



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

REYCA RODRIGUES E SILVA

**EFEITO DO β -CARIOFILENO EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DA
COX-2**

**PARNAÍBA
2018**

REYCA RODRIGUES E SILVA

**EFEITO DO β -CARIOFILENO EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DA
COX-2**

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

Área de concentração: Medicina I

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

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

PARNAÍBA
2018

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

S586e Silva, Reyca Rodrigues e.
Efeito do β -Cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por
5-fluorouracil: papel da via do óxido nítrico e da COX - 2 [manuscrito] /
Reyca Rodrigues e Silva. – 2018.
118 f. : il.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade
Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.
Co-Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.
Área de Concentração: Medicina I.

1. Antineoplástico. 2. Beta-cariofileno. 3. Inflamação. 3. 5-fluorouracil.
I. Título.

CDD: 610.7

REYCA RODRIGUES E SILVA

**EFEITO DO β -CARIOFILENO EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DA
COX-2**

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

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Gilberto Santos Cerqueira/Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas
– UFPI (Orientador)

Dr. Jand Venes Rolim Medeiros/Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas – UFPI (Co-orientador)

Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar/ Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas – UFPI (Examinador Externo)

PARNAÍBA
2018

*“A mente que se abre à uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, paciência e por ter me concedido esta oportunidade.

Aos meus pais e entes queridos, pelo amor, suporte, compreensão e carinho incondicional.

Ao Dr. Gilberto Santos Cerqueira e ao Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, pela prestatividade, suporte e atenção, assim como a toda equipe dos laboratórios LAFEXX e NEMPI.

À amiga Dainesy Santos Martins por ter me ajudado em todas as etapas dos experimentos, ainda que nos cansativos fins-de-semana.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram para que eu conseguisse esta vitória.

À todos, os meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Câncer.....	16
2.2 Quimioterapia.....	18
2.3 Efeitos colaterais.....	22
2.4 5-Fluorouracil.....	26
2.5 Mucosite.....	26
2.6 O estresse oxidativo e a resposta inflamatória na mucosite intestinal.....	28
2.7 Produtos naturais.....	32
2.8 Terpenos.....	33
2.9 Beta-cariofileno.....	36
2.10 Receptores canabinóides.....	40
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Geral.....	42
3.2 Específicos.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Animais.....	43
4.2 Drogas e Reagentes.....	43
4.3 Considerações éticas.....	43
4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	43
4.5 Grupos experimentais.....	44
4.6 Análise Ponderal.....	45
4.7 Análise Morfométrica e Histopatológica.....	47
4.8 Leucograma.....	6
4.9 Dosagem dos níveis de Malondialdeído (MDA).....	46
4.10 Análise da concentração de Glutathione (GSH).....	47
4.11 Determinação da concentração de mastócitos.....	47
4.12 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	48
4.13 Avaliação imunohistoquímica para detecção de IL-1 β	48
4.14 Papel do óxido nítrico no efeito protetor do β -cariofileno no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	49
4.15 Papel da COX no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	50
4.16 Análises Estatísticas.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Efeito do beta-cariofileno sobre a perda ponderal induzida por 5-FU.....	52
5.2 Efeito do β -cariofileno nas alterações histopatológicas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal de camundongos.....	54
5.3 Efeito do tratamento com β -cariofileno nos escores histopatológicos de	56

modelo experimentais de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	
5.4 Efeito do beta-cariofileno nas alterações morfológicas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal em camundongos.....	57
5.5 Efeito do beta-cariofileno sobre a contagem de leucócitos em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU.....	59
5.6 Efeito do beta-cariofileno sobre os níveis de MDA induzidos por 5-FU na mucosa intestinal de camundongos.....	60
5.7 Efeito do beta-cariofileno sobre os níveis de GSH em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU.....	62
5.8 Efeito do β -cariofileno sobre a contagem de mastócitos em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU.....	64
5.9 Efeito do beta-cariofileno sobre os níveis de MPO em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU.....	66
5.10 Efeito do β -cariofileno sobre a expressão de IL-1 β no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	68
5.11 Papel do óxido nítrico no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	71
5.11.1 Efeito do L-NAME, L-Arginina e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas e morfológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	73
5.12 Papel da COX-2 no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	74
5.12.1 Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas e morfológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	74
5.12.2 Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a expressão de COX-2 em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	77
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	114
Anexo I.....	115

RESUMO

A mucosite é uma síndrome caracterizada por ulceração de toda mucosa do trato gastrointestinal e ocorre em cerca de 40% dos pacientes com câncer tratados com o 5-fluorouracil, porém ainda não existe uma abordagem terapêutica específica para esta patologia. O β -cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno que vem sendo amplamente estudado, por demonstrar efeito antioxidante e anti-inflamatório em diversas condições inflamatórias. Neste contexto, o presente estudo visa investigar o efeito do BCF em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Camundongos *Swiss* machos receberam salina (0,9%, i.p.) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p. dose única). Após 24h da administração de 5-FU, administrou-se BCF (10, 30 ou 100 mg/kg, gavagem) nos dias 2 e 3, e os animais foram eutanasiados no quarto dia do protocolo experimental. Os segmentos do intestino delgado foram coletados para a análise dos seguintes parâmetros: perda ponderal, alterações histológicas, leucograma, dosagens de MDA, GSH, MPO, contagem de mastócitos e marcação de IL-1 β e COX-2 por imuno-histoquímica. O BCF não preveniu a perda de peso induzida pelo 5-FU, porém, na dose de 10 mg/kg, preveniu a leucopenia e reduziu as alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico no duodeno. O BCF também reduziu ($p < 0,05$) parâmetros oxidativos (por diminuir os níveis de MDA e aumentar GSH) e a parâmetros inflamatórios (por reduzir os níveis de mastócitos, MPO e expressão de IL-1 β e COX-2) induzida pelo 5-FU. No duodeno, a administração de L-NAME ou celecoxibe não reverteu o efeito do BCF, reduzindo as alterações histopatológicas induzidas pelo 5-FU. Diante disto, os resultados indicam que o BCF apresenta efeitos protetor, antioxidante e anti-inflamatórios, sem participação da via do óxido nítrico ou da COX-2, no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Palavras-Chave: Antineoplásico. Beta-cariofileno. Inflamação. 5-Fluorouracil

ABSTRACT

Mucositis is a syndrome characterized by ulceration of the gastrointestinal mucosa and occurs in nearly 40% of cancer patients treated with 5-fluorouracil, but there is no specific therapeutic approach for this pathology. β -caryophyllene (BCF) is a sesquiterpene that has been extensively studied, since it demonstrates antioxidant and anti-inflammatory effects in several inflammatory conditions. Thus, the present study aims to investigate the effect of BCF on 5-FU-induced intestinal mucositis model. Male Swiss mice received saline (0.9%, i.p.) or 5-FU (450 mg / kg, i.p. single dose). After 24 hours of 5-FU administration, BCF (10, 30 or 100 mg/kg, gavage) was given on days 2 and 3, and the animals were euthanized on the fourth day of the experimental protocol. Segments of the small intestine were collected for analysis of the following parameters: weight loss, histological changes, leukogram, MDA, GSH, MPO, mast cell counts, and IL-1 β and COX-2 labeling by immunohistochemistry. BCF did not prevent 5-FU induced weight loss, but at a dose of 10 mg/kg, it prevented leucopenia and reduced histopathological changes induced by chemotherapy in the duodenum. BCF also reduced ($p < 0.05$) oxidative parameters (by decreasing MDA levels and increasing GSH) and inflammatory parameters (by reducing mast cell levels, MPO and IL-1 β and COX-2 expression) induced by 5-FU. In the duodenum, administration of L-NAME or celecoxib did not reverse the effect of BCF, reducing histopathological changes induced by 5-FU. Therefore, the results indicate that BCF has protective, antioxidant and anti-inflammatory effects, without participation of the nitric oxide or COX-2 pathway, in the duodenum of the 5-FU induced intestinal mucositis model.

Keywords: Antineoplastic. Beta-caryophyllene. Inflammation. 5-Fluorouracil

LISTA DE SIGLAS

5-FU – 5-fluorouracil

BCF – beta-cariofileno

CA - câncer

CAT - catalase

CB1 – receptores canabinóides tipo 1

CB2– receptores canabinóides tipo 2

DMAPP - dimetilalil difosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

dTMP - deoxitimidina monofosfato

EROS – espécies reativas de oxigênio

FdUMP - fluorodeoxiuridina monofosfato

FdUTP - fluorodeoxiuridina trifosfato

FUTP - fluorouridina trifosfato

GI - gastrointestinal

GSH - glutationa

INOS – óxido nítrico sintase induzível

MAPK - proteínas quinase ativadas por mitógenos

MMP1 - metaloproteinases 1

MMP3 - metaloproteinases 1 e 3

MPO – mieloperoxidase

mRNA – RNA mensageiro

NK – células *Natural Killer*

PPAR - peroxisome proliferator-activated receptor γ

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossômico

SOD - superóxido dismutase

TNFR1 – receptor de fator e necrose tumoral tipo 1

TNFR2– receptor de fator e necrose tumoral tipo 2

tRNA – RNA transportador

TS – timidilato sintase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As principais características do câncer.....	17
Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil.....	22
Figura 3. Fases no desenvolvimento da mucosite.....	23
Figura 4. Sinais de amplificação durante mucosite.....	27
Figura 5. Desenvolvimento da mucosite intestinal.....	29
Figura 6. Sesquiterpenos interferem em diferentes etapas iniciais da resposta inflamatória generalizada.....	36
Figura 7. Estrutura química do β -cariofileno.....	39
Figura 8. Distribuição de receptores canabinóides no trato gastrointestinal.....	40
Figura 9. Delineamento experimental para indução de mucosite intestinal com 5-FU e tratamento com beta-cariofileno.....	45
Figura 10. Efeito do β -cariofileno na variação de peso corporal em camundongos submetidos a mucosite intestinal po 5-FU.....	53
Figura 11. Efeito do β -cariofileno nas alterações microscópicas da mucosa intestinal de camundongos submetidos à mucosite intestinal por 5-FU.....	55
Figura 12. Efeito do β -cariofileno na altura dos vilos e profundidade das criptas na mucosa intestinal de camundongos submetifos a mucosite intestinal por 5-FU.....	58
Figura 13. O β -cariofileno reduz a contagem global de leucócitos no sangue periférico de camundongos em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	59
Figura 14. O β -cariofileno reduz os níveis de MDA no duodeno e jejuno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	61
Figura 15. O β -cariofileno reduz os níveis de GSH no duodeno e jejuno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	63
Figura 16. O β -cariofileno reduz a contagem de mastócitos no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	64
Figura 17. Efeito do β -cariofileno sobre a contagem de mastócitos no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	65
Figura 18. O β -cariofileno reduz os níveis de MPO do duodeno e jejuno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	67
Figura 19. O β -cariofileno reduz a imunomarcção de IL-1 β no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	69
Figura 20. O β -cariofileno reduz a porcentagem de área imunomarcada para IL-1 β no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	70
Figura 21. Efeito do L-NAME, L-Arginina e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	62
Figura 22. Efeito do L-NAME, L-Arginina e β -cariofileno sobre as alterações morfométricas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.	73
Figura 23. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações	75

histopatológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	
Figura 24. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações morfológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.	76
Figura 25. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a imunomarcção de COX-2 no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	78
Figura 26. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a área imunomarcada para COX-2 no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de agentes quimioterápicos.....	19
Tabela 2. Níveis de intensidade de mucosite induzida por 5-FU.....	46
Tabela 3. Efeito do tratamento com beta-cariofileno nos escores histopatológicos de modelo experimentais de mucosite intestinal induzida por 5- FU.....	56

1 INTRODUÇÃO

O uso de drogas quimioterápicas e suas combinações, além da radioterapia e remoção cirúrgica dos tumores, são as formas de tratamento atualmente empregadas no tratamento do câncer (DESANTIS et al., 2014). No entanto, a utilização de quimioterápicos no tratamento do câncer está associada à ocorrência de diversos efeitos colaterais, tais como distúrbios gastrointestinais (GI), como é o caso da mucosite intestinal (ROY et al., 2014; AL-ASMARI et al., 2015).

A mucosite é uma síndrome caracterizada por ulceração de toda mucosa do trato gastrointestinal, e a intensidade dos sintomas depende de fatores, como idade, status de saúde, tipo, dose e frequência de administração da droga (FILHO et al., 2016). Por serem não-seletivos, drogas, como o 5-fluorouracil (5-FU), atacam ambas células tumorais e células normais em constante divisão, como é o caso das células do intestino, resultando em destruição das células basais e dos tecidos de conexão da mucosa GI (VILLA; SONIS, 2015).

Assim, os pacientes tratados com 5-FU podem apresentar sintomas como fadiga, desnutrição, desidratação, dor abdominal, diarreia, sangramento e desequilíbrio eletrolítico (KIM et al., 2015). Atualmente, ainda não existe tratamento específico para a mucosite, e as intervenções farmacológicas são usadas para bloquear o processo inflamatório e/ou para manter a homeostase do intestino (CHEN et al., 2016).

Considerando-se os altos custos e a baixa eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis, o desenvolvimento de terapias alternativas, como a utilização de produtos naturais, tem sido considerado (ÁVILA et al., 2015). Os vegetais constituem as principais fontes de substâncias de importância terapêutica, uma vez que possuem um amplo acervo estrutural de metabólitos com propriedades farmacológicas de grande importância, que podem ser utilizados no tratamento de mucosite (SRIVASTAVA; PANDEY, 2015).

O β -cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno bicíclico natural, encontrado em plantas como canela (*Cinnamomum spp.*), orégano (*Origanum vulgare L.*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata L.*) (SARPIETRO et al., 2014). Este sesquiterpeno tem sido amplamente estudado, por demonstrar efeitos anestésicos, anti-inflamatórios e ansiolíticos, e por prevenir colite e nefrotoxicidade, por meio da ativação de receptores canabinóides CB2 (AL

MANSOURI et al., 2014). No trato GI, os receptores CB2 são encontrados em neurônios entéricos e têm um papel fundamental na regulação da motilidade anormal, da inflamação intestinal e na redução da sensibilidade e dor visceral (BAKALI et al., 2015).

Apesar de já terem sido relatados diversas propriedades do BCF, pesquisas sobre a utilização desta molécula, especificamente, no tratamento da mucosite ainda são inexistentes, até o presente momento. Desta forma, este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito do β -cariofileno na modulação da inflamação em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, assim como verificar o papel do óxido nítrico e do COX-2 nos possíveis mecanismos de ação deste sesquiterpeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

Cerca de 8,2 milhões de pessoas morrem por ano de câncer (CA) no mundo, sendo, portanto, considerado um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento (INCA, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, foram constados cerca de 14 milhões de novos casos de câncer em 2012 no mundo e estima-se que este valor aumente em 70% nas próximas 2 décadas. No Brasil, mais de 596 mil casos da doença foram estimados para o ano de 2016 (INCA, 2016).

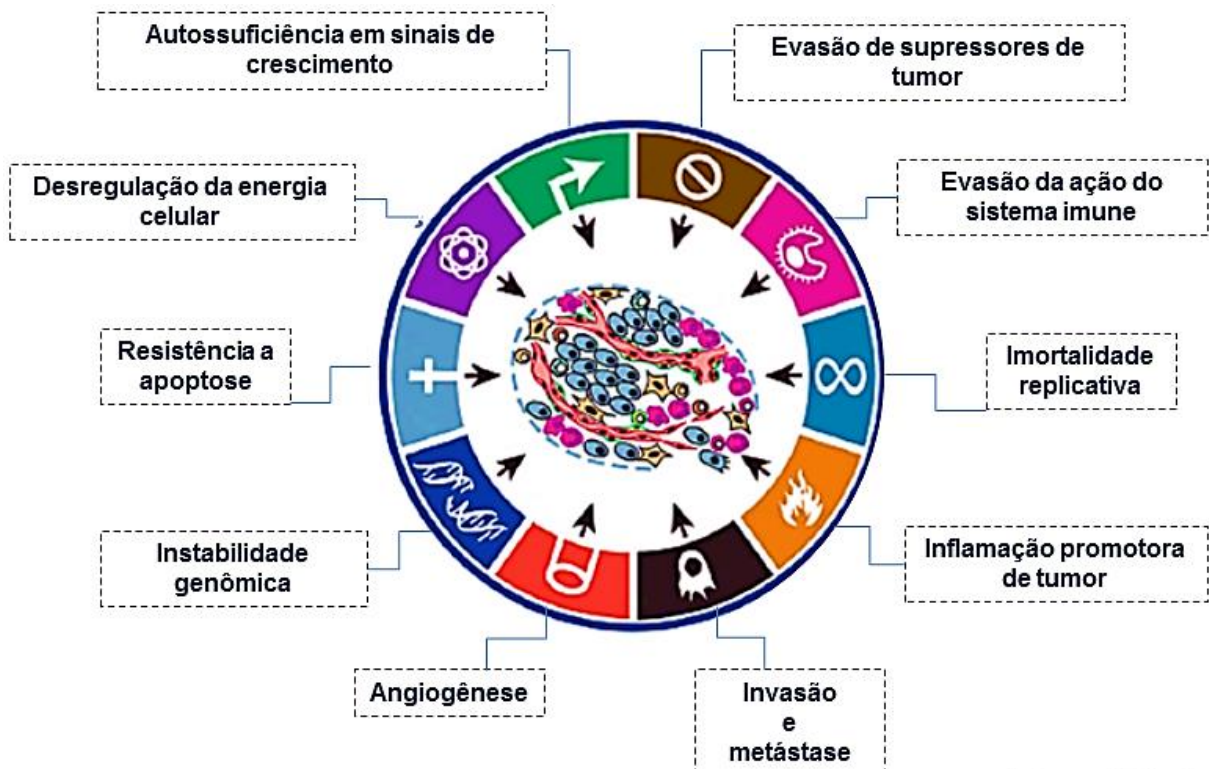
O CA é uma doença multigênica, multicelular e de etiologia multifatorial, que pode se originar a partir de qualquer tipo de célula e órgão (DESANTIS et al., 2014). No decorrer dos anos, grandes avanços foram feitos no entendimento da doença e atualmente sabe-se que diversos mecanismos patológicos complexos estão relacionados ao seu desenvolvimento e progressão (DIAZ-CANO, 2015).

Nesta patologia, as células cancerosas sofrem alterações nos ciclos de crescimento e divisão celular, assim como anormalidades metabólicas e funcionais (COLLER, 2014). Estas alterações se devem ao acúmulo de mutações somáticas, que podem afetar a integridade estrutural do DNA, ou a alterações epigenéticas, que alteraram a expressão do DNA, promovendo o silenciamento de regiões promotoras de importância, ao mesmo tempo em que ocorrem defeitos na maquinaria de reparo (WU; ZHAO, 2013; SEYFRIED et al., 2014).

Além disso, estudos têm evidenciado a facilitação do processo de carcinogênese por radicais livres, principalmente Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), durante o estresse oxidativo (SCHUMACKER, 2015; RECZEK; CHANDEL, 2016). Este processo é definido quando há o desequilíbrio entre a produção excessiva e, conseqüentemente, o acúmulo de EROs associado a redução na produção de defesas antioxidantes (ORTEGA-VILLASANTE et al., 2016). Assim, as EROs podem provocar instabilidade genômica, modificar a expressão de genes, além de promover novas mutações, levando à senescência e apoptose da célula (SOSA et al., 2013; YANG et al., 2016).

Hanahan e Weinberg (2011) registraram as dez principais características do câncer: 1) a autonomia na proliferação, ainda que na ausência de fatores de crescimento; 2) habilidade de evadir os mecanismos de indução de parada celular por fatores supressores de crescimento; 3) capacidade para auto-reprogramação metabólica; 4) mecanismos de resistência aos mecanismos de indução de apoptose; 5) alto potencial replicativo; 6) indução de angiogênese; 7) capacidade de deslocamento e invasão de outros tecidos; 9) promoção de inflamação nos tecidos normais; e, 10) aquisição de mudanças nos genes, causando instabilidade genômica (Figura 1).

Figura 1. As principais características do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

A partir do conhecimento das características do câncer e dos processos que induzem carcinogênese, além da cirurgia, foram desenvolvidas diversas abordagens no tratamento da doença, tais como quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia e imunoterapia (FARKONA et al., 2016).

2.2 Quimioterapia

A quimioterapia é uma das principais e mais efetivas terapias empregadas no tratamento de diversos tipos de câncer (ASLAM et al., 2014). Por meio do tratamento com agentes quimioterápicos, tanto os casos de câncer em estágio inicial como os casos mais avançados apresentam uma maior taxa de sobrevivência, com redução taxa de reincidência ou metástase (LIU; LV; YANG, 2015).

O alvo da quimioterapia é interferir no processo de proliferação celular, induzindo a parada do ciclo celular ou promovendo a morte de células cancerosas (CHAN; ISLMAIL, 2014). Assim, muitos quimioterápicos foram desenvolvidos com o objetivo de interferir em diferentes mecanismos fundamentais para divisão celular, enquanto que outros atuam de modo a destruir células cancerosas por meio da indução de estresse oxidativo, no qual as EROs induzem apoptose ou necrose celular (SAK, 2012).

De acordo com seu mecanismo de ação, a estrutura química e interação com outras drogas, os agentes quimioterápicos são classificados em diferentes categorias: agentes alquilantes, antimetabólitos, taxanos, antraciclinas e derivados de platina (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013). A classificação, os mecanismos de ação e exemplos de quimioterápicos foram resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação de agentes quimioterápicos

Tipo	Mecanismo	Exemplos
Agentes Alquilantes	Modificam grupos funcionais de ácidos nucleicos	Ciclofosfamida, dacarbazine
Antimetabólitos	São análogos de nucleosídios, comprometendo a síntese de DNA e RNA	5-fluorouracil, gencitabina
Taxanos	Corrompem a formação de microtúbulos, interrompendo a divisão celular	Placitaxel, docetaxel
Antraciclinas	Interferem na ação da maquinaria de replicação do DNA	Doxorrubicina, epirrubicina
Derivados de platina	Formam <i>cross-links</i> no DNA	Cisplatina, carboplatina, oxiplatina

Fonte: WEIR; LIWSKI; MANSOUR, 2011

Durante todas as etapas do ciclo celular, os agentes alquilantes fazem *cross-links* nos resíduos de guanina n-7, causando quebras no DNA, que resultam em erros de pareamento de bases, inibição da divisão celular e, conseqüentemente a morte de células cancerosas (KONDO et al., 2013). Os antimetabólitos induzem citotoxicidade por meio da interrupção de processos biossintéticos na célula, ou promovendo a parada da replicação do DNA, uma vez que podem ser incorporados a molécula, como é o caso do 5-fluorouracil (VALENZUELA; NEIDIGH; WALL, 2014).

Os taxanos, por sua vez, também conhecidos como inibidores mitóticos ou inibidores de microtúbulos, induzem citotoxicidade por meio da inibição do crescimento e divisão celular, separação de cromátides e, conseqüentemente, morte celular (KANG et al., 2016). As antraciclinas, como a doxorrubicina e epirrubicina, agem se intercalando ao DNA, induzindo quebras na fita, bloqueando a ação da topoisomerase II, o que dificulta os processos de transcrição e replicação, além de produzirem EROs (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2015).

Já os derivados de platina induzem citotoxicidade pela sua capacidade de causar danos ao DNA, por meio da formação de *cross-links* com bases purínicas, interferir nos mecanismos de reparo da molécula, produzir EROs e, conseqüentemente, induzir apoptose de células cancerosas (JOHNSTONE; PARK; LIPPARD, 2014; DASARI, TCHOUNWOU, 2014). Além disso, a terapia hormonal consiste em uma abordagem alternativa, na qual substâncias similares a hormônios promovem um efeito citostático nas células cancerosas, limitando o crescimento de

tumores que se desenvolvem por estimulação hormonal (BRITO; PORTELA, VASCONCELLOS, 2014).

Apesar da variedade de quimioterápicos disponíveis, há relatos a cerca da toxicidade destas drogas no organismo (KEPLIN et al., 2014). Pelo fato de alguns quimioterápicos poderem afetar também tecidos saudáveis, a aplicabilidade deste tipo de terapia pode resultar em toxicidade, resistência das células tumorais e, até mesmo, uma segunda neoplasia (QUIÑONES; LEE, 2015).

2.3 Efeitos colaterais

Concomitantemente ao crescente número de novos casos de câncer no mundo, muitos efeitos adversos relacionados ao uso de quimioterápicos têm sido relatados (CHAN; ISMAIL, 2014). Os quimioterápicos destroem células cancerosas, ao mesmo tempo em que células normais também são afetadas (ASLAM et al., 2014). Por isso, a aplicação deste tipo de terapia ainda é de alto risco, considerando-se a dificuldade de se tratar os efeitos colaterais (HASSAN, 2012).

No início, acreditava-se que drogas quimioterápicas destruíssem apenas células cancerosas, mas agora se sabe que células normais também são passíveis de danos, principalmente por drogas genotóxicas, resultando em efeitos colaterais dose-dependentes e até mesmo morte (CHAN; ISMAIL, 2014). Pelo fato de boa parte deste efeito genotóxico ser causada pela geração de EROs, muitos dos efeitos adversos observados durante o tratamento estão associados a promoção de estresse oxidativo pelos antineoplásicos nos pacientes (ASLAM et al., 2014).

Estes efeitos podem ocorrer de forma aguda (nas primeiras semanas de tratamento), intermediária ou tardia (meses ou anos após o tratamento), e a intensidade pode variar do grau suave ao intenso, de acordo com o tipo e a combinação de quimioterápicos utilizados (KEPLIN et al., 2014). Ainda, o mecanismo de ação de cada agente quimioterápico pode predizer os possíveis efeitos adversos: agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II aumentam o risco de câncer secundário, com é o caso de leucemia aguda e linfomas não-Hodgkins; antraciclinas podem induzir cardiotoxicidade; e inibidores mitóticos podem causar danos a nervos periféricos (SAK, 2012).

De modo geral, os efeitos mais comumente relatados são supressão da medula óssea, sangramento, neuropatias, alopecia, distúrbios gastrointestinais e

outros (OHNISHI; TAKEDA, 2015). Os queratinócitos da matriz capilar, as células hematopoiéticas normais e células epiteliais do intestino são normalmente as mais susceptíveis aos efeitos tóxicos causados por quimioterápicos (VANHOECKE et al., 2015). Adicionalmente, há relatos de que agentes quimioterápicos também podem levar a toxicidade de outros tecidos, como a pele, resultando em interrupção ou descontinuação do tratamento, reduzindo a qualidade de vida de pacientes oncológicos (FABBROCINI et al., 2013).

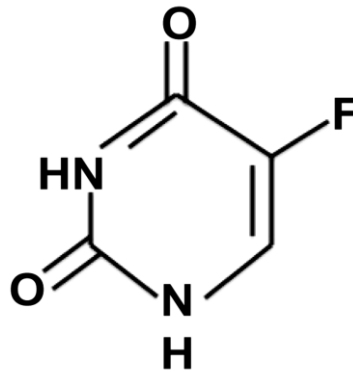
A redução da dose ou aumento no intervalo de administração das drogas consiste em umas das estratégias para reverter tais reações adversas (DAUGHTON; RUBOY, 2013). Além disso, uma boa nutrição, suplementação nutricional, como com a utilização de vitaminas, e a utilização da medicina alternativa e outros medicamentos administrados antes da terapia quimioterápica podem prevenir as reações de hipersensibilidade provocadas por estas drogas (MASTELARO et al., 2016).

Desta forma, medidas eficazes no tratamento de efeitos adversos causados pela quimioterapia são necessárias e fundamentais para a melhora da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que podem determinar na sua disposição para completar o tratamento (CHAN; ISMAIL, 2014).

2.4 5-Fluorouracil

O 5-fluorouracil ($C_4H_3FN_2O_2$) é um agente antineoplásicos da classe de antimetabólitos, por ser um análogo de uracila com um átomo de fluorina na posição C-5 (CHEN et al., 2016). A citotoxicidade da droga se dá pelo fato de agir diretamente na síntese de ácidos nucleicos e, por isso, é utilizada contra câncer de esôfago, estômago e mama, além de ser empregado como droga de primeira linha no tratamento câncer colorretal metastático (VAN DER KRAAK et al., 2016; PEREIRA et al., 2016) (**Figura 2**).

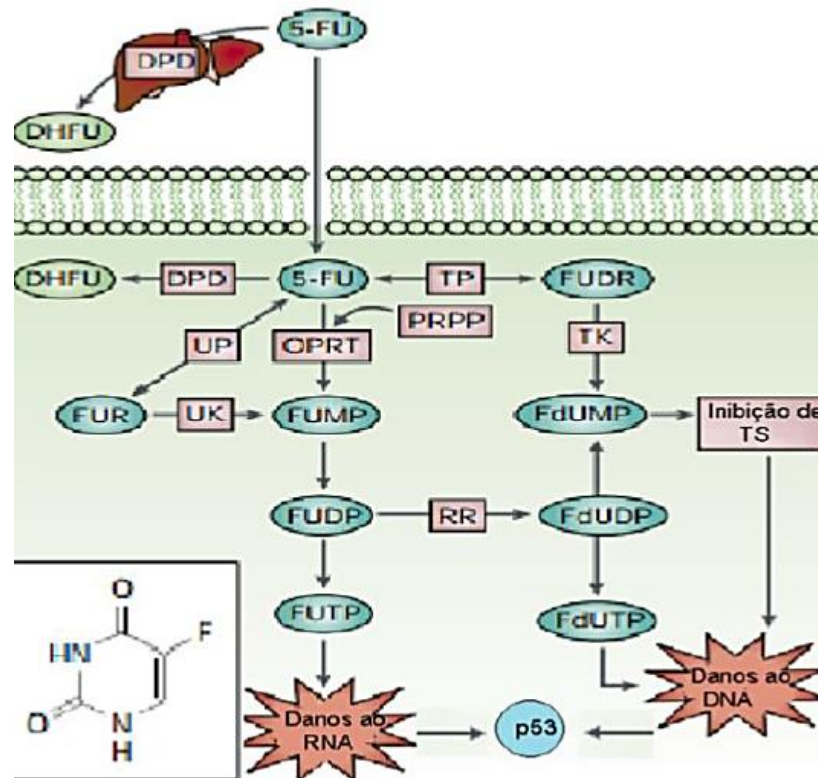
Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil



Fonte: Valenzuela; Neidigh; Wall, 2014

No fígado e no trato gastrointestinal, o 5-FU é catabolizado por uma série de reações enzimáticas, levando à formação dos seguintes metabólitos ativos que estão relacionados com a sua citotoxicidade: 1) fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), pela ação das enzimas timidina fosforilase (TP) e timidina quinase (TK); 2) fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP), por meio da ação de fluorouridina difosfato; e, 3) fluorouridina trifosfato (FUTP), pela ação da ribonucleotideo redutase (RR) (**Figura 3**) (VAN DER KRAAK et al., 2016).

Figura 3. Metabolização e mecanismos de ação do 5-FU



Fonte: Adaptado de Longley, Harkine, Johnston, 2003

Uma vez formados, estes nucleotídeos exercem seus efeitos citotóxicos por meio de sua incorporação ao DNA ou RNA, assim como inibição a síntese de timidilato sintase (TS) (KAEHLER et al., 2014; VAN DER KRAAK et al., 2016). O 5-FdUMP é capaz de formar uma ligação estável e, conseqüentemente, inibir as enzimas TS e deoxitimidina monofosfato (dTMP), resultando em bloqueio da síntese e reparo do DNA e, por fim, apoptose (DANENBERG et al., 2016).

A incorporação de 5-FdUTP ao DNA, promove a quebra da fita de DNA, comprometendo também a síntese de RNA, resultando em morte da célula cancerosa (GROVES et al., 2017). No RNA, o 5-FUTP incorporado bloqueia o processamento e a maturação de rRNA, tRNA e precursores de mRNA (KAEHLER et al., 2014). Ainda, a falha nos mecanismos de reparo por excisão de base também levar a um ciclo repetitivo de incorporação errônea destes metabólitos ao DNA, acentuando a fragmentação das fitas da molécula. Assim, os danos ao DNA e RNA levam a ativação do supressor tumoral p53, o qual pode ativar genes pró-apoptóticos, levando a morte da célula (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Concomitantemente a estes efeitos, há relatos sobre a indução de citotoxicidade por 5-FU via promoção de estresse oxidativo (SOSA, 2013). Segundo Gorrini e colaboradores (2013), 5-FU promove aumento na formação de EROs na mitocôndria, via ativação por p53, levando a célula à morte por estresse oxidativo. Um ensaio *in vivo* também demonstrou a indução de estresse oxidativo na mitocôndria por 5-FU, levando a peroxidação lipídica e de proteínas da organela e apoptose de células de câncer de cólon (SANTANDREU et al., 2011).

Contudo, há relatos de que a promoção de estresse oxidativo pela droga afeta tecidos normais, acometendo mais de 30% dos pacientes com efeitos adversos, tais como mucosite, diarreia, vômito, queda de apetite e fotossensibilidade (THOMAS et al., 2016). Ainda, estudos recentes relatam que o 5-FU pode induzir hepatotoxicidade (CAI et al. 2014), mielossupressão (LIU; LI; LI, 2017), toxicidade renal (RASHID et al., 2014), cardiotoxicidade (FOCAC CETTI et al., 2015) e toxicidade intestinal (LEE; RYAN; DOHERTY, 2014).

2.5 Mucosite

A mucosite é uma condição que se caracteriza pela degradação e a ulceração progressiva do tecido protetivo da mucosa oral e/ou do TGI (PETERSON et al., 2016). Esta condição resulta de uma série de eventos mediados por citocinas, que promovem a atrofia e ulceração da mucosa oral e/ou intestinal, podendo afetar todo o epitélio de revestimento desde a boca ao ânus (WARDILL; BOWEN; GIBSON, 2014).

Uma das consequências da mucosite gastrointestinal é a significativa perda de nutrientes em consequência de eventos recorrentes de vômitos e diarreia, o que resulta na redução de peso e desnutrição do paciente (KUIKEN; RINGS; TISSING, 2015). Além disso, a ulceração severa dos epitélios das mucosas oral e gastrointestinal resulta no aumento de risco para infecções, devido à facilitação para a entrada de bactérias e outros agentes patogênicos para o sistema circulatório (VAN SEBILLE et al., 2015).

A mucosite pode ser causada por doenças infecciosas, deficiência imune e medicações, tais como drogas quimioterápicas (REINKE et al., 2015). A indução de mucosite por agentes antineoplásicos ocorre pelo fato de serem drogas não-seletivas, incapazes de diferenciarem células cancerosas de células normais com

rápida divisão celular, como as células intestinais, resultando na destruição de células basais e em dano aos tecidos conectivos do TGI (MOSLEMI et al., 2016).

As estimativas indicam que todos os pacientes que recebem tratamento radioterápico da cabeça e pescoço e, aproximadamente, 20 a 40% dos pacientes que recebem quimioterapia convencional desenvolvem esta condição (VILLA; SONIS, 2015). Mais especificamente, a quimioterapia com 5-FU leva a uma incidência de aproximadamente 40% de mucosite severa do TGI nos pacientes que recebem este tipo de terapia (ARAÚJO et al., 2015). Ainda, o risco para o desenvolvimento de mucosite está diretamente relacionado a modalidade, intensidade e via de administração da droga, observando-se uma maior intensidade da doença nos casos quando ocorre a combinação de terapias (VANHOECKE et al., 2015).

Histologicamente, dependendo da região afetada, a mucosite se caracteriza por aumento de apoptose, atrofia das vilosidades, hiperplasia e dilatação das criptas, perda de epitélio, necrose, inflamação e excessiva secreção da mucosa (VAN SEBILLE et al., 2015). Os mecanismos fisiopatológicos de mucosite oral foram definidos em um modelo de 5 fases (iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e cicatrização), baseado em uma interação bioquímica dinâmica entre drogas quimioterápicas e constituintes da mucosa, além processos indiretos de sinalização (GIORGIOU et al., 2012)

A primeira etapa deste processo é a iniciação. Nela, a quimioterapia causa dano direto ao DNA, provocando quebra das fitas do material genético de uma pequena porção de células epiteliais basais e suprabasais (KUIKEN; RINGS; TISSING, 2015). Uma maior proporção de danos teciduais é resultante da ação de EROs altamente reativos gerados após a quimioterapia, que podem causar a desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e degradação de nucleotídeos, resultando em apoptose (KWON, 2016).

Na fase de sinalização, as EROs produzidas em excesso durante a quimioterapia induzem apoptose e promovem a ativação de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas IL-1 β e IL-6) e de fatores de transcrição (fator de transcrição nuclear-Kappa B (NF- κ B)) (GENEROSO et al., 2015). A ativação de NF- κ B leva a expressão de vários genes associados com a produção de citocinas pró-inflamatórias, citocinas moduladoras, enzimas de resposta ao estresse oxidativo (tais como ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico

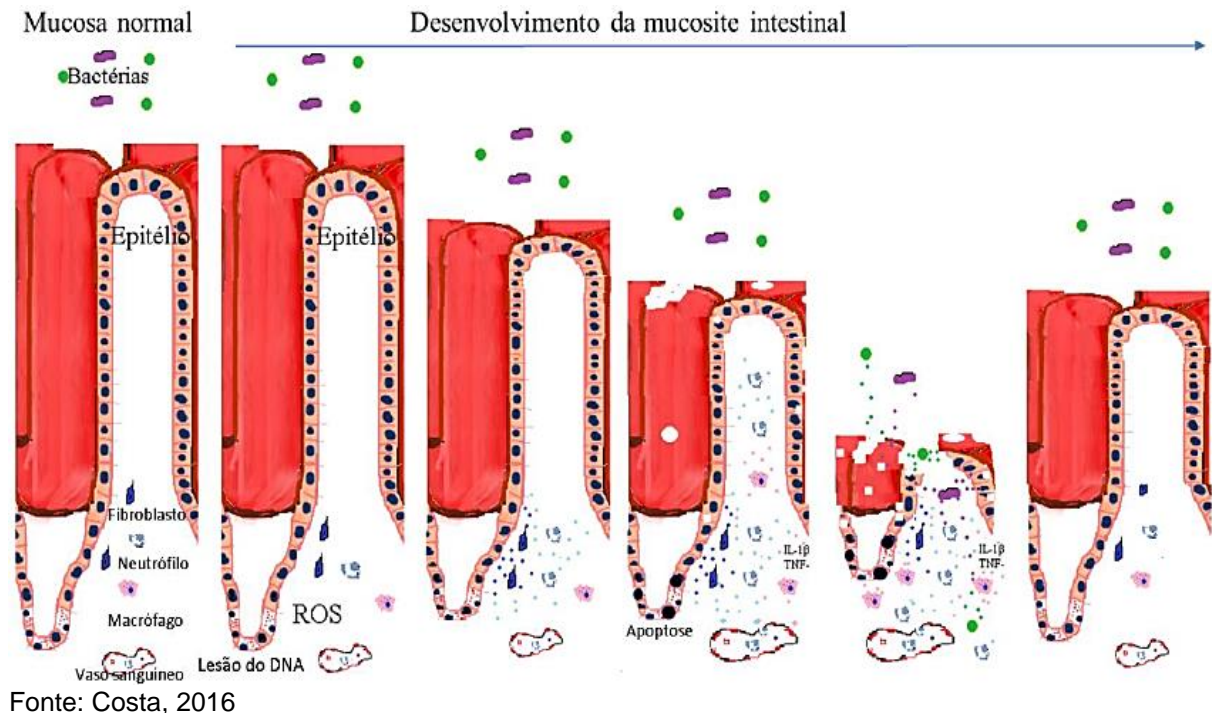
sintase induzível (iNOS) e superóxido dismutase (SOD)) e moléculas de adesão celular, além de também levar a apoptose (VILLA; SONIS, 2015).

Na fase seguinte, a de amplificação, mais citocinas inflamatórias são produzidas, uma vez que TNF- α pode promover um *feedback* positivo na ativação de NF- κ B, amplificando as cascatas de sinalização de quinase c-Jun N-terminal e, conseqüentemente, causando danos teciduais (VASCONCELOS et al., 2016). Durante a ulceração, a perda da integridade da mucosa produz lesões extremamente dolorosas, propiciando a entrada para microrganismos, principalmente de bactérias, que promovem a ativação e infiltração de macrófagos na estimulação do processo inflamatório (CHAVELI-LÓPEZ; BAGÁN-SEBASTIÁN, 2016).

Ainda nesta etapa, a subsequente colonização bacteriana leva a um ciclo contínuo de dano mediado por citocinas inflamatórias (STRINGER, 2016). No último estágio, o de cicatrização, envolve a sinalização via matriz extracelular, onde ocorre a proliferação, diferenciação e migração de células do epitélio, que, aos poucos, vão reestabelecendo a integridade da mucosa (KWON, 2016).

Contudo, segundo Costa (2016), a mucosite intestinal não apresenta fases bem definidas, como ocorre na mucosite oral. Na mucosa normal, macrófagos e neutrófilos encontram-se inativos e em poucas quantidades, porém, com a quimioterapia, EROs são produzidos excessivamente e o DNA sofre lesões. Além disso, os neutrófilos são ativados, induzindo a apoptose de células intestinais pela ação da mieloperoxidase, e as EROs estimulam vias de sinalização e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Por meio desta estimulação, mais células vão sendo destruídas, levando a perda da integridade do epitélio intestinal, onde se observa encurtamento das criptas e alargamento dos vilos, permitindo a entrada de bactérias e conseqüente acentuação da inflamação, com a infiltração leucocitária. Com a finalização da terapia, se inicia o processo de cicatrização, onde o epitélio começa a se reestruturar (**Figura 4**).

Figura 4. Desenvolvimento da mucosite intestinal



Os sintomas relacionados a mucosite gastrointestinal podem incluir diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, desnutrição, desidratação, desequilíbrio eletrolítico e infecções, e outras complicações que podem levar ao óbito (VANHOECKE et al., 2015). O tratamento das mucosite orais e gastrointestinais é um dos principais desafios encontrados durante o período de aplasia medular, uma vez que os graus de desintegração da mucosa e de supressão da medula podem condicionar o risco de sepse (PETERSON et al., 2016).

Durante a descamação epitelial e a inflamação da mucosa, ocorre a ativação de nociceptores aferentes por estimuladores de danos, causando dor, mesmo nas formas não ulcerativas da doença (BONOMI; BATT, 2015). Para o controle deste sintoma, pacientes hospitalizados são tratados com agonistas opióides potentes, como a morfina, e outros analgésicos (WHITTAKER et al., 2016).

O tratamento também inclui reidratação oral agressiva e reposição eletrolítica, além da utilização de medicamentos que reduzem a perda de líquidos ou a mobilidade intestinal (VAN SEBILLE et al., 2015). A persistência de mucosite pode implicar na redução ou no impedimento da administração de drogas na terapia do câncer, podendo vir a comprometer a eficácia do tratamento (TOUCHEFEU et al., 2014).

2.6 O estresse oxidativo e a resposta inflamatória na mucosite intestinal

Na resposta inflamatória, ocorre a liberação de diversos mediadores inflamatórios e células efectoras, com uma grande participação de EROs. Ainda, as EROs promovem a produção e maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (MITTAL et al., 2014). Dentre estas, apresentam uma maior expressão, principalmente, o NF- κ B, TNF- α e as interleucinas IL-1 β e IL-6 (SOARES et al., 2013).

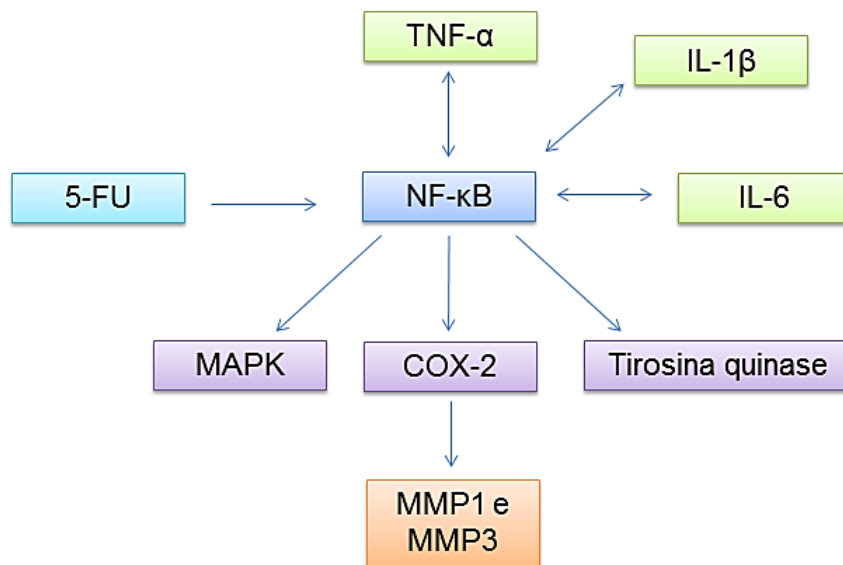
Há relatos de que a administração de 5-FU, na dose de 150 mg/kg, promove o aumento da expressão de NF- κ B e, conseqüentemente, de COX-2 e iNOS (óxido nítrico sintase induzível), além de promover o aumento da peroxidação lipídica, de malondialdeído (MDA) e de mieloperoxidase (MPO) durante a inflamação na mucosite intestinal induzida em ratos. Neste estudo, estas respostas inflamatórias acentuadas são provocados pela excessiva produção de EROs pelo quimioterápico, e são atenuados com a utilização de vitamina E como agente atioxidante (AL-ASMARI et al., 2016).

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 de altos níveis de MDA, estudos também demonstraram uma depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no soro e em amostras de tecidos intestinais de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU (JUSTINO et al., 2014; KIM et al., 2015). A determinação da concentração intracelular de GSH, que é uma importante enzima antioxidante endógena, associada a quantificação de MDA, constitui um importante indicador do perfil oxidativo durante a inflamação (HO et al., 2013).

A avaliação 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 na patofisiologia da inflamação (CASSINI-VIEIRA et al., 2015). Outro importante marcador 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, e é determinante para o entendimento dos efeitos da inflamação (PULLI et al., 2013).

Uma vez que a inflamação também se relaciona com a produção de citocinas, Sonis (2004) explica como se dá a amplificação da geração de citocinas durante a resposta inflamatória na mucosite. Primeiramente, a quimio e radioterapia induzem a transcrição de NF- κ B em células epiteliais, endoteliais, mesenquimais e macrófagos, levando ao aumento na expressão e produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Estas ainda, por *feedback* positivo, amplificam a sinalização na ativação de NF- κ B em outras células, resultando na transcrição de genes de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), COX2 e tirosina quinase, que, por fim, ativam MMP1 e MMP3 (metaloproteinases 1 e 3), resultando em danos teciduais (**Figura 5**)(SONIS, 2004).

Figura 5. Sinais de amplificação durante a mucosite



Fonte: Adaptado de Sonis (2004)

Na revisão realizada por Sultani e colaboradores (2012), é relatado que NF- κ B potencializa o processo inflamatório por meio da indução da produção de TNF, IL-6 e IL-1 β , as quais estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de mucosite.

A família de fatores de transcrição NF- κ B regula a expressão de uma grande variedade de genes relacionados ao processo inflamatório, aos processos de diferenciação e proliferação celular e na resposta imune (HOESEL; SCHMID, 2013). A ativação deste fator pode ocorrer em resposta a patógenos, estresse oxidativo,

carcinógenos e até mesmo outros estimuladores inflamatórios (NAPETSCHING; WU, 2013).

Dentre os mais variados mediadores inflamatórios, o NF- κ B é o regulador central da inflamação (HAYDEN; GHOSH, 2012). Com a ativação por agentes estimuladores, os dímeros inativos de NF- κ B que se encontram associados no citoplasma sofrem a ação do complexo I κ B quinase, levando a fosforilação, ubiquitinação e à degradação deste fator (CILDIR; LOW; TERGAONKAR, 2016).

Os NF- κ B liberados são translocados ao núcleo, onde promovem a transcrição de quase 200 genes específicos, tais como enzimas (COX-2, 5-lipoxigenase e sintase de óxido nítrico induzível iNOS), citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas e fator de necrose tumoral), além de moléculas de adesão, fatores angiogênicos e moléculas reguladoras do ciclo celular (COLLINS; MITXITORENA; CARMODY, 2016). Além disso, a síntese de todas estas proteínas é mediada por uma via de sinalização dependente de NF- κ B (SHIH; WANG, YANG, 2015).

Incluindo os processos de ativação e proliferação celular, os fatores de necrose tumoral também desempenham um papel importante em vários processos na inflamação e resposta imune (BAIZABAL-AGUIRRE et al., 2016). Alguns autores também evidenciaram o aumento na expressão de TNF- α em modelo de mucosite induzidos por quimioterápicos (JÚNIOR et al., 2014; ALVARENGA et al., 2016).

Como citocina pró-inflamatória, o TNF- α pode exercer papel homeostático ou patofisiológico (JAVED, 2014). O TNF- α é primeiramente sintetizado como uma proteína transmembranal (tmTNF- α) e, por meio da ação da enzima de conversão de TNF- α (TACE), ocorre a clivagem da porção extracelular desta proteína e esse fator é liberado e se torna capaz de se ligar a receptores específicos: receptor TNF- α 1 (TNFR1) e receptor TNF- α 2 (TNFR2) (DONG et al., 2015).

Expresso em diferentes tipos de células, o receptor TNFR1 ativado promove efeitos citotóxicos, além de ativar de vias de sinalização que regulam a expressão de vários outros genes que induzem efeito pró-apoptótico, a exemplo do NF- κ B (FISCHER; KONTERMANN; MAIER, 2015). A ativação do receptor TNFR2 está relacionada com a indução de processos de sobrevivência e proliferação celular e, controversamente, também pode induzir efeitos apoptótico, em cooperação com TNFR1 (DONG et al., 2015).

O estudo *in vivo* realizado por Arifa e colaboradores (2014) indicou que a produção de EROs por irinotecano promove a ativação de inflamossomos, que, por

sua vez, promovem aumento na produção de IL-1 e IL-18 no íleo, as quais mediam injúrias no tecido intestinal durante a mucosite. A IL-1 β é citocina pró-inflamatória produzida e secretada por vários tipos de células, principalmente as células componentes do sistema imune inato, e é essencial para a resposta imune na resistência a patógenos (DINARELLO, 2017).

Para que ocorra a liberação de IL-1 β por células hematopoiéticas, é necessário que ocorra primeiramente a ativação de receptores TLR por padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) e a síntese da sua precursora pró-IL-1 β mediada por NF- κ B (AFONINA et al., 2015). Assim, sob estímulo inflamatório, a pró-IL-1 β sofre a ação da enzima caspase-1, sendo convertida em IL-1 β na sua forma ativa, que é capaz de se ligar aos receptores IL-1R (DINARELLO, 2017).

A ativação destes receptores confere a IL-1 β o seu efeito pró-inflamatório via indução de uma complexa rede de citocinas e mediadores infamatórios, e também por meio da expressão de integrinas em leucócitos e células endoteliais (RIDER et al., 2011). Rider e colaboradores (2011) também demonstraram que, durante a inflamação, a IL-1 β promove o recrutamento e retenção de macrófagos no tecido, por via dependente de caspase-1.

Meirovitz et al. (2010) também analisou a relação entre os níveis de citocinas e a severidade de mucosite em pacientes que recebiam tratamento com quimio e radioterápicos, e observou que os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 aumentaram significativamente, principalmente nas duas primeiras semanas depois do início do tratamento. A IL-6 está envolvida nos processos de inflamação e imunológicos, além de participar da regulação de processos metabólicos, regenerativos e processos neurais (RINCON, 2012).

Os fatores nucleares NF-IL6 e NF- κ B, além de outros elementos, podem mediar a ativação de IL-6 (KAMIMURA et al., 2014). A atividade biológica da IL-6 é promovida pela sua ligação à proteína transmembrana gp130, na trans-sinalização, induzindo uma resposta pró-inflamatória, ou a sua ligação à mbIL-6R, na sinalização clássica, promovendo atividades regenerativas ou anti-inflamatórias (RINCON, 2012; SCHELLER et al., 2011).

Na resposta imunológica, a IL-6 estimula a proliferação de células T periféricas e atua como fator de estimulação de células B, na produção de imunoglobulinas (ERTA; QUINTANA, HIDALGO, 2012). Ao mesmo tempo, juntamente com a IL-1, induz a diferenciação de células T em células T citolíticas e

células NK (*Natural Killer*) (KAMIMURA et al., 2014). Há relatos de que a IL-6 modula a hematopoiese e a acumulação de neutrófilos no local da inflamação durante a resposta imune inata (HUNTER; JONES, 2015).

2.7 Produtos naturais

Na terapia do câncer, diferentes compostos naturais têm sido intensivamente explorados, uma vez que podem melhorar a eficácia da quimioterapia, reduzir a resistência de tumores ao tratamento, reduzir os efeitos adversos e detoxificar o corpo de quimioterápicos (SAK, 2014). Estes efeitos se devem a ação de um conjunto de compostos presentes, principalmente, nos óleos essenciais, de diversas plantas com potencial terapêutico (NEMA et al., 2013).

Durante seus processos biológicos, plantas produzem metabólitos primários e secundários naturais que desempenham uma série de funções (PRAKASH et al., 2013). Os metabólitos primários constituem açúcares, lipídios, aminoácidos e ácidos nucléicos relacionados aos processos celulares, enquanto que metabólitos secundários dizem respeito a substâncias produzidas em circunstâncias de estresse, como, por exemplo, contra herbívoros (SRIVASTAVA; PANDEY, 2015).

Após uma sequência de reações catalisadas por diversas enzimas, os metabólitos secundários são formados a partir de produtos derivados de processos fundamentais de produção de energia, como fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs (SINGH; SHARMA, 2015). A maioria dos produtos empregados na biossíntese destes metabólitos são os intermediários acetil-coenzima A, ácido xiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxixilulose 5-fosfato (KABERA et al., 2014). A partir destes, são produzidos três categorias principais de metabólitos secundários de plantas: terpenos e terpenóides (~25000 tipos), alcaloides (~12000 tipos) e compostos fenólicos (~8000 tipos) (SINGH; SHARMA, 2015).

Os metabólitos secundários são encontrados nos óleos essenciais de plantas, que constituem uma mistura complexa de substâncias e de compostos aromáticos biologicamente ativos, com potencial farmacológico para oferecer benefício terapêutico no tratamento de uma variedade de doenças humanas (AUMEERUDDY-ELALFI et al., 2016). São estes metabólitos que fornecem a maioria dos produtos naturais farmacologicamente ativos e, por este motivo, têm sido constantemente

explorados pelos seres humanos em diferentes aplicações (SINGH; SHARMA, 2015).

Algumas das atividades biológicas mais importantes são suas propriedades antitumorais, analgésica, anti-inflamatória, imunomodulatórias, antiviral, bactericida e outras (SONG et al., 2014). Estudos também têm demonstrado benefícios com a utilização de produtos naturais de plantas na terapia do câncer.

Segundo Thoppil e Bishayee (2011), terpenóides podem ser utilizados em combinação com quimioterápicos e radioterápicos, visando-se o aumento da eficácia terapêutica e limitação dos efeitos adversos relacionados ao tratamento. Lamine et al., (2016) demonstraram que alcaloides extraídos a partir de *Peganum harmala* L. apresentam atividade anticâncer, fornecendo um novo agente citotóxico contra células cancerosas resistentes a quimioterapia. Já Taamalli et al., (2012) demonstrou que a composição fenólica de folhas de oliveira apresentam uma atividade citotóxica contra células de câncer de mama.

Os produtos naturais constituem em uma grande aposta na área de atenção a saúde, por apresentarem o potencial para serem utilizados no tratamento de diversas doenças (LAHLOU, 2013). Assim, a utilização destes produtos se mostra bastante promissora, não apenas pelo fato de oferecerem baixo custo, mas também por apresentarem uma maior aceitabilidade, maior compatibilidade com o corpo humano e também por apresentarem mínimos efeitos adversos (YUAN et al., 2016).

2.8 Terpenos

Os terpenos constituem os produtos naturais mais abundantes (cerca de 30.000 compostos) e mais diversificados estruturalmente, associados ao desenvolvimento da planta e à interações planta-meio ambiente (SCHWAB et al., 2013). Normalmente, são encontrados em maiores concentrações em especializadas cavidades de estoque das folhas, juntamente com compostos aromáticos, vindo a constituir os óleos essenciais de plantas (SINGH; SHARMA, 2015). Por apresentarem propriedades farmacológicas e biológicas de grande importância, os terpenos são comercialmente utilizados na indústria de agroquímicos, fragrâncias e farmacêutica (SOUZA et al., 2014).

A biossíntese de terpenos se dá primeiramente a partir da geração de unidades de pentacarbono (C₅) com duas pontes insaturadas, tais como isopentenil

difosfato (IDP) ou dimetilalil difosfato (DMAPP), as quais são catalisadas por enzimas específicas, dando origem aos terpenos superiores (ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015). Assim, os terpenos passam a constituir hidrocarbonetos cíclicos ou acíclicos, classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas (C_5H_8) em: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos ($>C_{40}$) (MEWALAL et al., 2016). Destes, os mono- e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de vegetais, enquanto os demais são em maioria sólidos (DHIFI et al., 2016).

Os monoterpenos, formados a partir de duas unidades isoprênicas, representam cerca de 90% da constituição dos óleos essenciais e estão associados a funções antimicrobianas, analgésica, hipotensivas, anti-inflamatória e antiprurítica (SÁ, ANDRADE, SOUZA, 2013). Hidrocarbonos monoterpênicos monocíclicos são os constituintes mais comuns, mas também podem ser encontrados monoterpenos na forma linear ou bicíclica (GUIMARÃES et al., 2012). Quando sujeitos a modificações bioquímicas, tais como oxidações ou rearranjos, podem dar origem a diversos outros compostos, os monoterpênóides, que são unidades químicas altamente funcionais (ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015).

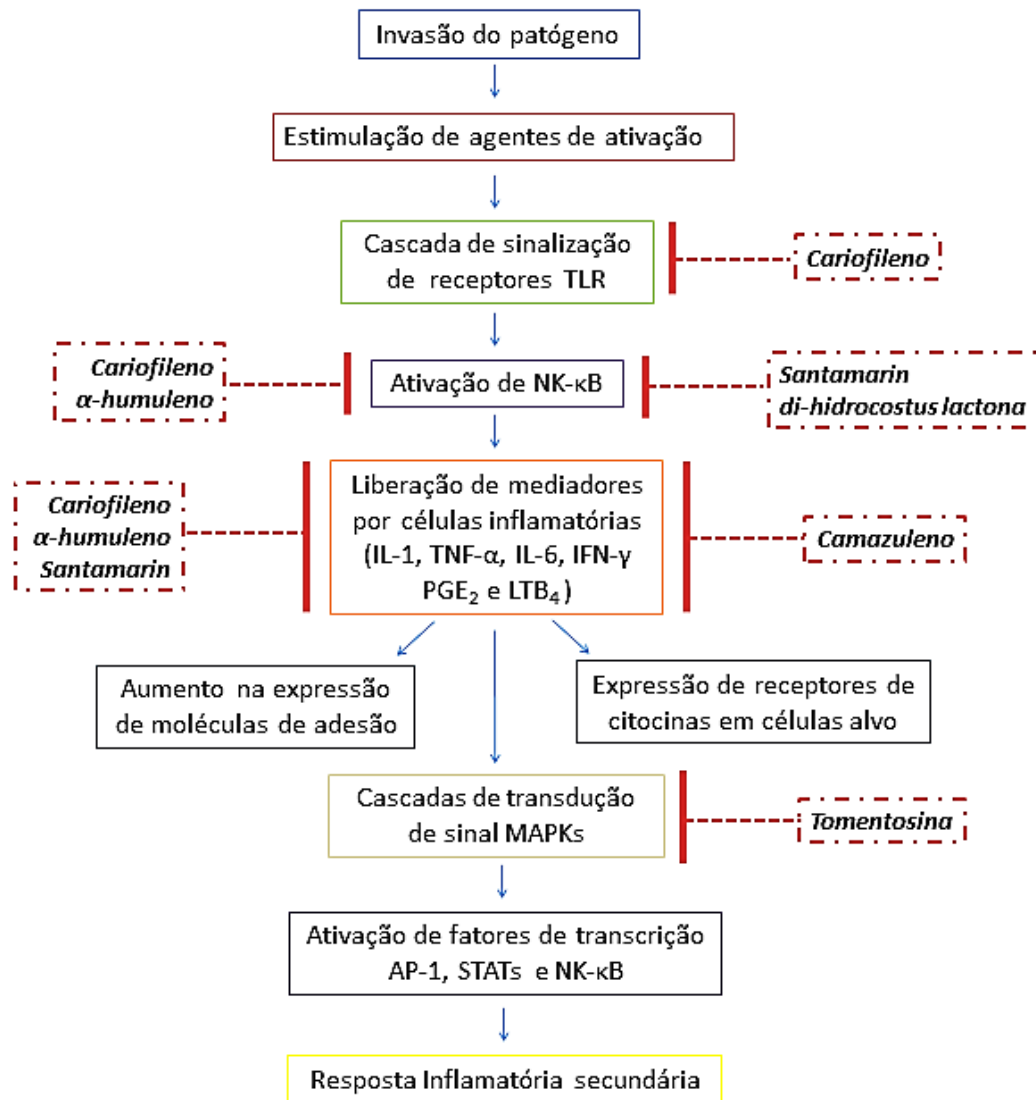
Os sesquiterpenos podem ser encontrados em vegetais superiores, organismos marinhos e fungos, nas formas de hidrocarbonos ou oxigenadas, incluindo lactonas, álcoois, ácidos, aldeídos e cetonas (AWOUAFACK et al., 2013). Desta forma, estes compostos apresentam estruturas variadas, tais como acíclica simples, anéis monocíclicos simples ou complexos, ou ainda formas dicíclicas e tricíclicas simples ou complexas, com diferentes nomenclaturas (ZHANG et al., 2014). A biogênese de sesquiterpenos ainda é pouco compreendida, e o fato de apresentarem estruturas altamente diversificadas e complexas dificulta os processos de identificação e quantificação destas moléculas (DUHAMEL et al., 2016).

Mais de 5000 sesquiterpenos já foram identificados, sendo responsáveis por desempenhar funções fisiológicas fundamentais nas plantas, além de propriedades farmacológicas importantes (DUHAMEL et al., 2016). Segundo Awouafack et al. (2013), diversos sesquiterpenos bioativos já foram isolados a partir de plantas medicinais da África, e muitos destes apresentam propriedades antimicrobianas, anticâncer, antioxidante, hepatoprotetivo, neuroproliferativas, analgésica, anti-inflamatória e outras.

Sá et al., (2015) reuniu informações a cerca de diversos sesquiterpenos de óleos essenciais com potencial terapêutico anti-inflamatório, identificando 12 compostos principais: farnesol, cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, bisabolol, camazuleno, valenceno, nootkatone, santamarin, di-hidrocostus lactona, tomentosina e tussilagone. Ainda, os autores avaliaram os possíveis mecanismos de ação destes compostos e observaram que muitos deles podem interferir na cascada de sinalização de receptores TLR, na ativação de NK- κ B, na liberação de mediadores da inflamação, na cascada de transdução de sinal MAPKs e na ativação de fatores de transcrição, durante o processo inicial da resposta inflamatória.

A investigação mostrou que o cariofileno e o α -humuleno podem participar em diferentes vias de sinalização, além da via de ativação de receptores canabinóides durante a resposta anti-inflamatória, atuando como potentes agentes anti-inflamatórios (SÁ et al., 2015) (**Figura 6**).

Figura 6. Sesquiterpenos interferem em diferentes etapas iniciais da resposta inflamatória generalizada



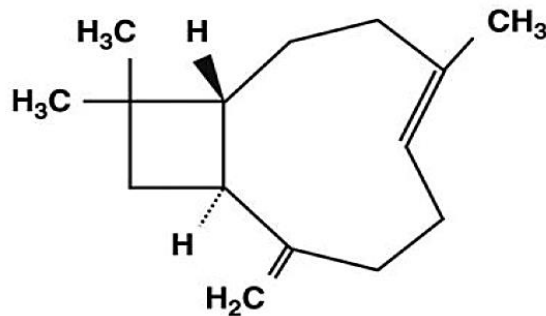
Fonte: Adaptado de Sá et al. (2015)

2.9 Beta-cariofileno

O β -cariofileno ($C_{15}H_{24}$) é um sesquiterpeno bicíclico, naturalmente encontrado em grandes quantidades em óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, tais como orégano, pimenta-do-reino, canela e maconha (YANG; NIE, 2016; ANDRADE-SILVA et al., 2016). É o principal e mais abundante componente volátil encontrado nos óleos essenciais de várias espécies de plantas, juntamente com pequenas quantidades de seus isômeros (Z)- β -cariofileno e α -humuleno (α -cariofileno) e seus produtos pós-oxidação (FIDYT et al., 2016). A estrutura química

deste sesquiterpeno apresenta um anel de ciclobutano, e está altamente susceptível a oxidação quando exposto ao ar, pelo fato de possuir um hidrocarbono insaturado, formando óxido de cariofileno (**Figura 7**) (BARBOSA et al., 2012).

Figura 7. Estrutura química do β -cariofileno



Fonte: Vijayalaxmi et al., 2015

Em resposta a ataques de herbívoros ou mudança nos fatores abióticos, o BCF liberado pelas plantas na atmosfera (BORGES et al., 2013). É também comercialmente utilizado no setor alimentício e de cosméticos, devido ao seu odor (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2016). Além disso, o BCF tem demonstrado diferentes propriedades farmacológicas, tais como anticâncer, anti-inflamatória, analgésica, cicatrizante, antidiabética, antibacteriana, antialérgica, entre outras (CHO et al., 2015).

O BCF se liga seletivamente a receptores canabinóides tipo 2 (CB2), agindo como um agonista canabinóide total (BAHI et al., 2014). Gertsh et al., (2008) relatou a ação do BCF como um agonista total de receptores CB2, demonstrando que o sesquiterpeno promove a liberação dose-dependente de CA^{2+} , através da mobilização da proteína G via CB2, em uma proporção semelhante ao endocanabinóide 2-AG, que é um potente ativador da via da proteína G, por meio desses receptores. Via ativação de CB2, estudos têm demonstrado o efeito anti-inflamatório e analgésico do sesquiterpeno no tratamento de dor neuropática (KUWAHATA et al., 2012), dor inflamatória (KLAUKE et al., 2014), endometriose (ABBAS et al., 2013) e melhora os sintomas de depressão e ansiedade (BAHI et al., 2014).

Além disso, Horváth e colaboradores (2012) demonstraram que, via receptores CB2, BCF promove melhora dos casos de nefrotoxicidade induzida por

cisplatina, inibindo as quimiocinas, a produção de citocinas e a infiltração de neutrófilos e macrófagos. Recentemente, pesquisadores demonstraram a eficácia terapêutica do β -cariofileno, que desempenhou atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, por meio da ativação de receptores CB2, demonstrando um potencial efeito neuroprotetivo (JAVED et al., 2016).

Devido a suas propriedades anti-inflamatórias, agentes canabinóides e seus derivados têm sido estudados e utilizados por seus benefícios contra disfunções do trato gastrointestinais (AHMED; KATZ, 2016). Por ser um potente fitocanabinóide, Bento et al. (2011) avaliou o efeito anti-inflamatório do β -cariofileno e verificou que o sesquiterpeno inibe a colite induzida por sulfato de sódio dextrano em ratos, por meio da ativação de receptores CB2 e de receptores gama ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR γ). No entanto, ainda são bastante escassos estudos a cerca do efeito terapêutico do BCF em desordens gastrointestinais, como a mucosite.

Apesar de estudos terem demonstrado o efeito anti-inflamatório do BCF, os mecanismos envolvidos na indução deste efeito pela molécula ainda não são totalmente esclarecidos (GERTSCH et al., 2008). Estudos demonstram que o β -cariofileno pode exercer mecanismos que contribuem para a indução de seus efeitos anti-inflamatórios, tais como: por meio da inibição das vias de ativação do complexo CD14/TLR4/MD2, o qual é responsável pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α); e, através da inibição de quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e a sinalização de quinases c-Jun N-terminal 1/2 (JNK 1/2) (BENTO et al., 2011).

2.10 Receptores canabinóides

Descoberto há aproximadamente 25 anos atrás, o sistema endocanabinóide é constituído em receptores canabinóides tipo 1 e tipo 2 (CB1 e CB2), ligantes endógenos, enzimas de biossíntese e de inativação de endocanabinóides (JAVED et al., 2016). Esse é um sistema fisiológico importante, envolvido em vários processos, como interações fisiológicas ou patológicas com o sistema nervoso central e periférico, metabolismo, digestão, motilidade, nocicepção, inflamação e outros (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016).

Ligantes canabinóides e seus derivados exercem efeitos paliativos em pacientes oncológicos, prevenindo náusea, vômito, dor, além de estimular o apetite,

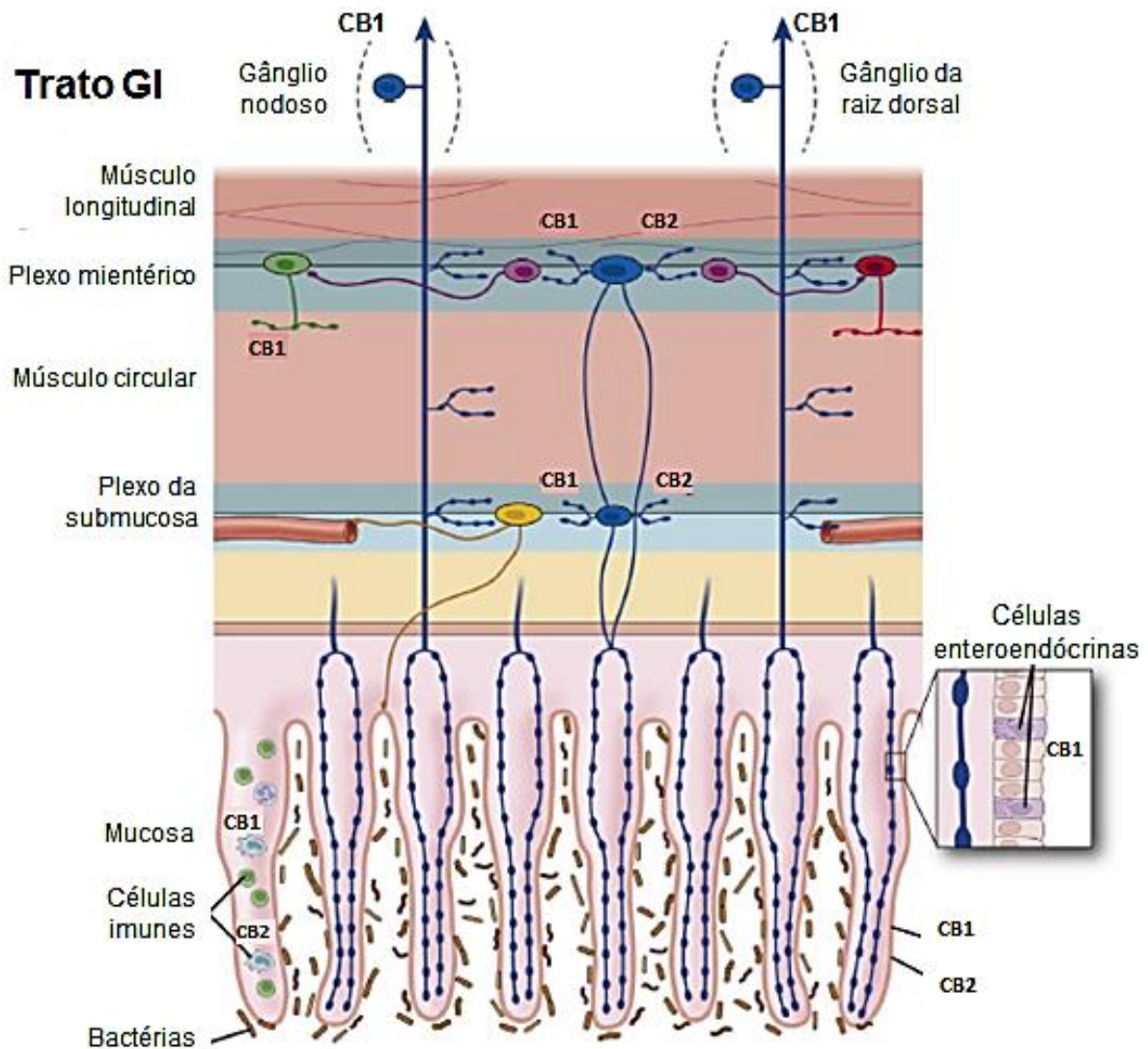
e também têm demonstrado atividade anticâncer *in vivo* e *in vitro*, por meio da modulação de vias de sinalização celular (PRAKASH et al., 2013). Canabinóides exógenos, como o canabidiol, e endógenos, como é o caso da anandamida, produzem seus efeitos biológicos por meio da interação com receptores CB1 e CB2 (LU; MACKIE, 2016).

Os receptores CB1 são um dos mais abundantes acoplados a proteína G, com ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico (DIPATRIZIO, 2016). Sua abundante presença no cérebro implica na sua importância no controle de neurotransmissão central, além de ser amplamente distribuído em todas as classes de neurônios entéricos, exceto nos neurônios motores inibitórios (IZZO; SHARKEY, 2010). A ativação de CB1 reduz a inflamação em vários modelos de animais, além de promover a inibição da liberação de acetilcolina, resultando na inibição de contratilidade *in vitro* ou atenuação de motilidade *in vivo* (DI MARZO; PISCITELLI, 2011).

Receptores CB2 são receptores acoplados à proteína G, e estão localizados nas células sanguíneas, predominantemente nas células imunes (DIPATRIZIO, 2016). A expressão de CB2 é induzida principalmente por células do sistema imune, sob condições inflamatórias, e apresentam uma potencial função terapêutica em doenças inflamatórias, como dor crônica (KLAUKE et al.2014). Estes receptores medeiam efeitos anti-inflamatórios em várias condições inflamatórias, tais como colite, sepse, artrite, isquemia cerebral (ANDRADE-SILVA, 2016).

Todos os componentes do sistema endocanabinóide têm sido detectados no sistema gastrointestinal, onde CB1 e CB2 encontram-se amplamente distribuídos (MACCARRONE, 2015). No TGI, os receptores CB1 estão localizados em células enteroendócrinas e no epitélio, em todas as classes de neurônios colinérgicos entéricos dos plexos da submucosa e mioentérico, além de em neurônios aferentes primários espinais e extrínsecos vagais (SHARKEY; WILEY, 2015). Já os receptores CB2 são encontrados tanto em células epiteliais e neurônios entéricos dos plexos nervosos, como também em células imunes (IZZO et al., 2015) (**Figura 8**).

Figura 8. Distribuição de receptores canabinóides no trato gastrointestinal



Fonte: Adaptado de Sharkey; Wiley, 2015

A ativação direta ou indireta de ambos receptores CB1 e CB2 na inflamação intestinal apresenta múltiplos benefícios, como a promoção da melhora da inflamação em vários modelos de colite em murinos, redução da hipersensibilidade visceral e da dor abdominal, assim como da hipermotilidade e diarreias associada à colite (GYIRES; ZÁDORI, 2016). Nestes tecidos, a ativação específica de receptores CB2 desempenha uma função fundamental na resposta imune e na inflamação, assim como também pode demonstrar um papel importante na regulação da motilidade anormal, da inflamação intestinal e na redução da sensibilidade e dor visceral (MALIK et al., 2015).

A ativação de CB2 por ligantes canabinóides é não psicotrópica, por isso o estudo deste receptor se mostra promissor para intervenções terapêuticas, com potencial para aliviar os sintomas, sem provocar efeitos colaterais ao sistema nervoso central (SHARKEY; WILEY et al., 2016). Em um estudo realizado por Singh e colaboradores (2012), foi observado que agonistas de receptores CB2 atuam no tratamento de colite em ratos IL-10^{-/-}, por meio da modulação da ativação de células T, e através da indução de apoptose destas células.

Harvey et al. (2013) demonstraram que receptores CB2 desempenham um discreto papel na atenuação do dano mediado por citocinas pró-inflamatórias prejudiciais da mucosa no cólon humano, sem afetar diretamente a função de barreira epitelial da mucosa. Fichna e colaboradores (2014) demonstraram que receptores canabinóides centrais e periféricos são responsáveis pela ação protetiva e terapêutica de canabinóides em modelos de ratos com colite, reduzindo a inflamação intestinal.

Apesar das recentes descobertas a cerca da ativação de CB2 na modulação da inflamação GI, ainda são escassos na literatura estudos sobre a utilização de agonistas deste receptor, como é o caso do β -cariofileno, no tratamento da mucosite intestinal. A partir destas observações, por meio de investigações científicas, pretende-se esclarecer as seguintes hipóteses: se o BCF apresenta um efeito protetor nos modelos de mucosite que receberam o tratamento; se observado, este efeito estaria relacionado a um possível efeito antiinflamatório do sesquiterpeno na mucosa intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o efeito do β -cariofileno no tratamento de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil, assim como investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na ação do sesquiterpeno.

3.2 Específicos

- Observar o efeito do beta-cariofileno na variação de peso corporal em camundongos submetidos a mucosite intestinal por 5-FU;
- Avaliar as alterações na arquitetura tecidual dos segmentos intestinais, assim como o grau de severidade de mucosite intestinal induzida por 5-FU, por meio de análises morfométricas e histopatológicas, respectivamente;
- Investigar o efeito do β -cariofileno sobre a contagem global de leucócitos nos animais tratados com 5-FU;
- Averiguar os efeitos do β -cariofileno frente aos efeitos oxidativos induzidos pelo 5-FU, por meio da dosagem de malondialdeído e de glutathiona reduzida;
- Avaliar os efeitos do β -cariofileno sobre a inflamação induzida por 5-FU, por meio da contagem de mastócitos, da avaliação da atividade da mieloperoxidase, quantificação e imunomarcção de IL-1 β ;
- Investigar o papel do óxido nítrico no efeito protetor do β -cariofileno, por meio da análise morfométrica da mucosa intestinal;
- Investigar o papel da COX-2 no efeito protetor do β -cariofileno, por meio da análise morfométrica da mucosa intestinal e imunomarcção de COX-2;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da raça *Swiss*, com peso entre 25 a 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus Porangabuçu. Estes animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, a serem substituídas duas vezes por semana, e foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia, em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com exaustão de ar, num ciclo de 12h claro/12h escuro, e com a água e ração padrão *ad libitum*.

4.2 Drogas e reagentes

Foi utilizado o 5-fluorouracil do laboratório farmacêutico Eurofarma (BR, 25 mg/mL). O BCF foi obtido a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e foi dissolvido em Tween 80 (10%). Todos os outros reagentes e produtos químicos serão de grau analítico e foram obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.3 Considerações éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo de número 282/17 (**Anexo I**).

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

A mucosite intestinal foi induzida nos camundongos com a administração de 5-FU, de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2008). O 5-FU foi administrado por via intraperitoneal, em dose única de 450 mg/kg, no primeiro dia do protocolo experimental. As doses de BCF (10, 30 e 100mg/g) analisadas no presente estudo foram escolhidas de acordo com doses terapêuticas já analisadas e relatadas na literatura. A eutanásia se deu por meio da administração da associação de cetamina (Syntec, Santana de Parnaíba, SP, BR) e xilazina (Agener

União, São Paulo, SP, BR), nas doses de 80 e 10 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, no 4º dia do protocolo. Por meio deste protocolo de 4 dias totais, os efeitos inflamatórios e funcionais que ocorrem no intestino após uso do antineoplásico foram mimetizados no modelo biológico.

4.5 Grupos experimentais





Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6):

- **Grupo controle:** Os animais foram tratados com soro fisiológico estéril 0,9% por via intraperitoneal. Sem mucosite intestinal.
- **Grupo 5-FU:** Os animais receberam dose única de 5-FU (450 mg/kg) por via intraperitoneal, no primeiro dia. Nos dias 2 e 3, receberam soro fisiológico estéril 0,9%.
- **Grupo BCF10:** Com mucosite induzida por 5-FU. Os animais receberam o BCF na dose de 10 mg/kg por gavagem, uma hora antes da administração da dose única de 5-FU (450 mg/kg, i.p.), no 1º dia de protocolo, e após 24 e 48 horas.
- **Grupo BCF30:** Com mucosite induzida por 5-FU. Os animais receberam o BCF na dose de 30 mg/kg por gavagem, uma hora antes da administração da dose única de 5-FU (450 mg/kg, i.p.), no 1º dia de protocolo, e após 24 e 48 horas.
- **Grupo BCF100:** Com mucosite induzida por 5-FU. Os animais receberam o BCF na dose de 100 mg/kg por gavagem, uma hora antes da administração da dose única de 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no 1º dia de protocolo, e após 24 e 48 horas.

No quarto dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e as amostras do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas. O delineamento experimental foi demonstrado na **Figura 9**:

Figura 9. Delineamento experimental para indução de mucosite intestinal com 5-FU e tratamento com beta-cariofileno

Grupos experimentais	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Controle	SF	SF	SF	+
5-FU	5-FU	SF	SF	+
BCF10	5-FU	BCF	BCF	+
BCF30	5-FU	BCF	BCF	+
BCF100	5-FU	BCF	BCF	+

 SF	Soro fisiológico (0,9%, gavagem)	 BCF	Beta-cariofileno (10, 30 ou 100 mg/kg, gavagem)
 5-FU	5-FU (450mg/kg, i.p.)		Eutanásia

Fonte: própria

4.6 Análise ponderal

Durante todo o período experimental, os camundongos foram pesados em balança antes da administração de quaisquer dos compostos (Soro fisiológico 0,9%, 5-FU ou β -cariofileno).

4.7 Análise Morfométrica e Histopatológica

Os segmentos intestinais foram fixados por 24h em formol tamponado a 10%. Em seguida, os segmentos foram retiradas do formol e conservadas em álcool a 70%. Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas a processamento (série de desidratação e emblocamento em parafina) para a realização de cortes histológicos de 5 μ m de espessura em micrótomo. As lâminas obtidas foram coradas com H&E (hemotoxilina-eosina) e, posteriormente, analisadas.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA). Nesta etapa, foram

mensurados a altura de 10 vilos e a profundidade de 10 criptas em cada lâmina. Os valores foram expressos em μm .

Com o auxílio de um microscópio óptico, o grau de severidade da mucosite foi avaliado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo et al. (2000), conforme segue na **Tabela 2**.

Tabela 2. Níveis de intensidade de mucosite induzida por 5-FU

Escore de severidade da mucosite	
0	Ausência de lesão
1	Menos de 10% das criptas contêm células necróticas
2	Mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta
3	Mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes
4	Semelhante à 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas (>20%) e encurtamento dos vilos

4.8 Leucograma

O Leucograma foi realizado previamente à eutanásia. Os animais foram anestesiados com combinação de anestésicos (Xilazina 10mg/kg e Cetamina 80mg/kg), para obtenção das amostras de sangue periférico por punção cardíaca, que foram diluídas em líquido de Turk a uma proporção de 20 μL de sangue para 380 μL de solução. Após isso, foi realizada a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer (MOURA et al, 1998), com resultados expressos na forma de número total de leucócitos por $10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

4.9 Dosagem dos níveis de Malondialdeído (MDA)

A dosagem do malondialdeído permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico – TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), vindo a constituir um indicador de peroxidação lipídica. Amostras das mucosas foram homogeneizadas a 10% com tampão fosfato de potássio (1,15%). Em seguida, em um microtubo, foram adicionados 62,5 μL , além

de 375µL de ácido fosfórico (1%) e 125µL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Na etapa seguinte, as amostras foram submetidas a banho-maria a 100°C, por 45 minutos. Após, foram adicionados 500µL de n-butanol, para posterior centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos. A seguir, 200µL do sobrenadante foram pipetados em placa de 96 poços e absorbância foi medida em leitor de microplacas a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína (LEFÈVRE et al., 1998)

4.10 Análise da Concentração de Glutathiona (GSH)

A concentração de Glutathiona (GSH) em amostras de tecidos do intestino delgado foi realizada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 100 mg da mucosa intestinal dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA (0,02M). Alíquotas de 100µL do homogenato foram misturadas a 80µL de água destilada e a 20µL de ácido tricloroacético (TCA) a (50%), para precipitação de proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi adicionado a 200µL de tampão Tris (0,4M, pH 8,9,) e a 5µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, a mistura foi agitada por 3 minutos e, por fim, a absorbância foi lida a 412nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/mg de tecido.

4.11 Determinação da concentração de mastócitos

Os blocos de parafina com amostras intestinais foram selecionados para a coloração com azul de toluidina. 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 seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, lavadas com água destilada e colocadas em estufa a 60° C por uma hora para secar. Após a secagem, as lâminas foram clareadas com uma série de xilol e montadas. Para evidenciar os mastócitos, tal como determinado por Michalany (2008), a contagem de mastócitos

de cada lâmina foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (40X) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA). Foi realizada a contagem de 10 campos e, em seguida, realizou-se a média de cada grupo.

4.12 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO por mg de tecido foi determinada através da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982). Cerca de 50mg dos segmentos intestinais foram homogeneizados em 500µL de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB) (0,5%), para posterior maceração. Em seguida, mais 500µL de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB) (0,5%) foram adicionados ao homogenato e a amostra foi agitada em córtex por 20 segundos. A seguir, as amostras foram submetidas ao freezer a -80°C, por 10 minutos e, após este tempo, foram novamente agitadas em vórtex por 20 segundos. Depois, o homegenato foi centrifugado a 5.000 rpm, durante 7 minutos a 4°C. Na placa de Elisa, foram adicionados 10µL do sobrenadante em duplicata, além de 200 µL da solução de Dianisidina em cada poço. A atividade de MPO no sedimento ressuspensão foi analisada através da medição da absorbância em 450 nm. Os resultados foram registrados como unidades de MPO por mg de tecido.

4.13 Avaliação imunohistoquímica para detecção de IL-1β e COX-2

Imunohistoquímica para IL-1β e COX-2 foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). O segmento intestinal que apresentou a melhor resposta foi fixado em formol 10% por 24 h. Após este período de tempo, as amostras de tecido foram processadas e parafinizadas, para posterior confecção de cortes histológicos em micrótomo, com espessura de 4µm, e confecção de lâminas histológicas. Em seguida, as lâminas contendo os cortes do segmento intestinal foram desparafinizados, por meio de incubação em estufa a 60°C *overnight* e de três banhos de xilol, durante 5 minutos cada. Decorrido este tempo, os cortes intestinais foram hidratados em dois banhos em etanol absoluto, um banho em etanol (90%), um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, durante três minutos cada. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submersas a um banho de água destilada por 10 minutos e, em seguida, com

tampão citrato (DAKO ®, pH 7,0) em banho-maria (95°C) por 20 minutos, para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), por 5 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (Abcam), durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e, depois, incubados *overnight* (4°C) com anticorpo primário de coelho anti- IL-1β (SantaCruz®) e anti-COX-2 (SantaCruz®) de cabra diluído em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho (GBI Labs®), diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, realizou-se a coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB, DAKO ®), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer, durante 8 minutos. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%. As imagens foram capturadas por meio de microscopia de luz, acoplado a câmara com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). Para quantificação da área imuno marcada para as citocinas, foi utilizado o programa *Adobe Photoshop 8.0*, para obtenção da área total do tecido e área imunomarcada. Para mensuração da área marcada em porcentagem, foi realizado o seguinte cálculo:

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

4.14 Papel do óxido nítrico no efeito protetor do β-cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito anti-inflamatório do BCF em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, modulou-se a via de síntese de NO por iNOS com o L-NAME. A mucosite intestinal foi induzida no dia 1, com uma dose única de 5-FU (450 mg/kg) i.p., em todos os grupos experimentais, exceto no grupo salina. Os grupos experimentais consistiram em:

Grupo Salina: receberam salina (NaCl a 0,9%), por gavagem, durante os quatro dias de protocolo experimental;

Grupo 5-FU: receberam 5-FU, i.p., no dia 1 de protocolo experimental;

Grupo BCF10: receberam o BCF (10 mg/kg) 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas, por gavagem;

Grupo L-NAME receberam L-NAME (20 mg/kg, i.p.) 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas, por gavagem;

Grupo L-NAME + BCF10: receberam L-NAME (20 mg/kg, i.p.) por gavagem, seguida pela administração imediata de BCF (10 mg/kg), 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas, por gavagem;

Grupo L-arginina + BCF10: receberam L-arginina (300 mg/kg, i.p.) por gavagem, seguida pela administração imediata de BCF (10 mg/kg), 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas, por gavagem;

Grupo L-NAME + L-arginina: receberam L-NAME (20 mg/kg i.p.), seguida pela administração imediata de L-arginina (300 mg/kg i.p.), 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas, por gavagem.

No quarto dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o duodeo foi retirado para quantificação gênica de iNOS e determinação indireta dos níveis de óxido nítrico, por meio da dosagem de nitrato/nitrito.

4.15 Papel da COX no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Para avaliar o papel da COX-2 no efeito anti-inflamatório do BCF, modulou-se a via da enzima utilizando-se o inibidor celecoxibe (SILVA, 2017). No protocolo experimental de 4 dias, a mucosite intestinal foi induzida no dia 1, com uma dose única de 5-FU (450mg/kg) i.p., em todos os grupos experimentais, exceto no grupo salina. Os grupos experimentais consistiram em:

Grupo Salina: Sem mucosite. Receberam apenas salina (NaCl a 0,9%), por gavagem, durante os quatro dias de protocolo experimental;

Grupo 5-FU: receberam 5-FU, i.p., no dia 1 de protocolo experimental;

Grupo CLX: receberam Celecoxibe (7,5mg/kg), i.p, 1 hora antes da administração de 5-FU no dia 1, e diariamente até o dia 3;

Grupo BCF10: receberam BCF (10 mg/kg), por gavagem, 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e diariamente até o dia 3.

Grupo BCF10+CLX: receberam BCF (10 mg/kg), por gavagem, e Celecoxibe (7,5 mg/kg), i.p, 1h antes da administração do 5-FU no dia 1, e após 24 e 48 horas.

No quarto dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o duodeno foi retirado para análise histopatológica (H&E) e imunomarcação de COX-2 (conforme item 4.13).

4.16 Análises Estatísticas

Os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Student Newman Keuls* como *post hoc* teste através do programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Os dados obtidos a partir da análise histológica foram analisados por estatística não-paramétrica, utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de *Dunn's* (comparações múltiplas). Para todas as análises, foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

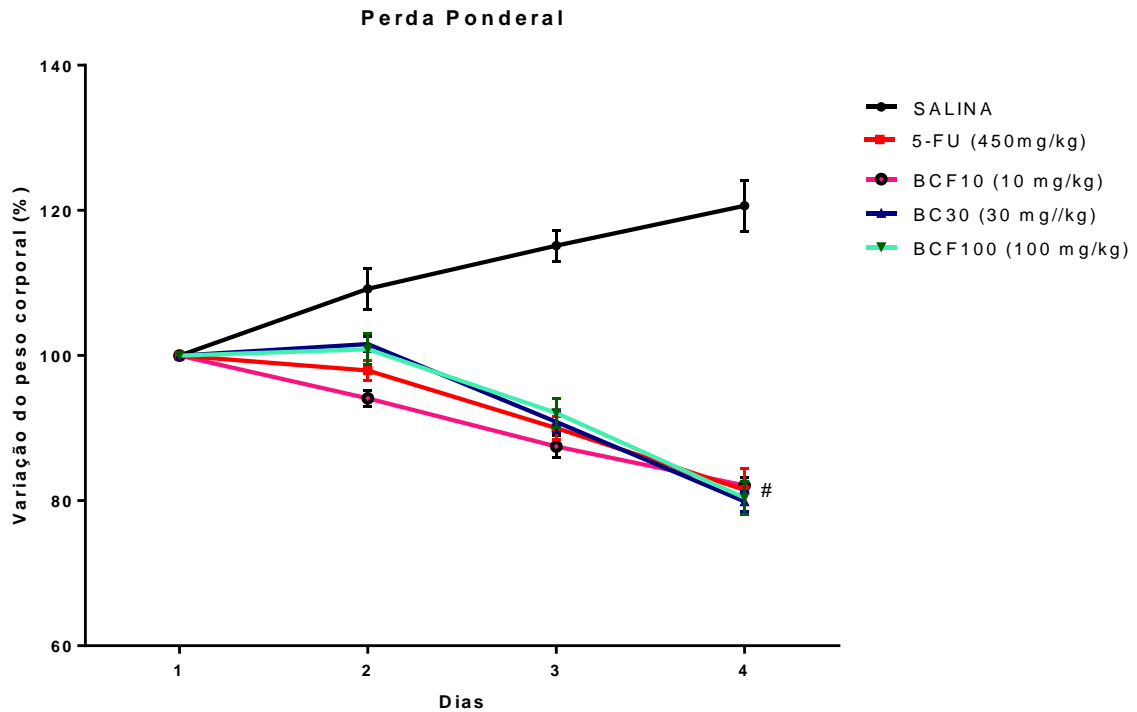
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do β -cariofileno sobre a perda ponderal induzida por 5-FU

A perda de peso é um dos parâmetros utilizados para a confirmação do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

A avaliação ponderal permitiu evidenciar a significativa ($p < 0,05$) perda de peso causada pelo 5-FU, a partir do segundo dia do protocolo experimental, quando comparado ao grupo salina. Neste grupo, por sua vez, houve gradual aumento do peso no decorrer dos quatro dias de protocolo. O tratamento com o BCF não preveniu a perda de peso induzida pelo quimioterápico (**Figura 10**).

Figura 10. Efeito do β -cariofileno na variação de peso corporal em camundongos submetidos a mucosite intestinal por 5-FU



Os camundongos (n=6/grupo) foram pesados diariamente até o 4º dia do protocolo experimental. A indução de mucosite intestinal por 5-FU induziu a perda de peso de forma significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos tratados com o antineoplásico, quando comparado ao grupo controle. A perda de peso se iniciou a partir do segundo dia, nos grupos tratados com 5-FU. Os pontos representam a média+EPM do percentual de variação do peso inicial. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; *, $p < 0,01$ quando comparado ao grupo 5-FU.

5.2 Efeito do β -cariofileno nas alterações histopatológicas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal de camundongos

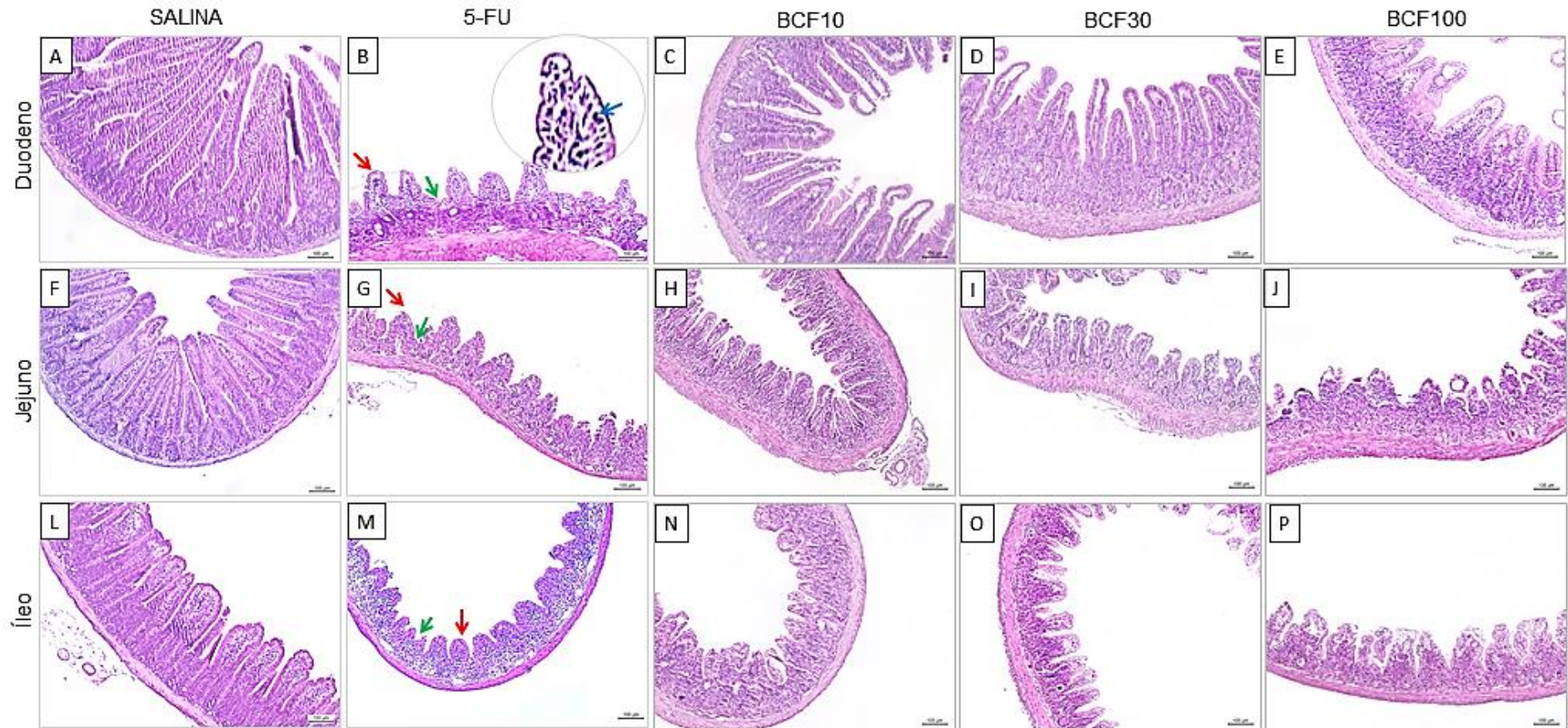
A coloração dos segmentos do duodeno, jejuno e íleo com hematoxilina e eosina permitiu a visualização microscópica da arquitetura tecidual, assim como as alterações morfológicas induzidas pelo 5-FU na mucosa intestinal.

No grupo salina (**Figuras 11A, 11F e 11L**) verifica-se a mucosa intestinal em condições normais, na qual se observa a preservação das criptas intestinais, sem alterações morfológicas, além da escassez de células leucocitárias.

A administração de 5-FU induziu alterações na arquitetura da mucosa intestinal, observadas pela evidente redução da altura dos vilos (setas vermelhas) e das criptas (setas verdes) e acentuado infiltrado de células inflamatórias (azuis) no duodeno (**Figura 11B**), jejuno (**Figura 11G**) e íleo (**Figura 11M**).

O tratamento com o BCF na dose de 10 mg/kg reverteu em grande parte a arquitetura tecidual apenas no duodeno (**Figura 11C**), aumentando comprimento dos vilos e das criptas e diminuindo o infiltrado de células. Tais observações não foram observadas no jejuno (**Figura 11H**) e íleo (**Figura 11N**) do grupo BCF10. A administração do BCF nas doses de 30mg/kg (**Figuras 11D, 11I e 11O**) e 100 mg/kg (**Figuras 11E, 11J e 11P**) reverteu apenas parcialmente o encurtamento de vilos e criptas no duodeno, enquanto que no jejuno e íleo tal efeito não foi não preveniu as alterações histopatológicas induzidas pelo 5-FU.

Figura 11. Efeito do β -cariofileno nas alterações microscópicas da mucosa intestinal de camundongos submetidos à mucosite intestinal por 5-FU



5-FU induziu redução da altura dos vilos (setas vermelhas) e da profundidade das criptas (setas verdes) e infiltrado de células leucocitárias (setas azuis) em segmentos do duodeno, jejuno e íleo (painéis D, E e F). O tratamento com o BCF na dose de 10mg/kg (painéis G, H e I) preveniu o encurtamento dos vilos, a perda da profundidade das criptas, e reduziu o infiltrado de células leucocitárias no duodeno. A administração do BCF nas doses de 30mg/kg e 100 mg/kg não preveniu as alterações histopatológicas induzidos pelo 5-FU na mucosa intestinal. Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μ m (X10).

5.3 Efeito do tratamento com β -cariofileno nos escores histopatológicos de modelo experimentais de mucosite intestinal induzida por 5-FU

De acordo com os escores histopatológicos de severidade da mucosite apresentados na tabela 3, observa-se que o 5-FU aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) os escores histopatológicos em todos os segmentos do intestino delgado (escore 4), atingindo o grau máximo, em relação ao grupo salina. O tratamento com o BCF na dose de 10 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) o escore histopatológico apenas no duodeno, quando comparado ao 5-FU (**Tabela 3**). Os tratamentos com o BCF na dose de 30 mg/kg ou 100 mg/kg não apresentaram diferença estatística, quando comparado ao grupo 5-FU.

Estes dados indicam que o BCF na dose de 10 mg/kg desempenhou um melhor efeito terapêutico contra os danos induzidos pelo 5-FU, especialmente no duodeno.

Tabela 3. Efeito do tratamento com β -cariofileno nos escores histopatológicos em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Segmentos intestinais	Grupos Experimentais				
	Salina	5-FU	BCF10	BCF30	BCF100
Duodeno	0 (0-0)	4 (4-4) [#]	1 (0-3) [*]	1,5 (1-3)	2 (1-4)
Jejuno	0 (0-0)	4 (4-4) [#]	3 (3-4)	3,5 (3-4)	4 (1-4)
Íleo	0 (0-0)	4 (4-4) [#]	3 (1-4)	3 (1-4)	4 (1-4)

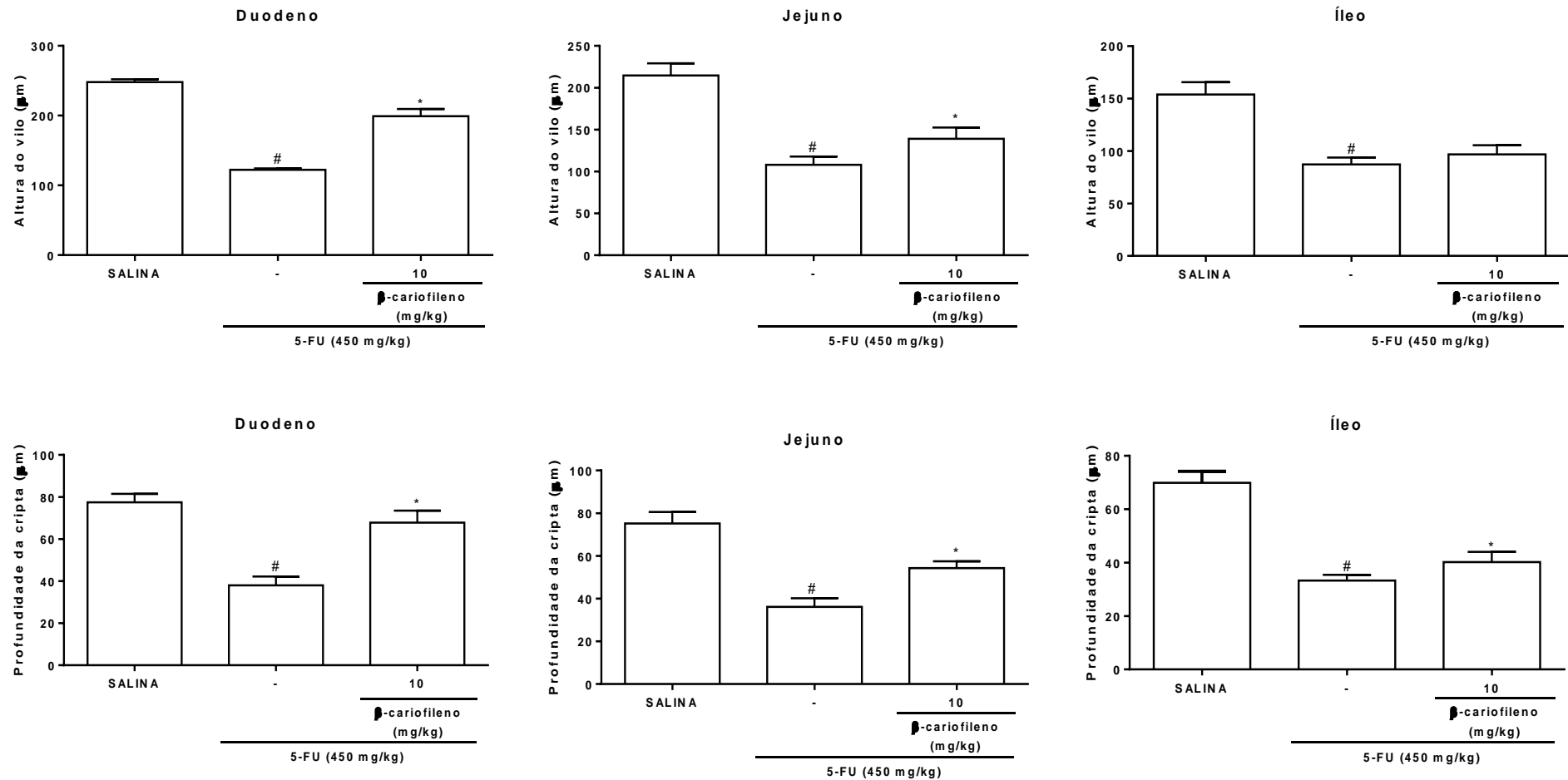
Os valores foram expressos como mediana, e foram analisados pelo *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunn's*. #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

5.4 Efeito do β -cariofileno nas alterações morfométricas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal em camundongos

De acordo com a **Figura 12**, a administração de 5-FU diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a altura dos vilos nos segmentos intestinais analisados (duodeno: $122,4 \pm 0,75$; jejuno: $107,9 \pm 4,47$; íleo: $87,2 \pm 2,70$), quando comparado aos seus respectivos controles (duodeno: $248,1 \pm 1,62$; jejuno: $214,7 \pm 6,45$; íleo: $153,9 \pm 5,26$). No entanto, o BCF na dose de 10mg/kg reverteu de forma significativa ($p < 0,05$) o encurtamento dos vilos no duodeno ($199,0 \pm 4,30$) e jejuno ($139,1 \pm 5,45$), quando comparados aos respectivos grupos 5-FU, porém sem diferença estatisticamente significativa no íleo ($101,5 \pm 5,58$).

De forma semelhante, a administração de 5-FU promoveu o encurtamento das criptas do duodeno ($37,99 \pm 1,72$), jejuno ($36,14 \pm 1,82$) e íleo ($33,23 \pm 0,96$), quando comparados aos respectivos grupos salina ($p < 0,05$) (duodeno: $76,73 \pm 1,63$; jejuno: $75,16 \pm 2,40$; íleo: $69,90 \pm 1,76$). Contudo, o BCF na dose de 10mg/kg reverteu significativamente ($p < 0,05$) o encurtamento das criptas dos segmentos intestinais (duodeno: $67,80 \pm 2,57$; jejuno: $54,32 \pm 1,39$; íleo: $40,20 \pm 1,70$), quando comparado aos grupos 5-FU.

Figura 12. Efeito do β -cariofileno na altura dos vilos e profundidade das criptas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

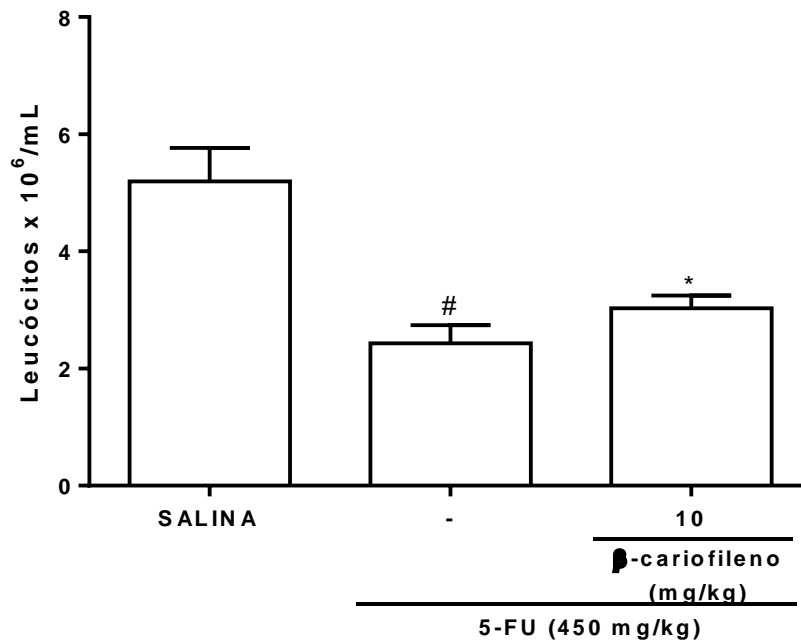


5-FU diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a altura dos vilos e profundidade das criptas do duodeno, jejuno e íleo, quando comparado ao grupo salina. O BCF (10 mg/kg) previniu de forma significativa ($p < 0,05$) o encurtamento dos vilos e das criptas induzido pelo 5-FU. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M., pelo teste ANOVA seguido de *Student Newman-Keulsz*. #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina; *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo 5-FU.

5.5 Efeito do β -cariofileno sobre a contagem de leucócitos em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU

Por meio da contagem global de leucócitos (**Figura 13**), observou-se que o 5-FU diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o número de leucócitos ($2,42 \pm 0,11$), quando comparado ao grupo salina ($5,19 \pm 0,21$). O BCF na dose de 10 mg/kg reverteu significativamente ($p < 0,05$) a contagem total de leucócitos ($3,17 \pm 0,18$), quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 13. O β -cariofileno aumenta a contagem global de leucócitos no sangue periférico de camundongos em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



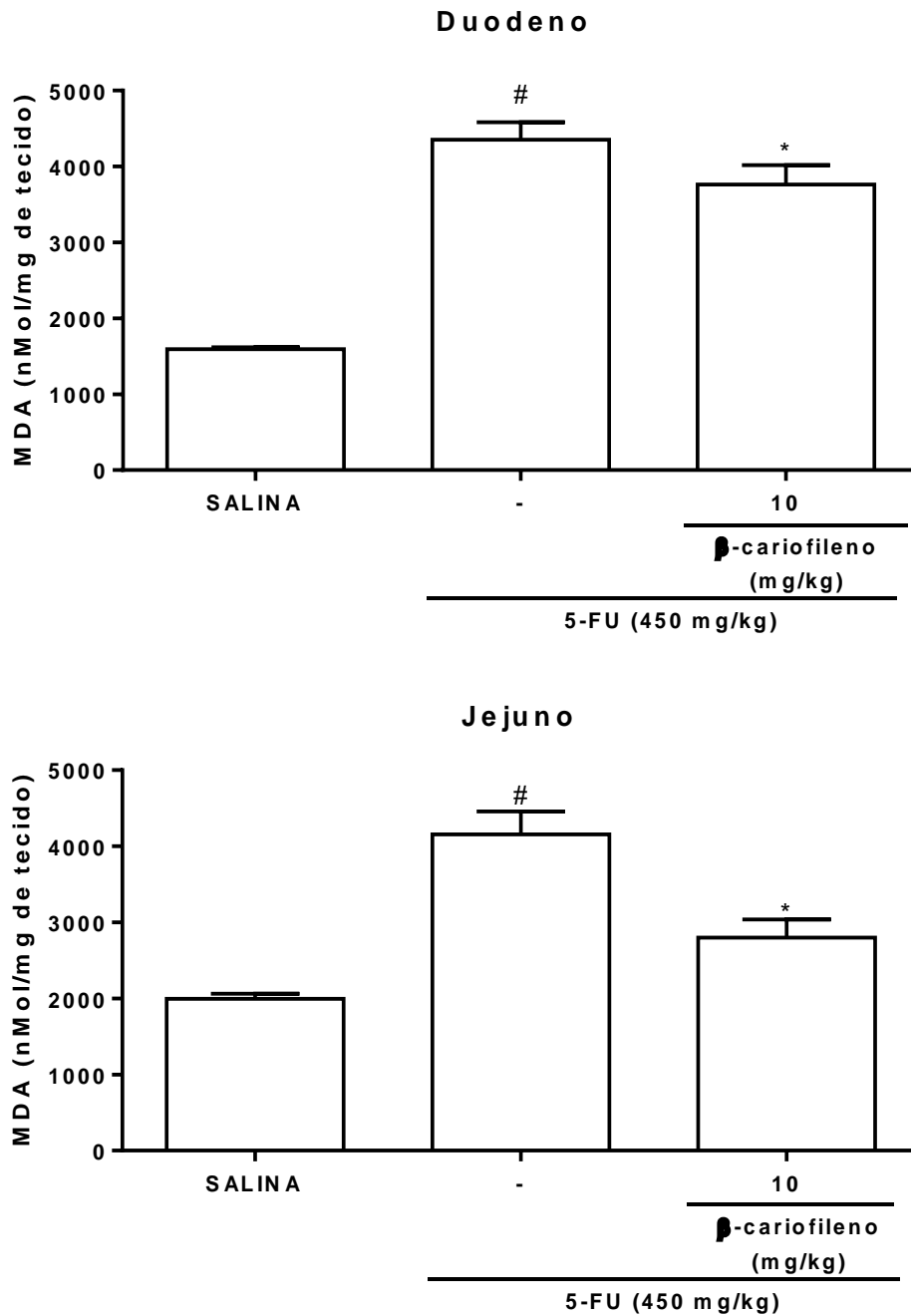
Os valores foram apresentados como média+EPM dos níveis de leucócitos expressos em mL de sangue periférico. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

5.6 Efeito do β -cariofileno sobre os níveis de MDA em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU

O malodialdeído (MDA) constitui um marcador de estresse oxidativo, uma vez que é produto da peroxidação lipídica pela ação de espécies reativas de oxigênio.

Quanto aos níveis de MDA, quando comparado ao grupo salina (duodeno: $1593 \pm 26,16$; jejuno: $1993 \pm 67,07$), houve significante ($p < 0,05$) aumento dos níveis deste marcador de peroxidação lipídica pelo 5-FU no duodeno ($4353 \pm 230,1$) e jejuno (4157 ± 300). O BCF na dose de 10mg/kg reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de MDA nos segmentos intestinais analisados (duodeno: $3763 \pm 253,6$; jejuno: $2800 \pm 237,2$), em comparação ao grupo 5-FU (**Figura 14**).

Figura 14. O β -cariofileno reduz os níveis de MDA no duodeno e jejuno em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU



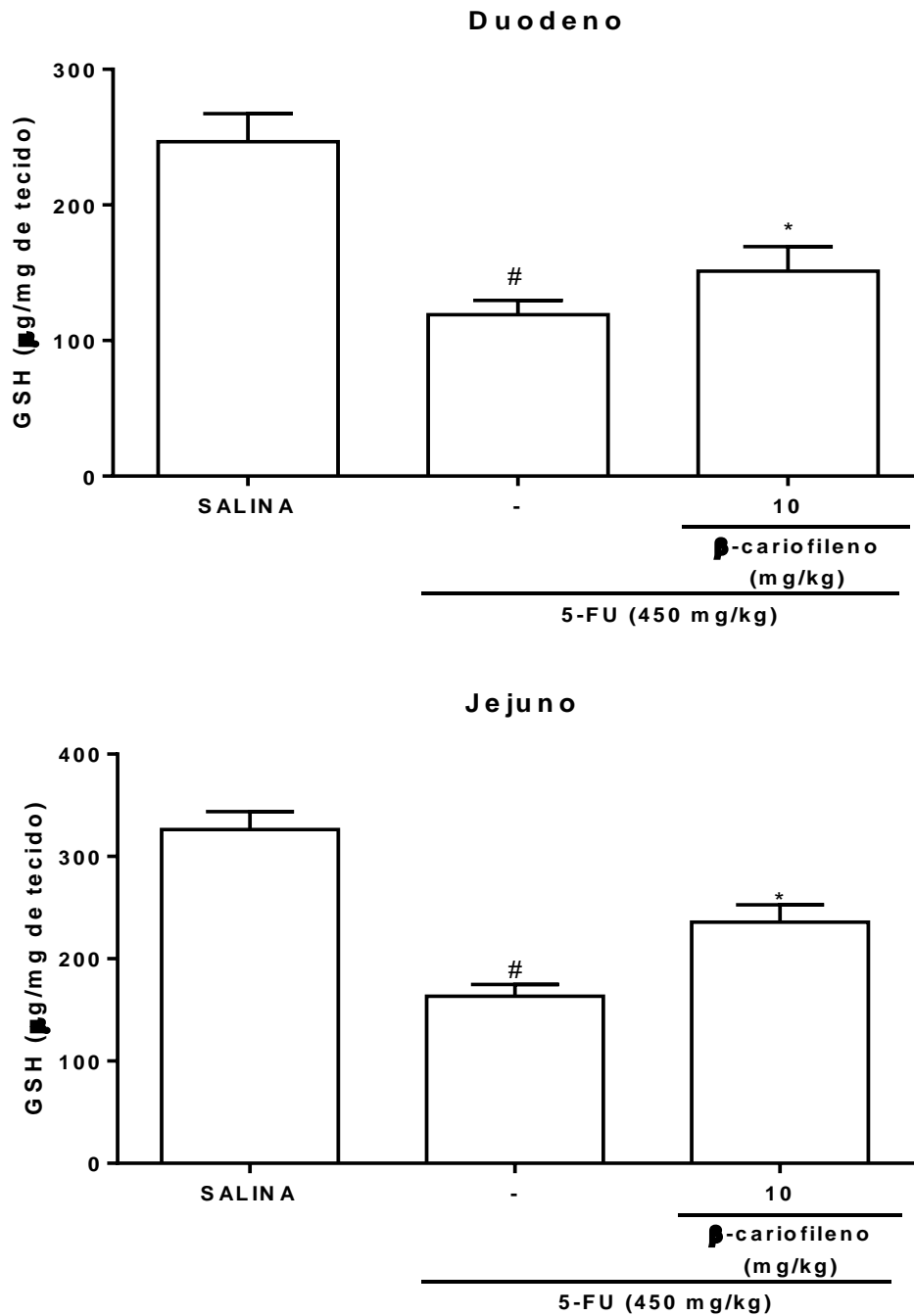
Os segmentos do intestino delgado foram coletados para avaliação dos níveis de MDA, o qual constitui um marcador de peroxidação lipídica. 5-FU eleva significativamente ($p < 0,05$) os níveis de MDA em todos os segmentos intestinais, quando comparado ao grupo controle. O BCF na dose de 10mg/kg reduz os níveis de MDA no duodeno e jejuno. Os valores foram apresentados como média+EPM dos níveis de MDA expressos em Mol/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido de *Student Newman-Keuls*, onde #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

5.7 Efeito do β -cariofileno sobre os níveis de GSH em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU

A glutathiona reduzida (GSH) constitui em uma defesa antioxidante endógena, que se apresenta em altos níveis em circunstâncias fisiológicas normais, porém passa a ser gradativamente consumida durante os processos inflamatórios, devido a sua ação neutralizante contra EROs.

Em relação aos níveis de GSH, o 5-FU reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis da enzima antioxidante no intestino delgado (duodeno: $119,0 \pm 4,352$; jejuno: $163,3 \pm 11,64$), quando comparado ao grupo controle (duodeno: $246,6 \pm 8,461$; jejuno: $326,3 \pm 17,46$). Em contrapartida, o BCF na dose de 10 mg/kg aumentou os níveis de GSH no duodeno ($151,2 \pm 7,349$) e jejuno ($235,6 \pm 17,03$), quando comparado ao grupo 5-FU (**Figura 15**).

Figura 15. O β -cariofileno aumenta os níveis de GSH no duodeno e jejuno em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU



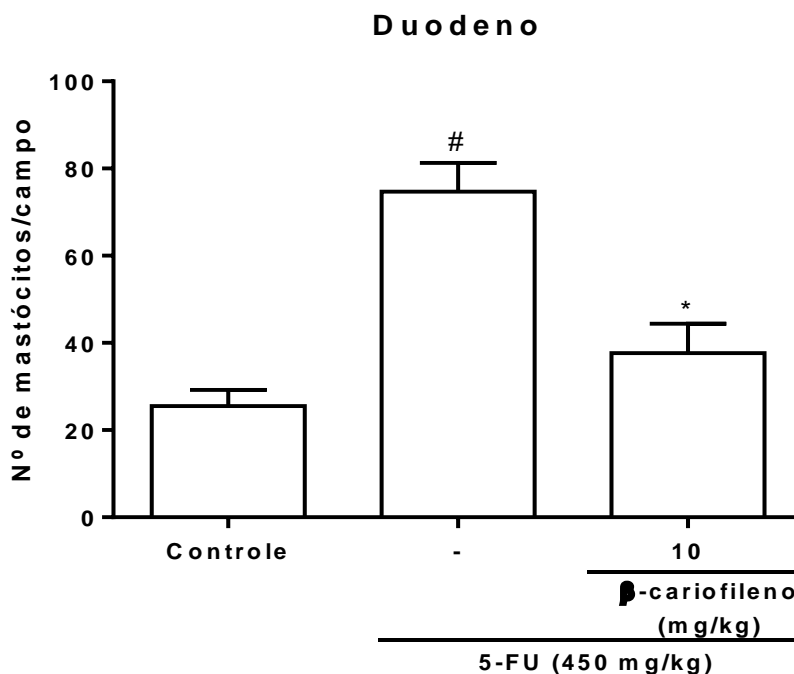
Os valores foram apresentados como média+EPM dos níveis de GSH expressos em µg/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

5.8 Efeito do β -cariofileno sobre a contagem de mastócitos em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU

A coloração de segmentos intestinais com azul de toluidina permite a visualização microscópica da presença de mastócitos, propiciando a verificação de infiltração leucocitária. Pelo fato de terem apresentado uma melhor resposta ao tratamento com o BCF, segmentos do duodeno dos animais submetidos a mucosite intestinal foram escolhidos para coloração com azul de toluidina.

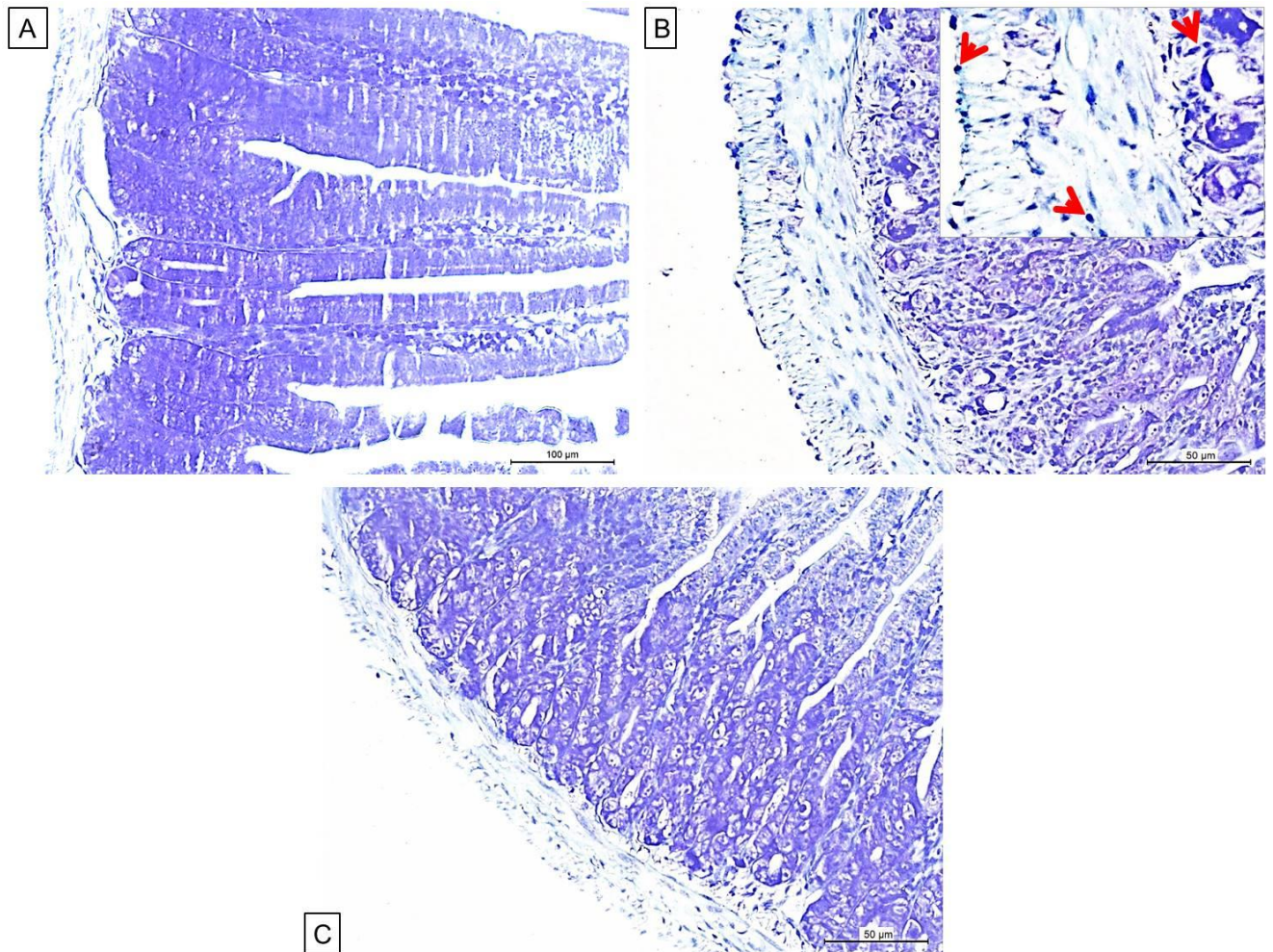
De acordo com a **Figura 16**, observou-se que houve um significativo ($p < 0,05$) aumento na contagem de mastócitos no grupo 5-FU ($74,73 \pm 2,68$), quando comparado ao grupo controle ($25,50 \pm 1,50$). Em contrapartida, o BCF na dose de 10 mg/kg reduziu o número destas células leucocitárias no segmento intestinal analisado ($37,70 \pm 3,00$), em comparação ao grupo 5-FU.

Figura 16. O β -cariofileno reduz a contagem de mastócitos no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU



Os valores foram apresentados como média+EPM dos níveis de mastócitos expressos em nº de mastócitos $\times 10^6$ /campo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 17. Efeito do β -cariofileno sobre a contagem de mastócitos no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU



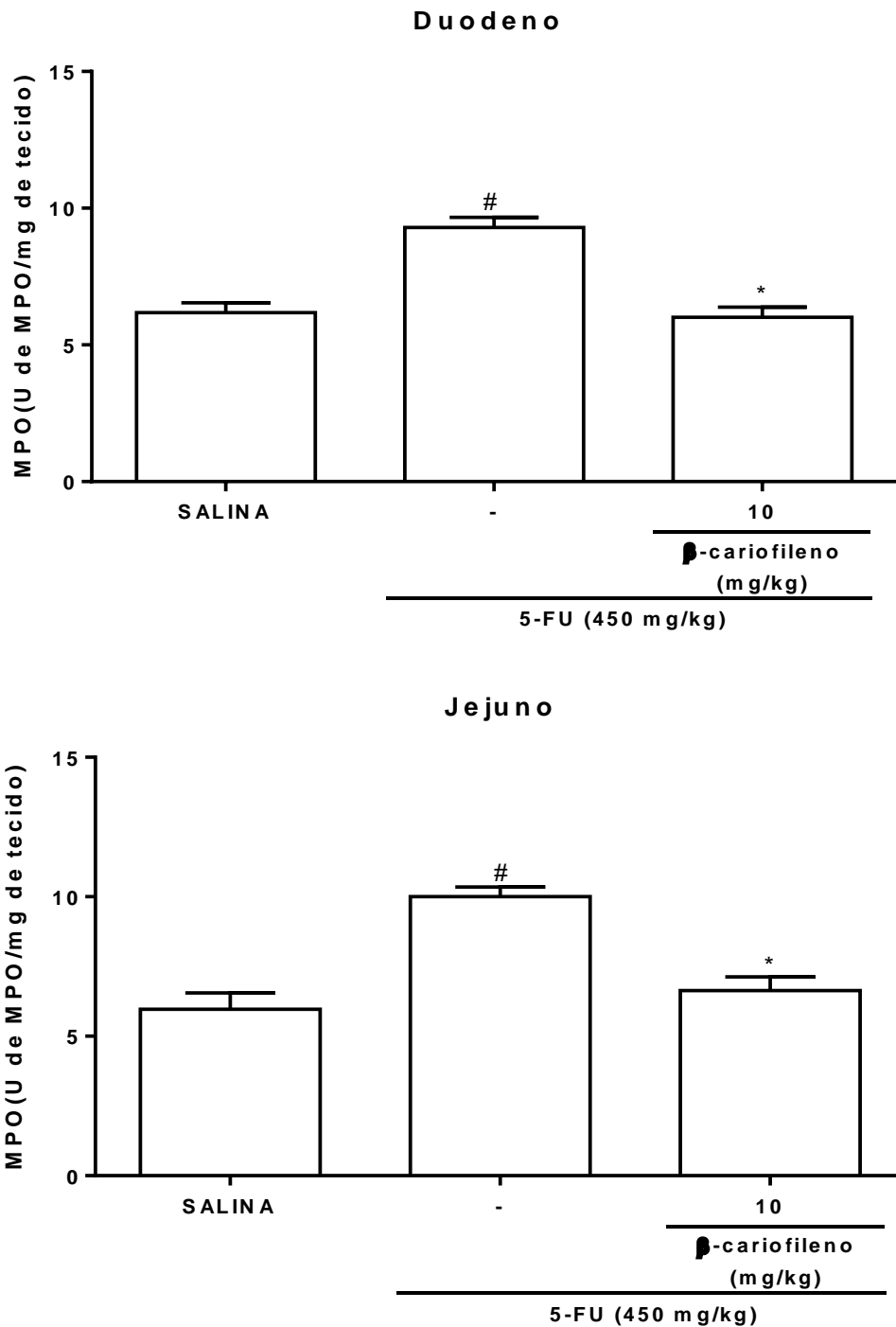
Os segmentos foram corados com azul de toluidina para a contagem de mastócitos. O 5-FU (B) aumenta o número de mastócitos (setas vermelhas) no duodeno, quando comparado ao grupo controle (A). O BCF na dose de 10mg/kg (C) reduz a quantidade destas células no mesmo segmento intestinal, quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m (40x).

5.9 Efeito do β -cariofileno sobre os níveis de MPO em modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU

A mieloperoxidase (MPO) constitui em um marcador de infiltração leucocitária, uma vez que está presente em neutrófilos granulocíticos.

Observou-se que houve um significativo ($p < 0,05$) aumento nos níveis de MPO por 5-FU (duodeno: $9,298 \pm 0,363$; jejuno: $10,00 \pm 0,344$), quando comparado ao grupo controle (duodeno: $6,176 \pm 0,365$; jejuno: $5,964 \pm 0,593$). Em contrapartida, o BCF na dose de 10 mg/kg reduziu os níveis da enzima nos segmentos intestinais analisados (duodeno: $6,017 \pm 0,369$; jejuno: $6,633 \pm 0,493$), em comparação ao grupo 5-FU (**Figura 18**).

Figura 18. O β -cariofileno reduz os níveis de MPO do duodeno e jejuno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os valores foram apresentados como média+EPM dos níveis de MPO expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

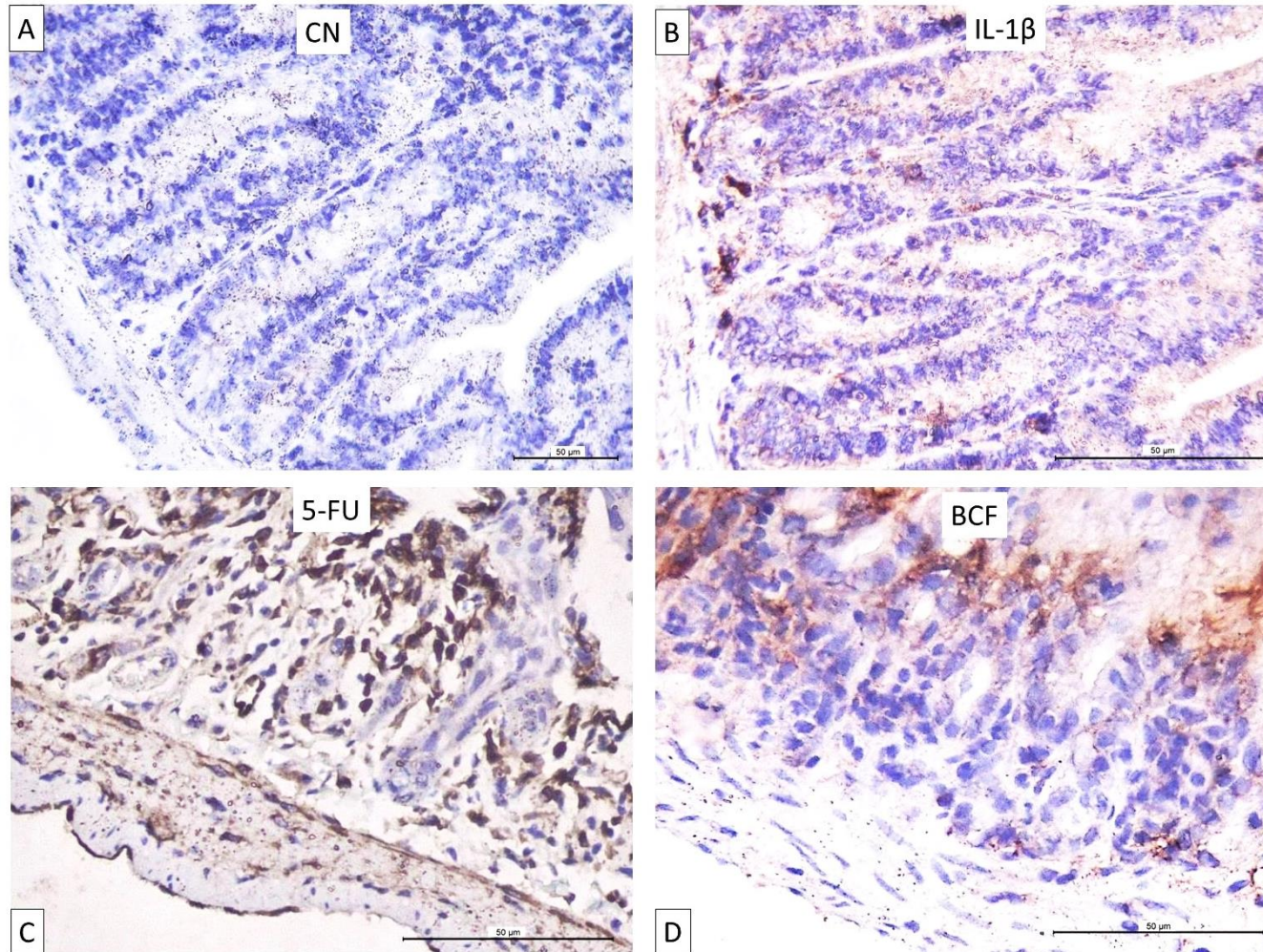
5.10 Efeito do β -cariofileno sobre a expressão de IL-1 β no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU

A IL-1 β consiste em uma citocina pró-inflamatória cuja expressão se encontra aumentada em processos inflamatórios.

Em condições fisiológicas, observa-se pouca expressão de IL-1 β no duodeno de animais do grupo controle (**Figura 19 B**). Em contraste a este grupo, o 5-FU aumentou consideravelmente a imunomarcção da citocina (**Figura 19 C**). O tratamento com o BCF (10mg/kg) reduziu a imunomarcção de IL-1 β na mucosite intestinal induzida por 5-FU (**Figura 19 D**).

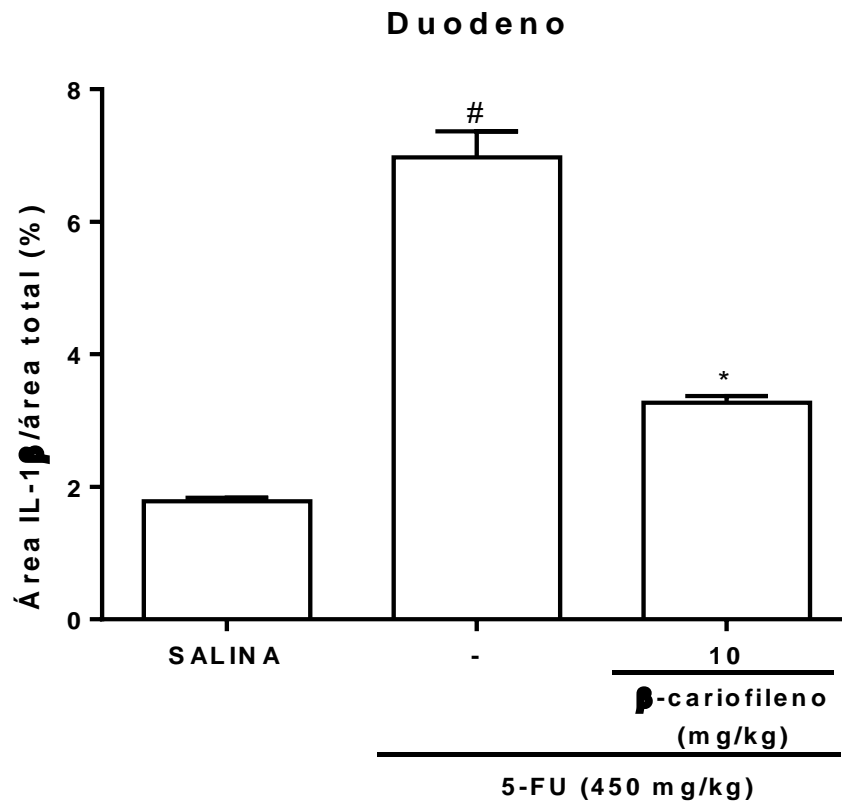
Conforme a **Figura 20**, a análise quantitativa revelou que o 5-FU aumenta de forma significante ($p < 0,05$) a porcentagem da área imunomarcada para IL-1 β ($6,971 \pm 0,16$) no duodeno, quando comparado ao grupo controle ($1,728 \pm 0,02$). O tratamento com o BCF na dose de 10mg/kg diminui significativamente ($p < 0,05$) a área marcada para a citocina ($3,271 \pm 0,04$), quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 19. O β -cariofileno reduz a imunomarcação de IL-1 β no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os duodenos de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU foram processados para a realização de imunohistoquímica para marcação da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Observou-se um aumento da imunomarcação para IL-1 β no duodeno do grupo 5-FU (450mg/kg) (C), quando comparado ao grupo controle (B). Em contraste, no grupo tratado com o BCF na dose de 10mg/kg (D) houve diminuição da expressão da citocina, quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m (X40).

Figura 20. O β -cariofileno reduz a porcentagem de área imunomarcada para IL-1 β no duodeno de modelo de mucosite intestinal induzidos por 5-FU



Os valores foram apresentados como média+EPM da expressão de IL-1 β expressos em % da área IL-1 β /área total. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

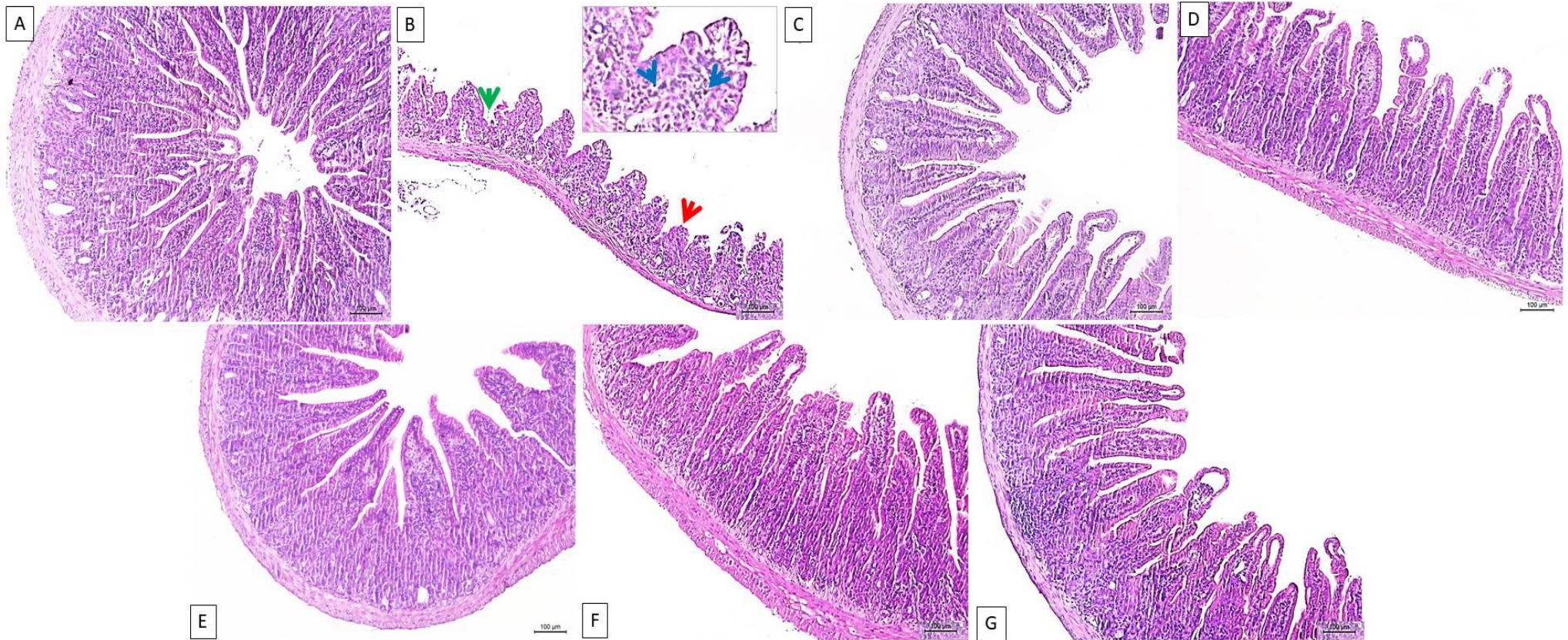
5.11 Papel do óxido nítrico no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

A coloração com hematoxilina e eosina dos segmentos do duodeno permitiu a visualização de alterações microscópica da arquitetura tecidual induzidas pelo 5-FU na mucosa intestinal.

Conforme a **Figura 21**, a administração do substrato de NOS, a L-arginina, quando administrado simultaneamente ao BCF (**Figura 21 D**) ou ao L-NAME (**Figura 21 G**), não reverteu os efeitos destas substâncias no duodeno de modelos de mucosite intestinal induzida por 5-FU. O L-NAME (**Figura 21 E**) preservou parcialmente a arquitetura do tecido e reduziu o infiltrado inflamatório. Ainda, o inibidor de NOS não reverteu o efeito protetor do BCF no duodeno (**Figura 21 F**), demonstrando um efeito sinérgico do inibidor de NOS e do sesquiterpeno contra as alterações microscópicas induzidas pelo quimioterápico na arquitetura tecidual, evidenciadas pela observação preservação da altura dos vilos e da estrutura das criptas, além de redução de infiltrado leucocitário.

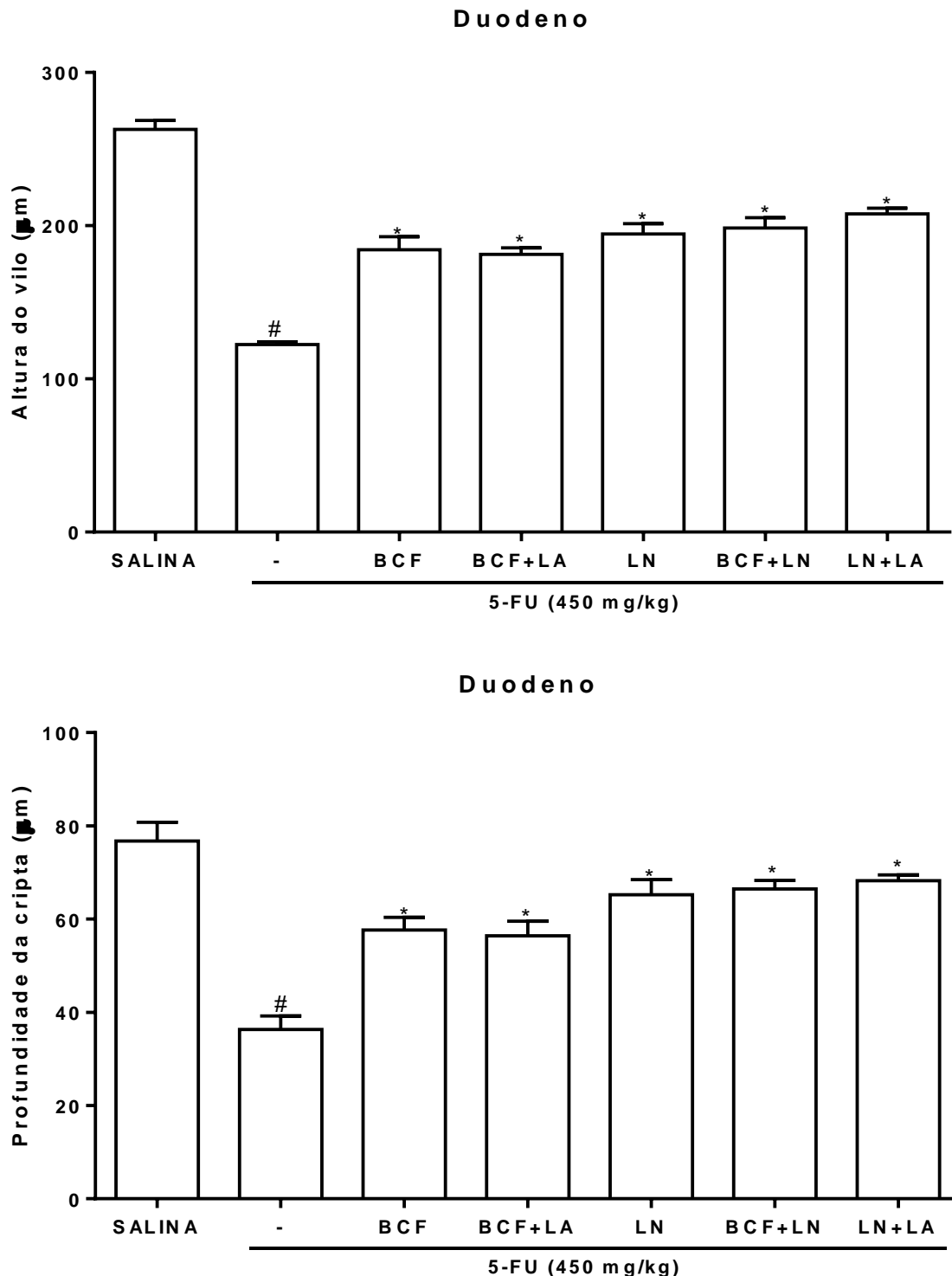
De acordo com a **Figura 22**, o L-NAME aumentou ($p < 0,05$) a altura dos vilos ($194,6 \pm 2,734$) e das criptas ($65,23 \pm 1,330$), quando comparado ao grupo 5-FU. Ainda, na associação de BCF e L-NAME também houve uma significativa preservação da altura dos vilos ($198,5 \pm 2,744$) e profundidade das criptas ($66,43 \pm 0,767$), quando comparado ao 5-FU, de forma semelhante ao observado no grupo L-NAME e L-arginina (vilos: $207,8 \pm 1,514$; criptas: $68,22 \pm 0,504$).

Figura 21. Efeito do L-NAME, L-Arginina e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



5-FU (B) reduziu a altura dos vilos (setas vermelhas) e a profundidade das criptas (setas verdes) e promoveu um infiltrado de células leucocitárias (setas azuis) em segmentos do duodeno do modelo de mucosite intestinal, quando comparado ao grupo salina (A). Mesmo quando associado à L-arginina (D), o BCF (C) previne em grande parte as alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico. O L-NAME (E) também preservou em parte a arquitetura da mucosa duodenal. A associação de BCF e L-NAME (F) preservou de forma mais eficaz a arquitetura tecidual em segmentos do duodeno, de forma semelhante ao grupo L-NAME e L-arginina (G). Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μ m (X10).

Figura 22. Efeito do L-NAME, L-Arginina e β -cariofileno sobre as alterações morfológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



5-FU diminuiu ($p < 0,05$) a altura dos vilos e profundidade das criptas do duodeno, quando comparado ao grupo salina. O BCF (10mg/kg) preveniu ($p < 0,05$) o encurtamento dos vilos e das criptas induzido pelo 5-FU, mesmo quando associado a L-arginina (LA). O tratamento simultâneo com BCF e L-NAME (LN) preveniu de forma mais eficaz o encurtamento dos vilos e criptas, assim como o grupo L-NAME+L-arginina (LN+LA), de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo 5-FU. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M., pelo teste ANOVA seguido de *Student Newman-Keulsz*. #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina; *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo 5-FU.

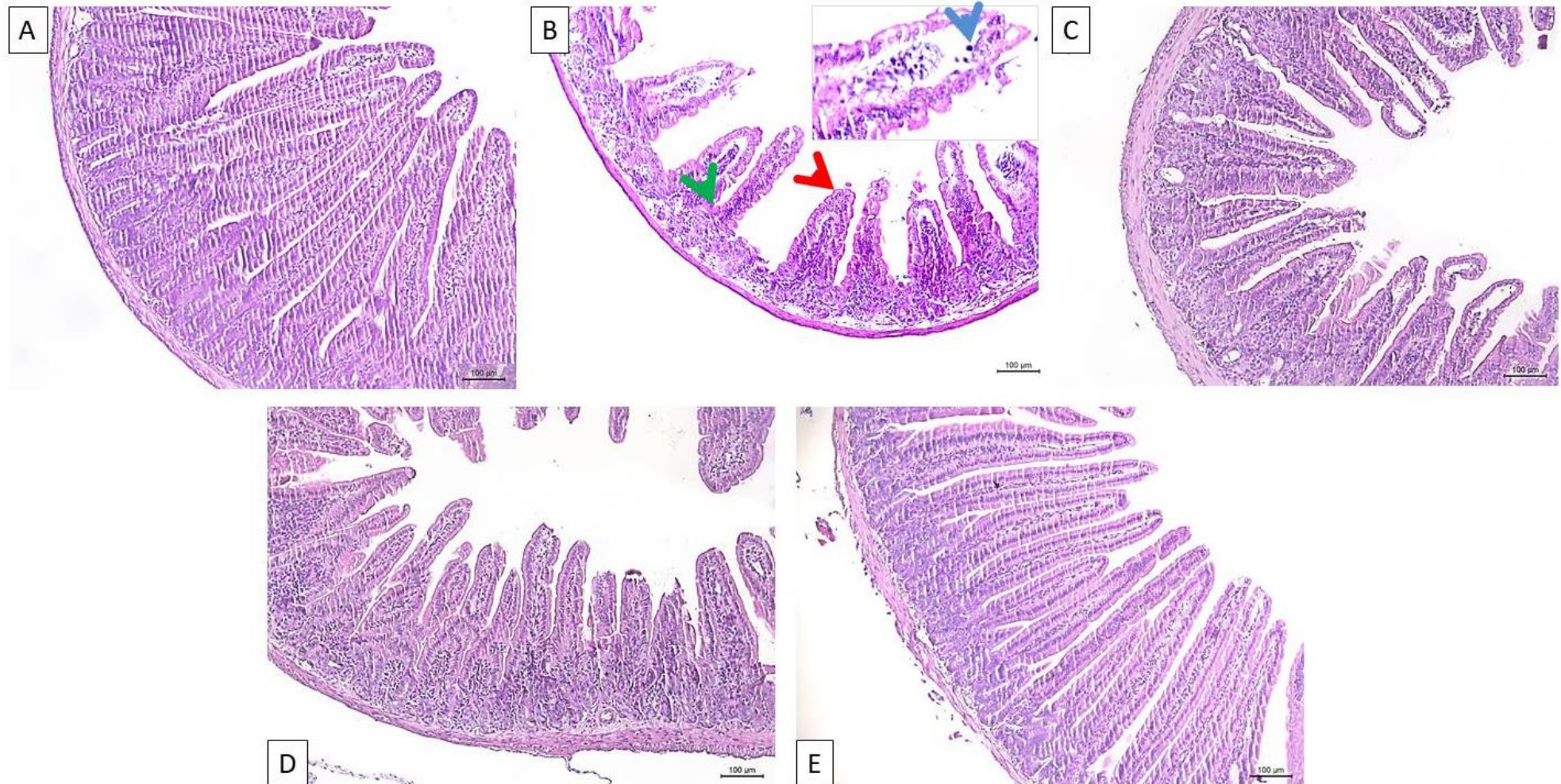
5.12 Papel da COX-2 no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

5.12.1 Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas e morfométricas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

De acordo com a Figura 23, o tratamento simultâneo com a celecoxibe e o BCF demonstrou que o inibidor de COX-2 não reverteu o efeito do sesquiterpeno contra as alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico na arquitetura tecidual, evidenciadas pela observação preservação da altura dos vilos e da estrutura das criptas, além de redução de infiltrado leucocitário.

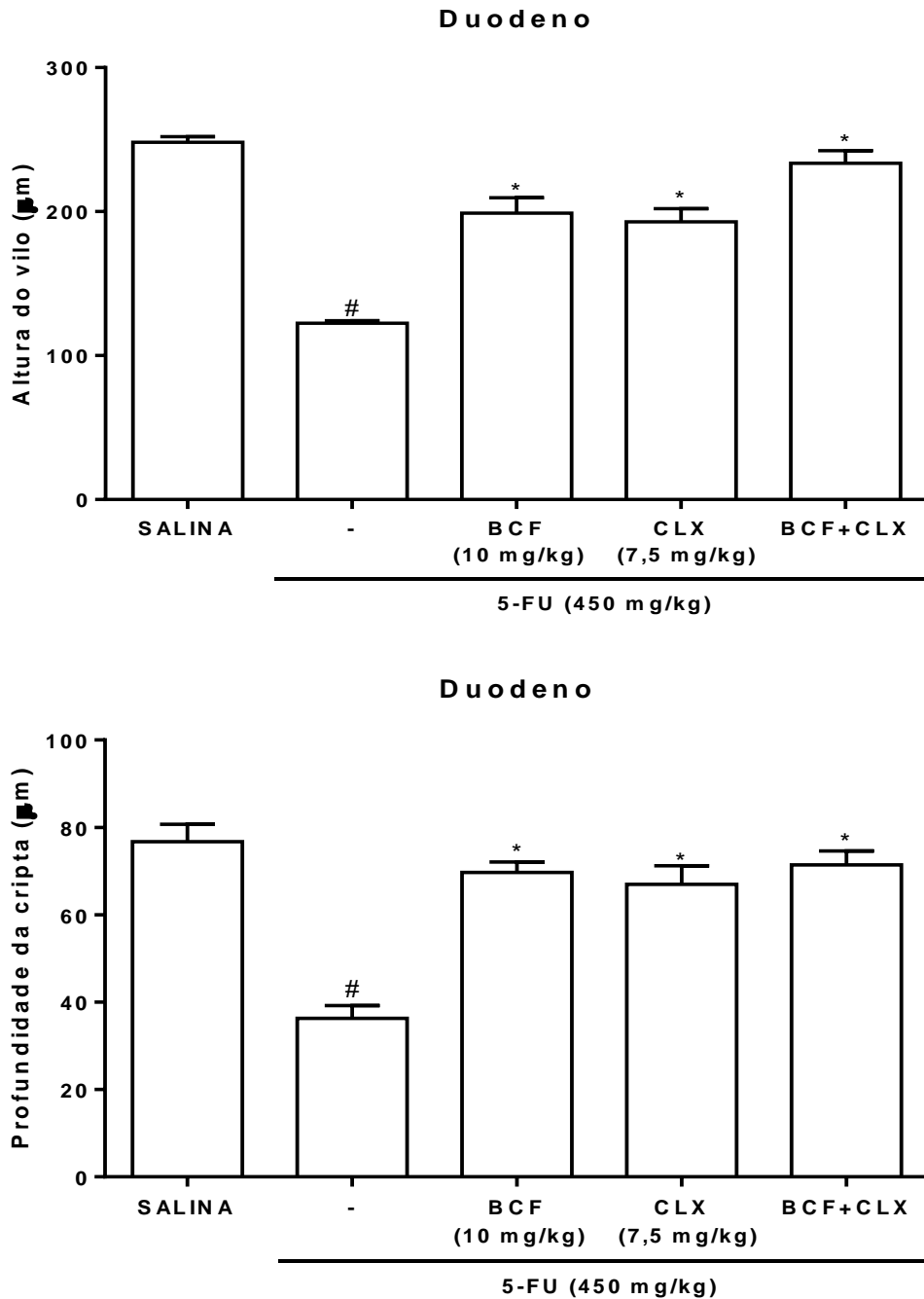
Como observado na **Figura 24**, a celecoxibe na dose de 7,5mg/kg preservou de forma significativa ($p < 0,05$) a altura dos vilos ($192,9 \pm 3,755$) e a profundidade das criptas ($66,95 \pm 1,736$), quando comparado ao grupo 5-FU. Ainda, na associação de BCF e celecoxibe também houve uma significativa preservação da altura dos vilos ($233,5 \pm 3,636$) e profundidade das criptas ($71,42 \pm 1,301$), quando comparado ao 5-FU.

Figura 23. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações histopatológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



5-FU (B) reduziu a altura dos vilos (setas vermelhas) e a profundidade das criptas (setas verdes) e promoveu um infiltrado de células leucitárias (setas azuis) em segmentos do duodeno do modelo de mucosite intestinal, quando comparado ao grupo salina (A), enquanto que o BCF (C) e CLX (D) previniram as alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico. A associação de BCF e CLX (E) preservou de forma mais eficaz a arquitetura tecidual do duodeno. Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μ m (X10).

Figura 24. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre as alterações morfológicas observadas em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU



O 5-FU diminuiu ($p < 0,05$) a altura dos vilos e profundidade das criptas no duodeno, quando comparado ao grupo salina. O BCF (10mg/kg) e CLX (7,5mg/kg) previniram ($p < 0,05$) o encurtamento dos vilos e das criptas induzido pelo 5-FU. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M., pelo teste ANOVA seguido de *Student Newman-Keulsz*. #, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina; *, $p < 0,05$, quando comparado ao grupo 5-FU.

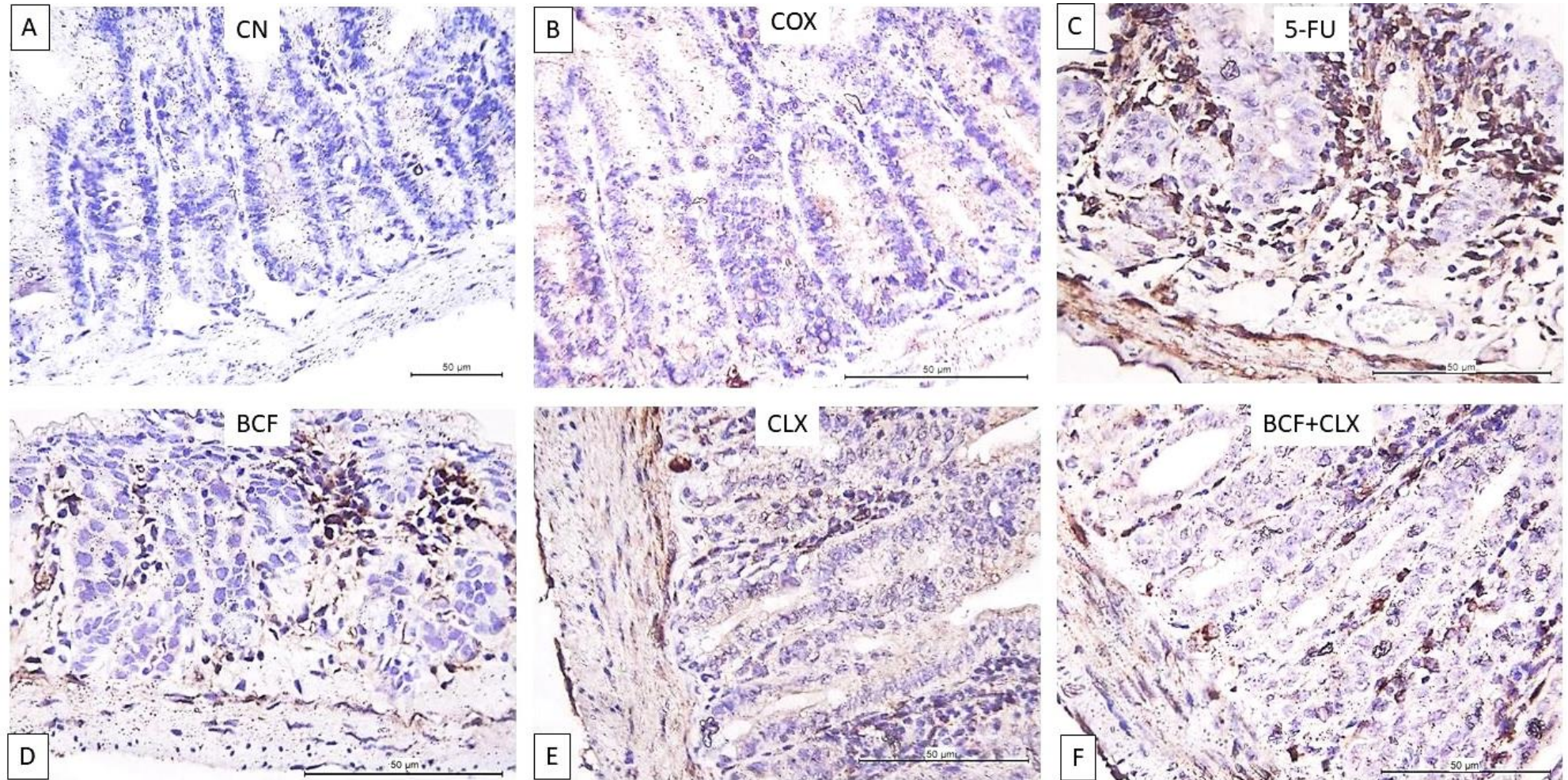
5.12.2 Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a expressão de COX-2 em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Buscando avaliar a ação do BCF sobre a expressão de COX-2, realizou-se a análise qualitativa e quantitativa da marcação celular por imuno-histoquímica para a enzima.

Em condições fisiológicas, observa-se pouca expressão de COX-2 no duodeno de animais do grupo controle (**Figura 25 B**). Em contraste a este grupo, o 5-FU aumentou consideravelmente a imunomarcção da enzima (**Figura 25 C**). De forma semelhante ao grupo tratado com celecoxibe (**Figura 25 E**), o tratamento com o BCF (10mg/kg) reduziu a imunomarcção de COX-2 na mucosite intestinal induzida por 5-FU (**Figura 25 D**). Uma menor imunomarcção da expressão da enzima foi observada nos grupos tratados simultaneamente com o BCF e celecoxibe (**Figura 25 F**).

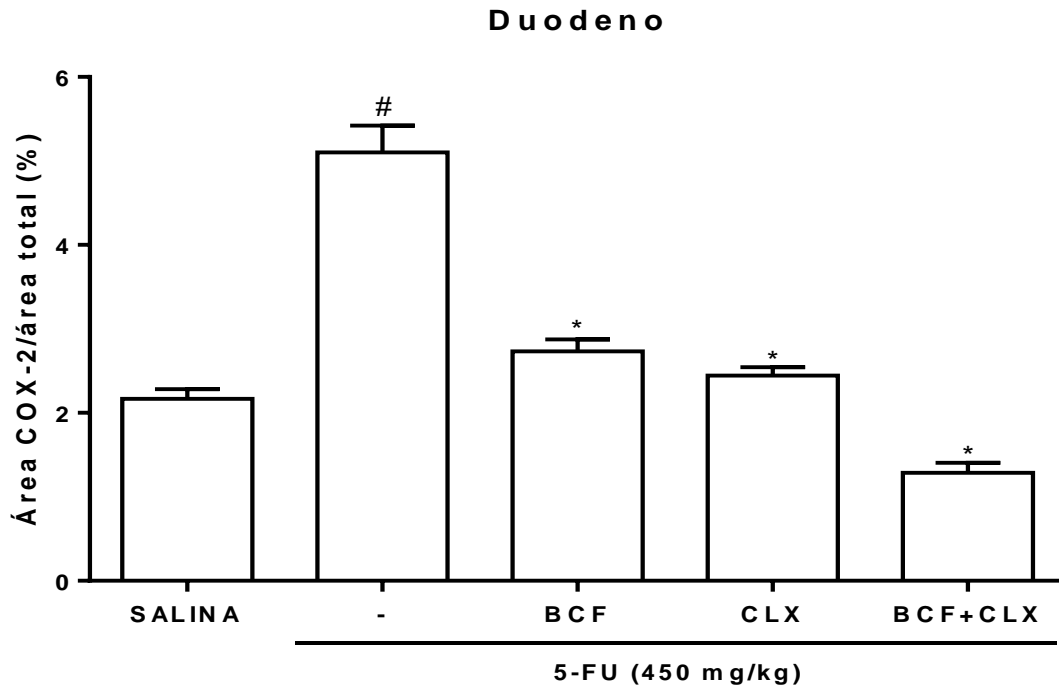
Conforme a **Figura 26**, a análise quantitativa revelou que o 5-FU aumenta de forma significativa ($p < 0,05$) a porcentagem da área imunomarcada para COX-2 ($5,10 \pm 0,12$) no duodeno, quando comparado ao grupo controle ($2,16 \pm 0,04$). Assim como o grupo celecoxibe ($2,44 \pm 0,04$), o tratamento com o BCF na dose de 10mg/kg diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a área marcada para a enzima ($2,73 \pm 0,05$), quando comparado ao grupo 5-FU. Ainda, o tratamento simultâneo com o BCF e celecoxibe ($1,28 \pm 0,04$) reduziu em aproximadamente quatro vezes a expressão de COX-2, quando comparado ao grupo 5-FU.

Figura 25. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a imunomarcação de COX-2 no duodeno de animais submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os duodenos de camundongos submetidos   mucosite intestinal induzida por 5-FU foram processados para a realiza o de imunohistoquímica para marca o de COX-2. Observou-se um aumento da imunomarca o para COX-2 no duodeno do grupo 5-FU na dose de 450mg/kg (C), quando comparado ao grupo controle (B). O tratamento com o BCF e/ou celecoxibe diminuiu a expressão da enzima, quando comparado ao grupo 5-FU. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m (X40).

Figura 26. Efeito da Celecoxibe e β -cariofileno sobre a área imunomarcada para COX-2 no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU



Os valores foram apresentados como média+EPM da expressão de COX-2 expressos em % da área IL-1 β /área total. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de *Student Newman Keuls*, onde # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Salina; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, reproduziu-se o modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU, como descrito na literatura, ao qual foram incluídas adaptações. A mucosite intestinal foi induzida com administração de 5-FU na dose única de 450mg/kg em camundongos *Swiss*, como descrito por Soares et al. (2008). Nesta dose, os sinais clínicos apresentados por pacientes que fazem uso desse quimioterápico, tais como diarreia, perda de peso e inflamação da mucosa intestinal, podem ser mimetizados em modelos de animais para estudos experimentais da mucosite intestinal (SOARES et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; JUSTINO et al., 2015).

Neste trabalho, o β -cariofileno foi testado nas doses de 10, 30 e 100mg/kg, as quais foram escolhidas de acordo com doses terapêuticas já relatadas na literatura, e observou-se que o tratamento com o BCF na dose de 10mg/kg apresentou o melhor efeito terapêutico, prevenindo a mucosa contra os danos induzidos pelo quimioterápico, principalmente no duodeno. O BCF foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído e aumentar a concentração de glutatona, além de reduzir a contagem de mastócitos, mieloperoxidase e reduzir a expressão de IL-1 β e COX-2 no modelo de mucosite intestinal. Além disso, verificou-se que seu mecanismo de ação não envolve a participação da via do óxido nítrico ou da COX-2.

Inicialmente, investigou-se o efeito do sesquiterpeno sobre a perda de peso induzida pelo 5-FU, a qual consiste em uma das principais manifestações clínicas apresentadas por pacientes tratados com quimioterapia (SHEPPARD et al., 2014; OP DEN KAMP et al., 2014). No presente estudo, foi evidenciado a perda de peso em todos os animais tratados com o 5-FU, o que permitiu a confirmação da indução de mucosite intestinal pelo quimioterápico, corroborando com a literatura (COSTA, 2017). A perda ponderal pode ser justificada pelo fato de o 5-FU induzir uma alta toxicidade no intestino delgado, causando sua disfunção e comprometendo a retenção de alimentos e absorção de seus nutrientes (AL-SHAMMARI et al., 2016).

Além disso, observou-se também que o tratamento com o BCF não preveniu a perda de peso induzida pelo quimioterápico. Uma possível explicação para este resultado é a de que o sesquiterpeno pode não ter sido eficaz em inibir integralmente a toxicidade causada pela alta dose de 5-FU (450mg/kg) utilizada conforme o protocolo adotado neste trabalho para a indução da mucosite intestinal.

Neste distúrbio intestinal, episódios de vômito e diarreia comprometem a retenção e a digestão de alimentos, e, por conseguinte, a absorção de nutrientes, resultando na perda de peso (KUIKEN; RINGS; TISSING, 2015). Associado à má nutrição, a perda de peso consiste em um fator de risco para o desenvolvimento de infecções, comprometendo a qualidade de vida e a terapia e, conseqüentemente, as chances de sobrevivência do paciente (LIN et al., 2015).

Por conseguinte, as análises histopatológicas realizadas demonstraram que o 5-FU altera a arquitetura da mucosa intestinal, provocando a redução dos vilos, nos quais se observa um intenso infiltrado de células inflamatórias, e vacuolização de células epiteliais, conforme já evidenciado em estudos anteriores (LIU et al., 2013; SOARES et al., 2013; AL-REFAI, 2014; ARAÚJO et al., 2015). Estes achados conferiram grau máximo de intensidade de mucosite intestinal induzida por 5-FU no duodeno, jejuno e íleo. Isto ocorre porque a capacidade de auto-renovação de células epiteliais que se proliferam rapidamente, como as do intestino, é comprometida com a utilização de drogas citotóxicas, com o 5-FU, ocasionando no achatamento de vilos e comprometimento das criptas (ZUO et al., 2014).

Entretanto, identificou-se que o BCF na dose de 10 mg/kg exibiu um efeito protetor, prevenindo o encurtamento dos vilos e cripta e, conseqüentemente, preservando a arquitetura da mucosa intestinal da toxicidade induzida pelo 5-FU. Corroborando com este resultado, já foi demonstrado o efeito protetor do β -cariofileno em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos *Swiss*. Nesse estudo, Lemos et al., (2015) observou que o BCF na dose de 30 mg/kg (baseada na dose de omeprazol utilizada clinicamente) demonstrou um efeito gastroprotetor nos modelos de úlcera, reduzindo a quantidade e a severidade das lesões induzidas pelo álcool.

O efeito nefroprotetor do BCF (10 mg/kg) contra os danos à morfologia, à resposta inflamatória e, conseqüentemente, contra a disfunção renal induzida pela cisplatina em camundongos também já foi relatado (HORVÁTH et al., 2012). Ainda recentemente, foi demonstrado que a proteção conferida pelo β -cariofileno em células da glia está relacionada a sua capacidade em estimular defesas antioxidantes, prevenindo as células contra agentes citotóxicos (ASSIS et al., 2014).

A mielossupressão também é relatada como um dos principais efeitos colaterais induzidos por 5-FU (LIU; LIA; LI, 2017). Os resultados do presente estudo demonstraram que o 5-FU reduz a quantidade de leucócitos totais no sangue

periférico, quando comparado ao grupo controle, enquanto que o BCF na dose de 10 mg/kg previne a mielossupressão induzida pela droga.

Esta mielossupressão, caracterizada principalmente por neutropenia, é resultado do efeito inibitório do crescimento e da citotoxicidade de drogas antineoplásicas sobre as células da medula óssea (BARRETO et al., 2014). Adicionalmente, há relatos de que esta mielossupressão está relacionada à indução de estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico na medula óssea (NUMAZAWA et al., 2010; BASU et al., 2015).

Altos níveis de estresse oxidativo também são evidenciados na mucosite intestinal induzida por 5-FU, levando a uma intensificação da severidade desta patologia (AL-ASMARI, 2016). Um dos principais danos celulares causados pelo excesso de EROs nas células é a peroxidação lipídica das membranas celulares (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). O malondialdeído é um produto final resultado da peroxidação lipídica mediada por EROs, sendo amplamente utilizado como marcador de estresse oxidativo (SINGH et al., 2014).

Para prevenir a oxidação celular, o organismo dispõe de um conjunto de enzimas antioxidantes endógenas, composto principalmente por catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH) capazes de neutralizar radicais livres e impedir que estes se acumulem e interfiram nos processos biológicos (EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013). A enzima GSH participa não só da defesa no sistema antioxidante, como também de processos metabólicos, agindo contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ZHAO et al., 2016). De forma semelhante, SOD e CAT promovem a neutralização de radicais livres, tais como radicais superóxido produzidos nas mitocôndrias (CRISTIANA; ELENA; NINA, 2014).

Diante disto, verificou-se o efeito antioxidante do β -cariofileno por meio das dosagens de MDA e GSH. Os resultados do presente estudo sugerem altos níveis de estresse oxidativo induzidos por 5-FU, identificado por altos níveis de MDA, além de uma redução dos níveis da enzima antioxidante GSH, corroborando com os resultados já demonstrados em estudos anteriores (ARIFA et al., 2014; JUSTINO et al., 2014; KIM et al., 2015; FILHO et al., 2016; AL-ASMARI et al., 2016). Sabe-se que a indução de estresse oxidativo mediada por 5-FU consiste em um dos mecanismos de ação da droga, que promove o aumento de radicais livres altamente citotóxicos, causando danos a moléculas biológicas, como lipídios, proteínas e material genético,

e comprometendo o sistema de defesa antioxidante endógeno (POLK et al., 2014; FU et al., 2014; FOCACCETTI et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

Em constraste, evidenciou-se que a administração do BCF na dose de 10 mg/kg reduziu os níveis de MDA e aumentou os níveis de GSH no duodeno e jejuno, indicando um efeito antioxidante do sesquiterpeno. Estes resultados sugerem que o BCF induz uma maior disponibilização de defesas antioxidantes pelo organismo para o combate e neutralização dos radicais livres produzidos direta ou indiretamente pelo quimioterápico 5-FU. Corroborando com os estes resultados do presente estudo, foi demonstrado que o β -cariofileno extraído a partir de óleos essenciais exibe uma potente atividade antioxidante, uma vez que inibe da peroxidação lipídica e promove a eliminação de radicais livres, principalmente radicais hidroxil e ânions superóxido (CALLEJA et al., 2012; DONATI et al., 2014; DAHAM et al., 2015).

Ainda em concordância com os resultados aqui obtidos, além de GSH, o efeito antioxidante do sesquiterpeno também foi evidenciado por meio da manutenção dos níveis e da atividade da enzima CAT em tecidos cerebrais, após a suplementação com o BCF (50mg/kg, i.p.) em modelos experimentais de doença de Parkinson (OJHA et al., 2016). Adicionalmente, há evidências de que a atividade antioxidante do BCF está relacionada a sua habilidade de estimular a atividade da enzima de detoxificação glutationa S- transferase (GST), cuja importância está na sua propriedade de conjugar metabólitos tóxicos à GSH, otimizando o funcionamento desta enzima no organismo (ALVAREZ-GONZÁLEZ; MADRIGAL; CASTRO-GARCÍA, 2014).

As EROs produzidos em excesso por quimioterápicos lesionam principalmente o DNA de células do epitélio de revestimento da mucosa intestinal, resultando em ativação de proteínas pró-apoptóticas, tais como p53, culminando em apoptose destas células (STRINGER, 2013; GAO et al., 2014). Como consequência, ocorre a deterioração do epitélio intestinal, que permite a exposição direta da mucosa a patógenos, principalmente bactérias, induzindo uma resposta inflamatória local (KUIKEN; RINGS; TISSING, 2015).

Com a indução de uma resposta inflamatória primária, células do sistema imune, além de citocinas pró-inflamatórias, são ativadas e recrutadas para o local da inflamação, acentuando a severidade da mucosite intestinal (COSTA, 2016). O infiltrado de células inflamatórias consiste em uma das características da mucosite, tendo sido documentado em diversos estudos da patologia, e ocorre por meio da

ativação de moléculas de adesão por NF- κ B (SOARES et al., 2013; LEOCÁDIO et al., 2015; TANG et al., 2017).

Diante do exposto, com o objetivo de avaliar a intensidade do processo inflamatório, realizou-se a contagem de mastócitos e o ensaio de mieloperoxidase (MPO), que são técnicas amplamente utilizadas como marcadores de infiltração leucocitária (ARIFA et al., 2014; TANG et al., 2017). Os mastócitos desempenham um papel relevante na inflamação e na resposta imune (WANG et al., 2014). Estas são células granulocíticas que se encontram fisiologicamente em pequenas quantidades em tecidos conectivos e na mucosa, podendo ser ativadas por meio da estimulação de receptores IgE de alta afinidade, além da ativação direta por diferentes antígenos, citocinas, fatores de crescimento e hormônios, levando a liberação de diferentes mediadores inflamatórios pela célula (CONTI, 2013).

Durante uma reação inflamatória, mastócitos são recrutados e se acumulam no estroma de tecidos inflamados, fagocitando ou produzindo EROs para destruição de microrganismos e modulando as respostas imunes inatas e adaptativas (URB; SHEPPARD, 2012). Por conseguinte, atuam produzindo e liberando leucotrienos, prostaglandinas, mediadores vasoativos, fatores ativadores de plaquetas, quimiocinas e citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , para recrutamento e ativação de outras células leucocitárias para o local da inflamação (THEOHARIDES; VALENT; AKIN, 2015).

Recentemente, foi demonstrado um aumento no número de mastócitos em tecidos intestinais de modelo de mucosite induzida por agentes quimioterápicos (AL-ASMARI et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2017). Consistentemente, os resultados do presente estudo revelaram um aumento no número destas células em amostras de duodeno de animais tratados com 5-FU. O acúmulo de mastócitos no tecido inflamado leva ao recrutamento de múltiplas células inflamatórias, intensificando a resposta inflamatória e resultando, principalmente, na indução de dano tecidual (URB; SHEPPARD, 2012). Um dos mecanismos de ação pelo qual mastócitos desempenham seu papel na inflamação intestinal é por meio da ação de ATP extracelular, que medeia a ativação de receptores purinérgicos P2X7 por mastócitos durante a iniciação e exacerbação da inflamação intestinal, demonstrado em modelo colite (KURASHIMA et al., 2012).

A administração de BCF na dose de 10mg/kg reduziu a quantidade de mastócitos no duodeno dos animais tratados, quando comparado a grupo 5-FU.

Acredita-se que a redução do infiltrado leucocitário tenha contribuído para o efeito protetor do BCF na mucosa intestinal, considerando-se a liberação de histamina pelos mastócitos remanescentes no tecido inflamado. Incluindo mastócitos, a histamina é liberada por uma grande variedade de células e, por meio da ligação a receptores histamínicos H1, H2, H3 e H4, participa de diversos processos fisiológicos no TGI, modulando respostas imunológicas, a nocicepção visceral, a secreção gástrica e intestinal, assim como a motilidade intestinal (DEITEREN et al., 2015).

Localizados nas células epiteliais intestinais e no plexo submucoso do cólon, os receptores H2 ativados pela histamina podem modular a desgranulação de mastócitos, promover o aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, ao mesmo tempo em que inibe a secreção de IL-12, TNF- α e IL-23, desempenhando um efeito anti-inflamatório (SMOLINSKA et al., 2013). Além disso, a ativação destes receptores pode diminuir a imunorreatividade através da redução da resposta quimiotática de células inflamatórias, atenuando o processo inflamatório e desempenhando efeito protetivo na mucosa intestinal (CORUZZI et al., 2015; EL-MAHDY et al., 2013).

A MPO é uma enzima peroxidase expressa em leucócitos granulares azurofílicos, e tem sua atividade aumentada durante processos infecciosos, desempenhando um papel fundamental na iniciação e progressão da inflamação (GUVEN et al., 2013). Seu mecanismo de ação consiste na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e outros radicais livres, os quais são tóxicos a microrganismos, e causam sua destruição (RYMASZEWSKI et al., 2014).

Corroborando com o aumento do número de mastócitos, confirmou-se um intenso infiltrado leucocitário induzido pelo 5-FU por meio da observação de uma alta atividade da enzima MPO liberada por leucócitos azurofílicos, tais como neutrófilos e macrófagos, também presentes no local da inflamação. De fato, esta infiltração leucocitária ocorre como um mecanismo de defesa do organismo, para bloquear a liberação de proteases e EROs tóxicas produzidas por microrganismos aos tecidos, sendo necessário para a resolução da inflamação intestinal induzida pela quimioterapia (ORTEGA-GOMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

Entretanto, observou-se que o BCF na dose de 10 mg/kg suprimiu a atividade de MPO nos segmentos intestinais analisados, demonstrando um resultado semelhante ao evidenciado por Cho e colaboradores (2015), que relataram a

redução nos níveis da enzima em modelo de colite com a administração do BCF nas doses de 30 e 300 mg/kg, por gavagem. A redução na atividade da MPO indica uma redução do infiltrado de células leucocitárias e, conseqüentemente, da atenuação da inflamação promovida pelo sesquiterpeno no tecido lesionado (MARCELINO et al., 2015).

As células do sistema imune inato, incluindo neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas, controlam a invasão por patógenos através da liberação de quimiocinas e citocinas, as quais permitem a sua interação com outras células e mediam a resposta imune no organismo (LACY;STOW, 2017). Esta liberação inclui famílias de citocinas pró- e anti-inflamatórias que iniciam uma cascada de eventos que deve ser precisamente regulada para um funcionamento apropriado do sistema imune (STRIZ et al., 2014).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias que exercem um papel fundamental no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, destacam-se TNF- α , IL-6 e IL-1 β , cujas expressões são diretamente moduladas por meio do fator nuclear NF- κ B (SULTANI, 2012). Logo, verificou-se a expressão de IL-1 β em amostras de duodeno do presente modelo de mucosite intestinal e observou-se um aumento na área imunomarcada para a citocina no grupo tratado com 5-FU, quando comparado o grupo controle, como já foi demonstrado anteriormente em outros modelos de mucosite intestinal (ARIFA et al. 2014; BEN-LULU et al., 2012).

A IL-1 β é citocina pró-inflamatória produzida e secretada principalmente por células componentes do sistema imune inato, e é essencial para a resposta imune na resistência a patógenos (AFONINA et al., 2015). Sob estímulo inflamatório, a IL-1 β é ativada e se liga a receptores IL-1R, promovendo a ativação de uma complexa rede de citocinas e mediadores inflamatórios, além da expressão de integrinas em leucócitos e células endoteliais (RIDER et al., 2011; DINARELLO, 2017). Ainda, os efeitos pro-inflamatórios de IL-1 β estão relacionados à sua capacidade de promover o recrutamento e retenção de macrófagos no tecido, por via dependente de caspase-1, e induzir a produção de enzimas envolvidas no processo inflamatório, tais como COX-2, iNOS e fosfolipase A (RIDER et al., 2011; MOLDOVEANU et al., 2015).

No presente estudo, ainda, verificou-se que a área imunomarcada para IL-1 β foi reduzida nos animais tratados com o BCF na dose de 10 mg/kg, demonstrando que o efeito anti-inflamatório do BCF no intestino delgado também está relacionado

à sua capacidade de reduzir a expressão e liberação desta citocina pró-inflamatória por células no duodeno. Estas observações corroboram com os relatos recentes que demonstram um efeito protetor do sesquiterpeno por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , em diferentes modelos de inflamação (HORVÁTH et al., 2012; LIU et al., 2015; CHO et al., 2015; FIDYT et al., 2016).

Por conseguinte, com o objetivo de se identificar um dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório do β -cariofileno, decidiu-se investigar o papel do óxido nítrico frente à ação do sesquiterpeno na inflamação intestinal induzida por 5-FU. Para isso, utilizou-se um inibidor de NOS, o L-NAME, e o substrato L-arginina para análise da produção de NO e expressão gênica de iNOS.

O NO, em baixas concentrações, participa de vários processos biológicos, porém uma superprodução desta molécula durante o estresse oxidativo está relacionada a diversos mecanismos patológicos (MA et al., 2017). Este gás é produzido em diferentes tipos de células e é sintetizado com a conversão da L-arginina em L-citrulina, por meio da ação de diferentes isoformas de óxido nítrico sintases (nNOS, eNOS e iNOS), sendo essencial na regulação de diversos processos fisiológicos (EL-NOOR et al., 2017). Contudo, durante o processo inflamatório, ocorre uma maior expressão da enzima citoplasmática iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzível), em resposta a radicais livres, citocinas pró-inflamatórias e outros estimulantes fisiopatológicos (GARRY et al., 2015; LIU et al., 2015). Como consequência, ocorre uma superprodução de NO associado à radicais livres, que induz efeitos citotóxicos e promove a expressão de NF- κ B, o qual regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias e das enzimas iNOS e COX-2 relacionadas ao processo inflamatório (ANTOSOVA et al., 2012; ANTOSOVA et al., 2015).

Já é bastante reportado na literatura que na mucosite intestinal induzida por agentes quimioterápicos ocorre um aumento significativo na expressão de iNOS e, conseqüentemente, a superprodução de NO promotor de danos celulares e lesões na mucosa intestinal (KIM et al., 2015; AL-ASMARI et al., 2016; ALVARENGA et al., 2017; NATARAJAN et al., 2017). Nosso estudo demonstrou que o tratamento com o L-NAME, inibidor de NOS, preveniu de forma parcial o encurtamento dos vilos causados pelo 5-FU, corroborando com os resultados apresentados em estudos anteriores (LEITÃO et al., 2011).

A análise histopatológica também demonstrou que a administração de L-arginina ou L-NAME não reverteu o efeito protetor do β -cariofileno. Estes resultados

sugerem que, assim como o inibidor L-NAME, o BCF atua de modo a atenuar os danos teciduais causados pela produção excessiva de NO por NOS durante o processo inflamatório, o que confere o efeito protetor do sesquiterpeno na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Este efeito protetor também pode estar relacionado à capacidade do BCF em modular a ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual está diretamente envolvido na ativação da transcrição de iNOS sob estímulo inflamatório (FIDYT et al., 2016). Em suma, estes resultados sugerem que não há participação da via do óxido nítrico no efeito protetor do BCF contra os danos induzidos por 5-FU na mucosa intestinal.

A ativação da transcrição do fator nuclear NF- κ B na mucosite intestinal também determina a expressão de enzimas fundamentais no processo inflamatório, como é o caso da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (CHANG et al., 2012). Diante disto, pretendeu-se verificar o papel da síntese de prostaglandinas pela COX-2 frente ao efeito anti-inflamatório do β -cariofileno, utilizando-se para isso a celecoxibe, que consiste em um inibidor seletivo da enzima.

A COX-2 consiste em uma das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), expressa principalmente em células endoteliais e células envolvidas no processo inflamatório, que catalisa a conversão de ácido aracdônico em prostaglandinas G2 (PGG2), e desta em prostaglandinas H2 (PGH2) (ZARGUI; ARFAEI, 2011). Uma vez produzidas, PGH2 são convertidas em metabólitos mais estáveis, incluindo SPGE2, PGF2, PGI2 e tramboxanos (GUPTA et al., 2011). Ao contrário de COX-1, que produz prostaglandinas que regulam funções fisiológicas, tais como gastroproteção e integridade homeostática, a COX-2 é ativada apenas em resposta a estímulos fisiopatológicos, tais como inflamatórios, citocinas ou toxinas, resultando na liberação excessiva de prostanóides (JUAN et al., 2015).

Os prostanóides sintetizados pela COX-2 desempenham um papel importante na resposta inflamatória, contribuindo para o desenvolvimento dos sinais de inflamação aguda em tecidos inflamados (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Além disso, há relatos que a atividade da COX-2 causa depleção da atividade de GSH (que reduz PGG2 em PGH2) em células redutoras, promove a geração de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no tecido nervoso, contribuindo para a toxicidade causada por Fe^{2+} , e induz a geração de EROS que causam injúrias à mucosa do tecido inflamado (LAUBE; KNISS, PIETZSH, 2016; CHANG et al., 2012).

A celecoxibe é uma droga anti-inflamatória não esteróides (AINEs), com propriedades analgésica, antipirética, anti-inflamatória e anticâncer, utilizadas no tratamento de dor aguda, artrite reumatoide, osteoartrite e câncer colorretal (ZWEERS et al., 2011; ZHOU et al., 2017). O efeito anti-inflamatório da celecoxibe se dá pela inibição da síntese das prostaglandinas por COX-2, bloqueando seletivamente a produção de PGG₂ e PGH₂ sintase (GONG et al., 2012). Também foi demonstrado que a CLX diminui a inflamação por meio da redução da expressão gênica de COX-2 e IL-6 e também através da modulação de NF- κ B, que controla a ativação da transcrição dos genes da enzima (KAWASHIMA et al., 2013; AFZAL et al., 2013).

De acordo com as análises histopatológicas e morfométricas do presente estudo, o tratamento com o sesquiterpeno, seguida pela administração da celecoxibe, desempenhou um efeito sinérgico na proteção do duodeno, preservando em maiores proporções a integridade dos vilos e criptas e reduzindo consideravelmente o infiltrado inflamatório na mucosa do segmento analisado. Correlacionando com estas observações, evidenciou-se ainda que, de forma similar ao CLX, o BCF reduziu significativamente a expressão de COX-2 no duodeno dos animais submetidos a mucosite intestinal, principalmente quando associado ao referido inibidor. Os resultados encontrados no presente estudo apontam para um efeito inibitório na via da COX-2 pelo β -cariofileno, de forma tão eficaz quanto ao da celecoxibe, sugerindo que este efeito esteja diretamente envolvido no efeito anti-inflamatório desempenhado pelo sesquiterpeno na mucosa intestinal.

Em concordância com nossos resultados, há relatos de que a inibição seletiva de COX-2 induz efeitos benéficos, atenuando o processo inflamatório (GUPTA; YADAV, 2011). Fidy e colaboradores (2016) relatam que o BCF reduz a expressão de COX-2, assim de iNOS, TNF- α , prostaglandinas E₂, via supressão da ativação de NF- κ B, promovendo analgesia. Ainda, foi demonstrado que a administração oral de BCF (48mg/kg) reduziu a expressão da COX-2, assim como a expressão gênica de TNF- α e IL-1 β no córtex cerebral, exibindo um efeito anti-inflamatório eficaz por meio da ativação de receptores canabinóides CB₂ (CHENG et al., 2014).

Adicionalmente, estudos demonstram que a COX-2 medeia a oxigenação de endocanabinóides, levando à inativação dos mesmos, e, conseqüentemente, à inibição da ativação de receptores canabinóides (DUGGAN et al., 2011; VECCHIO; MALKOWSKI et al, 2011). Visando-se bloquear esta inativação, os autores sugerem

a utilização de inibidores seletivos de COX-2 como uma nova estratégia terapêutica para aumentar a sinalização de endocanabinóides, otimizando as abordagens clínicas que envolvem a estimulação destas moléculas para obtenção de efeito terapêutico (HERMANSON et al., 2014).

Com base nos resultados apresentados do presente estudo, o β -cariofileno na dose de 10 mg/kg promove um efeito benéfico na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Este efeito se dá por meio da manutenção dos níveis totais de leucócitos no sangue periférico, redução de estresse oxidativo e da inflamação, por meio da diminuição da infiltração leucocitária, dos níveis de IL-1 β e COX-2, contra a toxicidade induzida pelo quimioterápico na mucosa intestinal. Diante do exposto, o β -cariofileno apresenta propriedades terapêuticas promissoras para o tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se que o β -cariofileno no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU:

- ✓ Reverte em grande parte as alterações histológicas induzidas por 5-FU na mucosa intestinal de camundongos;
- ✓ Reverte a leucopenia induzida pelo quimioterápico no sangue periférico
- ✓ Diminui o estresse oxidativo, por meio do aumento os níveis de GSH e da redução dos níveis de MDA na mucosa intestinal;
- ✓ Diminui a inflamação, por meio da redução da infiltração por mastócitos, dos níveis de MPO e da expressão de IL-1 β e COX-2 na mucosa intestinal
- ✓ Não envolve a participação da via do NO ou da COX-2 nos seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.A.; TAHA, M.O.; ZIHLIF, M.A.; DISI, A.M. β -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, n. 1-3, p.12-19, 2013.
- AFONINA, S.; MULLER, C.; MARTIN, S.J.J; BEYART, R. Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 991-1004, 2015.
- AFZAL, A.; ORIQAT, G.; KHAN, M.A.; JOSE J. et al. Chemistry and biochemistry of terpenoids from curcuma and related species. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 3, n. 1, p. 1-55, 2013.
- AHMED, W.; KATZ, S. Therapeutic use of cannabis in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v.12, n. 11, 2016.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; ELEZGARAI, I.; RICO, I.; ZARANDONA, I. et al. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, 2016.
- ALBERTI, T.B.; BARBOSA, W.L.R./ VIEIRA, J.L.F.; RAPOSO,, N.R.B. et al. (-)- β -caryophyllene, a cb2 receptor-selective phytocannabinoid, suppresses motor paralysis and neuroinflammation in a murine model of multiple sclerosis. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 691, p. 1-14, 2017.
- AL MANSOURI, S.; OJHA, S.; AL MAAMARI, E.; AL AMERI, M.; et al, The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 260-268, 2014.
- AL-ASMARI, A.K.; KHAN,A.Q.; AL-QASIM, A.M. et al. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 908–916, 2015.
- AL-ASMARI, A.K.; KHAN,A.Q.; AL-ASMARI, S.A.; AL-RAWI, A. et al. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. **Journal of Complementary & Integrative Medicine**, 2016.
- AL-REFAI, A.S. Immunohistochemical study of the effect of chamomile extract on 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in albino rats. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 5, n. 4, 2014.
- AL-SHAMMARI, A.M.; SALMAN, M. I.; SAIHOOD, Y.D; YASEEN, N.Y. et al. In vitro synergistic enhancement of newcastle disease virus to 5-fluorouracil cytotoxicity against tumor cells. **Biomedicines**, v. 4, n. 3, 2016.

ALVARENGA, E.M., SOUZA, L. K., ARAÚJO, T. S., NOGUEIRA, K. 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.

ALVAREZ-GONZÁLEZ, I.A.; BUJAJIDAR, E.M.; GARCÍA, S.C. Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidant and GST induction activities. **Journal of Toxicologic Sciene**.v. 39, n. 6, p. 849-859, 2014.

AMIEL, E.; OFIR, R.; DUBAI, N; SOLOWAY, E. et al. β -Caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of gilead (commiphora gileadensis), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

ANDRADE-SILVA, M. CORREAS, L.B.; CANDÉA et al. The cannabinoid 2 receptor agonist b-caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by Mycobacterium bovis BCG by inhibiting neutrophil migration. **Inflammation Research**, v. 65, n. 11, p. 869-879, 2016.

ARAÚJO, A.A.; BORBA, P.B.; SOUZA, F.H.D.; NOGUEIRA, A.C. 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.; LAZZAROTTO, C.R.; FIGUEIREDO, I.L.; COSTA, T.B. 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.

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

ASLAM, M.S.; NAVEED, S.; AHMED, A.; ABBAS, Z. et al. Side effects of chemotherapy in cancer patients and evaluation of patients opinion about starvation based differential chemotherapy, **Journal of Cancer Therapy**, v. 5, p. 817-822, 2014.

ASSIS, L.C.; STRALIOTTO, M.R.; ENGEL, D.; HORT, M.A. et al. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. **Neuroscience**, v. 24, n. 279, p. 220-231, 2014.

AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIMB, A.; MAHOMOODALLY, M.F. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 89-94, 2015.

ÁVILA, P.H.M.; ÁVILA, R.I.; FILHO, E.X.S.; BASTOS, C.C.C. 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.

AWOUAFACK, M.D.; TANE, P.; KUETES, V.; ELOFF, J.N. Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. In.: **Medicinal Plant Research in Africa**, 2013.

AYALA, A.; MUÑOS, M.F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

AZEVEDO, O. G. R. et al. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Gastroenterology**, v.1 2, n. 35, p. 1-18, 2012.

BAHI, A.; AL MANSOURI, S.; AL MEMARI, E.; AL AMERI, M. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v.135, p. 119–124, 2014.

BAKALI, J.E.; MUCCIOLI, G.G.; BODY-MALAPEL, M. et al. Conformational restriction leading to a selective cb2 cannabinoid receptor agonist orally active against colitis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 198–203, 2015.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G. et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.

BARRETO, J.N.B.; MCCULLOUGH, K.B.; ICE, L.L.; SMITH, J.A. Antineoplastic agents and the associated myelosuppressive effects: a review. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 440, 2014.

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 50-58, 2016.

BASU, A.B.; GHOSH, P.; BHATTACHARJEE, A.; PATRA, A.R. et al. Prevention of myelosuppression and genotoxicity induced by cisplatin in murine bone marrow cells: effect of an organovanadium compound vanadium(III)-l-cysteine. **Mutagenesis**, v. 30, p. 509–517, 2015.

BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; ROSALES, C.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; GÓMEZ, M.I. Control and resolution mechanisms of the inflammatory response 2016. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

BEN-LULU S.; POLLAK, Y.; MOGILNER, J.; BEJAR, J.; et al. Dietary transforming growth factor-beta 2 (tgf-b2) supplementation reduces methotrexate-induced intestinal mucosal injury in a rat. **PLoS ONE**, v 7, n. 9, 2012.

BENTO, A.F.; MARCON, R.; DUTRA, R.C. et al. β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through cb2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, 2011.

BONOMI, M.; BATT, K. Supportive management of mucositis and metabolic derangements in head and neck cancer patients. **Cancers**, v. 7 p.1743-1757, 2015.

BORGES, V.R.A.; RIBEIRO, A.F.; ANSELMO, C.S.; CABRAL, L.M.; SOUZA, V.P. Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers -caryophyllene and humulene in copaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 35– 41. 2013.

STRIZ, I.; BRABCOVA, E.; KOLESAR, L.; SEKERKOVA, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical Science**, v. 126, p. 593-612, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P.P; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n.3, p. 618-622, 1982.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, A.P. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33,n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; DE VASCONCELLOS, M. T. L. Factors associated to persistence with hormonal therapy in women with breast cancer. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 2, p. 284–295, 2014.

CAI, Z.; YANG, J.; SHU, X.; XIONG, X. Chemotherapy-associated hepatotoxicity in colorectal câncer. **Journal of Balkan Union of Oncology**, v. 19, n. 2, p. 350-356, 2014.

CALLEJA, M.A.; VIEITES, J.A.; METERDEZ, T.M.; TORRES, M.I. et al. The antioxidant effect of b-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 394–401, 2013.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, I. P. F.; ARAUJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C. et al. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digestive diseases and sciences**, v. 49, n. 1, p. 65-72, 2004.

CASSINI-VIVEIRA, P.; ARAÚJO, F.A.; DIAS, F.L.C.; RUSSO, R.C. et al. iNOS activity modulates inflammation, angiogenesis, and tissue fibrosis in polyether-polyurethane synthetic implants. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2015, 2015.

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

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

CHANDRAM, S.P.; NATARAJAN, S.B.; CHANDRASEHARAN, S.; SHAHIMI, M.S.B.M. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal câncer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2017, p. 45-48, 2017.

CHANG, C.T.; HO, T.Y.; LIN, H.; LIANG, J.A. et al. 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kb activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2012.

CHAVELI-LÓPEZ, B.; BAGÁN-SEBASTIÁN, J.V. Treatment of oral mucositis due to chemotherapy. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v.8, n.2, p. e201-e209, 2016.

CHEN, Y.; ZHENG, H.; ZHANG, J.; WANG, L.; JIN, X.; GAO, W. Protective effect and potential mechanisms of Wei-Chang-An pill on high-dose 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 90, p. 200-211, 2016.

CHENG, Y.; DONG, Z.; LIU, S. β -Caryophyllene Ameliorates the Alzheimer-Like Phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 Receptor Activation and the PPAR γ Pathway. **Pharmacology**, v. 94, p. 1–12, 2014.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVERG.; NISLOW, C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 20, n.5, p. 648-659, 2013.

CHO, J.Y.; KIM, H.Y.; KIM, S-K.; PARK, J-H. et al. β -Caryophyllene attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via modulation of gene expression associated mainly with colon inflammation. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1039–1045, 2015.

CILDIR, G. LOW, K.C.; TERGAONKAR, V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 414-429, 2016.

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

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

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; POZZOLI, C. Role of histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract. **Frontiers in bioscience**, v. 1, n. 4. p. 226-39, 2012

COSTA, D.V.S. **Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-fluorouracil: regulação de células gliais e de neurônios entéricos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

CRISTIANA, F.; ELENA, A.; NINA, Z. Superoxide dismutase: therapeutic targets in sod related pathology. **Health**, v. 6, p. 975-988, 2014.

DAHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A.; AHMED, M.B.K. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, p. 11808-11829, 2015.

DANENBERG, P.V.; GUSTAVSSON, B.; JOHNSTON, P.; LINDBERG, P., et al. Folates as adjuvants to anticancer agents: chemical rationale and mechanism of action. **Oncology Hematology**, v.106, p. 118-131, 2016.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 0, p. 364–378, 2014.

DAUGHTON, C.G.; RUBOY, I.S. Lower-dose prescribing: Minimizing “side effects” of pharmaceuticals on society and the environment. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 324–337, 2013.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621–1637, 2009.

DEITEREN, A.; DE MAN, J.G.; PELCKMANS, P.A.; DE WINTER, B.Y. Histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 5, p. 1165–1178, 2015.

DER KRAAK, L. V. D.; GOEL, G.; RAMANAN, K.; KALTENMEIER, C. et al. 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7- H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 4, n. 65, 2016.

DESANTIS, C.E.; LIN, C.C.; MARIOTTO, A.B.; SIEGEL, L. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. **Cancer Journal of Clinicians**, v. 64 p. 252-271, 2014.

DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N. et al. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v. 3, n. 25, 2016.

DIAZ-CANO, S. J. Pathological bases for a robust application of cancer molecular classification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 8655-8675, 2015.

DI MARZO, V.; PISCITELLI, F. Gut feelings about the endocannabinoid system. **Neurogastroenterol Motility**, v. 23, p. 391–398, 2011.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. et al. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 8, p. 42-45, 1994.

DICKSCHAT, J. S. Biosynthesis and function of secondary metabolites. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, p. 1620–1621, 2011.

DIPATRIZIO, N.V. Endocannabinoids in the gut. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 67–77, 2016.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-3732, 2011.

DONATIA, M.; MONDINB, A.; CHENA, Z.; MIRANDA, F.M. et al. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, b-caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, 2014.

DONG, Y.; DEKENS, W.; DEYN, P.; NAUDÉ, P. et al. Targeting of tumor necrosis factor alpha receptors as a therapeutic strategy for neurodegenerative disorders. **Antibodies**, v. 4, p. 369-408, 2015.

DUGGAN, K.; HERMANSON, D.J.; MUSEE, J.; PRUSAKIEWICZ, J.J. (R)-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 11, p. 803–809., 2012.

DUHAMEL, N.; MARTIN, D.; LARCHER, R.; FEDRIZZI, B. et al. Convenient synthesis of deuterium labelled sesquiterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 4496-4499, 2016.

EL-BELTAGI, H.S.; MOHAMED, H.I. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic**, v. 41, n. 1, p. 44-57, 2013.

EL-MAHDY, N.A.; EL-SISI, A.E.; DEWIDAR, B.I.; EL-DESOUKY, K.I. Histamine protects against the acute phase of experimentally-induced hepatic ischemia/reperfusion. **Journal of Immunotoxicology**, v.10, n. 1, p. 9-16, 2013.

EL-NOOR, M.M.; ELGAZZAR, F.M.; ALSHEMNAWY, H.A. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 52, p. 148-153, 2017.

FABBROCINI, G.; CAMELI, N.; ROMANO, M.C.; MARIANO, M. et al. Chemotherapy and skin reactions. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 31, n. 50, 2012.

FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC Medicine**, v. 14, n. 73, 2016.

FAUZEE, N.J.S.; DONG, Z.; WANG, Y. Taxanes: promising anti-cancer drugs. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 837-851, 2011.

- FICHNA, J.; BAWA, M.; THAKUR, G.A.; TICHKULE, R. et al. Cannabinoids alleviate experimentally induced intestinal inflammation by acting at central and peripheral receptors. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. e109115, 2014.
- FIDYT, K.; FIEDOROWICZ, A.; STRZAŁA, L.; SZUMNY, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 2016.
- FILHO, E.X.S.; ÁVILA, P.; H.M.; BASTOS, C.C.C.; BATISTA, A.A. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 55–62, 2016.
- FISCHER, R.; KONTERMANN, R.E.; MAIER, O. Targeting sTNF/TNFR1 signaling as a new therapeutic strategy. **Antibodies**, v. 2015, n. 4, p. 48-70, 2015.
- FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymology**, v.105, p. 93-104, 1984.
- FOCACCI, C.; BRUNO, A.; MAGNANI, E.; BARTOLINI, D.; PRINCIPI, E, DALLAGLIO K. et al. (2015) 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.
- FONTES, L.B.A.; DIAS, D.S.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.A. et al. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 91, v.2017, p. 257–264, 2017.
- FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Adjuvant therapies for very young women with early stage breast cancer. **Breast**, v. 20, n. 3, p. 146-149, 2011.
- FU, Y.; YANG, G.; PENG, C.; LI, W. et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. e983, 2014.
- GAO, J. et al. Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 axis contributes to p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil. **Cancer Biology & therapy**, v. 15, n. 8, p. 982-991, 2014.
- GARCÍA, M.A.; CARRASCO, E. AGUILERA, M.; ALVAREZ, P.; RIVAS C. CAMPOS, J.M. et al. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53- independent manner in colon and breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- GENEROSO, S.V.; RODRIGUES, N.M.; TRINDADE, L.M.; PAIVA, N.C. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 54, 2015.

GERTSCH, J. Anti-inflammatory cannabinoids in diet: towards a better understanding of CB(2) receptor action? **Communicative & Integrative Biology**, v.1, n. 26, 2008.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.

GIORGIOU, M.; PATAPATIOU, G.; DOMOXOUDIS, S.; PISTEVOU-GOMPAKI, K et al. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 215–216, 2012.

GONG, L.; THORN, C.F.; BERTAGNOLLI, M.M.; GROSSER, T.; et al. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenet Genomics**, v. 22, n. 4, p. 310–318, 2012.

GORRINI, C.; HARRIS, I.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROVES, A. T. R.; FARRIS R.; ANDERSONA, J. E.; ALEXANDERA, T. C.; KIFFER, F.; CARTERA, G.; WANGA, J. et al. 5-Fluorouracil chemotherapy upregulates cytokines and alters hippocampal dendritic complexity in aged mice. **Behavioural Brain Research**. v. 316, p. 215–224, 2017.

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANA, J.S.S.; JÚNIOR, L.J.Q. Monoterpenes with analgesic activity - a systematic review. **Phytotherapy Research**, 2012.

GUPTA, V.; YADAV, S..K. Cyclooxygenase-2: pathway from anti-inflammatory to anti- cancer drugs. **International Journal Of Pharmacy & Life Sciences**, v. 2, n.2, p.571-82, 2011.

GUVEN, F.M.K.; AYDIN, H.; YILDIZ, G.; ENGIN, A. et al. The importance of myeloperoxidase enzyme activity in the pathogenesis of Crimean–Congo haemorrhagic fever. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 441–5, 2013.

GYIRES, K.; ZÁDORI, Z. role of cannabinoids in gastrointestinal mucosal defense and inflammation. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 8, p. 935-951, 2016.

HAMOUDA, N.; SANO, T.; OIKAWA, Y.; OZAKI, T. Apoptosis, dysbiosis and expression of inflammatory cytokines are sequential events in the development of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 121, n. 3, p. 159-168, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.

HARVEY, B.S.; NICOTRA, L.L. SMID, S.D. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates cytokine-evoked mucosal damage in a human colonic explant model without changing epithelial permeability. **Cytokine**, v. 63, p. 209 – 217, 2013.

HASSAN, B.A.R. Main critical side effects associated with chemotherapy used in cancer treatment. **Pharmaceutical Analytica Acta**, v. 3, n. 5, 2012.

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

HERMANSON, D.J.; GAMBLE-GEORGE, J.C.; MARNETT, L.J.; PATEL, S. Substrate-selective COX-2 inhibition as a novel strategy for therapeutic endocannabinoid augmentation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 7, p.358-67, 2014.

HO, E.; GALOUGAHI, K.K.; LIU, C-C.; BHINDI, R. et al. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biology**, 2013.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and câncer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 86, 2013.

HORVÁTH, B.; MUKHOPADHYAY, P.; KECHRID, M.; PATEL, V. et al. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 1325–1333, 2012.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

HUNTER, C.A.; JONES, S. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

IZZO, A.A.; MUCCIOLI, G.G.; RUGGIERI, M.R.; SCHICHO. Endocannabinoids and the digestive tract and bladder in health and disease. In.; **Endocannabinoids**. p. 423- 447, 2015.

IZZO, A.A.; SHARKEY, K.A. Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p. 21–38, 2010.

JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; EMDADULHAQUE, M.; OJHA, S.K. Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p.321, 2016.

JAVED, Q. Clinical implications of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and resistin in coronary artery disease. **World Journal of Cardiovascular Diseases**, v. 4, p. 416-421, 2014.

JOHNSTONE, T.C.; PARK, G.Y.; LIPPARD, S.J. Understanding and improving platinum anticancer drugs – phenanthriplatin. **Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 471–476, 2014.

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

JÚNIOR, J.A.S.; MOURE, E.R.D.; CRIADO, P.R.; BRANDT, H.R.C.; et al. Adverse mucocutaneous reactions to chemotherapeutic agents - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 425-437, 2010.

JÚNIOR, R. F.A., REINALDO, M. P. O.S.; BRITO, G. A.C.; CAVALCANTI, P.F. et al. Olmesartan decreased levels of IL-1 β and TNF- α , down-regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and up-regulated SOCs-1 in an intestinal mucositis model. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114923, 2014.

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

JUSTINO, P.F.C.; MELO, L. F.; NOGUEIRA, A. F.; MORAIS, C. M.; et al. G Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 559-567, 2015.

KABERA, J.N.; SEMANA, E.; MUSSA, A.R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.

KAEHLER, C.; ISENSEE, J.; HUCHO, T.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6436–6447, 2014.

KAMIMURA, D.; ARIMA, Y.; HIRANO, T.; OGURA, H. et al. IL-6 and inflammatory diseases. In: YOSHIMOTO, T; YOSHIMOTO, T (Eds.). *Cytokine Frontiers: regulation of immune responses in health and disease*. Japan: Springer, 2014.

KANG, B.W.; KWON, O-K.; CHUNG, H.Y.; YU, W. et al. Taxanes in the treatment of advanced gastric cancer. **Molecules**, v. 21, n.651, 2016.

KAWASHIMA, M.; OGURA, N.; AKUTSU, M.; ITO, K. The anti-inflammatory effect of cyclooxygenase inhibitors in fibroblast-like synoviocytes from the human

temporomandibular joint results from the suppression of PGE2 production. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, p. 499–506, 2013.

KEPLIN, H.; PITCHER, B.N.; BALLMAN, K.V.; KOMBLITH, A.B. et al. Comorbidity, chemotherapy toxicity, and outcomes among older women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer on a clinical trial: calgb 49907 and calgb 361004 (alliance). **Health Care Delivery**, 2014.

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

KIMBALL, E.S.; SCHNEIDER, C.R.; WALLACE, N.H.; HORNBY, P.J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, p. G364–G371, 2006.

KLAUKE, A.-L.; RACZA, I.; PRADIERA, B.; MARKERTA, A. et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 608–620, 2014.

KONDO, N.; TAKAHASHI, A.; ONO, K.; OHNISHI, T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, n. 543531, p. 1-7, 2010.

KUIKEN, N.S.S.; RINGS, E.H.H.M.; TISSINGA, W. J.E. Risk analysis, diagnosis and management of gastrointestinal mucositis in pediatric cancer patients. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 94, p. 87–97, 2015.

KURASHIMA, Y.; AMIYA, T.; NOCHI, T.; FUJISAWA, K. et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. **Nature Communications**, v. 3, n. 1034, 2012.

KUWAHATA, H.; KATSUYAMA, S.; KOMATSU, T.; NAKAMURA, H. et al. Local peripheral effects of β -caryophyllene through cb2 receptors in neuropathic pain in mice. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, p. 397-403, 2012.

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

LACY, P.; STOW, J.L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, n. 1, p.9-18, 2011.

LAHLOU, M. The Success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LAMINE, B.; SIHEM, B.; SOFIANE, F.; FATIHA, B et al. Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala L.*(*Zygophyllaceae*). **European Journal of Integrative Medicine**. 2016.

LAUBE M.; KNISS, T.; PIETZCH, J. Development of antioxidant cox-2 inhibitors as radioprotective agents for radiation therapy - a hypothesis-driven review. **Antioxidants**, v. 5, n. 2, 2016.

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

LEFÈVRE, G.; BELJEAN-LEYMARIE, M.; BEYERLE, F.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D. et al. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. **Annales de Biologie Clinique**, v.56, n. 3, p. 305-19., 1998.

LEMOS, M.;; SANTIN, J.R.; MIZUNO, C.S.; BOEING, T. et al. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2015, p. 238–245, 2015.

LEITÃO, R.F.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; BRAGA-NETO, M.B. et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterology**, n. 11, v. 90, 2011.

LEOCÁDIO, P.C.L.; ANTUNES, M.M.; TEIXEIRA, L.G.; LEONEL, A.J. et al. L-Arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-fu in mice. **Nutrition and cancer**, v.0, n. 0, p.1-8, 2015.

LIN, Y-H.; CHANG, K-P.; LIN, Y-S.; CHANG, T-S. et al. Evaluation of effect of body mass index and weight loss on survival of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiation therapy. **Radiation Oncology**, v. 10, n. 136, 2015.

LIU, H.; LV, L.; YANG, K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 880-893, 2015.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T. et al. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemistry Research**, v. 40, p:118–23, 2015.

LIU, T.; LI, T.; LI, N. Effects and mechanism of juglone in combination with 5-FU on colon cancer CT-26 cells *in vivo*. **BIO Web of Conferences**, v. 8, n. 01013, 2017.

LIU, X.; WU, G.; SHI, D.; ZHU, R. et al. Effects of nitric oxide on notexin-induced muscle inflammatory responses. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 156-167, 2015.

LIU, Z.; XI, J.; SCHODER, S.; WANG, W. et al. *Chimonanthus nitens var. salicifolius* aqueous extract protects against 5-fluorouracil induced gastrointestinal mucositis in a mouse model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 12, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, H.C.; MACKIE, K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516-25, 2016.

MA, J.; YANG, X.; WANG, P.; DONG, B. et al. Phytochemicals with NO inhibitory effects and interactions with iNOS protein from *Trigonostemon howii*. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 71–77, 2017.

MACCARRONE, M.; BAB, I.; BÍRÓ, T.; CABRAL, G.A. et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 277–296, 2015.

MALIK, Z.; BAIK, D.; SCHEY, R. The role of cannabinoids in regulation of nausea and vomiting, and visceral pain. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 9, 2015.

MARCELINO, M. Y.; FUOCO, N. L.; QUAGLIO, A.E.V.V; BITTENCOURT, R.A.C. et al . Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease . **Journal of Coloproctology** , v. 35, n. 1, p. 20-27, 2015.

MASTELARO, I.; PUPIN, M..P.; RIBEIRO, S.M.; OLIVEIRA, H.F. et al. Longitudinal assessment of nutritional risk in patients under chemo or radiotherapy. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 7, p.659-663, 2016.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B. et al. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.61, n. 5, p. 775-84, 2008.

MEIROVITZ, A.; KUTEN, M.; BILLAN, S.; ABDAH-BORTNYAK, R. et al. Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer - a prospective pilot study. **Radiation Oncology**, v. 5, n. 16, 2010.

MEWALAL, R.; RAI, D.K.; KAINER, D.; CHEN, F. et al. Plant-derived terpenes: a feed stock for specialty biofuels. **Trends in Biotechnology**, v. S0167-7799, n. 16, p. 30128-30127, 2016.

MICHALANY J. Técnica histológico los anatomia patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3a ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda; 1998.. p. 153-5.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M.R.; TRAN, K.; REDDY, S.P. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, 2014.

MIURA, K.; KINOUCI, M.; ISHIDA, K.; FUJIBUCHI, W. et al. 5-FU Metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, v. 2, p.1717-1730, 2010.

MOSLEMI, D.; NOKHANDANI, A.M.; OTAGHSARAEI, M.T.; MOGHADAMNIA, Y. et al. Management of chemo/radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: A review of the current literature. **Radiotherapy and Oncology**, v. 120, n. 1, p. 13-20, 2016.

NAPETSCHING, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, p. 19.1–19.26, 2013.

NATARAJAN, K.; ABRAHAM, P.; KOTA, R.; SELVAKUMAR, D. Aminoguanidine pretreatment prevents methotrexate-induced small intestinal injury in the rat by attenuating nitrosative stress and restoring the activities of vital mitochondrial enzymes. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 239-247, 2017.

NEMA, R.; KHARE, S.; PRADHAN, A.; GUPTA, A. et al. Natural products potential and scope for modern cancer research. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 1270-1277, 2013.

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 329–342, 2014.

NOGUEIRA, L.T.; COSTA, D.V.S.; GOMES, A.S.; MARTINS, C. S. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 79, 2017.

NUMAZAWA, S.; SUGIHARA, K.; MIYAKE, S.; TOMIYAMA, H. et al. Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 40–45, 2015.

OHNISHI, S.; TAKEDA, H. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 14, 2015.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M.E. b-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2016.

OP DEN KAMP, C.M.H.; DE RUYSSCHER, D.K.M., VAN DEN HEUVEL, M.;ELFERINK, M.;HOUBEN, R.M. A. et al. Early body weight loss during concurrent chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.5, n.2, p. 127-137, 2014.

ORTEGA-VILLASANTE, C.; BURÉN, S.; BARÓN-SOLA, A.; MARTÍNEZ, F.; HERNÁNDEZ, L. E. In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: present approaches and future perspectives. **Methods**, v. 15, n. 109, p. 92-104, 2016.

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

PETERSON, D.E.; BENSADOUN, R.J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 6, p. vi78–vi84, 2011.

PETERSON, D.E.; O'SHAUGHNESSY, J.A.; RUGO, H.S.; ELAD, S. et al. Oral mucosal injury caused by mammalian target of rapamycin inhibitors: emerging perspectives on pathobiology and impact on clinical practice. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 8, p. 1897–1907, 2016.

POLK, A.; VISTISEN, K.; NILSEN, M.V.; NIELSEN, D.L. A systematic review of the pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. **Pharmacology and Toxicology**, v. 15, n. 47, 2014.

PRAKASH, O.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; AJEET. Anticancer potential of plants and natural products: a review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 104-115, 2013.

QUIÑONES, L.A.; LEE, K.S. Editorial: Improving cancer chemotherapy through pharmacogenomics: a research topic. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 195, 2015.

RASHID, S.; ALI, N.; NAFEES, S.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p. 185–193, 2014.

RECZEK, C.R.; CHANDEL, N.S. The two faces of reactive oxygen species in câncer. **Annual Review of Cancer Biology**, v.1, p. 4.1–4.20, 2017.

REINKE, D.; KRITAS, S.; POLYCHRONOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A.L.; ALIGIANNIS, N.; TRAN, C. D. Herbal substance, acteoside, alleviates intestinal mucositis in mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, p. 9, 2015.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

RIDER, P.; CARMI, Y.; GUTTMAN, O.; BRAIMAN, A. et al. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 187, 2011.

RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 11, p. 571-577, 2012.

RYMASZEWSKI, A.L.; TATE, E.; YIMBESALU, J.P.; GELMAN, A.E. The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development. **Cancers**, v. 6, p. 1111-1127, 2014.

ROCHA, N.F.M.; VENÂNCIO, E.T.; MOURA, B.A.; SILVA, M.G. et al. Gastroprotection of (-) - α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2010.

ROY, S.S.; CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYA, S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 195-209, 2014.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUZA, D.P. Sesquiterpenes from essential oils and anti-inflammatory activity. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 10, p. 1767-1774, 2015.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; et al. Contribution of interleukin-1b to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Pharmacological Society**, v. 115, p. 1265–1275, 1995.

SÁ, R.C.; ANDRADE, L.N.; SOUZA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 2013, n. 18, p. 1227-1254, 2013.

SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2012, 2012.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, B.A.; AGUILAR, M.A.; KING-DIAS, B.; RIVERO, J.F. et al. The sesquiterpenes β -caryophyllene and caryophyllene oxide isolated from *senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis inhibitors. **Molecules**, v. 17, p. 1437-1447, 2012.

SANTANDREU, F. M.; VALLE, A.; OLIVER, J.; ROCA, P. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 219-228, 2011.

SARPIETRO, M.G.; SOTTO, A.D.; ACCOLLA, M.L.; CASTELLI, F. Interaction of beta-Caryophyllene and beta-Caryophyllene oxide with phospholipid bilayers: Differential scanning calorimetry study. **Thermochimica Acta**, v. 600, p. 28-34, 2014.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; ARRAS, D.S. JOHN, S.R. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878–888, 2011.

SCHUMACKER, P.T. Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil. **Cancer Cell**, v. 27, p. 156-157, 2015.

SCHWAB, W.; FUNCHS, C.; HUANG, F-C. Transformation of terpenes into fine chemicals. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, p. 3 - 8, 2013.

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

SEYFRIED, T.N.; FLORES, R.E.; POFF, A.M.; D'AGOSTINO, D.P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 3, p.515–527, 2014.

SHARKEY, K.A.; WILEY, J. W. The role of the endocannabinoid system in the brain–gut axis. **Gastroenterology**, v.151, p. 252–266, 2016.

SHEPPARD, V.B.; DASH, C.; OPPOONG, B.; CAPBEL, L.L.A. Weight changes in black and white women receiving chemotherapy treatment for breast câncer. **JSM Clinical Oncology and Research**, v. 3, n. 1, p. 1042, 2015.

SHIH, R-H.; WANG, C-Y.; YANG, C-M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2015.

SIDERAS, K.; HALLEMEIER, C.L.; LOPRINZI, C.L. Oral Complications (2015). Clinical Gate. Disponível em: <<http://clinicalgate.com/oral-complications-2/>>. Acesso em: 13 de Fevereiro de 2017.

SILVA, V.C. **Estudo da participação da via dos leucotrienos no modelo experimental de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil**. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SINGH, B.; SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, p. 129–151, 2015.

SINGH, P.; SINGH, A. Ocular adverse effects of anti-cancer chemotherapy and targeted therapy. **Journal of Cancer Therapeutics & Research**, 2012.

SINGH, Z.; KARTHIGESU, I.P.; SINGH, P.; KAUR,R. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, n.3, p. 7-16, 2014.

SKEFF, M. A.; BRITO, G. A.; DE OLIVEIRA, M. G.; BRAGA, C. M. et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **PLoS One**, v.9, n.12, p.1-25, 2014.

SMOLINSKA ,S.; JUTEL, M.; CRAMERI, R.; O'MAHONY, L. Histamine and gut mucosal immune regulation. **Allergy**, 2013.

SOARES, P. M. G., MOTA, J. M. S., BRITO, G. A. C., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A., & SOUZA, M. H. S1297 Role of IL-4 and IL-1 β On the Pathogenesis of 5-Fluorouracil (5-FU) Induced Intestinal Inflammation in Mice. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. A-220-A-221, 2008.

SOARES, P. M. G. et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, p. 46-49, 2013.

SOARES, R.Z.; VUOLO, F.; DALL'LGNA, M.; MICHELS, M. et al. Avaliação do papel do sistema canabidiol em um modelo de lesão renal por isquemia/reperfusão em animais. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.27, n.4, p. 383-389, 2015.

SONG, Y-H.; SUN, H.; ZHANG, A-H.; YAN, G-L. et al. Plant-derived natural products as leads to anti-cancer drugs. **Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research**, v. 2, p. 6-15, 2014.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews**, v. 4, p. 277-283, 2004.

SOSA, V.; MOLINÉ. T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH. H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOUZA, M.T.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SUARTE M.C. Structure - activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile – a systematic review. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, p. 244–256, 2014.

SRIVASTAVA, P.K.; PANDEY, A.K. Natural products and derivatives: biological and pharmacological activities. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 15, n. 1, p. 1-38, 2015.

STRINGER, A.M. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients**, v. 5, p. 1488-1499, 2013.

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

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to dna damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.

TAAMALLI, A.; ROMÁN, D.A.; CATALÁN, E.B.; TORRES, V.R. et al. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1817-1825, 2012.

TANG, Y.; WU, Y.; HUANG, Z.; DONG, W. et al. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, v. 33, p. 96–104, 2017.

THEOHARIDES, T.C.; VALENT, P.; AKIN, C. Mast cells, mastocytosis, and related disorders. **The New England Journal Of Medicine**, v. 373, n. 2, 2015.

THOMAS, S. A. et al. Adverse effects of 5-fluorouracil: focus on rare side effects. **Can Cell Microenviron**, v.3, 2016.

THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 3, n. 9, p. 228–249, 2011.

TOUCHEFEU, Y.; MONTASSIER, E.; NIEMAN, K.; GASTINNE, T. et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis – current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 40, p. 409–421, 2014.

VALENZUELA, M.M.A.; NEIDIGH, J.W.; WAL, N. Antimetabolite treatment for pancreatic câncer. **Chemotherapy**, v. 3, n. 3, 2014.

VAN SEBILLE, Y.Z.A.; STANSBOROUGH, R.; WARDILL, H.R.; BATEMAN, E.; GIBSON, R.J.; KEEFE, D.M. management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. **Current Oncology Reports**, v. 17, p. 50, 2015.

VANHOECKE, B.; BATEMAN, E.; MAYO, B.; VANLANCKER, E et al. Dark Agouti rat model of chemotherapy-induced mucositis: establishment and current state of the art. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, p. 725–741, 2015.

VASCONCELOS, R.M.; SANFILIPPO, N.; PASTER, B.J.; KERR, A.R. et al. Host-microbiome cross-talk in oral mucositis. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 7, p. 725-733, 2016.

VECCHIO, A. J.; MALKOWSKI, M. G. The structural basis of endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenase-2. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20736–45, 2011.

VIJAYALAXMI, A.; VASUDHA, B.; NAZIA, B.; KOWMUDI, V. et al. Anti-arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against freund's complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 29, 2015.

URB, M.; SHEPPARD, D.C. The role of mast cells in the defence against pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

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

WANG, J.; ZHENG, J.; KULKARNI, A.; WANG, W. et al. Palmitoylethanolamide regulates development of intestinal radiation injury in a mast cell dependent manner. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 11, p. 2693–2703, 2014.

WARDILL, H.R.; BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J. New pharmacotherapy options for chemotherapy-induced alimentary mucositis. **Expert Opinion on Biological Therapy**. V. 14, n. 3, p. 347-354, 2014.

WEIR, G.M.; LIWSKI, R.S.; MANSOUR, M. Immune modulation by chemotherapy or immunotherapy to enhance cancer vaccines. **Cancers**, v. 3, p. 3114-3142, 2011.

WHITTAKER, A.L.; LYMN, K.A.; WALLACE, G.L.; HOWARTH, G.S. Differential effectiveness of clinically- relevant analgesics in a rat model of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Occupational exposure to antineoplastic agents. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 12 de Abril de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 09 de Maio de 2017.

WRIGHT, K.L; DUNCAN, M.; SHARKEY, K.A. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 263–270, 2008.

WU, W.; ZHAO, S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 1, p. 18–26, 2013.

YANG, J.; NIE, Q. Engineering Escherichia coli to convert acetic acid to β -caryophyllene. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p.74, 2016.

YANG, Y.; KARAKHANOVA, S.; HARWIG, W.; D'HAESE, J.G. et al. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, p. 2570–2581, 2016.

YEUNG, C.Y.; CHAN, W.T.; JIANG, C.B.; CHENG, M.L. et al. Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 559, p. 1-18, 2016.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 4, p. 655-83, 2011.

ZHAO, M.; LIU, Q.; GNG, Y.; XU, X. et al. GSH-dependent antioxidant defense contributes to the acclimation of colon cancer cells to acidic microenvironment. **Cell Cycle**, v. 15,n. 8, p. 1125–1133, 2016.

ZHANG, H.; QIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, J.; SUN, Y.; WANG, C.; FONG, H. Plant terpenes. phytochemistry and pharmacognosy. **Encyclopedia of Life Support Systems**, 2014.

ZHOU, F.; DU, Y.; HUANG, W.; SHANM, J. et al. The efficacy and safety of early initiation of preoperative analgesia with celecoxib in patients underwent arthroscopic knee surgery A randomized, controlled study. **Medicine**, v. 96, n. 42, 2017.

ZUO, T., LI, X., CHANG, Y., DUAN, G., YU, L., ZHENG, R., XUE, C., TANG, Q. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* and its enzymatically degraded fragments could prevent intestinal mucositis induced by chemotherapy in mice. **Food & function**, v. 6, n. 2, p. 415-422, 2014.

ZUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. What are Essential Oils? In.: **Bioactive Essential Oils and Cancer**, 2015.

ZWEERS, M.C.; DE BOER, T.N.; VAN ROON, J.; BIJLSMA, J.W.; LAFEBER, F.P. Mastbergen SC. Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 5, p. 239, 2011.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 001-007, 2008.

ANEXOS

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do β -cariofileno no tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil e seu mecanismo de ação", registrada nº 282/17, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. GILBERTO SANTOS CERQUEIRA– Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica (ou Ensino)- 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 **24/03/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Maior 2017 à Março/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
Nº de Animais	156
Peso/ Idade	20-30g/ 1 mês
Sexo	Machos
Origem	Biotério do CCA/UFPI.

Teresina, 24 de Março de 2017.


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