterapia isolada ou combinada com radioterapia, para tratamento de câncer. Infelizmente, este tipo de terapia é frequentemente complicado pelo dano tóxico provocado às mucosas, como do trato gastrointestinal, também conhecido como mucosite (VAN DER VELDEN et al.,2014; QUEIROZ et al 2018).

O sucesso exponencial desta terapêutica antineoplásica pode ser atribuído ao uso de terapias imunossupressoras, como a quimioterapia, e à combinação de agentes quimioterápicos com intensificação das doses utilizadas. No entanto, a toxicidade provocada por esses medicamentos ainda representa um problema clínico significativo, pois interfere no equilíbrio psicossomático e na qualidade de vida dos pacientes (Do DODD et al., 2001; RIBEIRO,2015). Essa toxicidade é uma resposta dos tecidos às injúrias, que envolve uma complexa gama de ativação de enzimas, liberação de mediadores, extravasamento de fluidos, migração de células, destruição e reparo tecidual na mucosite (VIEIRA ,2006; MOURA ,2012).

Portanto na tentativa de diminuir este efeito citotóxico, esta pesquisa visou estudar prováveis efeitos de um aminoácido semiessencial denominado L-cisteína , que pode atuar aumentando os níveis de sulfeto de hidrogênio (H₂S), na mucosite oral induzida pelo antineoplásico 5-FU. Com base em estudos prévios que demonstram que a L-cisteína, atua como um substrato para síntese de H₂S, está envolvido em inúmeras funções fisiológicas, como a resposta imune, antioxidante , cicatricial ,inflamatória, percepção e mediação da dor, sendo produzido em muitos tecidos de mamíferos (FIORUCCI et al., 2006; JERÔNIMO et al., 2016; KANIKA; KHAN; JENA, 2015).

Assim para verificar o efeito protetor da L-cisteína no modelo de mucosite oral foram utilizados hamsters pela facilidade de observar as suas mucosas jugais e pela sua tolerância aos quimioterápicos que induzem a mucosite (SONIS et al., 1990). Este modelo de mucosite oral por 5-FU em hamsteres foi idealizado por Sonis et al., (1990), posteriormente foi modificado por Lima et al., (2005) e Leitão et al., (2007). Onde o mesmo, consiste na aplicação de duas doses de 5-FU (60 e 40 mg/kg), aplicadas no 1º e 2º dia do protocolo experimental seguido pela realização do trauma mecânico, este potencializa o estabelecimento da lesão oral, além de se assemelhar com as alterações na fonação, mastigação, deglutição, perda ponderal observados dentro da clínica.

Por meio de pesquisas antecedentes de Lima et al., (2005), Leitão et al., (2007), Leitão et al., (2008), Medeiros et al., (2010), Ribeiro et al., (2015) e Silva et al., (2017), verificou-se que o auge do processo inflamatório neste modelo é no 10º dia de experimento, por meio dos achados histológicos na coloração por HE. Por isso, o 10º dia foi o escolhido, para esta pesquisa, para coletar as amostras das mucosas. Os animais sujeitos ao modelo de mucosite por 5-FU, na presente pesquisa, apresentaram processo inflamatório acentuado no 10º dia, sobretudo no grupo 5-FU, com hiperemia, áreas hemorrágicas úlceras e abscessos. Estes achados são evidentes no pico do processo inflamatório de forma semelhante aos estudos anteriores denotando o sucesso da reprodutibilidade deste modelo experimental nesta pesquisa (TANIDEH, et al.2013 SILVA et al.,2017; SKEFF *et al.*, 2014; YOSHINO *et al.*, 2013).

Assim esta pesquisa teve como ponto de partida a escolha da(s) dose(s) de L-Cisteína para investigar o efeito protetor desta substância no modelo aqui proposto, fundamentadas na pesquisa realizada por Magierowski e colaboradores (2017). Para isto, verificou-se que nas doses de 10 e 40 mg/kg da L-Cisteína havia revertido a taxa de sobrevida diminuída no grupo 5-FU. Quanto à perda ponderal constatou-se que as dose de 10 e 40 mg/kg de L-Cisteína conseguiram reverter a perda de peso provocado pelo quimioterápico 5-FU. Esses achados podem ser decorrentes da absorção da L-Cisteína que tem efeito gastroprotetor, por meio da produção de H₂S, secretando muco, bicarbonato e mantendo fluxo sanguíneo gástrico (MAGIEROSWSKI et al., 2017), que restabelecem a integridade da mucosa gastrointestinal lesionada pelo 5-FU.

A perda de peso é um importante efeito colateral presente em pacientes que estão em esquema quimioterápico (MIRANDA et al., 2013), assim como também em modelos experimentais de lesão provocadas pelo uso de quimioterápicos (TANIDEH et al.,2014; JUSTINO et al.,2014). Tal efeito pode ser consequência da redução significativa na ingestão de alimentos decorrente: da lesão na mucosa oral, da diminuição da absorção dos nutrientes pelo epitélio intestinal devido à inflamação e rompimento dessa barreira epitelial, surgimento de alterações no trânsito intestinal e diarreia (LOTICI et al.,2014) e também na sobrevida e análise ponderal nos modelos de lesão causados por quimioterápicos (TANIDEH et al.,2014; JUSTINO et al.,2014).

Por conseguinte, neste estudo, foi visto de modo inédito que macroscopicamente, as doses de L-cisteína 10mg e 40mg administradas no 3º e 5º dia de experimento protegeu a mucosa jugal, em resposta aos danos causados pelo 5-FU. Entretanto, no aspecto microscópico notou-se aumento do infiltrado celular, ingurgitamento vascular e abscesso na dose de 10mg de

L-cisteína. Sendo assim, a dose de 40mg/Kg de L-Cisteína foi a escolhida para observar o efeito protetor desta substância no modelo estudado.

Seguindo a observação, pode-se inferir que a dose de L-Cisteína 40 mg/Kg no 4º dia de tratamento, após a lesão, ativou fibroblastos, que aumentaram a porcentagem de colágeno total e conseqüentemente a espessura da derme (conforme visto nas figuras 16 e 17), depositado na área lesionada evidenciando sua ação antiinflamatória. Pois, na fase de resolução do processo inflamatório, por meio da ativação de fibroblastos, acontece a deposição de colágeno que é um passo chave nesta fase, para formar uma matriz extracelular transitória, dando estabilidade da lesão, que posteriormente é degradada (MCCARTY; PERCIVAL, 2013; GONZALO et al., 2014; YATES et al., 2012; FRANCO, 2015).

Ainda durante este processo inflamatório, pode-se constatar aumento de células inflamatórias que alteram a homeostase, produzindo radicais livres desencadeando efeitos danosos (ARAÚJO et al., 2015). O aumento desses radicais livres que reagem com fosfolipídios da membrana, aumenta conseqüentemente a geração destes aldeídos tóxicos dentre eles, o 3-hidroxinonenal e MDA que são marcadores de peroxidação lipídica, resultantes da alteração na função da membrana e dano tecidual (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Tal efeito danoso é bem descrito na literatura por meio do 5-FU que eleva a formação de MDA na mucosa oral de hamsters (ARAÚJO et al., 2015; KOOHI-HOSSEINABADI et al., 2015; MEDEIROS et al., 2011).

Da mesma forma que foi mostrado na presente pesquisa, além disso, pela primeira vez observou-se o efeito da L-Cisteína na redução desse marcador de peroxidação lipídica neste modelo de lesão. Sendo observado este efeito apenas para dose de 40 mg de L-cisteína que demonstrou ser a principal dose que medeia esse efeito na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (figura 18).

Na fase inicial de instauração da mucosite oral ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SONIS et al., 2004; ARIFA et al., 2014; AHMED; SELIM; EL-SAYED, 2017). Elas desempenham papéis importantes em várias doenças, incluindo câncer, hipertensão e diabetes (SOUZA et al., 2017; AVELAR et al., 2015). As ERO são compostas por um radical ânion superóxido (O_2^-) e um radical hidroxila (OH) e induzem estresse oxidativo por meio de vários mecanismos, incluindo peroxidação lipídica, apoptose e danos ao DNA (CHAPPLE, 1996). Um dos mecanismos envolvidos no surgimento da mucosite oral por quimioterapia é a geração de ERO, que, por sua vez, ativam várias vias de sinalização (SIOMEK et al., 2006; SONIS et al., 2002).

A geração excessiva de EROs no estágio inicial da mucosite oral induzida por 5-FU ocasiona o consumo de grandes quantidades de antioxidantes da mucosa jugal (YOSHINO *et al.*, 2013). Esses achados estão de acordo com os apresentados no presente estudo, onde se mostrou que 5-FU reduziu os níveis de GSH na mucosa jugal. Estudos anteriores também mostraram achados semelhantes (AHMED; SELIM; EL-SAYED,2017; SKEFF *et al.*, 2014; YOSHINO *et al.*, 2013). A ingestão exógena de antioxidantes tem mostrado contribuir para a eliminação de EROs pelo organismo (YOSHINO *et al.*, 2013). Neste caso, na presente pesquisa, quando administrou-se exogenamente a L-cisteína na dose de 40mg/Kg, observou-se o aumento nos níveis de GSH. Isto, talvez, pode ser resultante da somatização das concentrações de L-Cisteína (Figura 19). Visto que, a mesma, a nível intracelular é importante para homeostase celular produzindo GSH (YIN *et al.*,2016) e diminuindo a produção intracelular de EROS (MANNA e JAIN,2013).

Além disso, observou-se também o recrutamento de neutrófilos por meio da avaliação da concentração de Mieloperoxidase (MPO). A MPO pode agir no endotélio vascular promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento da permeabilidade vascular e aumento da adesão de neutrófilos (FAURSCHOU, BORREGAARD; 2003). Estas características podem ser vistas no modelo de mucosite por 5-FU (ARAÚJO *et al.*,2015; AHMED; SELIM; EL-SAYED,2017).

Dessa forma, demonstrou-se que a L-cisteína nas doses de 10 e 40 mg/Kg reduziram os níveis de MPO na mucosa oral de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, verificando assim, ação antioxidante e anti-inflamatória da L-cisteína exógena no modelo de mucosite oral (vide figura 20). Pois, sabe-se que o nível de MPO reflete a quantidade de neutrófilos, e uma diminuição na sua atividade reflete em diminuição da inflamação do tecido lesionado (KRAWISZ; SHARON; STENSON, W.F, 1984; MARCELINO *et al.*, 2015).

Ainda analisando-se os parâmetros inflamatórios observa-se de acordo com a figura 21, que a administração de 5-FU elevou os níveis de íons nitrito quando comparado ao grupo normal, enquanto que a administração de L-cisteína na dose 40 mg/kg diminuiu tais níveis de forma significativa. Este resultado corrobora com os achados pelos de JUSTINO e colaboradores, (2015) e Medeiros (2011) onde encontraram níveis elevados de íons nitrito em modelos de mucosite induzida por 5-FU. O íon nitrito está entre as Espécies Reativas de Nitrogênio mais frequentes, às quais intensificam o processo inflamatório, sendo altamente reativo no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA (REIS *et al.*, 2009). A dosagem desse radical livre serve de marcador indireto para a ação do mediador gasoso óxido nítrico, o qual encontra-se evidente em processos inflamatórios, sendo que níveis elevados do mesmo

encontra-se proporcional à atividade de iNOs (MEDEIROS et al.,2011). Assim, podemos sugerir, que a L-cisteína administrada exogenamente diminui os níveis de óxido nítrico, inibindo o processo inflamatório resultante da lesão pelo 5-FU no modelo de mucosite oral.

Ainda durante o processo inflamatório acontece o aumento do infiltrado de células inflamatórias, dentre elas os mastócitos, os quais são os responsáveis, entre outras atividades, pela defesa imunológica, estando envolvidos em reações como a de interação com fibroblastos e sua contribuição para síntese de colágeno em muitas condições patológicas (DE MATOS et al.,2014). Essas células são conhecidas por liberar uma variedade de fatores que aumentam a angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGFs), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e interleucina 8 (IL-8) (KASHYAP; REDDY; NALINI, 2012). Quando ativados desencadeiam o aumento do número, tamanho e granulosidade podendo levar a cronificação do processo de cicatrização tecidual (BARRETO et al.,2013).

Nesta pesquisa podemos observar que no grupo 5-FU houve o aumento no número de mastócitos. Já no grupo tratado com a dose de 40mg/kg de L-Cisteína nota-se uma menor quantidade de mastócitos na área lesionada quando comparada com o grupo 5-FU. Pois, sabe-se que os mastócitos são responsáveis na cascata inflamatória por ativar fatores de crescimento, como descrito anteriormente, sendo importante na fase inflamatória (fase ulcerativa) (figura 24C) na mucosite oral. Isto pode ser observado no grupo 5-FU que apresentou aumento na quantidade de mastócitos levando a cronificação do processo inflamatório observado no 10º dia de experimento. Assim quanto maior o controle na formação e desgranulação de mastócitos, mais rápido o desenvolvimento do reparo cicatricial. Este controle pode ser observado quando administrou-se a dose de 40mg/kg de L-cisteína.

Além disso, Ao longo da reação inflamatória há diversos mediadores inflamatórios liberados, dentre eles, destacam-se as prostaglandinas e citocinas que desempenham papéis importantes na mucosite oral e intestinal (RIBEIRO et al.,2017; MOURA ,2012). A ciclooxigenase (COX) ou prostaglandina H₂ sintetase é uma enzima chave na biossíntese das prostaglandinas (PGs). Existem 3 isoformas de COX, a tipo 1 (COX-1), a tipo 2 (COX-2) e a COX -3 (compartilha todas as características catalíticas e estruturais tanto da COX-1 como da COX-2) (SMITH et al.,1998;BELLÓ et al.,2015). E acredita-se que a COX-2 esteja envolvida em processos inflamatórios e mitóticos sendo regulada positivamente em resposta a diferentes fatores de crescimento, promotores de tumor e citocinas (BELL et al.,2014). Além de resultar na persistência da inflamação devido a prevenção da síntese de prostanóides anti-inflamatórios

(WOO et al.,2015; URBANSKA; ZHANG,2015). No estudo realizado por Lalla et al., (2014) sugeriu a hipótese que a COX₂ não conduz a mucosite, mas na verdade amplifica a toxicidade celular, provavelmente aumentando a duração ou a gravidade das úlceras formadas, já que a expressão de Cox₂ é alta no 10º dia de experimento ao mesmo tempo que a mucosite oral.

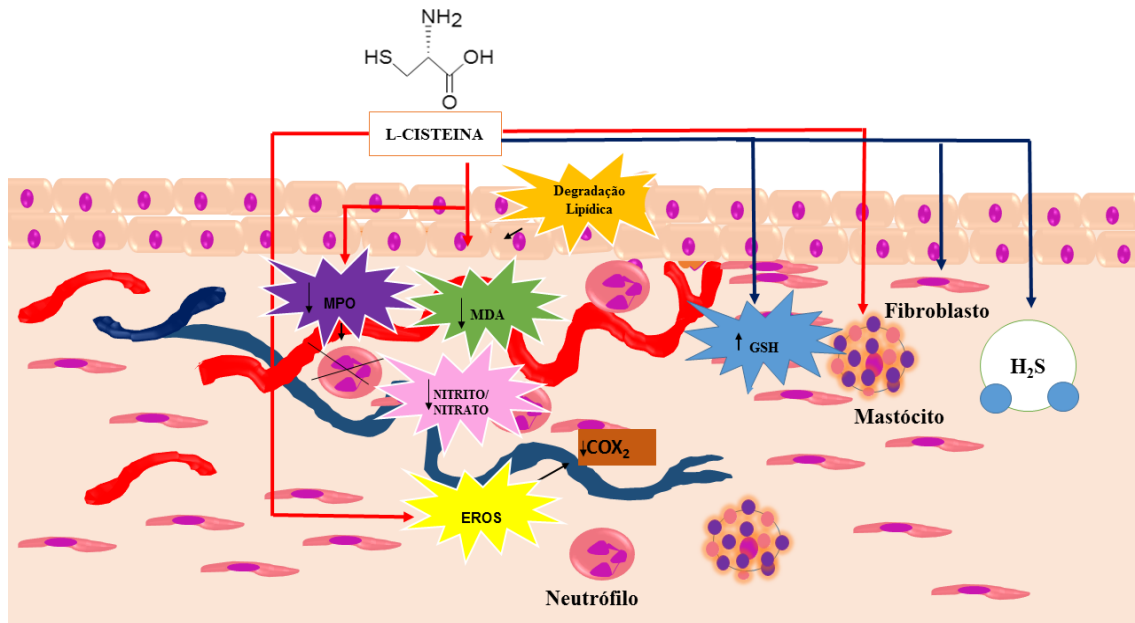
Nesse contexto pode-se notar na pesquisa realizada que no grupo 5-FU houve aumento da expressão de COX₂ na análise imunohistoquímica, e área de úlceras nas análises macro e microscópicas evidenciando a participação da Ciclooxygenase neste modelo corroborando com estudos prévios de Silva et al., (2017) e Lalla et al(2014).Sendo observado também que houve a diminuição na expressão da COX₂ no grupo que foi administrado a dose de 40 mg/Kg de L-Cisteína .Isto talvez seja resultado da *up-regulation* dos prostanoídes anti-inflamatórios por meio da L-Cisteína , já que houve diminuição significativa na expressão da Cox. Assim pode-se sugerir que a L-Cisteína atua diminuindo os níveis de expressão da Ciclooxygenase 2.

Tendo em vista, estudos que descrevem que a L-cisteína pode atuar como substrato enzimático, aumentando os níveis de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) que tem ação anti-inflamatória (INGENBLEEK e KIMURA,2013).A presente pesquisa objetivou-se estudar se há aumento nos níveis de Sulfeto de Hidrogênio, por meio da administração exógena da L-Cisteína, no modelo de mucosite oral.Sendo observado, que no grupo 5-FU houve aumento estatisticamente significativo, nos níveis de H₂S quando comparado ao grupo normal (vide figura 22).Pois, sabe-se que a L-cisteína intracelularmente é responsável pela homeostase celular produzindo níveis basais de H₂S. Em resposta ao dano causado, pode haver aumento da produção dos níveis de H₂S, visando a ação anti-inflamatória local ,como visto no grupo 5-FU (figura 12 e 13).Pode-se observar também, que houve um aumento expressivo dos níveis H₂S no grupo que foi administrado L-cisteína, quando comparado ao grupo 5-FU , (figura 22) e quando administrado NaHS ,doador direto de H₂S, pode-se ver também o aumento destes níveis em resposta ao dano causado pelo 5-FU, assim provavelmente ,pode-se fazer uma possível correlação entre o aumento dos níveis de H₂S com a diminuição do processo inflamatório na mucosite oral (figuras 12 e 13; tabela 4).Já que o H₂S é considerado uma potente molécula anti-inflamatória(GEMICI et al.,2015).Podendo ser produzida pela L-cisteína .

Em resumo nossos achados sugerem que a L-cisteína na dose de 40 mg tem efeito protetor no modelo de mucosite oral induzido por 5-FU. Por meio das suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatriciais demonstradas por meio da redução nos níveis de MDA, MPO,Nitrito/Nitrato, no número de células inflamatórias, dentre elas os mastócitos, e na expressão de COX₂ e aumento dos níveis de GSH e H₂S. Além disso, por ativar fibroblastos,

aumentar a espessura da derme e a concentração de colágeno em resposta ao dano provocado pelo 5-FU (figura 27).

Figura 27. Esquemática do Efeito protetor da L-Cisteína no modelo de mucosite oral induzido por 5-FU.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Neste esquema mostra o efeito protetor da L-Cisteína na mucosite oral induzida por 5-FU. A L-Cisteína diminui o número de mastócitos, diminui os níveis de MDA, MPO, Nitrito/Nitrato, expressão de COX₂ e aumenta os níveis de GSH e H₂S.

7.CONCLUSÕES

- A L-Cisteína demonstrou ter efeito protetor, prevenindo os danos causados, no epitélio da mucosa oral, pelo 5-FU e potencializado com o trauma mecânico, por meio da ativação de fibroblastos, que aumentaram a densidade da derme e o percentual de fibras colágenas e diminuição de mastócitos;
- A L-Cisteína demonstrou ter efeito anti-inflamatório e anti-oxidante, diminuindo os níveis de MDA, MPO, Nitrito/Nitrato e aumentando os níveis de GSH após, a lesão induzida pelo quimioterápico 5-FU;
- A L-Cisteína, pode ser um provável substrato enzimático, aumentando os níveis de H₂S para o modelo de Mucosite Oral;
- A L-Cisteína demonstrou ter efeito protetor na mucosite oral, talvez, por meio da diminuição da expressão de COX₂.

REFERENCIAS

- AHMED, A. A.M; SELIM, M. A.A; EL-SAYED, N. M. α -Lipoic acid ameliorates oral mucositis and oxidative stress induced by methotrexate in rats. Histological and immunohistochemical study. **Life sciences**, v. 171, p. 51-59, 2017.
- AKPINAR, B. et al. 5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43679, 2015.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 312-320, 2017.
- ALVARENGA, E. M. et al. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 129-140, 2016.
- ARAÚJO, A. A. et al. O azilsartan reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β , aumentou os níveis de IL-10 e aumentou o VEGF, FGF, KGF e TGF- α em um modelo de mucosite oral. **PloS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116799, 2015.
- ARAÚJO, A.A.; BORBA, P.B.; SOUZA, F.H.D. et al. In a methotrexate-induced model of intestinal mucositis, olmesartan reduced inflammation and induced enteropathy characterized by severe diarrhea, weight loss, and reduced sucrose activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 746–752, 2015.
- ARAÚJO, C.V. et al. Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 6, p. 493-501, 2015.
- ARAÚJO, S. et al. AMPK activation promotes gastroprotection through mutual interaction with the gaseous mediators H₂S, NO, and CO. **Nitric Oxide**, 2018.
- ASIKAINEN, P. J. et al. Radiation-induced changes in the microstructure of epithelial cells of the oral mucosa: A comparative light and electron microscopic study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 10, p. 1004-1010, 2017.
- AVELAR, T. M.T et al. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 4, p. 231-239, 2015.
- AVELAR, T. M.T et al. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 4, p. 231-239, 2015.

- ÁVILA, P. H. M. et al. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 563–573, 2015.
- ARIFA, R.D. et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-Induced mucositis through IL-1beta and IL-18 in mice. **Am. J. Pathol.**, 184, pp. 2023–2034, 2014.
- AVELAR, T. M.T et al. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 4, p. 231-239, 2015.
- BREDA, M. et al. Adenocarcinoma nasal-Experiência do serviço orl do hospital de braga. **Revista Portuguesa De Otorrinolaringologia E Cirurgia Cérvico-Facial**, v. 54, n. 4, p. 233-238, 2016.
- BAGAN, J. et al. Oxidative stress and recurrent aphthous stomatitis. **Clinical oral investigations**, v. 18, n. 8, p. 1919-1923, 2014.
- BARKOKEBAS, A. et al. Impact of oral mucositis on oral-health-related quality of life of patients diagnosed with cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 44, n. 9, p. 746-751, 2015.
- BARRACH, R. H. et al. Oral changes in individuals undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 81, n. 2, p. 141-147, 2015.
- BARRETO, A. L. S. et al. Análise quantitativa de mastócitos na cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 1, n. 2, p. 79-90, 2013.
- BASTOS, M. J. F. et al. A novel model of megavoltage radiation-induced oral Mucositis in hamsters: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. **International journal of radiation biology**, v. 91, n. 6, p. 500-509, 2015.
- BELL, E. et al. COX2 expression in neuroblastoma increases tumorigenicity but does not affect cell death in response to the COX2 inhibitor celecoxib. **Clinical & experimental metastasis**, v. 31, n. 6, p. 651-659, 2014.
- BELLÓ, C. et al. O cetoprofeno como oportunidade terapêutica no estresse oxidativo: uma revisão. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.
- BERKOVITZ, B. K. B.; HOLLAND, G. R.; MOXHAM, B. J. **Anatomia, embriologia e histologia bucal**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.
- CHAPPLE, I.L. CHAPPLE. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. **Clinical Molecular Pathology**, 49 (5), pp. M247–M255, 1996.
- CAMPOLINA, A. G. et al. Comparação De Tratamentos Para Câncer De Cabeça E Pescoço Ajustado Por Escore De Propensão: Radioterapia Versus Cirurgia+ Radioterapia. **Value in Health**, v. 18, n. 7, p. A816, 2015.
- CARDANI, D. et al. Sodium glucose cotransporter 1 ligand BLF501 as a novel tool for management of gastrointestinal mucositis. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.
- CAROCHO, M; FERREIRA, I. C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CASSINI-VIVEIRA, P. et al. iNOS activity modulates inflammation, angiogenesis, and tissue fibrosis in polyether-polyurethane synthetic implants. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2015, 2015.
- CASTILLA, M. S.; MATEOS, A. G. L.; LÓPEZ MARTÍNEZ, J. Respuesta inflamatoria sistematica: fisiopatologia y mediadores. **Medicina intensiva**, v. 24, n. 8, p. 353-360, 2000.
- CASTRI, P. et al. Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 and Its Cleavage Products Differentially Modulate Cellular Protection through NF-κB-Dependent Signaling. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1843, n. 3, p. 640–651, 2014. **PMC**. Web. 29 May 2018.
- CASTRO, C. C. T. S. et al. Clinical and molecular spectrum of patients with 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17-β-HSD3) deficiency. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 8, p. 533-539, 2012.
- CHANG, C.T .et al. Comprehensive assessment of host responses to 5-fluorouracil-induced oral mucositis through transcriptomic analysis. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0135102, 2015.
- CHAUDHURI, K.; NAIR, K. K.; ASHOK, L. Salivary levels of TNF-α in patients with recurrent aphthous stomatitis: A cross-sectional study. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 12, n. 1, p. 45, 2018.
- CHEN, X; LIU, X.S. Hydrogen sulfide from a NaHS source attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammation via inhibiting nuclear factor-κB. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 17, n. 3, p. 209-217, 2016.

- CHEN, Y.; LYGA, J. Brain-skin connection: stress, inflammation and skin aging. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 13, n. 3, p. 177-190, 2014.
- CHOUHDARY, G.S.; AL-HARBI, S; ALMASAN, A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. In: **Apoptosis and Cancer**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 1-9.
- CICCHELLI, M. Q. et al. Mucosite Oral induzida por terapia oncológica—Uma revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 1, p. 85-88, 2017.
- CURRA, M. et al. Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF-kB. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 12, p. 125008, 2015.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 364-378, 2014.
- DO NASCIMENTO JÚNIOR, B.J. et al. Efficacy of Phytotherapy in Oral Mucosites Induced by Chemotherapy and Radiotherapy Phytotherapy in OM really work?. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 71, n. 2, p. 293-299.
- DAUGÉLAITÉ, G et al. Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. **Medicina**, v. 55, n. 2, p. 25, 2019.
- DE AQUINO, R. C. A. et al. Aspectos epidemiológicos da mortalidade por câncer de boca; conhecendo os riscos para possibilitar a detecção precoce das alterações na comunicação. **Revista CEFAC**, v. 17, n. 4, p. 1254-1261, 2015.
- DE MATOS, F. R. et al. Retrospective analysis of the histopathologic features of 288 cases of reactional lesions in gingiva and alveolar ridge. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 22, n. 7, p. 505-510, 2014.
- DE ARAÚJO, S. et al. AMPK activation promotes gastroprotection through mutual interaction with the gaseous mediators H₂S, NO, and CO. **Nitric Oxide**, 2018.
- DE PAULA, J. M; SAWADA, N. O. Qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer em tratamento radioterápico. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 16, n. 1, p. 106-113, 2015.
- DE SOUZA, T, F. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia. **Buscando a excelência na disseminação do conhecimento científico**, v. 11, n. 2, p. 112-7, 2013.
- DUFTON, N. et al. Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: A comparative study utilizing a novel fluorescent probe. **Scientific reports**, v. 2, p. 499, 2012.

- DUNN, W. R. et al. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 158, p. 101-13, 2016.
- ELBELTAGY, M. et al. The effect of 5-fluorouracil on the long term survival and proliferation of cells in the rat hippocampus. **Brain research bulletin**, v. 88, n. 5, p. 514-518, 2012.
- ESPINOSA, J. et al. Optimizacion De La Quimioterapia En El Cáncer Epidermoide De Pulmon Avanzado, Antimetabolitos O Taxanos? **Value in Health**, v. 18, n. 7, p. A816, 2015.
- FIORUCCI, S. et al. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis, **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 996–1002, 2007.
- FOCAC CETTI, C. et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0115686, 2015.
- FAURSCHOU, M; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection** 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.
- FRANCO, A. S. SPARC reduces secretion of TGF-[beta] and type I collagen in myofibroblasts extracted from infarcted rats/SPARC reduz a secrecao de TGF-[beta] e colageno tipo I em miofibroblastos de ratos infartados. **Revista de Medicina**, v. 94, n. 1, p. 1-3, 2015.
- GUO, W.; CHENG, Z. Y.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulfide and translational medicine. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 10, p. 1284-1291, 2013.
- GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2014.
- GAO, K. et al. Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 10, p. 2971–2980, 2016.
- GARDIZANI, T. P. et al. Phagocytosis and nitric oxide production by peritoneal adherent cells in response to *Candida albicans* in aging: a collaboration to elucidate the pathogenesis of denture stomatitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 3, p. 265-273, 2017.
- GARRITANO, C. R. O. et al. Use of transfer factor in immunosuppressed surgical patients. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 5, p. 452-456, 2017.
- GAUTAM, A. P. et al. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients—a triple blinded randomized controlled trial. **Radiotherapy and Oncology**, v. 104, n. 3, p. 349-354, 2012.
- GEMICI, B. et al. H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 25–31, 2015.

- GEORGIOU, M. et al. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 215–216, 2012.
- GLASER, K. et al. Effects of the new generation synthetic reconstituted surfactant CHF5633 on pro-and anti-inflammatory cytokine expression in native and LPS-stimulated adult CD14+ monocytes. **PloS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146898, 2016.
- GONZALO-GIL, E; GALINDO-IZQUIERDO, M. Role of transforming growth factor-beta (TGF) beta in the physiopathology of rheumatoid arthritis. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 10, n. 3, p. 174-179, 2014.
- GARDIZANI, T. P. et al. Phagocytosis and nitric oxide production by peritoneal adherent cells in response to *Candida albicans* in aging: a collaboration to elucidate the pathogenesis of denture stomatitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 3, p. 265-273, 2017.
- GOODMAN, K. A. et al. Capecitabine With Mitomycin Reduces Acute Hematologic Toxicity and Treatment Delays in Patients Undergoing Definitive Chemoradiation Using Intensity Modulated Radiation Therapy for Anal Cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 98, n. 5, p. 1087-1095, 2017.
- GOYRI, B. L. M. et al. Estomatotoxicidad bucal inducida por quimioterapia. **Revista odontológica mexicana**, v. 18, n. 2, p. 89-95, 2014.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.
- GUERREIRO, D. D. et al. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprodução & Climatério**, v. 30, n. 2, p. 90-99, 2015.
- GUERREIRO, M. D.; SWENSON, K. K. Herpes simplex vírus-related oral mucositis in patients with lymphoma. **Onc Nurs Forum**, v. 41, n. 3, p. 327-330, 2014.
- GUNTER, B. R. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 42, n. 1, p. 27-38, 2017.
- GUO, S. et al. Role of A20 in cIAP-2 Protection against Tumor Necrosis Factor A (TNF-A)-Mediated Apoptosis in Endothelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3816–3833, 2014. **PMC**. Web. 27 May 2018.
- GUO, W.; CHENG, Z. Y.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulfide and translational medicine. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 10, p. 1284-1291, 2013.

- HAMZA, R. Z.; EL-SHENAWY, N. S. The beneficial effects of l-cysteine on brain antioxidants of rats affected by sodium valproate. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 11, p. 1212-1221, 2017.
- INGENBLEEK, Y; KIMURA, H. Nutritional essentiality of sulfur in health and disease. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 7, p. 413-432, 2013.
- HADDOCK, E. S.; COHEN, P. R. 5-Fluorouracil-induced exacerbation of rosacea. **Dermatology online journal**, v. 22, n. 11, 2016.
- HARADA, K. et al. A dieta elementar inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos através da supressão da ativação do NF-κB. **Relatórios de oncologia**, 2018.
- HAVERMAN, T. M. et al. Oral Complications in Hematopoietic Stem Cell Recipients: The Role of Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- HE, M.; DONG, L. M.; HOU, X. B. Time-related expression of IL-6, IL-8 and TNF-alpha following explosive injury to rabbit's chest. **Fa yi xue za zhi**, v. 30, n. 2, p. 85-87, 2014.
- HENGARTNER, N. E. et al. Crucial role of IL1beta and C3a in the in vitro-response of multipotent mesenchymal stromal cells to inflammatory mediators of polytrauma. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116772, 2015.
- HOSOKAWA, S. et al. Risk and prognostic factors for multiple primary carcinomas in patients with head and neck cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, 2017.
- HOWE, L. R. et al. O celecoxib, um inibidor selectivo da ciclooxigenase 2, protege contra o cancro da mama induzido pelo receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano (HER-2)/neu. **Pesquisa sobre o câncer**, v. 62, n. 19, p. 5405-5407, 2002.
- HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 11, p. 1349-53, 1981.
- INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 122 p, 2015.
- JERÔNIMO, M. S. et al. Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. **Acta cirurgica brasileira**, v. 31, n. 9, p. 586-596, 2016.
- JESUS, L. G. et al. Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. **RFO UPF**, v. 21, n. 1, p. 130-135, 2016.
- JONES, C. D., GUIOT, L., MIKE, S., GORMAN, M., TEHRANI, H. The use of chemotherapeutics for the treatment of keloid scars. **Dermatology reports**, v. 7, n. 2, 2015.

- JUNG, Kyong-Jin et al. Involvement of hydrogen sulfide and homocysteine transsulfuration pathway in the progression of kidney fibrosis after ureteral obstruction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 1989-1997, 2013.
- JUNG, Y. S. et al. Metachronous second primary malignancies after head and neck cancer in a Korean cohort (1993-2010). **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0134160, 2015.
- JUNIOR, M. P. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e seu efeito ergogênico no desempenho físico humano. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 6, n. 36, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. Junqueira J, Carneiro F. **Histologia Básica: Texto & Atlas**. 13th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 149-175, 2017.
- JUSTINO, P. F. et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Nutr**, v. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.
- KARBELKAR, S. A; MAJUMDAR, A.S. Altered systemic bioavailability and organ distribution of azathioprine in methotrexate-induced intestinal mucositis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 241, 2016.
- KAWASHIMA, R. et al. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon. **Support Care Cancer**, 2015.
- KABIL, O; BANERJEE, R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 21903-21907, 2010.
- KANAREK, N. et al. Critical role for IL-1 β in DNA damage-induced mucositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. E702-E711, 2014.
- KANG, Y. et al. A curcumina sensibiliza as células cancerígenas gástricas humanas ao 5-fluorouracilo através da inibição da via de sinalização de sobrevivência NF κ B. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 7373–7384, 2016.
- KANIKA, G.; KHAN, S.; JENA, G. Sodium butyrate ameliorates L-arginine-induced pancreatitis and associated fibrosis in wistar rat: role of inflammation and nitrosative stress. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 29, n. 8, p. 349-359, 2015.
- KANIKARLA-MARIE, P; JAIN, S. K. L-Cysteine supplementation reduces high-glucose and ketone-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by inhibiting ROS. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 391, n. 1-2, p. 251-256, 2014.
- KANOMATA, N. et al. Preparation of a novel antiserum to aromatase with high affinity and specificity: Its clinicopathological significance on breast cancer tissue. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177439, 2017.

- KASHYAP, B; REDDY, P. S; NALINI, P. Reactive lesions of oral cavity: A survey of 100 cases in Eluru, West Godavari district. **Contemporary clinical dentistry**, v. 3, n. 3, p. 294, 2012.
- KEYEL, P. A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. **Cytokine**, v. 69, n. 1, p. 136-145, 2014.
- KHATTAR, V.; THOTTASSERY, J. V. Cks1 proteasomal turnover is a predominant mode of regulation in breast cancer cells: Role of key tyrosines and lysines. **International journal of oncology**, v. 46, n. 1, p. 395-406, 2015.
- KOBUCHI, S.; ITO, Y.; TOSHIYUKI, S. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 707-718, 2017.
- KODA, K. et al. Tumor 5-FU-related mRNA expression and efficacy of oral fluoropyrimidines in adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. **Anticancer research**, v. 36, n. 10, p. 5325-5331, 2016.
- KODAIRA, T. et al. Definitive radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: update and perspectives on the basis of EBM. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 45, n. 3, p. 235-243, 2014.
- KONDO, T. Radiation-Induced Cell Death and Its Mechanisms. **Radiat Emerg Med**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2013.
- KUIKEN, N. S.S; RINGS, E. H.H.M; TISSING, W.J.E. Risk analysis, diagnosis and management of gastrointestinal mucositis in pediatric cancer patients. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 94, n. 1, p. 87-97, 2015.
- KUMAR, A. et al. Isolamento, Purificação e Caracterização de Vinblastina e Vincristina do Fungo Endofítico *Fusarium Oxysporum* Isolado de *Catharanthus Roseus*. Ed. Vipul Bansal. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e71805, 2013. **PMC**. Rede. 26 de maio de 2018.
- KUMAR, S. et al. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 415–420, 2010.
- KWON, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2007–16, 2016.
- KANAREK, N. et al. Critical role for IL-1 β in DNA damage-induced mucositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. E702-E711, 2014.

- KRAWISZ, J.E; SHARON, P;STENSON ,W.F. Ensaio quantitativo para a inflamação intestinal aguda com base na actividade de mieloperoxidase. Avaliação da inflamação no modelo de rato e hamster. **Gastroenterologia**, 87: 1344-50, 1984.
- KOOHI-HOSSEINABADI, O. et al. Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil: a golden hamster model. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 7, n. 2, p. e304, 2015.
- LAHEIJ, A. M.G.A; DE SOET, J.J. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 8, n. 2, p. 180-187, 2014.
- LALLA, R. V. et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-1461, 2014.
- LALLA, R. V. et al. Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. **Supportive Care in Cancer**, v. 18, n. 1, p. 95, 2010.
- LEBEAUX, D. et al. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or l-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1704-1712, 2015.
- LEE, J. J.; BEUMER, J. H.; CHU, E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 447-464, 2016.
- LEE, S. et al. Dietary L-cysteine improves the antioxidative potential and lipid metabolism in rats fed a normal diet. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 7, p. 1430-1434, 2013.
- LEE, W. M. et al. The Role of Steroid Sulfatase as a Prognostic Factor in Patients with Endometrial Cancer. **Yonsei medical journal**, v. 57, n. 3, p. 754-760, 2016.
- LEGERT, K. G. et al. The relationship between oral mucositis and levels of pro-inflammatory cytokines in serum and in gingival crevicular fluid in allogeneic stem cell recipients. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 6, p. 1749-1757, 2015.
- LEITÃO, R. F. C. et al. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 61, p.215-222, 2008.
- LEITÃO, R.F.C. et al. Papel do óxido nítrico na patogênese da mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracilo no hamster. **Quimioterapia e farmacologia de câncer**, v. 59, n. 5, p. 603-612, 2007.
- LEMOS JUNIOR, C. A. et al. Oral cancer based on scientific evidences. **Rev assoc paul ciR dent**, v. 67, n. 3, p. 178-86, 2013.

- LIMA, L. S. M. et al. Regulation of radiotherapy and chemotherapy services by health plan organizations in Brazil. **CIENCIA & SAUDE COLETIVA**, v. 19, n. 1, p. 195-204, 2014.
- LIMA, V. et al. Efeitos dos inibidores do fator-inibidor de necrose tumoral pentoxifilina e talidomida em mucosite oral experimental de curto prazo em hamsters. **Revista européia de ciências da boca**, v. 113, n. 3, p. 210-217, 2005.
- LIN, W. et al. The role of TLR2/JNK/NF- κ B pathway in amyloid β peptide-induced inflammatory response in mouse NG108-15 neural cells. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 880-884, 2013.
- LIU, S. et al. Therapeutic Effects of L-Cysteine in Newborn Mice Subjected to Hypoxia-Ischemia Brain Injury via the CBS/H₂S System: Role of Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. **Redox Biology**, v. 13, p. 528–540, 2017. **PMC**. Web. 31 May 2018.
- LOBB, I. et al. Hydrogen sulphide and the kidney: important roles in renal physiology and pathogenesis and treatment of kidney injury and disease. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 55-65, 2015.
- LOGAN, R. M. et al. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 63, n. 2, p. 239-245, 2009.
- LOGAN, R. M. et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer treatment reviews**, v. 33, n. 5, p. 448-460, 2007.
- LOGAN, R. M. et al. Fator nuclear- κ B (NF- κ B) e ciclooxigenase-2 (COX-2) expressão na mucosa oral após a quimioterapia do câncer. **Oncologia oral**, v. 43, n. 4, p. 395-401, 2007.
- LOTICI, T. et al. Prevalência de perda de peso, caquexia e desnutrição, em pacientes oncológicos. **Revista Uniabeu**, v. 7, n. 17, p. 94-106, 2014.
- LUCETTI, L. T. et al. Nitric oxide and hydrogen sulfide interact when modulating gastric physiological functions in rodents. **Digestive diseases and sciences**, v. 62, n. 1, p. 93-104, 2017.
- M.A, Y. S. et al. Efeito antiproliferativo modulado com alta concentração de glicose e citotoxicidade de 5-fluorouracil em células humanas de câncer de cólon. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 2, p. 64-72, 2014. **PMC**. Rede. 26 de maio de 2018.
- MUHAMMAD, M. O; ELIOPOULOS, N; MUANZA, T. Radiation-induced oral mucositis. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 89, 2017.
- MAGIEROWSKI, M. et al. Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide Protects Gastric Mucosa against the Formation and Time-Dependent Development of Ischemia/Reperfusion-

- Induced Acute Lesions Progressing into Deeper Ulcerations. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 295, 2017.
- MAGIEROWSKI, M. et al. Nitric oxide, afferent sensory nerves, and antioxidative enzymes in the mechanism of protection mediated by tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer and sodium hydrosulfide against aspirin-induced gastric damage. **Journal of gastroenterology**, v. 53, n. 1, p. 52-63, 2018.
- MALHI, S. S. et al. Intracellular delivery of redox cycler-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes. **International journal of pharmaceutics**, v. 432, n. 1-2, p. 63-74, 2012.
- MAMOUNI, N. et al. Tumeurs rares de l'ovaire: à propos d'une série de 11 cas de tumeurs non épithéliales malignes de l'ovaire. **Pan African Medical Journal**, v. 20, n. 1, 2015.
- MANCHANDA, A; IYENGAR, A. R.; PATIL, S. Association between serotonin transporter gene polymorphism and recurrent aphthous stomatitis. **Dental research journal**, v. 13, n. 3, p. 206, 2016.
- MANNA, P.; JAIN, SUSHIL, K. L-cysteine and hydrogen sulfide increase PIP3 and AMPK/PPAR γ expression and decrease ROS and vascular inflammation markers in high glucose treated human U937 monocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 10, p. 2334-2345, 2013.
- MARCUSSEN, M. et al. A systematic review of molecular responses to cancer therapy in normal human mucosa. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 124, n. 4, p. 355-366, 2017.
- MARIA, O. M.; ELIOPOULOS, N.; MUANZA, T. Radiation-Induced Oral Mucositis. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 1, p. 89, 2017. **PMC**. Web. 26 May 2018.
- MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 14, n. 1, p. 11, 2017.
- MATSUNAMI, M. et al. Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. **Neuroscience**, v. 181, p. 257-64, 2011.
- MCCARTY, S. M.; PERCIVAL, S. L. Proteases and delayed wound healing. **Adv. Wound Care** **2**, 438-447. 10.1089/wound.2012.0370,2013.
- MEDEIROS, C. A. C. X. et al. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 1085-1100, 2011.

- MEDEIROS, R. Jand-Venes. et al. Immunohistochemical approach reveals localization of cystathionine- γ -lyase and cystathionine- β -synthetase in ethanol-induced gastric mucosa damage in mice. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 50, n. 2, p. 157-160, 2013.
- MENDONÇA, R. M. H. et al. Oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients: Evaluation of microbiological and hematological factors. **Pediatric hematology and oncology**, v. 32, n. 5, p. 322-330, 2015.
- MICHALANY, J. **Técnica histológico los anatomia patológica**: Com instruções para o cirurgião, enfermeiro, citotécnico. 3 ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda. 2008. P. 153-5.
- MIHARA, M.; UCHYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem**, v. 86, p. 271-278, 1978.
- MIRANDA, T. V. de et al. Estado nutricional e qualidade de vida de pacientes em tratamento quimioterápico. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 59, n. 1, p. 57-64, 2013.
- MIYAMOTO, R.; OTSUGURO, K.; ITO, S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. **Neuroscience Letters**, v. 499, n. 2, p. 137–142, 2011.
- MOLINA PRATS, P. et al. The therapeutic effects of apigenin and dexamethasone on 5-fluorouracil-induced oral mucositis—a pilot study using a Syrian hamster model. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 2, p. 142-147, 2017.
- MOORE, K.; PERSAUD, T. V. N. **Embriología clínica**. Elsevier Brasil, 2016.
- MORAIS, E. F. de et al. Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 80, n. 1, p. 78-85, 2014.
- MUT, A. et al. High Dose Rate Brachytherapy in Early Stage Squamous-Cell Carcinoma of the Lip. **Acta Otorrinolaringologica (English Edition)**, v. 67, n. 5, p. 282-287, 2016.
- OCHIAI, T. et al. Impact of 5-fluorouracil metabolizing enzymes on chemotherapy in patients with resectable colorectal cancer. **Oncology reports**, v. 32, n. 3, p. 887-892, 2014.
- MARCELINO, M. Y. et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. **J. Coloproctol. (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 20-27, 2015.
- PAIVA, C. I. et al. Efeitos da quimioterapia na cavidade bucal. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 5, n. 1, p. 109-119, 2016.
- PÁLINKÁS, Z. et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 6, p. 1516–1532, 2015.

- PANGENI, R. et al. Multiple Nanoemulsion System for an Oral Combinational Delivery of Oxaliplatin and 5-Fluorouracil: Preparation and in Vivo Evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6379–6399, 2016. **PMC**. Web. 26 May 2018.
- PARKER, A. L. et al. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1434, 2017. **PMC**. Web. 26 May 2018.
- PEREIRA, D. M. et al. A inibição da sinalização MEK5 / ERK5 aumenta a sensibilidade das células do câncer de cólon ao 5-fluorouracil através de um mecanismo dependente de p53. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34322-34340, 2016.
- POWELL, C. R.; DILLON, K. M.; MATSON, J. B. A Review of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors: Chemistry and Potential Therapeutic Applications. **Biochemical pharmacology**, 2017.
- PUGAZHENTHI, S. et al. Induction of an inflammatory loop by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α involves NF- κ B and STAT-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. **PloS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69585, 2013.
- PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PloS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013.
- QUARESMA, M. P. **Lactobacillus spp. e Bifidobacterium sp. atenuam a mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil em camundongos**. 2016. 86p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- QUEIROZ, N. C.A et al. Arrabidaea chica for oral mucositis in patients with head and neck cancer: a protocol of a randomised clinical trial. **BMJ open**, v. 8, n. 10, p. e019505, 2018.
- QUÉRÉ, S. L. et al. The role of superoxide dismutase (SOD) in skin disorders. **Nutrafoods**, v. 13, p. 13-27, 2014.
- QUINTERO, K. et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 79, n. 3, p. 375-381, 2013.
- RABAGLIATI, R. et al. Epidemiology of febrile neutropenia in adult patients with acute leukemia and lymphoma: Cohort study of public and private hospital of Santiago, Chile. **Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia**, v. 31, n. 6, p. 721-728, 2014.

- REINALDO, M. P. O. S. **Efeito da Olmesartana na resposta inflamatória em modelo de mucosite intestinal em ratos**. 2015. 71p. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- REIS, O. T. G. et al. Effect of L-Arginine and L-NAME treatments on polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells influx during tumor growth. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 107-111, 2009.
- RIBEIRO, D. et al. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 858-870, 2015.
- RIBEIRO, I. L. A. et al. Factors associated with lip and oral cavity cancer. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 618-629, 2015.
- RIBEIRO, S. B. et al. Efeito protetor da dexametasona na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186511, 2017.
- RODRIGUEZ-CABALLERO, A. et al. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 41, n. 2, p. 225-238, 2012.
- ROGERO, M. M. et al. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.
- RONDINELLI, M. F. C. et al. 5-Fluorouracil induced late peripheral neuropathy. Case report. **Revista Dor**, v. 18, n. 2, p. 178-180, 2017.
- ROSA, D. P. et al. Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea. **Inflammation Research**, v. 64, n. 1, p. 21-29, 2015.
- ROSA, Flávia Troncon et al. Oxidative stress and inflammation in obesity after taurine supplementation: a double-blind, placebo-controlled study. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 3, p. 823-830, 2014.
- RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Estudos em carcinogênese de 2-acetilaminofluoreno: III. A utilização de uracil-2-C14 por hepatoma de fígado e rato de rato pré-neoplásico. **Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 119-123, 1954.
- SZABÓ, G et al. Cardioprotective effects of hydrogen sulfide. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 201–210, 2011.
- SAIF, M. W. et al. Incidence and management of ZIV-aflibercept related toxicities in colorectal cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 5, p. 1028, 2014.
- SALMAN, Z. K. et al. The combined effect of metformin and L-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. **European journal of pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 448-455, 2013.

- SALVADÓ, L. et al. PPAR β/δ prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. **Diabetologia**, v. 57, n. 10, p. 2126-2135, 2014.
- SASAKO, M. et al. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 3, p. 538-548, 2015.
- SCHEIN, C. F. et al. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2016.
- SCHICHO, R. et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1542–1552, 2006.
- SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P. D. Oral mucositis. **Oral diseases**, v. 12, n. 3, p. 229-241, 2006.
- 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.
- SETRERRAHMANE, S.; XU, H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 153, 2017. **PMC**. Web. 26 May 2018.
- SHARMA, A. et al. Lactobacillus brevis CD2 lozenges reduce radiation-and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: a randomized double-blind placebo-controlled study. **European journal of cancer**, v. 48, n. 6, p. 875-881, 2012.
- SHIMAMURA, Y. et al. A Mouse Model for Oral Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy. **Anticancer research**, v. 38, n. 1, p. 307-312, 2018.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.
- SILVA, G. et al. Influence of L-arginine during bovine in vitro fertilization. 2014.
- SILVA, V. C. et al. Role of the route of leukotrienes in an experimental model of oral mucositis induced by 5-fluorouracil. **Acta cirurgica brasileira**, v. 32, n. 9, p. 712-725, 2017.
- SINGLETERRY, J.; SREEDHAR, A.; ZHAO, Y. Components of cancer metabolism and therapeutic interventions. **Mitochondrion**, v. 17, p. 50-55, 2014.
- SKEFF, M. A. et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **PloS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113378, 2014.
- SMITH, L. B. et al. The role of IL-1 β and TNF- α signaling in the genesis of cancer treatment related symptoms (CTRS): a study using cytokine receptor-deficient mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 38, p. 66–76, 2014.

- SONG, Ze he. et al. L-Cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF- κ B and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge. **Innate immunity**, v. 22, n. 3, p. 152-161, 2016.
- SONIS, S. T. et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. **Cancer**, v. 100, n. S9, p. 1995-2025, 2004.
- SONIS, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral oncology**, v. 45, n. 12, p. 1015-1020, 2009.
- SONIS, S. T. Oral mucositis in head and neck cancer. **Soc Clin Oncol** .Educ Book, p. 236-240, 2013.
- SONIS, S. T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol**, v. 5, n. 9, Suppl 4, p. 3-11, 2007.
- SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 277 – 284, 2004.
- SONIS, S. T. The quest for effective treatments of mucositis. **The journal of supportive oncology**, v. 9, n. 5, p. 170-171, 2011.
- SOUSA, F. B.M. et al. H₂S is a key antisecretory molecule against cholera toxin-induced diarrhoea in mice: Evidence for non-involvement of the AC/cAMP/PKA pathway and AMPK. **Nitric Oxide**, v. 76, p. 152-163, 2018.
- SOUZA TERRA, F. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia. **Buscando a excelência na disseminação do conhecimento científico**, v. 11, n. 2, p. 112-7, 2013.
- SOUZA, I. B. et al. Lipid peroxidation in female dogs bearing mammary gland carcinomas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1335-1338, 2017.
- SOUZA, I. B. et al. Lipid peroxidation in female dogs bearing mammary gland carcinomas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1335-1338, 2017.
- STASHKEVYCH, M. et al. The influence of 5-fluorouracil on activity of thymidine phosphorylase in gastric adenocarcinoma and normal adjacent tissue. **Experimental oncology**, n. 36, n. 4, p. 267-270, 2014.
- SUI, X. et al. JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. **Scientific reports**, v. 4, p. 4694, 2014.
- SEN, N. et al. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF κ B mediates its antiapoptotic actions. **Molecular Cell**, v. 45, n. 1, p. 13–24, 2012.

- SIOMEK, A. et al. Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. **International Journal of Cancer**, 119 (9) pp. 2228–2230, 2006.
- TAKANO, Hideyuki. et al. O γ -tocotrienol previne a produção de espécies de oxigênio reativo induzidas por 5-FU em queratinócitos orais humanos através da estabilização da ativação induzida por 5-FU de Nrf2. **Revista internacional de oncologia**, v. 46, n. 4, p. 1453-1460, 2015.
- TANIDEH, N. et al. Comparative assessment of the therapeutic effects of the topical and systemic forms of *Hypericum perforatum* extract on induced oral mucositis in golden hamsters. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 43, n. 10, p. 1286-1292, 2014.
- TANIGUCHI,S; KANG. L; KIMURA ,T. N . 2011. Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic β -cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress. **Br J Pharmacol** 162:1171-1178.
- TERRA, R. M. et al. Applications for a hybrid operating room in thoracic surgery: from multidisciplinary procedures to image-guided video-assisted thoracoscopic surgery. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 5, p. 387-390, 2016.
- TOJAL, A.; PINTO-DE-SOUSA, J. Terapêutica multimodal do carcinoma da Junção esôfago-gástrica. **Arquivos de Medicina**, v. 28, n. 3, p. 78-87, 2014.
- TRAVERSO, N. et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.
- URBANSKA, A. M; ZHANG, X; P, S. Bioengineered colorectal cancer drugs: orally delivered anti-inflammatory agents. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 72, n. 3, p. 757-769, 2015.
- VAN DER VELDEN, W. J.F.M et al. Mucosal barrier injury, fever and infection in neutropenic patients with cancer: introducing the paradigm febrile mucositis. **British journal of haematology**, v. 167, n. 4, p. 441-452, 2014.
- VAN DER WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer: some considerations. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 18, n. 1, p. e33, 2013.
- VAN SEBILLE, Y. Z.A et al. Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. **Current oncology reports**, v. 17, n. 11, p. 50, 2015.
- VANLANCKER, E. et al. 5-Fluorouracil sensitivity varies among oral microorganisms. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 8, p. 775-783, 2016.

- VEENA, M. S. et al. p16 Protein and gigaxonin are associated with the ubiquitination of NF κ B in cisplatin-induced senescence of cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 50, p. 34921-34937, 2014.
- VICENTE, J. B. et al. Bioenergetic relevance of hydrogen sulfide and the interplay between gasotransmitters at human cystathionine β -synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1857, n. 8, p. 1127-1138, 2016.
- VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: patobiologia e manejo. **Opinião atual em oncologia**, v. 27, n. 3, p. 159-164, 2015.
- VOKURKA, S. et al. The risk factors for oral mucositis and the effect of cryotherapy in patients after the BEAM and HD-I-PAM 200 mg/m² autologous hematopoietic stem cell transplantation. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 15, n. 5, p. 508-512, 2011.
- WALLACE, J. L.; WANG, R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 329-345, 2015.
- WANG, W.; CHENG, J.; ZHU, Y. The JNK signaling pathway is a novel molecular target for S-propargyl-L-cysteine, a naturally-occurring garlic derivatives: link to its anticancer activity in pancreatic cancer in vitro and in vivo. **Current cancer drug targets**, v. 15, n. 7, p. 613-623, 2015.
- WANG, Xian-Hui et al. Dysregulation of cystathionine γ -lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage. **Cellular signalling**, v. 25, n. 11, p. 2255-2262, 2013.
- WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2 e COX-3 e o futuro tratamento da doença inflamatória crônica. **The Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 646-648, 2000.
- WONG, D. V. T. et al. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **PloS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139985, 2015.
- WOO, J. K. et al. Evaluation of preventive and therapeutic activity of novel non-steroidal anti-inflammatory drug, CG100649, in colon cancer: Increased expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors enhance the apoptotic response to combination treatment with TRAIL. **Oncology reports**, v. 33, n. 4, p. 1947-1955, 2015.
- WU, X. et al. TNF- α sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells. **Cancer cell international**, v. 17, n. 1, p. 13, 2017.
- YI-SHING, M.A. et al. High glucose modulates antiproliferative effect and cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colon cancer cells. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 2, p. 64-72, 2014.

- YAMANE, Satoshi et al. l-cysteine/d, l-homocysteine-regulated ileum motility via system L and B,+ transporter: Modification by inhibitors of hydrogen sulfide synthesis and dietary treatments. **European journal of pharmacology**, v. 764, p. 471-479, 2015.
- YANG, H. et al. IL-10 negatively regulates oxLDL-P38 pathway inhibited macrophage emigration. **Experimental and molecular pathology**, v. 97, n. 3, p. 590-599, 2014.
- YAO, J. J. et al. Radiotherapy with neoadjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for ascending-type nasopharyngeal carcinoma: a retrospective comparison of toxicity and prognosis. **Chinese journal of cancer**, v. 36, n. 1, p. 26, 2017.
- YATES, C.C.; HEBDA, P; WELLS, A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 96, n. 4, p. 325-333, 2012.
- YAYLALI, Y. T. et al. Atrial Function in Patients with Breast Cancer After Treatment with Anthracyclines. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 107, n. 5, p. 411-419, 2016.
- YIN, Jie et al. l-Cysteine metabolism and its nutritional implications. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 1, p. 134-146, 2016.
- YOSHIDA, K. et al. Preventive effect of Daiokanzoto (TJ-84) on 5-fluorouracil-induced human gingival cell death through the inhibition of reactive oxygen species production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112689, 2014.
- YOSHIDA, M. et al. S-1 as adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: a randomized phase III study (ACTS-CC trial). **Annals of oncology**, v. 25, n. 9, p. 1743-1749, 2014.
- YOSHINO, F. et al. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82834, 2013.
- ZEB, A; ULLAH, F. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2016, 2016.
- ZBINDEN, A; BOSTANCI, N; BELIBASAKIS, G. N. The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 177-182, 2015.
- ZHANG, C. et al. Chemotherapy plus estramustine for management of castration-resistant prostate cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. **Actas Urológicas Españolas (English Edition)**, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2014.
- ZHAO, H. et al. Endogenous hydrogen sulphide attenuates NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation by suppressing the P2X7 receptor after intracerebral haemorrhage in rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 163, 2017.

ZOU, Xiang-cai; WANG, Qi-wen; ZHANG, Ji-min. comparison of 5–fu-based and Capecitabine-based Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer: A Meta-analysis. **Clinical colorectal cancer**, v. 16, n. 3, p. e123-e139, 2017.

ANEXOS

Anexo 1. Carta do parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, n. 1309, Parnaíba, Piauí, Brasil (CEP) 64201-900
 Telefone: (88) 321-5211 e-mail: comite@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS EFEITOS DA L-CISTEÍNA (L-CIS) NA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR 5-FU", registrada nº 002/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros do Curso de Biologia do Campus Ministro Reis Velloso/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 14/12/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Março/ 2019 à Junho/ 2019
Espécie/União/geminação	Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i> / Golden)
Nº de Animais	34
Peso/ Idade	60 – 140g/ 30 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Parnaíba, 14 de Dezembro de 2018.


 Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
 (Coordenador da CEUA/OMRV-UFPI)