



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Laboratório de Epidemiologia molecular



Talita Alves Faria Martins Magalhães

Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Ouro Preto - MG
2018

Talita Alves Faria Martins Magalhães

Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Dr^a. Renata Nascimento de Freitas - DENCS

Coorientadora: Dr^a. Joana Ferreira do Amaral - DENCS

Ouro Preto

2018

M188e Magalhães, Talita Alves Faria Martins.
Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil [manuscrito] / Talita Alves Faria Martins Magalhães. - 2018.
112f.: il.: color; graf.; tabs; quadros.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Nascimento de Freitas.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Joana Ferreira do Amaral.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .
Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Mucosite. 2. 5-Fluorouracil. 3. Açaí. 4. Estresse oxidativo. 5. Inflamação. I. Freitas, Renata Nascimento de. II. Amaral, Joana Ferreira do. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 613.2.038



UFOP
Universidade Federal de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dez dias do mês de agosto de dois mil e dezoito, às nove horas, no Auditório do Bloco de Salas de Aulas da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Talita Alves Faria Martins Magalhães**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelas professoras Daniela Caldeira Costa (UFOP), Patrícia Aparecida Vieira de Barros, Joana Ferreira do Amaral (UFOP) e Renata Nascimento de Freitas (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em camundongos Balb/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



APROVAR CONDICIONALMENTE



REPROVAR

Patrícia Aparecida Vieira de Barros,
Examinadora Externa.

Profa. Daniela Caldeira Costa (UFOP),
Examinadora Interna.

Profa. Joana Ferreira do Amaral (UFOP),
Coorientadora.

Profa. Renata Nascimento de Freitas (UFOP),
Orientadora.

Talita Alves Faria Martins Magalhães,
Mestranda.

Dedico este trabalho a Deus, quem me deu força para continuar e ao meu esposo Charles Henrique Xavier M. Magalhães, pelo amor e paciência nessa caminhada.

Agradecimentos pessoais

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada posso fazer.

Ao meu esposo Charles Henrique Xavier M. Magalhães, por estar ao meu lado nos dias bons e ruins.

Aos meus pais Elisabete Alves Faria Martins e Arnaldo Alves Martins, pelo importante amparo.

Ao meu pastor Edson Faria Maciel, pela grande amizade e aconselhamento.

Agradecimentos

A minha orientadora Renata Nascimento de Freitas, pela paciência, apoio e direcionamento.

A minha coorientadora Joana Ferreira do Amaral, pela importante colaboração.

As agências de fomento: CAPES, FAPEMIG e UFOP que tornaram este trabalho possível.

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP) pelo fornecimento dos animais utilizados.

Aos integrantes do Laboratório de Epidemiologia Molecular, pelo auxílio fundamental prestado. Em especial, a Priscila Oliveira Barbosa, pela amizade e importante apoio e a professora Melina Oliveira de Souza, pela gentileza e assistência.

Ao laboratório de imunobiologia (LIB/UFMG) pela essencial colaboração e recursos prestados.

Aos integrantes do laboratório de biomateriais e patologia experimental (LBPE/UFOP). Em especial, a Marina Barcelos de Miranda, pela grande ajuda e amizade, e aos professores Sandra Aparecida Lima de Moura e Laser Antônio Machado pela importante colaboração.

Ao professor Marcelo Eustáquio Silva (LABNEx/UFOP) pelos recursos fornecidos.

A professora Arlete Rita Penitente Barcelos (Medicina/UFOP) pela solicitude e cooperação.

A professora Daniela Caldeira Costa (LBM/UFOP) pela importante colaboração e a Me. Sttefany Viana Gomes pela presteza.

Ao professor André Talvani Pedrosa da Silva (LABIIN/UFOP) e ao Dr. Guilherme de Paula Costa (LABIIN/UFOP) pela gentileza e colaboração.

Ao professor Frank Silva Bezerra (LAFEx/UFOP), pela colaboração e prestimosidade.

Ao professor Luís Carlos Crocco Afonso (LIP/UFOP), pela estima e cooperação.

A Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva e Maria Chaves dos Santos pela disposição e auxílio prestado.

*“E sabemos que todas as coisas contribuem
juntamente para o bem daqueles que amam a
Deus, daqueles que são chamados segundo o
seu propósito”.*

Romanos 8:28

O presente trabalho, apresenta ao leitor um manuscrito de dissertação segmentado em seis capítulos com o objetivo de favorecer a exposição do estudo realizado. O primeiro capítulo contém uma introdução do conteúdo abordado. O segundo capítulo apresenta o esboço de um artigo de revisão simples dos elementos deste estudo: mucosite e dieta. O terceiro capítulo contém uma revisão da literatura sobre o *Euterpe Oleracea* Martius. O quarto capítulo expõe a justificativa do trabalho, seguida dos objetivos e da metodologia. O quinto capítulo aponta os resultados obtidos e o sexto e último capítulo apresenta a discussão, seguida das conclusões e considerações finais.

A mucosite intestinal (MI) causada por quimioterapia antineoplásica caracteriza-se por um processo inflamatório da mucosa e pode ocorrer entre 50% e 80% dos pacientes oncoterápicos tratados com 5-fluorouracil (5-FU), droga comumente utilizada nesse contexto. Até o presente momento não há terapia aprovada para a MI. Diante disso, diversos estudos têm demonstrado efeito antioxidante e anti-inflamatório do açaí (*Euterpe oleracea* Martius), um fruto tipicamente brasileiro e normalmente consumido por essa população e cada vez mais pela população mundial. O presente estudo objetivou investigar o efeito da polpa de açaí na resposta antioxidante e inflamatória em um modelo animal de MI induzida por 5-FU. Camundongos BALB/c receberam pré-tratamento com polpa de açaí a 200g/kg de uma dieta padrão durante quatorze dias. No décimo quinto dia da experimentação, parte dos animais receberam injeção intraperitoneal única de 5-FU (200mg/kg) sendo eutanasiados três (D3) ou sete (D7) dias após a administração da droga. Ao findar dezoito e vinte e dois dias, os grupos CTL, CTL+Açaí, MUC e MUC+Açaí tiveram o jejuno coletado para as seguintes análises: histológica, atividade das enzimas SOD e CAT, concentração de grupos SH totais e polifenóis totais e de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β). O fluido intestinal foi coletado para avaliar a concentração de sIgA e da atividade enzimática da MPO. A ingestão de açaí pelos grupos com MI promoveu resistência e recuperação da altura das vilosidades, recuperou a razão vilos/cripta e regenerou quase que completamente o aspecto histológico tecidual. Nesse mesmo grupo, houve diminuição da atividade da SOD, aumento da atividade da MPO e da liberação de sIgA no D3. A atividade da enzima MPO elevou em todos grupos com MI no D7. A enzima CAT apresentou redução de sua atividade nos grupos com essa alteração no D3 e aumento nos grupos que receberam açaí no D7. Não houve alteração no teor de polifenóis totais, no nível tecidual de grupos SH totais e nas concentrações de TNF- α e IL-1 β . Nossos resultados demonstraram efeito protetor dos componentes da polpa de açaí na injúria intestinal provocada por 5-FU, bem como, na capacidade de controlarem o estresse oxidativo e a resposta inflamatória intestinal, no sentido de mobilizarem vias de defesa para acelerar o reparo tecidual. Os mecanismos que envolvem esses achados carecem de elucidações.

Palavras-chave: Mucosite, 5-fluorouracil, Açaí, Estresse oxidativo, Inflamação.

Intestinal mucositis (IM) caused by antineoplastic chemotherapy is characterized by an inflammatory mucosal process and can occur between 50% and 80% of oncoterapeutic patients treated with 5-fluorouracil (5-FU), a drug commonly used in this context. To date, there is no approved therapy for IM. Therefore, several studies have demonstrated antioxidant and anti-inflammatory effects of açai (*Euterpe oleracea* Martius), a brazilian fruit typically consumed by this population and increasingly by the world population. The present study aimed to investigate the effect of açai pulp on the antioxidant and inflammatory response in an animal model of IM induced by 5-FU. BALB/c mice received pre-treatment with açai pulp at 200g/kg of a standard diet for fourteen days. On the fifteenth day of the experiment, part of the animals received single intraperitoneal injection of 5-FU (200mg/kg), three (D3) or seven (D7) days after administration of the drug were euthanized. At the end of eighteen days, the CTL, CTL+Açai, MUC and MUC+Açai groups had the jejunum collected for the following analyzes: histological, SOD and CAT enzyme activity, concentration of total SH groups and total polyphenols and proinflammatory mediators (TNF- α and IL-1 β). The intestinal fluid was collected to evaluate the concentration of sIgA and the enzymatic activity of MPO. Intake of açai by the IM groups promoted resistance and recovery of villus height, recovered the villi/crypt ratio and almost completely regenerated the tissue histological aspect. In this same group, there was a decrease in SOD activity, an increase in MPO activity and the release of sIgA in D3. The activity of the MPO enzyme increased in all groups with IM in D7. The CAT enzyme showed a reduction of its activity in the groups with this change in D3 and increase in the groups that received açai in D7. There was no change in the total polyphenol content, in the tissue level of total SH groups and in TNF- α and IL-1 β concentrations. Our results demonstrated a protective effect of açai pulp components on intestinal injury caused by 5-FU, as well as the ability to control oxidative stress and inflammatory bowel response, in order to mobilize defense pathways to accelerate tissue repair. Mechanisms involving these findings need to be elucidated.

Key words: Mucositis, 5-fluorouracil, Açai, Oxidative stress, Inflammation.

Lista de figuras e quadros

Figura 2.1: Fases fisiopatológicas da MI de acordo com Sonis.	26
Quadro 2.1: Estudos experimentais com uso de aminoácidos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.	30
Quadro 2.2: Estudos experimentais com uso de substâncias derivadas de plantas para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.	32
Quadro 2.3: Estudos experimentais com uso de vitaminas para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.	33
Quadro 2.4: Estudos experimentais com uso de ácidos graxos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.	35
Quadro 2.5: Estudos experimentais com uso de probióticos, prebióticos e simbióticos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.	37
Figura 3.1: Açazeiro do <i>Euterpe oleracea</i> Martius.	46
Figura 3.2: Estrutura química das principais antocianinas presentes na polpa de açai.	48
Figura 4.1: Desenho esquemático do delineamento experimental.	63
Figura 5.1: : Ingestão alimentar diária (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açai) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açai).	74
Figura 5.2: Avaliação da ingestão alimentar diária (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açai) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açai).	75
Figura 5.3: Evolução ponderal (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açai) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açai).	76
Figura 5.4: Variação ponderal (g) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açai) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açai).	77
Figura 5.5: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno dos grupos CTL no D3 e D7 (A), CTL+Açai no D3 e D7 (B), MUC no D3 (C), MUC+Açai no D3 (D), MUC no D7 (E) e MUC+Açai no D7 (F).	80
Figura 5.6: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno proximal dos grupos MUC no D3. Degeneração hidrópica ou vacuolar ao longo das vilosidades (A), atrofia das vilosidades e erosão/necrose das criptas (B).	81
Figura 5.7: Avaliação da altura das vilosidades (μm) no jejuno proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle (CTL e CTL+Açai) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açai).	82
Figura 5.8: Avaliação da profundidade das criptas (μm) no jejuno proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle	83

(CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí).

Figura 5.9: Avaliação da razão (vilos/cripta - μm) no jejuno proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 84

Figura 5.10: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno proximal no D3 (A, C, E e G) e D7 (B, D, F e H) dos grupos: CTL (A e B), CTL+Açaí (C e D), MUC (E e F) e MUC+Açaí (G e H). 85

Figura 5.11: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno distal no D3 (A, C, E e G) e D7 (B, D, F e H) dos grupos: CTL (A e B), CTL+Açaí (C e D), MUC (E e F) e MUC+Açaí (G e H). 86

Figura 5.12: Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT e de gSH no D3 (A, C e E) e no D7 (B, D e F) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 87

Figura 5.13: Avaliação do teor de polifenóis totais no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 88

Figura 5.14: Avaliação da concentração dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β no D3 (A e C) e no D7 (B e D) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 89

Figura 5.15: Avaliação da concentração de sIgA no D3 (A) e no D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 90

Figura 5.16: Avaliação da atividade da enzima MPO no D3 (A) e no D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). 90

Lista de tabelas

Tabela 4.1: Composição das dietas experimentais AIN-93M padrão e contendo açaí.	62
Tabela 4.2: Classificação histopatológica.	65
Tabela 5.1: Ingestão alimentar a partir da administração das dietas dos grupos experimentais avaliados.	75
Tabela 5.2: Presença e gravidade de diarreia em diferentes dias nos grupos experimentais.	78
Tabela 5.3: Escores histopatológicos do jejuno proximal (JP) e do jejuno distal (JD) dos grupos experimentais avaliados três dias após a indução da mucosite.	79
Tabela 5.4: Escores histopatológicos do jejuno proximal (JP) e do jejuno distal (JD) dos grupos experimentais avaliados sete dias após a indução da mucosite.	79

Lista de siglas e abreviaturas

5-FU	5-fluorouracil
AGCC	Ácido (s) graxo (s) de cadeia curta
AIN-93M	American Institute of Nutrition, 1993, Manutenção
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase 2
D3	Eutanásia três dias após a administração de 5-FU
D7	Eutanásia sete dias após a administração de 5-FU
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EPO	Peroxidase de eosinófilos
ERO	Espécie (s) reativa (s) de oxigênio
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
gSH	Grupos sulfidril totais
GSR	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ID	Intestino delgado
IgA	Imunoglobulina A
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IM	<i>Intestinal mucositis</i>
ip	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
JD	Jejuno distal
JP	Jejuno proximal

LPS	Lipopolissacarídeo (s)
MDA	Dialdeído malônico
MI	Mucosite intestinal
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator de transcrição nuclear eritróide
PI	Permeabilidade intestinal
PON	Paraoxonase
RNA	Ácido ribonucleico
SH	Sulfidril
sIgA	Imunoglobulina A secretória
SOD	Superóxido dismutase
TB	Translocação bacteriana
TGI	Trato gastrintestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
vs	<i>Versus</i>
ω-3	Ácido graxo ômega 3/Linolênico
ω-6	Ácido graxo ômega 6/Linoleico
ω-9	Ácido graxo ômega 9/Oleico

Capítulo 1: Introdução	17
Referências	20
Capítulo 2: Artigo de revisão	23
Resumo	24
1. Introdução	25
2. Aminoácidos	28
3. Produtos naturais encontrados em plantas	30
4. Vitaminas	33
5. Ácidos graxos	34
6. Probióticos, prebióticos e simbióticos	35
7. Conclusão	39
Referências	40
Capítulo 3: <i>Euterpe oleracea</i> Martius	45
1. Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Martius)	46
2. Defesas antioxidantes e o estresse oxidativo	48
3. Polifenóis e seus benefícios à saúde	49
4. Açaí, estresse oxidativo e inflamação	50
Referências	54
Capítulo 4: Justificativa, Objetivos e Metodologia	59
1. Justificativa	60
2. Objetivos	61
2.1. Objetivo geral	61
2.2. Objetivos específicos	61
3. Metodologia	62
3.1. Protocolo experimental	62
3.1.1. Animais e dieta experimental	62
3.1.2. Delineamento experimental	62

3.1.3. Indução da mucosite intestinal	63
3.1.4. Eutanásia e coleta de material biológico	63
3.2. Variáveis avaliadas	64
3.2.1. Ingestão alimentar, peso corporal e registro da sobrevida	64
3.2.2. Avaliação da diarreia	64
3.3. Histologia	64
3.3.1. Preparo do tecido para análise histopatológica e morfométrica	64
3.3.2. Análise histopatológica	65
3.3.3. Análise morfométrica	66
3.4. Dosagens bioquímicas e imunoenzimáticas	66
3.4.1. Resposta antioxidante	66
3.4.2. Resposta inflamatória	68
3.4.3. Determinação de proteína totais no jejuno e fluido intestinal	70
3.5. Análise estatística	70
Referências	71
Capítulo 5: Resultados	73
1. Análise da ingestão alimentar, do acompanhamento ponderal e da sobrevida	74
2. Avaliação da diarreia	78
3. Histologia	78
3.1. Análise histopatológica	78
3.2. Análise morfométrica	81
4. Análise da resposta antioxidante	87
4.1. Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT e da concentração de grupos sulfidril totais (gSH)	87
4.2. Avaliação do teor de polifenóis totais	88

5. Análise da resposta inflamatória	89
5.1. Determinação da concentração de TNF- α e IL-1 β	89
5.2. Determinação da concentração de sIgA	90
5.3. Avaliação da atividade da enzima MPO	90
Capítulo 6: Discussão, Conclusões e Considerações finais	91
1. Discussão	92
2. Conclusões	105
3. Considerações finais	106
Referências	107
Anexo	111

O câncer, conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o processo neoplásico maligno e metastático, é considerado problema de saúde pública mundial desde as últimas décadas. De acordo com estimativas epidemiológicas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio 2018-2019, presume-se ocorrência anual de 600 mil novos casos da doença no país. Sua gravidade consiste basicamente no comprometimento da função de órgãos e tecidos, podendo levar o indivíduo a óbito⁽¹⁻⁴⁾.

Considerada um dos tratamentos comumente utilizados na prática clínica, a quimioterapia antineoplásica ou antilásica, se baseia na utilização de drogas denominadas genericamente de quimioterápicas que tem como objetivo primordial desencadear a eliminação do tumor maligno. Essas drogas inabilitam e/ou impedem as funções celulares e/ou induzem a apoptose, por meio de alterações no material genético e no processo de divisão celular⁽⁵⁻⁹⁾. O 5-FU é considerado um dos mais eficazes oncoterápicos utilizados mundialmente nesse contexto em mais de 60% dos tratamentos⁽¹⁰⁾, sendo administrado por via intravenosa ou intraperitoneal e implementado na terapia de diversos tipos de neoplasias, como o câncer que acomete a região da cabeça e pescoço, a tireoide, a pele, as mamas, a próstata, o tubo digestório, dentre outros^(3, 8, 9, 11-17).

Células cancerígenas são sensíveis às drogas oncoterápicas devido ao metabolismo elevado que apresentam em relação às células não cancerígenas, no entanto, muitas dessas drogas, incluindo o 5-FU, atuam de maneira inespecífica quanto ao alvo celular. Sendo assim, os quimioterápicos também podem atingir células saudáveis que apresentam alta taxa de divisão, especialmente as células do trato gastrointestinal (TGI). Esse tipo de acometimento induzido por tratamento antineoplásico à mucosa do TGI é denominado mucosite⁽¹⁸⁾ e pode afetar a ingestão alimentar e provocar perda de peso, êmese, diarreia, dentre outras consequências^(2, 5, 7, 9, 17, 19-21). Estima-se que 50% a 80% dos pacientes tratados com 5-FU desenvolverão a mucosite gastrointestinal, inclusive na região do intestino proximal^(22, 23).

Estudos que utilizam modelos experimentais de mucosite são realizados com diferentes espécies da família *muridae*, bem como diferentes dosagens de 5-FU administradas em períodos distintos. Em relação a isso, a utilização de camundongos nos estudos de mucosite experimental tem proporcionado modelo promissor, uma vez que a injeção intraperitoneal de 5-FU em animais dessa espécie provoca dano tecidual considerável, sobretudo no intestino delgado (ID)⁽¹⁶⁾.

Estudos publicados por Generoso *et al.*⁽²⁴⁾ e Barros *et al.*⁽²⁵⁾, demonstraram que o modelo de MI induzida por 5-FU responde a alterações dietéticas. Isso demonstra o potencial desse modelo em melhorar a compreensão da atuação de componentes dietéticos como adjuvantes no controle dos efeitos adversos induzidos pelo tratamento quimioterápico. Neste sentido, vários compostos como vitaminas, probióticos e ácidos graxos têm sido

testados na finalidade de promover recuperação da mucosa intestinal e melhorar a qualidade de vida dos pacientes^(23, 24, 26, 27).

Trabalhos da nossa equipe e de outros grupos de pesquisadores, têm demonstrado que o açaí (*Euterpe oleracea* Martius) apresenta importante efeito antioxidante e anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais e em humanos⁽²⁸⁻³³⁾. Tomando estas observações em consideração, realizamos um estudo que avaliou o efeito do consumo da polpa de açaí na mucosa do ID, sobre o estado antioxidante e inflamatório em camundongos com MI induzida por 5-FU.

Referências

1. INCA. Abc do câncer 2011 [Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf.
2. INCA. Quimioterapia 2010 [Available from: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Orientacoespacientes/orientacoes_quimioterapia.pdf.
3. Leocádio PCL. Efeito do pré-tratamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos. 2013.
4. INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 2018 [Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>.
5. Soares PMG. Mucositis intestinal experimental induced by 5-fluorouracil : role IL-1 β , IL-4 and PAF and evaluation of the alterations of motility gastrointestinal. 2008.
6. Saúde Md. Manual de bases técnicas da oncologia 2011 [Available from: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manual_oncologia_13edicao_agosto_2011.pdf.
7. Silva AM, Franco LdP, Santos TSdS, Passos XS, Costa BMF. Impacto das aversões alimentares no estado nutricional de pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia 2012 [Available from: https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02_abr-jun/V30_n2_2012_p166-170.pdf.
8. Groves TR, Farris R, Anderson JE, Alexander TC, Kiffer F, Carter G, et al. 5-Fluorouracil chemotherapy upregulates cytokines and alters hippocampal dendritic complexity in aged mice. *Behav Brain Res.* 2017;316:215-24.
9. INCA. Quimioterapia 2017 [Available from: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101.
10. Biomnis. Personalised cancer treatments: Biomnis, in partnership with ODPM, is releasing a test to determine the toxicity risk to 5-FU chemotherapy. 2015 [Available from: <https://www.eurofins-biomnis.com/wp-content/uploads/2015/07/160112-Biomnis-Personalised-therapy-in-oncology.pdf>.
11. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
12. Junior SA. Prognostic and predictive value of the immunohistochemical expression of thymidylate synthase in patients with colorectal carcinoma. 2004.
13. Matuo R. Avaliação da atividade citotóxica de 5-fluorouracil e seu metabólito FdUMP, e os sistemas de reparo envolvidos. 2008.
14. Sá OMdS. Efeitos da glicina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamster. 2010.
15. Martins CG, Wagner SC, Linden R. Individualización farmacocinética de las dosis de 5-fluorouracil en el cáncercolorrectal. 2013.
16. Filho EXdS. Efeitos da formulação mucoadesiva com extrato de Curcuma longa L. em animais portadores de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil. 2014.
17. Manual BCACD. Fluorouracil 2015 [Available from: http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Fluorouracil_monograph_1Sep2015.pdf.

18. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.
19. Ribeiro R, Leitão R, Sant'ana R, Moura J, Lima V, Medeiros R, et al. Mucosite Oral: patogênese e manuseio clínico 2008 [Available from: <http://docplayer.com.br/11366036-Mucosite-oral-patogenese-e-manuseio-clinico.html>].
20. Cheah KY, Howarth GS, Yazbeck R, Wright TH, Whitford EJ, Payne C, et al. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(4):382-90.
21. Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN, Paiva NC, Cardoso VN, Fernandes SO, et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *J Negat Results Biomed*. 2014;13:6.
22. Song MK, Park MY, Sung MK. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *J Cancer Prev*. 2013;18(4):322-9.
23. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Asmari SA, Al-Rawi A, Al-Omani S. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. *J Complement Integr Med*. 2016;13(4):377-85.
24. Generoso S de V, Rodrigues NM, Trindade LM, Paiva NC, Cardoso VN, Carneiro CM, et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis*. 2015;14:54.
25. Barros PA, Generoso SV, Andrade ME, da Gama MA, Lopes FC, de Sales ESEL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer*. 2017;69(1):168-75.
26. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Masri N. Mitigation of 5-fluorouracil-induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox-sensitive transcription factors. *Hum Exp Toxicol*. 2016.
27. Yuan KT, Yu HL, Feng WD, Chong P, Yang T, Xue CL, et al. *Bifidobacterium infantis* has a beneficial effect on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Benef Microbes*. 2015;6(1):113-8.
28. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26(7-8):804-10.
29. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res*. 2010;695(1-2):22-8.
30. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):262-9.
31. Machado FS, Marinho JP, Abujamra AL, Dani C, Quincozes-Santos A, Funchal C. Carbon Tetrachloride Increases the Pro-inflammatory Cytokines Levels in Different Brain Areas of Wistar Rats: The Protective Effect of Acai Frozen Pulp. *Neurochem Res*. 2015;40(9):1976-83.

32. Barbosa PO, Pala D, Silva CT, de Souza MO, do Amaral JF, Vieira RA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. *Nutrition*. 2016;32(6):674-80.

33. Pala D, Barbosa PO, Silva CT, de Souza MO, Freitas FR, Volp ACP, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. *Clin Nutr*. 2018;37(2):618-23.

Abordagens dietéticas para o tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Resumo

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga antimetabólica muito utilizada na terapia de diversos tipos de câncer e age na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA e suprimindo a proliferação de células tumorais. No entanto, células saudáveis com alta taxa de divisão celular, como as células da mucosa do trato gastrointestinal (TGI) também são afetadas. Essa inflamação da mucosa do TGI é denominada mucosite. A mucosite intestinal (MI) é um processo complexo que envolve produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e culmina na ativação de várias vias de sinalização celular, que potencializam a inflamação local. No presente artigo de revisão, investigamos novas abordagens nutricionais na toxicidade gastrointestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU. Nos últimos anos é crescente o número de estudos em busca de nutrientes que possam regular as respostas inflamatórias e aumentar a qualidade de vida de pacientes em tratamento quimioterápico. Foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos da suplementação de imunomoduladores como aminoácidos, ácidos graxos, produtos naturais à base de plantas, vitaminas e o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos atuando como adjuvantes no tratamento da MI em vários modelos experimentais. Essas pesquisas instigam mais estudos da área, uma vez que, até o presente momento não há terapia específica e aprovada nesse contexto. Isso proporcionaria futura inclusão de compostos da dieta adjuvantes à quimioterapia, o que promoveria maior efetividade desse tratamento.

Palavras-chave: Mucosite intestinal, 5-fluorouracil, Aminoácidos, Vitaminas, Ácidos graxos, Probióticos, Prebióticos, Simbióticos.

1. Introdução

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e tem influenciado muitos estudos ao longo dos anos na busca de tratamentos farmacológicos que proporcionariam o aumento da sobrevivência de pacientes com a doença. Dentre esses fármacos, podemos citar o 5-FU^(1, 2).

O 5-FU é um quimioterápico comumente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de cabeça e pescoço, mama e o colorretal. Seu mecanismo de ação está relacionado com a sua conversão, no meio intracelular, a três nucleotídeos citotóxicos, como o 5-fluoro-2'- deoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP), 5-fluoro-2'- deoxiuridina 5'-difosfato (FdUDP) e 5-fluoro-uridina 5'-trifosfato (FUTP). Esses metabólitos ativos inibem a enzima timidilato sintase (TS) e conseqüentemente bloqueiam a síntese de DNA e ainda podem ser incorporados ao DNA e RNA. Este processo aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativam fatores de transcrição que estimulam genes com caráter inflamatório, ocasionando a infiltração de células da resposta imológica, ativação de vias de sinalização e morte celular. Por apresentar baixa especificidade, o 5-FU atinge, além das células cancerosas, células normais de tecidos com alta taxa de renovação celular, como as do TGI, provocando a MI^(1, 3, 4).

A MI tem uma natureza complexa, atingindo aproximadamente 40% dos pacientes em quimioterapia e embora o mecanismo exato do dano intestinal induzido pelo tratamento não seja totalmente esclarecido, está bem evidenciado que a produção exacerbada de ERO, apoptose, hipoproliferação (nas fases iniciais) e a expressão aumentada de mediadores inflamatórios desempenham um papel importante na patogênese da mucosite induzida por 5-FU^(3, 5-7).

Sonis⁽³⁾ propôs a patobiologia da MI em um modelo de cinco fases: iniciação, resposta a danos primários, amplificação dos sinais, ulceração e cicatrização. Estas fases estão ilustradas na Figura 2.1.

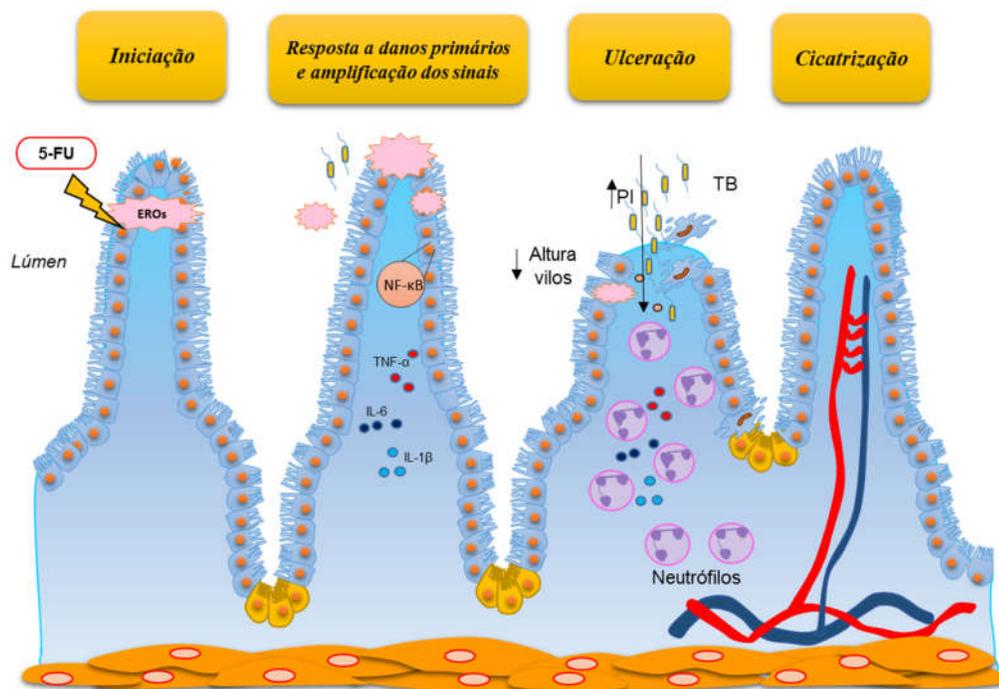


Figura 2.1: Fases fisiopatológicas da MI de acordo com Sonis⁽²⁾. A primeira fase recebe o nome de iniciação e ocorre imediatamente após exposição do 5-FU ao lúmen intestinal. O dano ao DNA da célula devido à toxicidade do fármaco gera um aumento na produção de ERO e ativação de mediadores inflamatórios visualizados na fase de resposta a danos primários. As citocinas pró-inflamatórias são os componentes principais da terceira fase denominada amplificação de sinais pois potencializam a lesão tecidual devido a ativação adicional do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), provocando a ativação de várias outras vias de sinalização celular. A quarta fase é a ulceração, onde ocorre um aumento da permeabilidade intestinal (PI) e perda da integridade da mucosa. A última fase e menos compreendida até o momento é a fase de cicatrização, caracterizada pelo aumento da proliferação celular, diferenciação e migração de células epiteliais.

A primeira fase denominada iniciação, ocorre imediatamente após a administração do 5-FU. O fármaco causa toxicidade celular e dano ao DNA, fazendo com que ocorra posterior ativação de várias vias de transdução de sinais responsáveis pelos posteriores eventos citotóxicos^(3, 4, 8).

A segunda fase é nomeada resposta a danos primários e ocorre simultaneamente ao dano inicial. O aumento da formação de ERO ativa o NF-κB, uma das moléculas mais importantes para o desencadeamento da toxicidade às células da camada mucosa, e assim o processo inflamatório é desencadeado. Estudos sugerem que o NF-κB promove aumento da expressão de moléculas de adesão e da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), assim como um desequilíbrio entre proteínas da família BCL2, exercendo regulação positiva de genes de proteínas pró-apoptóticas, acelerando assim, a morte celular, inclusive de células saudáveis. Além disso, o NF-κB promove aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, IL-1β e IL-6^(3, 8).

No estágio posterior, denominado fase de amplificação dos sinais, essas citocinas são consideradas mediadores chaves, pois retroalimentam (*feedback* positivo) e amplificam o dano induzido pela quimioterapia. Esse evento ativa diferentes cascatas de sinalizações

celulares que provocam uma ativação adicional do NF-κB, colaborando para a morte celular e injúria tecidual^(3,7,8).

O quarto estágio compreende a fase ulcerativa, onde a mucosite é considerada clinicamente notória e apresenta sintomas evidentes. Os eventos danosos desencadeiam a diminuição da integridade da mucosa com conseqüente ineficiência da barreira intestinal. Isso acarreta lesões profundas e altamente dolorosas, assim como aumento da PI e translocação bacteriana (TB). Além disso, a resposta intestinal a micro-organismos invasores, também pode potencializar a inflamação local e agravar o dano à mucosa^(3, 8). Em relação aos aspectos histológicos, a MI é caracterizada pela desorganização da arquitetura tecidual, encurtamento das vilosidades e alteração na profundidade das criptas, aumento da infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos, e acúmulo de líquido tecidual^(3, 9-11).

Por conseguinte, o aumento da taxa de proliferação e de migração celular promovem sinais resolutivos às camadas do órgão. Nesse último estágio, é provável que a microbiota intestinal também seja restituída^(3, 8, 12). Até o momento, essa fase é a menos compreendida e estudada e é denominada fase de cicatrização.

Os tratamentos atuais da mucosite são direcionados a cura dos sintomas apresentados pelos pacientes em terapia com 5-FU. Dentre esses sintomas, pode-se destacar: xerostomia, disgeusia, dor na região afetada, náuseas, êmese, diarreia (geralmente severa), constipação, hiporexia/anorexia, dentre outras complicações^(8, 11, 13, 14).

A esse respeito, a abordagem clínica é baseada no tratamento dos sintomas inerentes a MI e na profilaxia de infecções secundárias causadas por micro-organismos e consistem na administração de analgésicos, anti-inflamatórios dentre outros compostos. Contudo, em outros casos a melhora desses sintomas está relacionada com a diminuição da dose do quimioterápico prescrito ou até mesmo a suspensão da terapia antitumoral administrada, o que pode prolongar o tempo e custo da quimioterapia, além de favorecer a progressão da neoplasia maligna e o contágio a infecções oportunistas^(3, 15, 16).

Desse modo, é de fundamental importância o estudo de meios alternativos que possam atenuar a MI e proporcionar uma melhora na qualidade de vida dos pacientes em tratamento do câncer, e assim aumentar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos.

Neste artigo, revisamos trabalhos que demonstraram os efeitos da suplementação de nutrientes imunomoduladores, como a utilização de aminoácidos, ácidos graxos, produtos naturais extraídos de plantas, micronutrientes e o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos na MI induzida por 5-FU.

2. Aminoácidos

Têm sido enfatizado a importância dos aminoácidos na manutenção da função intestinal e seus possíveis efeitos terapêuticos em doenças relacionadas ao intestino⁽¹⁷⁾. A glutamina é um aminoácido não essencial, precursor da síntese de glutatona e responsável pela manutenção da integridade da mucosa. Desempenha importante papel na regulação da PI e TB^(18,19). Choi *et al.*⁽²⁰⁾ investigaram o efeito da suplementação de glutamina oral na MI induzida por 5-FU e leucovorina (LV) pelo teste de PI em 51 pacientes em terapia oncológica. Esses autores observaram que a glutamina pode exercer um efeito protetor na mucosite induzida por 5-FU/LV e sugeriram que o teste de PI através da excreção urinária de Cr-EDTA (cromo-etilenodiaminotetracético) pode ser uma ferramenta útil na avaliação da gravidade da MI.

A arginina é um aminoácido essencial, metabolizado por enterócitos e tem sido estudada por vários pesquisadores por possuir inúmeras propriedades. Em condições de estresse, como na endotoxemia por lipopolissacarídeo e obstrução intestinal, a arginina promoveu melhora aos aspectos morfológicos, aumento da proliferação de enterócitos e diminuição do risco de septicemia^(21,22). Na MI induzida por 5-FU, o pré-tratamento com L-arginina promoveu melhora do comprimento intestinal, recuperação parcial da arquitetura da mucosa, melhora dos aspectos histopatológicos e atenuação da infiltração de neutrófilos. Além disso, os autores observaram melhoria na PI, considerando que a redução desse parâmetro é fundamental para preservar a arquitetura da mucosa e impedir a inflamação sistêmica⁽²³⁾.

Um estudo⁽²⁴⁾ recente sugere que a suplementação com 295mg ou 458mg de L-arginina/dia suprime os efeitos colaterais da toxicidade do 5-FU, incluindo trombocitopenia e neutropenia, além de modular a produção de imunoglobulina A secretória (sIgA). Além disso, a suplementação com 458mg de L-arginina pôde reduzir o infiltrado inflamatório no intestino de ratos com MI. Esses efeitos podem estar relacionados aos metabólitos produzidos pela arginina, o óxido nítrico (NO) e poliaminas, que em condições estressantes, atuam no reparo da mucosa gastrointestinal e estimulam a restituição epitelial pelo aumento da proliferação celular e regulação da apoptose^(25,26).

A L-citrulina é um aminoácido precursor de arginina sendo considerado um importante componente da via do NO. Ela tem sido usada como biomarcador sérico da função dos enterócitos, pois é produzida por essas células⁽²⁷⁾. Antunes *et al.*⁽²⁸⁾ avaliaram o efeito da administração de L-citrulina e observaram que este aminoácido reduz o dano a arquitetura da mucosa e a PI.

A taurina, um aminoácido semi-essencial, desempenha um papel importante na prevenção de doenças infecciosas e inflamatórias e apresenta um alto poder antioxidante⁽²⁹⁾. Al-Asmari *et al.*⁽³⁰⁾ propuseram avaliar o efeito preventivo da taurina contra a toxicidade

induzida pelo 5-FU em diferentes órgãos de ratos. Os autores observaram que no intestino, a taurina atenuou o dano à mucosa e suprimiu a infiltração de mastócitos. No fígado e nos rins, a taurina reduziu a necrose e a degeneração vacuolar, bem como, a infiltração de células inflamatórias. Também foi observado melhora das alterações morfológicas dos órgãos reprodutivos dos animais. Os autores sugeriram que a taurina melhorou efetivamente os danos inflamatórios nesses órgãos devido a sua natureza antioxidante e anti-inflamatória.

Assim como a taurina, o rebamipide também possui efeitos antioxidantes e preventivos contra lesões na mucosa intestinal⁽³¹⁾. Kim *et al.*⁽³²⁾ investigaram os efeitos do rebamipide na MI induzida por 5-FU e verificaram que o aminoácido protege a mucosa intestinal, diminuindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, diarreia e perda de peso em um modelo experimental murino. Além disso, na lesão intestinal induzida por radiação em camundongos C57BL/6, o rebamipide promoveu melhora da estrutura das junções firmes, diminuição de citocinas pró-inflamatórias, aumento da proliferação celular e ativação da via de sinalização Wnt β -catenina; importante no reparo do DNA de células epiteliais⁽³³⁾. Esses resultados (resumidos no Quadro 2.1) reforçaram os benefícios de aminoácidos na modulação de danos causados por quimioterapia na MI induzida por 5-FU.

Quadro 2.1: Estudos experimentais com uso de aminoácidos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

Modelo	Tratamento	Resultado	Ref.
Humanos	Glutamina 30g/dia por 15 dias	↓PI.	(20)
Camundongos Swiss (machos)	L-arginina 2% na água durante 10 dias	↓PI e ↓MPO no jejuno.	(23)
Ratos Wistar (machos)	L-arginina 295mg ou 458mg/dia durante 7 dias	↑Ingestão água; ↑AST; ↓creatina no soro; ↑IgA; ↓neutropenia; ↓trombocitopenia e ↓infiltrado inflamatório.	(24)
Camundongos Swiss (machos)	Citrulina na água por 10 dias	↓dano tecidual e preservou parcialmente o comprimento das vilosidades no jejuno proximal e ↓PI.	(28)
Ratos Wistar (machos)	Taurina 50mg ou 100mg/kg durante 4 dias	↓MPO nos rins; ↓ mastócitos; suprimiu alterações histológicas nos rins, fígado, testículo e próstata e suprimiu deformidades intestinais induzidas por 5-FU.	(30)
Camundongos BALB/c (machos)	Rebamipide 150mg/kg por 6 dias	↓perda de peso; ↑altura dos vilos; ↓TNF-α no soro; ↓apoptose; ↓iNOS; ↓macrófagos; ↓TGF-β1 e ↓diarreia.	(32)

Abreviações: Ref., referências; PI, permeabilidade intestinal; MPO, mieloperoxidase; AST, aspartato amino transferase; IgA, Imunoglobulina A; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; TGF-β1, fator de crescimento transformador beta 1.

3. Produtos naturais encontrados em plantas

Compostos naturais extraídos de plantas têm sido investigados como potenciais adjuvantes do tratamento quimioterápico e resultados interessantes têm sido relatados, como efeito antioxidante e anti-inflamatório⁽³⁴⁻³⁷⁾.

O primeiro estudo a avaliar o potencial terapêutico dos curcuminoídes da *Curcuma longa* na MI observou que sua administração oral promoveu menor perda ponderal e atenuação do dano à mucosa duodenal, assim como diminuição da infiltração de neutrófilos e da peroxidação lipídica na MI induzida por 5-FU⁽³⁸⁾.

Cheah *et al.*⁽³⁹⁾ observaram atenuação da injúria, dos aspectos histológicos e da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na mucosa jejunal e ileal exposta ao 5-FU em ratos Dark Agouti tratadas por via oral com extrato da semente de uva. Outro estudo, também realizado com extrato de semente de uva na MI por 5-FU em ratos, evidenciou diminuição do peso do timo e baço, redução da atividade da MPO na junção jejuno-íleo e de parâmetros histológicos. Além disso, esse extrato *in vitro* foi capaz de diminuir a viabilidade celular de Caco-2⁽⁴⁰⁾. Os benéficos da administração desse extrato rico em proantocianidinas são provenientes do potencial antioxidante e imunomodulador desses polifenóis.

Chen *et al.*⁽⁴¹⁾ avaliaram o efeito das proantocianidinas extraídas do *Ficus virens* sobre as células do câncer de mama (MDA-MB-213 e MCF-7) e observaram que o extrato de proantocianidinas do caule do *Ficus virens* (SPAs) diminuiu a viabilidade dessas células, aumentou a relação Bax/Bcl-2 e caspase 3, diminuiu o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e aumentou a produção de ERO. Em ratos, esse mesmo estudo observou que as SPAs impediram a perda de peso corporal, diminuiu o peso do baço e timo, diminuiu o escore de gravidade da doença, bem como, reverteu os danos causados a mucosa intestinal provocados pelo 5-FU.

Outro estudo⁽⁴²⁾ avaliou o efeito do extrato aquoso de ruibarbo na MI induzida por 5-FU em ratos. O ruibarbo é uma planta muito utilizada na medicina chinesa como um remédio natural contra complicações gastrointestinais. Os autores avaliaram que doses baixas deste extrato conferiu proteção parcial contra o dano a mucosa intestinal e atenuou a inflamação. Os resultados dessas pesquisas (resumidas no Quadro 2.2) permitem-nos observar ampla atuação de componentes presentes em plantas na amenização da injúria tecidual mediada por 5-FU.

Quadro 2.2: Estudos experimentais com uso de substâncias derivadas de plantas para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

Modelo	Tratamento	Resultados	Ref.
Camundongos BALB/c (machos)	Formulação mucoadesiva de <i>Curcuma longa</i> (3,75mg/kg, 7,5mg/kg e 15mg/kg) durante 6 dias	Todas as doses: ↓perda de peso; ↑altura vilosidades duodenais; ↑profundidade das criptas; ↓escore histopatológico no duodeno; Dose de 15mg/kg: ↑Ki-67; ↓p53; ↓Bax; ↓Bcl-2; ↓MPO e ↓MDA.	(38)
Ratos Dark Agouti (fêmeas)	Extrato de semente de uva 400mg/kg durante 8 dias	Previne a ↓ viabilidade celular (IEC-6); ↓MPO; ↓escore de gravidade da doença e ↓alterações histológicas.	(39)
Ratos Dark Agouti (fêmeas)	Extrato de semente de uva (400mg/kg; 600mg/kg; 1000mg/kg) durante 9 dias	Todas as doses: ↓peso do timo e baço; Dose de 600mg/kg: ↓ MPO na junção jejuno- íleo; Dose de 1000mg/kg: melhora na profundidade das criptas jejunais e na espessura da mucosa e ↓viabilidade celular de células Caco-2.	(40)
<i>In vitro</i> : Células MDA- MB-213 e MCF-7. <i>In vivo</i> : Ratos Dark Agouti (fêmeas)	<i>In vitro</i> : células incubadas em diferentes concentrações de um extrato de SPAs/5-FU. <i>In vivo</i> : 100mg/kg de SPAs durante 6 dias	<i>In vitro</i> : ↓viabilidade celular (MDA-MB213 e MCF-7); ↑ERO; ↓MMP; ↑relação Bax/Bcl-2 e ↑Caspase 3. <i>In vivo</i> : SPAs impediram a perda ponderal e reduziram o peso do baço e timo; ↓ escore de gravidade da doença e ↓ dano à mucosa.	(41)

Ratos Dark Agouti (fêmeas)	Extrato de Ruibarbo (LDR: 20mg/kg) durante 8 dias	↑ altura das vilosidades; ↑ profundidade das criptas; ↓ apoptose e ↓ MPO no íleo; alívio da perda de água através da barreira epitelial e atenuação da inflamação intestinal.	(42)
----------------------------	---	---	------

Abreviações: Ref., referências; MPO, mieloperoxidase; MDA, dialdeído malônico; SPAs, protoantocianidinas do caule de *Ficus Virens*; ERO, espécie reativa de oxigênio; MMP, potencial de membrana mitocondrial; LDR, baixa dose de Ruibarbo.

4. Vitaminas

Na MI induzida por 5-FU em ratos Sprague Dawley, a suplementação de 500mg/kg de vitamina C (ácido ascórbico) promoveu uma diminuição da atividade da MPO e da peroxidação lipídica, diminuição da expressão do fator de transcrição NF-κB e da COX-2, redução da depleção de mucina; glicoproteínas que compõem o muco protetor, e melhora na regeneração celular. Também foi observado uma atenuação nas deformidades histológicas promovida pelo quimioterápico⁽⁴³⁾ (Quadro 2.3).

Quadro 2.3: Estudos experimentais com uso de vitaminas para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

Modelo	Tratamento	Resultados	Ref.
Ratos Sprague Dawley (machos)	500mg/kg Vitamina C durante 10 dias	↓MPO; ↓MDA; ↓NF-κB (p105/p50) e COX-2; ↓depleção de mucina; ↓ atrofia das vilosidades; normalização no índice mitótico e supressão da apoptose.	(43)
Ratos Sprague Dawley (machos)	300mg/kg Vitamina E durante 10 dias	↓MPO; ↓MDA; ↓NF-κB (p105/p50) e COX-2 e ↓iNOS; ↓depleção de mucina e das alterações histológicas.	(44)

Abreviações: Ref., referências; MPO, mieloperoxidase; MDA, diadeído malônico; NF-κB, fator nuclear kappa B; COX-2, ciclooxigenase 2; iNOS: óxido nítrico sintase induzível.

No mesmo modelo experimental, o tratamento com vitamina E (tocoferol) foi eficaz na diminuição da atividade da enzima MPO, no nível de dialdeído malônico (MDA), na injúria tecidual, bem como, na imunoexpressão do NF-κB e das enzimas COX-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Também foi constatado menor depleção de mucinas no grupo mucosite tratado com o tocoferol⁽⁴⁴⁾. Esses achados (resumidos no Quadro 2.3) demonstram que as vitaminas C e E tem considerável capacidade anti-inflamatória e antioxidante contra a toxicidade intestinal induzida por 5-FU.

5. Ácidos graxos

Generoso *et al.*⁽⁴⁵⁾ constataram redução na perda ponderal, na PI e na TB, bem como, menor número de células em apoptose e maior integridade da mucosa ileal (razão vilosidades/criptas) em camundongos BALB/c com mucosite induzida por 5-FU. Esses animais foram tratados com ácido graxo linolênico (ω -3) adicionado à dieta durante 9 e 11 dias. Os referidos resultados foram obtidos no íleo de animais eutanasiados 72h (11 dias) após à injeção da droga. Não foram encontradas alterações significativas nos grupos sacrificados após 24h (9 dias) da administração do quimioterápico.

Barros *et al.*⁽⁴⁶⁾ avaliaram o efeito da suplementação de ácido linoleico conjugado (CLA) na dieta de camundongos BALB/c com MI induzida por 5-FU e verificaram que o tratamento com CLA por 34 dias foi suficiente para aumentar a ingestão alimentar, diminuir a perda de peso, reduzir a PI e TB no sangue, fígado, pulmões e linfonodos mesentéricos. Também foi observado diminuição da expressão de mRNA de ZO-1 (zônula de oclusão 1) e ocludina e redução de biomarcadores da resposta inflamatória. Esse estudo sugeriu que a suplementação com CLA na dieta foi capaz de reduzir danos à mucosa intestinal. Por outro lado, Barros *et al.*⁽⁴⁷⁾ observaram que o tratamento em camundongos BALB/c com uma manteiga enriquecida com CLA durante 31 dias exacerbou os danos à mucosa intestinal. Os autores constataram aumento da PI, aumento da atividade enzimática da MPO e diminuição da sIgA.

Ferreira *et al.*⁽⁴⁸⁾ observaram que a administração oral por 10 dias de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi capaz de minimizar as lesões à mucosa intestinal ocasionadas por 5-FU em camundongos Swiss. Foi constatado alteração da arquitetura tecidual, inflamação, ulceração e diminuição do comprimento das vilosidades, bem como, aumento da atividade da MPO e da peroxidase de eosinófilos (EPO) em todo o intestino delgado dos camundongos do grupo mucosite. A administração de AGCC ou butirato proporcionou reversão da lesão tecidual a nível histológico, aumento da ingestão alimentar e diminuição da atividade da EPO. Além disso, animais com MI que receberam butirato isoladamente, não apresentaram perda de peso e esse composto foi capaz de diminuir a PI. Essas pesquisas (resumidas no Quadro 2.4) demonstram atuação dos ácidos graxos na integridade intestinal e na redução da resposta inflamatória na MI induzida por 5-FU.

Quadro 2.4: Estudos experimentais com uso de ácidos graxos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

Modelo	Tratamento	Resultados	Ref.
Camundongos BALB/c (machos)	Ômega-3 durante 9 e 11 dias	24h: nenhuma alteração. 72h: ↓perda de peso; ↓PI; ↓TB no sangue, fígado, baço e linfonodo mesentérico; ↑altura das vilosidades; ↑razão vilos/cripta e ↓células apoptóticas.	(45)
Camundongos BALB/c (machos)	CLA durante 34 dias	↑ingestão alimentar; ↓perda de peso; ↓PI; ↑mRNA ZO-1 e ocludina; ↓TB no sangue, fígado, pulmão e linfonodo mesentérico; ↓MPO; ↓NAG; ↓EPO; ↑slgA; ↓caspase-3; ↑CDC47; ↓IL-6; ↓IFN-γ; ↓IL-1β; ↓CXCL1(KC/IL-8); ↓TNF-α e ↑IL-10.	(46)
Camundongos BALB/c (machos)	Manteiga enriquecida com CLA durante 31 dias	↑PI; ↓MPO e ↓slgA.	(47)
Camundongos Swiss (fêmeas)	AGCC ou butirato na água por 10 dias	↓perda de peso (AGCC); inibição da perda de peso (butirato); ↑ingestão alimentar; ↓escore histopatológico; ↓EPO e ↓PI (butirato).	(48)

Abreviações: Ref., referências; PI, permeabilidade intestinal; TB: translocação bacteriana; CLA, ácido linoleico conjugado; mRNA: RNA mensageiro; ZO-1, zônula de oclusão 1; MPO, mieloperoxidase; NAG, N-acetilglicosaminidase; EPO: peroxidase de eosinófilo; slgA, imunoglobulina A secretória; IL-6, interleucina 6; IFN-γ, interferon gama; IL-1β, interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IL-10, interleucina 10; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta.

6. Probióticos, prebióticos e simbióticos

Os probióticos são micro-organismos vivos que habitam o intestino e muitos deles podem promover melhoria a saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas⁽⁴⁹⁾. Possuem um importante papel na homeostase da microbiota, no reforço da arquitetura do epitélio intestinal, na prevenção da inflamação no intestino e melhora da resposta imunológica, dentre outras particularidades⁽⁵⁰⁾. A utilização de diferentes cepas de probióticos tem sido reportada na literatura com resultados promissores no tratamento da MI induzida por 5-FU e já está elucidado que a microbiota está intimamente relacionada com o

desenvolvimento da dessa alteração⁽⁵¹⁾. Algumas espécies são frequentemente comercializadas como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*.

Um estudo utilizando *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da MI induzida por 5-FU em camundongos Swiss, evidenciou uma melhora significativa nos aspectos inflamatórios, na perda de peso e nas alterações histopatológicas e morfométricas no jejuno e íleo desses animais. Além disso, os *L. acidophilus* atenuaram a dismotilidade associada a MI induzida por essa droga⁽⁵²⁾. Outro estudo com extrato da folha da amoreira fermentado com *L. acidophilus* A4 mostrou um abrandamento da MI devido à melhora de aspectos inflamatórios e histopatológicos no jejuno e íleo de ratos Wistar com MI induzida por 5-FU⁽⁵³⁾.

A administração de *Bifidobacterium bifidum* (BBG9-1) reduziu significativamente a gravidade da MI murina induzida por esse quimioterápico, uma vez que suprimiu respostas inflamatórias e diminuiu a disbiose. Nesse estudo, o 5-FU alterou a microbiota intestinal reduzindo significativamente a abundância relativa de *Firmicutes* e aumentando *Bacteroidetes*, enquanto que a suplementação com BBG9-1 promoveu efeito oposto, suprimindo assim a inflamação em camundongos⁽⁵⁴⁾.

Outro estudo investigou a suplementação de *Bifidobacterium infantis* em ratos Sprague Dawley portadores de MI e verificaram melhora de aspectos morfométricos, diminuição de infiltração de neutrófilos e redução de citocinas pró-inflamatórias. Além disso *B. infantis* diminuiu a expressão do NF- κ B⁽⁵⁵⁾.

Entretanto, estudos que avaliaram o efeito da administração de outros probióticos no tratamento da MI apresentam resultados controversos. Whitford *et al.*⁽⁵⁶⁾ verificaram que a administração de *Streptococcus thermophilus* TH-4 melhorou a contagem mitótica e os danos histopatológicos causados pelo 5-FU em ratos Dark Agouti. Utilizando outros probióticos Justino *et al.*⁽⁵⁷⁾ avaliaram o efeito da suplementação de *Saccharomyces boulardii* em camundongos Swiss com MI e verificaram uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e da quimiocina CXCL-1 no jejuno e íleo dos animais. No entanto, Maioli *et al.*⁽⁵⁸⁾ não constataram redução da injúria à mucosa em camundongos Swiss com MI também suplementados com *Saccharomyces boulardii*.

Estudos sobre os efeitos do uso de probióticos já são extensos na literatura. No entanto, são escassos os estudos que avaliam o efeito da combinação de probióticos e prebióticos na MI permitindo pouca compreensão de suas possíveis atuações nesse contexto. Os prebióticos são compostos não digeríveis que resultam em uma alteração da composição da microbiota gastrointestinal e que conferem benefício a saúde do hospedeiro. Uma combinação de probióticos e prebióticos dá origem aos simbióticos. Esse, por sua vez pode estar relacionado com a restauração da diversidade microbiana⁽⁵⁹⁾.

Smith *et al.*⁽⁶⁰⁾ investigaram o efeito da suplementação de *Lactobacillus fermentum* BR11 e do prebiótico frutooligossacarídeo (FOS), tanto individualmente, como em combinação simbiótica. Os autores verificaram que quando administrados isolados,

probiótico e prebiótico, reduziram parcialmente os danos histopatológicos no jejuno de ratos Dark Agouti com MI, porém quando em combinação este efeito não foi alcançado. Além disso, nenhum dos tratamentos foi eficaz na redução dos danos funcionais e estruturais causados pelo 5-FU.

Trindade *et al.*⁽⁶¹⁾ avaliaram a administração oral de um simbiótico (Simbioflora®) ou prebiótico (Fosvita®) em camundongos BALB/c. Foi constatado diminuição da PI, atenuação da perda de peso e do escore histopatológico, bem como, redução da atividade da enzima EPO, aumento da camada de muco e da produção de AGCC quando comparado o grupo com MI. Os efeitos do simbiótico foram superiores aos efeitos do prebiótico isolado. O tratamento com simbiótico ainda aumentou a altura das vilosidades e promoveu elevação da produção de butirato, contribuindo para o aumento da homeostase da mucosa intestinal. Esses achados (resumidos no Quadro 2.5) sugerem potencial capacidade dos probióticos, prébióticos e simbióticos no abrandamento do dano intestinal e inflamação causados pela quimioterapia antineoplásica com 5-FU.

Quadro 2.5: Estudos experimentais com uso de probióticos, prebióticos e simbióticos para tratamento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

Modelo	Tratamento	Resultados	Ref.
Camundongos Swiss (machos)	<i>L. acidophilus</i> (16 x 10 ⁹ UFC/kg) durante 3 dias	↓perda de peso; ↓alterações histopatológicas (jejuno e íleo); ↑altura das vilosidades; ↓profundidade das criptas; ↓MPO; ↑GSH; ↓TNF-α; ↓IL-1β; ↓CXCL-1 e ↓retenção gástrica.	(52)
Ratos Wistar (machos)	Extrato da folha de amoreira fermentado com <i>L. acidophilus</i> A4 durante 10 dias	↑mRNA para MUC2 e MUC5AC; ↓mRNA para IL-1β; ↓alterações histopatológicas e ↓MPO.	(53)
Camundongos ICR (CD1) (machos)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> G9-1 (BBG9-1) durante 9 dias	↓perda de peso; ↑comprimento do intestino delgado; ↑altura das vilosidades; ↑número de células nas criptas; ↓MPO; ↓TNF-α e ↓IL-1β.	(54)
Ratos Sprague Dawley (machos)	<i>Bifidobacterium infantis</i> (10 ⁹ UFC/ml) durante 11 dias	↓perda de peso; ↓escore de diarreia; ↓IL-6; ↓IL-1β; ↓TNF-α; ↓CD4 ⁺ e CD17A ⁺ T; ↑CD4 ⁺ , CD25 ⁺ e Foxp3 ⁺ .	(55)

Ratos Dark Agouti (fêmeas)	<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4 durante 5 dias	↓atividade mitótica e ↓fissão das criptas.	(56)
Camundongos Swiss (machos)	<i>S. boulardii</i> (16 x 10 ⁹ UFC/kg) durante 3 dias	↓perda de peso; prevenção da diarreia; ↓escore do dano à mucosa (jejuno e íleo); ↓apoptose; ↑altura das vilosidades; ↓profundidade das criptas; ↓MPO; ↓TNF- α ; ↓IL-1 β ; ↓CXCL-1 e ↓retenção gástrica.	(57)
Camundongos Swiss (machos)	<i>S. boulardii</i> (10 ⁹ UFC/ml) durante 13 dias	O tratamento não afetou a perda de peso, nem a injúria intestinal, a PI e o nível de slgA.	(58)
Ratos Dark Agouti (fêmeas)	<i>L. fermentum</i> BR11 (10 ⁶ ou 10 ⁹ UFC/ml) ou FOS (3% ou 6%) ou combinação (BR11+FOS) durante 9 dias	↓MPO (parcial) no jejuno e ineficácia quanto as alterações estruturais e funcionais no intestino delgado, avaliados por meio da altura das vilosidades e profundidade das criptas e da atividade da enzima sucrase, dentre outros parâmetros.	(60)
Camundongos BALB/c (machos)	0,1ml de simbiótico (Simbioflora®) ou 0,1ml de prebiótico (Fosvita®) durante 13 dias	Ambos os tratamentos: ↓perda de peso; ↓escore histopatológico; ↑muco; ↓EPO; ↑acetato e propionato e ↓PI; Simbiótico: ↑butirato e ↑altura das vilosidades.	(61)

Abreviações: Ref., referências; MPO, mieloperoxidase; GSH, glutationa reduzida; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β , interleucina 1 beta; mRNA: RNA mensageiro; MUC2, mucina 2; MUC5AC, mucina 5AC; IL-6, interleucina 6; PI, permeabilidade intestinal; slgA, imunoglobulina A secretória; FOS, frutooligossacarídeos; EPO, peroxidase de eosinófilo.

7. Conclusão

Desde as últimas décadas, estudos que avaliam o efeito de componentes da dieta em diferentes patologias e alterações têm instigado pesquisas na área. Os achados descritos no presente artigo estimulam mais estudos que objetivem a implementação de abordagens dietéticas preventivas e terapêuticas na MI induzida por drogas quimioterápicas, visto que, até o presente momento não há terapia específica e aprovada nesse contexto. Isso impulsionaria futura inclusão de compostos da dieta na prática clínica, promovendo melhora na qualidade de vida dos pacientes e resposta mais efetiva à quimioterapia administrada.

Referências

1. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
2. You W, Henneberg M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. *Evol Appl*. 112018. p. 140-52.
3. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.
4. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008;13(8):1551-69.
5. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis—Complicating the Treatment of Cancer. *Neoplasia*. 62004. p. 423-31.
6. Chang CT, Ho TY, Lin H, Liang JA, Huang HC, Li CC, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kappaB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*. 2012;7(3):e31808.
7. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(5):448-60.
8. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100(9 Suppl):1995-2025.
9. Keefe DMK. The effect of cytotoxic chemotherapy on the mucosa of the small intestine / by Dorothy Mary Kate Keefe. 1998.
10. Keefe D, Brealey J, Goland G, Cummins A. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*. 2000;47(5):632-7.
11. Keefe DM. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. *Support Care Cancer*. 2004;12(1):6-9.
12. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Tyskin A, Keefe DM. Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(3):337-48.
13. Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*. 2006;14(9):890-900.
14. Schirmer EM, Ferrari A, Trindade LCT. Oral mucositis evolution after nutritional intervention in cancer patients under palliative care. *Rev dor*. 2012;13(2):141-6.
15. Ribeiro R, Leitão R, Sant'ana R, Moura J, Lima V, Medeiros R, et al. Mucosite Oral: patogênese e manuseio clínico 2008. *Rev. Bras. Oncologia Clínica* 2008; 15 (5):18-24.
16. Barillari ME, Goulart MN, Gomes ACP. Complicações das terapias antineoplásicas: prevenção e tratamento da mucosite oral. *Investigação* 2015;14(6):121-4.

17. Wang WW, Qiao SY, Li DF. Amino acids and gut function. *Amino Acids* 2009;37:105–10.
18. Weitzel L-RB, Wischmeyer PE. Glutamine in Critical Illness: The Time Has Come, The Time Is Now. *Crit Care Clin* 2010;26:515–25.
19. Li Y, Chen Y, Zhang J, Zhu J-F, Liu Z-J, Liang S-Y, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats. *Am J Surg* 2010;199:35–42.
20. Choi K, Lee SS, Oh SJ, Lim SY, Lim SY, Jeon WK, et al. The effect of oral glutamine on 5-fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test. *Clin Nutr* 2007;26:57–62.
21. Sukhotnik I, Mogilner J, Krausz MM, Lurie M, Hirsh M, Coran AG, et al. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxemia in rat. *J Surg Res* 2004;122:256–62.
22. Viana ML, Santos RGC, Generoso S V., Arantes RME, Correia MITD, Cardoso VN. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition* 2010;26:218–23.
23. Leocádio PCL, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DCC, et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. *Nutr Cancer* 2015;67:486–93.
24. Balmant BD, Araújo EON, Yabuki D, Novais AB, Genaro SC, Laposy CB, et al. Effects of L-Arginine Supplementation on Leukogram, Inflammatory Bowel Infiltrates and Immunoglobulins with 5-FU Use in Rats. *Nutr Cancer* 2018;70:249–56.
25. Moinard C, Cynober L, de Bandt J-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 2005;24:184–97.
26. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000;109:150–8.
27. Vokurka S, Svoboda T, Rajdl D, Sedláčková T, Racek J, Koza V, et al. Serum citrulline levels as a marker of enterocyte function in patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation - a pilot study. *Med Sci Monit* 2013;19:81–5.
28. Antunes MM, Leocádio PCL, Teixeira LG, Leonel AJ, Cara DC, Menezes GB, et al. Pretreatment With L-Citrulline Positively Affects the Mucosal Architecture and Permeability of the Small Intestine in a Murine Mucositis Model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2016;40:279–86.
29. Tabassum H, Parvez S, Rehman H, Dev Banerjee B, Siemen D, Raisuddin S. Nephrotoxicity and its prevention by taurine in tamoxifen induced oxidative stress in mice. *Hum Exp Toxicol* 2007;26:509–18.
30. Al-Asmari AK, Al-Zahrani AM, Khan AQ, Al-Shahrani HM, Ali Al Amri M. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats: A biochemical and histological study. *Hum Exp Toxicol* 2016;35:10–20.
31. Banan A, Fitzpatrick L, Zhang Y, Keshavarzian A. OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic Biol Med* 2001;30:287–98.

32. Kim HJ, Kim JH, Moon W, Park J, Park SJ, Song GA, et al. Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. *Biol Pharm Bull* 2015;38:179–83.
33. Shim S, Jang H-S, Myung H-W, Myung JK, Kang J-K, Kim M-J, et al. Rebamipide ameliorates radiation-induced intestinal injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017;329:40–7.
34. Shiota A, Hada T, Baba T, Sato M, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, et al. Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. *J Med Invest* 2010;57:314–20.
35. Wright TH, Yazbeck R, Lymn KA, Whitford EJ, Cheah KY, Butler RN, et al. The herbal extract, Iberogast, improves jejunal integrity in rats with 5-Fluorouracil (5-FU)-induced mucositis. *Cancer Biol Ther* 2009;8:923–9.
36. de Ávila PHM, de Ávila RI, dos Santos Filho EX, Cunha Bastos CC, Batista AC, Mendonça EF, et al. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Toxicol Reports* 2015;2:563–73.
37. Kato S, Hayashi S, Kitahara Y, Nagasawa K, Aono H, Shibata J, et al. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells. *PLoS One* 2015;10:e0116213.
38. Dos Santos Filho EX, Ávila PHM, Bastos CCC, Batista AC, Naves LN, Marreto RN, et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive, proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. *Toxicol Reports* 2016;3: 55–62.
39. Cheah KY, Howarth GS, Yazbeck R, Wright TH, Whitford EJ, Payne C, et al. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis *Cancer Biol Ther* 2009;8:382–90.
40. Cheah KY, Howarth GS, Bastian SEP. Grape seed extract dose-responsively decreases disease severity in a rat model of mucositis; concomitantly enhancing chemotherapeutic effectiveness in colon cancer cells. *PLoS One* 2014;9.
41. Chen X-X, Lam KH, Chen Q-X, Leung GP-H, Tang SCW, Sze SC-W, et al. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats. *Food Chem Toxicol* 2017;110:49–61.
42. Bajic JE, Eden GL, Lampton LS, Cheah KY, Lymn KA, Pei J V, et al. Rhubarb extract partially improves mucosal integrity in chemotherapy-induced intestinal mucositis. *World J Gastroenterol* 2016;22:8322–33.
43. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Qasim AM, Al-Yousef Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. *Toxicol Reports* 2015.
44. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Asmari SA, Al-Rawi A, Al-Omani S. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. *J Complement Integr Med* 2016;13:377–85.

45. Generoso S de V, Rodrigues NM, Trindade LM, Paiva NC, Cardoso VN, Carneiro CM, et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis* 2015;14:54.
46. Barros PAV, Rabelo Andrade ME, de Vasconcelos Generoso S, Mendes Miranda SE, dos Reis DC, Lacerda Leocádio PC, et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. *Biomed Pharmacother* 2018;103:1567–76.
47. Barros PAV de, Generoso S de V, Andrade MER, da Gama MAS, Lopes FCF, de Sales e Souza ÉL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer* 2017;69:168–75.
48. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids* 2012;47:669–78.
49. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32:439–42.
50. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Liver Physiol* 2009;296:G1140–9.
51. Pedroso SH, Vieira AT, Bastos RW, Oliveira JS, Cartelle CT, Arantes RM, Soares PM, Generoso SV, Cardoso VN, Teixeira MM, Nicoli JR MF. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. *Microbiology* 2015;161:1950–60.
52. Justino PFC, Melo LFM, Nogueira AF, Morais CM, Mendes WO, Franco AX, et al. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:559–67.
53. Oh NS, Lee JY, Lee JM, Lee KW, Kim Y. Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett Appl Microbiol* 2017;64:459–68.
54. Kato S, Hamouda N, Kano Y, Oikawa Y, Tanaka Y, Matsumoto K, et al. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017;44:1017–25.
55. Yuan K-T, Yu H-L, Feng W-D, Chong P, Yang T, Xue C-L, et al. *Bifidobacterium infantis* has a beneficial effect on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Benef Microbes* 2015;6:113–8.
56. Whitford EJ, Cummins AG, Butler RN, Prisciandaro LD, Fauser JK, Yazbeck R, et al. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent, 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biol Ther* 2009;8:505–11.
57. Justino PFC, Melo LFM, Nogueira AF, Costa JVG, Silva LMN, Santos CM, et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br J Nutr* 2014;111:1611–21.
58. Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN, Paiva NC, Cardoso VN, Fernandes SO, et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in

Swiss mice. J Negat Results Biomed 2014;13:6.

59. Bielecka M, Biedrzycka E, Majkowska A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. Food Research International. 2002;35(2):125-31.

60. Smith CL, Geier MS, Yazbeck R, Torres DM, Butler RN, Howarth GS. *Lactobacillus fermentum* BR11 and Fructo-Oligosaccharide Partially Reduce Jejunal Inflammation in a Model of Intestinal Mucositis in Rats. Nutr Cancer 2008;60:757–67.

61. Trindade LM, Martins VD, Rodrigues NM, Souza ELS, Martins FS, Costa GMF, et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. Benef Microbes 2018;9:477–86.

1. Açaí (*Euterpe oleracea* Martius)

O açaí é um fruto com nome de origem indígena, pertencente à família *Arecaceae* e ao gênero *Euterpe*. Deriva do açazeiro, uma palmeira nativa da América do Sul, presente abundantemente na região amazônica localizada em grande parte do norte do Brasil, também, na Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela e Colômbia. Possui forma globosa, cor pardo-violácea e polpa oleosa (Figura 3.1). Esse fruto pode ser cultivado durante todo o ano com maior produção entre os meses de agosto e dezembro e é atualmente produzido em larga escala principalmente na região norte do Brasil. Os estados do Pará e do Amazonas são os principais responsáveis pela comercialização do fruto, detendo aproximadamente 90% do manufaturamento. O despulpamento proporciona o consumo do açaí na forma de bebidas energéticas, sorvetes, geleias, vinhos, licores e *etc.* que são transportados para outras regiões do país e do mundo⁽¹⁻⁸⁾.

O açaí comercializado pode ser proveniente de duas espécies: *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius, sendo que essa última possui concentração de antioxidantes cerca de 50% maior, contudo suas propriedades biológicas são pouco conhecidas na literatura e o fruto da espécie *Euterpe oleracea* é o mais estudado atualmente^(6, 7, 9).



Fonte: Adaptado de Ppmac⁽¹⁰⁾

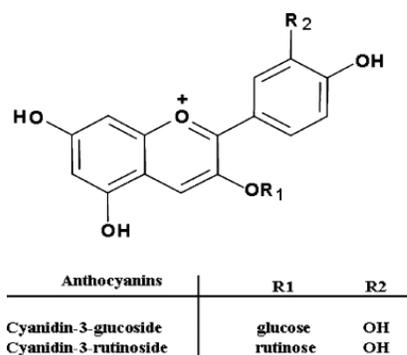
Figura 3.1: Açazeiro do *Euterpe oleracea* Martius.

Schauss *et al.*^(1, 11) foram um dos pioneiros em analisar a composição nutricional e fitoquímica da polpa do açaí. Em síntese, cada 100g de peso seco contém 52,2% de carboidratos totais, quantidade apreciável de fibra alimentar (44,2% dos carboidratos), reduzido teor de carboidratos simples (1,3% dos carboidratos) e 8,1% de proteínas. Possui considerável teor de lipídeos (32,5%) e desse teor 26,1% são provenientes de ácidos graxos saturados, sendo 24,1% de ácido palmítico. A maior parte do conteúdo lipídico é composto por ácidos graxos insaturados, sendo 60,6% de ácidos graxos monoinsaturados e 13,3% de

poli-insaturados, predominando os ácidos graxos oleico/ ω -9 (56,2%) e linoleico/ ω -6 (12,5%), respectivamente. Contém fitoesteróis (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol), vitaminas (α -tocoferol, retinol, filoquinona, complexo B e ácido ascórbico) e elementos traços (cálcio, potássio, fósforo, sódio, zinco, ferro, cobre, magnésio)⁽⁷⁾. O uso etnofarmacológico do açaí ainda não foi integralmente validado por estudos científicos, no entanto, populações nativas utilizam há séculos a fruta inteira, sua fração polposa e raízes do açaí no propósito de combater diarreia, hemorragia, infecções parasitárias e úlcera^(1, 7).

Diversos estudos com o açaí têm sido realizados desde a década de 80, com marcado aumento nos últimos anos. Suas descobertas demonstraram que além de proporcionar alto valor agregado no âmbito nutricional e sensorial, o açaí tem recebido destaque no meio científico e potencial alegoria para ser denominado “alimento funcional”. Esse prestígio o equipara a outras frutas como romã, goji berry e o mirtilo e está atribuído a sua notável capacidade antioxidante e anti-inflamatória observada em estudos *in vivo* e *in vitro*. A considerável concentração de compostos fenólicos promove a notoriedade do açaí, sendo as antocianinas, flavonoides pertencentes à subclasse dos polifenóis, responsáveis por além de agregarem coloração ao fruto, promoverem a maior capacidade antioxidante conhecida encontrada na polpa. Dentre outras frutas de coloração arroxeadada/avermelhada, estima-se que o açaí possui dez vezes mais antioxidantes do que a uva^(1, 2, 5-8, 12-14).

O teor total de antocianinas pode variar de aproximadamente 1,3 a 46,3mg/100g de polpa de açaí. Essas oscilações podem ser devidas a diferenças nos procedimentos executados no plantio, assim como nas técnicas de processamento, conservação, armazenamento e transporte da polpa da fruta. As principais antocianinas presentes na polpa de açaí são a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo^(1, 8, 15, 16) (Figura 3.2). Desde o ano 2.000 a manipulação da polpa do açaí proporcionou aumento de sua comercialização no Brasil e em outros países como Estados unidos, Europa, Japão e China. Apesar do processamento e congelamento da polpa serem necessários para possibilitar sua conservação e comercialização, estes procedimentos afetam a concentração de compostos fenólicos, compreendendo um teor de 3.120mg/100g de polifenóis totais no extrato do fruto fresco e de 182,95mg a 598,55mg/100g na polpa comercial. Contudo, o teor de polifenóis totais e antocianinas permanece elevado^(2, 3, 8, 17, 18). Kuskoski *et al.*⁽¹⁹⁾ e Zielinski *et al.*⁽²⁰⁾ demonstraram que entre as polpas congeladas de acerola, amora, uva, morango e goiaba, a polpa de açaí apresentou teor considerável desses fitoquímicos.



Fonte: Adaptado de Schauss *et al.*⁽¹⁾

Figura 3.2: Estrutura química das principais antocianinas presentes na polpa de açaí.

Estudos sugerem que a composição da polpa de açaí rica em antocianinas, outros flavonoides, fibras, polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, promove potencial proteção contra danos ao organismo mediados pelo estresse oxidativo e inflamação⁽⁶⁻⁸⁾.

2. Defesas antioxidantes e o estresse oxidativo

O termo espécies reativas tem sido mais utilizado atualmente e inclui radicais livres, moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados, e outras partículas, que, apesar de não possuírem elétrons nesse estado, são altamente reativas devido a sua instabilidade química. Essas espécies podem ser geradas na mitocôndria, no retículo endoplasmático, no citosol e na membrana celular, e promovem grande interesse em pesquisas científicas, uma vez que todos os organismos aeróbios estão constantemente sujeitos a reações oxidativas provenientes dos metabólitos do oxigênio, denominadas ERO^(21, 22).

O estado redox celular é determinado pelo equilíbrio entre a presença de espécies reativas, outras moléculas potencialmente reativas e os redutores equivalentes. Nesse sentido, quando há elevação transitória ou cronicamente aumentada do estado oxidante além da capacidade de defesa enzimática endógena, o estresse oxidativo é estabelecido⁽²²⁻²⁴⁾.

As principais fontes biológicas produtoras de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são a mitocôndria durante a respiração celular, a enzima xantina óxido-redutase no citosol, a citocromo P450 redutase no retículo endoplasmático e a NAHPH oxidase presente na membrana plasmática de fagócitos. O ânion superóxido produzido é convertido em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) pelas enzimas superóxido dismutase (SOD). A enzima SOD pode ser encontrada em diferentes formas dependendo do contexto celular, sendo a Mn-SOD mitocondrial e as Cu, Zn-SOD citosólicas. Por conseguinte, as enzimas glutathione peroxidase (GPX) presente na mitocôndria e citosol e catalase (CAT) presente na fração peroxissomal, convertem boa parte do peróxido de hidrogênio produzido em água⁽²²⁾. A atividade antioxidante da GPX é mantida por outra enzima, a glutathione redutase (GSR), que

às custas de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) converte a GPX da forma oxidada (GSSG) para sua conformação de origem (GSH). Outras espécies reativas como o radical hidroxil (OH), o óxido nítrico (NO), o ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singlete (1O_2), podem ser produzidas a partir do peróxido de hidrogênio, íons ferro/cobre ou por enzimas das células da imunidade inata⁽²¹⁻²⁴⁾.

Os mecanismos endógenos de defesa citados são fundamentais para impedir interações excessivas das espécies reativas com biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), evitando assim, consequente dano tecidual, mutações no DNA e processos inflamatórios. Contudo, níveis celulares elevados dessas espécies provindas de qualquer perturbação no controle da sinalização redox, por exemplo, por meio do uso de drogas antineoplásicas, caracterizam o estresse oxidativo. Isso culmina em potenciais consequências patológicas ao organismo^(23, 25).

Além desses mecanismos de defesa antioxidante, há componentes de fonte exógena, que podem ser provenientes da dieta e que também participam da neutralização de espécies reativas, dentre eles, micronutrientes como vitamina C, vitamina E e o selênio e os não nutrientes, como o β -caroteno e os polifenóis^(26, 27). Os compostos fenólicos constituem o maior grupo dentre as substâncias bioativas não nutritivas presentes nos vegetais e estão amplamente distribuídos na dieta humana^(13, 28). Devido à ressonância do anel fenólico, esses fitoquímicos neutralizam espécies e quelam metais de transição pela capacidade em doarem átomos de hidrogênio formando intermediários relativamente estáveis. Em adição, pesquisas sugerem que esses compostos regulam positivamente a expressão gênica de enzimas de detoxificação de fase II e promovem proteção ao DNA^(26, 28, 29).

3. Polifenóis e seus benefícios à saúde

Estudos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias dos polifenóis de diferentes frutas como: cereja, framboesa, maçã, cacau, morango, uva, mirtilo, lichia, pequi, romã e açaí. Isso tem proporcionado estratégias promissoras quanto à prevenção e/ou tratamento de muitas doenças, dentre elas, câncer, doenças cardiovasculares e renais, enfermidades neurodegenerativas, diabetes mellitus, obesidade, doenças inflamatórias intestinais, úlcera péptica, esteatose, fibrose hepática, dentre outras^(7, 28, 30-43).

Os polifenóis são um conjunto de compostos fenólicos que possuem estrutura química de um anel benzênico ligado a uma ou mais hidroxilas. Eles proporcionam pigmentação, fotoproteção, atividade inseticida, antimicrobiana e antioxidante às plantas. Os ácidos fenólicos (café), os estilbenos (uva), as cumarinas (aipo), as ligninas (linhaça) e o flavonoides (frutas e hortaliças) compreendem os principais subgrupos dos polifenóis. Esse

último subgrupo possui mais de cinco mil substâncias identificadas e é considerado o maior e mais estudado^(13, 14, 28, 39, 44).

A literatura sugere que a capacidade antioxidante dos polifenóis promove inibição da ativação do NF- κ B e supressão da ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-1 β ⁽⁴⁵⁾. Um estudo realizado por Louis *et al.*⁽⁴⁶⁾ demonstrou prevenção no decaimento da atividade das enzimas SOD e CAT e melhor desempenho em cardiomiócitos pré-tratados com extrato de mirtilo após estímulo com norepinefrina. Lee *et al.*⁽⁴⁷⁾ demonstraram diminuição na atividade da SOD, aumento na atividade da CAT e inalteração na ação da GPX em eritrócitos de adultos jovens com excesso de peso e leve hipercolesterolemia e que receberam um extrato aquoso de goji berry. Esse estudo também observou diminuição da expressão de mRNA para TNF- α e IL-6.

Outra pesquisa⁽⁴⁸⁾ observou redução dos níveis séricos de TNF- α e IL-6 e aumento de interleucina IL-10 em camundongos obesos tratados com diferentes extratos de romã. Em um modelo de colite, pesquisadores verificaram menor atividade da enzima MPO e redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em camundongos que receberam extratos de uva⁽⁴⁹⁾. Taverniti *et al.*⁽³⁰⁾ constataram efeito supressor de um extrato rico em antocianinas do mirtilo na ativação do NF- κ B induzida por IL-1 β em células epiteliais intestinais. Dentre os apreciáveis efeitos dessas frutas, o açaí também tem proporcionado importante atuação reguladora de eventos danosos em organismos biológicos.

4. Açaí, estresse oxidativo e inflamação

Pesquisas tem demonstrado considerável efeito antioxidante *in vitro* do açaí. Schauss *et al.*⁽¹¹⁾ constataram elevada capacidade dos componentes da polpa de açaí liofilizada na neutralização de radicais peroxil (RO₂ \cdot) e ânion superóxido, mas baixa capacidade contra radicais peroxinitrito (ONOO \cdot) e radicais hidroxila (OH \cdot). Esses achados ajudaram a compreender a atuação antioxidante dos compostos fenólicos do açaí. Permitindo destacar a ação dos mesmos sob ânions superóxido, considerados precursores para a formação de outras espécies reativas de oxigênio.

Hogan *et al.*⁽⁵⁰⁾ observaram que um extrato concentrado em antocianinas do açaí apresentou maior capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) em comparação com extratos ricos em compostos fenólicos de outras frutas, como a framboesa, o mirtilo e o morango, assim como considerável capacidade em neutralizar outros radicais, como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Zielinski *et al.*⁽²⁰⁾ demonstraram que comparada às polpas de abacaxi, mamão e cacau, a polpa de açaí apresentou elevada capacidade em neutralizar radicais DPPH, atingindo eficiência similar à goiaba e ao morango. Nesse mesmo trabalho, foi salientado o alto poder de redução do íon ferro pela polpa de açaí comparado à outras dezoito polpas analisadas, se equiparando à amora. Outro estudo⁽⁵¹⁾ demonstrou efeito similar de antioxidantes da polpa de açaí quanto a atividade das enzimas SOD e CAT em

relação a neutralização de ERO⁽⁵²⁾. Esses trabalhos demonstram eficácia dos componentes da polpa do açaí em atuar sobre diferentes espécies reativas.

A atividade antioxidante do açaí é a mais estudada atualmente e pode compreender o cerne de muitos de seus benefícios⁽⁷⁾, entretanto o açaí tem demonstrado diversos outros efeitos. Relata-se ação antiproliferativa⁽⁵⁰⁾, antinociceptiva⁽⁵³⁾ e antitumoral⁽⁵⁴⁾ em diferentes modelos experimentais, e sugere-se que a atuação dos compostos fenólicos da fruta pode ser responsável por esses achados, apesar disso requerer maior elucidação nesses contextos.

Pesquisas utilizam diferentes maneiras para administração do açaí e/ou seus componentes em distintos modelos experimentais. Será apresentado a seguir um compilado de estudos que avaliaram a resposta antioxidante e/ou inflamatória do açaí utilizando administração do fruto na forma de polpa ou de diferentes extratos.

Ribeiro *et al.*⁽⁴⁾ demonstraram ausência de efeito genotóxico no sangue periférico, células hepáticas e renais de camundongos tratados com polpa de açaí por gavagem nas concentrações de 3,33; 10,00 e 16,67g/kg/dia durante quatorze dias. Também foi observado que essas células foram protegidas contra danos causados pelo quimioterápico doxorubicina por meio do tratamento subagudo (quatorze dias) comparado ao agudo (24h). De Souza *et al.*⁽⁵⁵⁾, constataram diminuição da atividade da enzima SOD sérica, aumento de grupos sulfidril e da atividade da enzima paraoxonase (PON) no soro de ratas que receberam dieta hipercolesterolêmica juntamente com 2% de açaí (200g de polpa/kg de dieta) durante seis semanas.

Um estudo realizado por Bonomo *et al.*⁽⁵⁶⁾ em *Caenorhabditis elegans* pré-tratados com um extrato aquoso do açaí, demonstrou que a resistência a agentes oxidativos induzida pelo tratamento com açaí ocorre pela ativação de vias de sobrevivência, como a via dependente de DAF-16/FOXO. A resistência ao estresse oxidativo foi relacionada com a diminuição da produção de ERO e com a prevenção do decaimento de grupos sulfidril.

Barbosa *et al.*⁽⁵⁷⁾ avaliaram o impacto da ingestão de polpa de açaí sobre mecanismos antioxidantes em mulheres saudáveis. Foi observado que a ingestão diária de 200g de polpa do fruto durante quatro semanas, proporcionou aumento da atividade da enzima CAT e da capacidade antioxidante total (TAC) e redução da produção de ERO em células polimorfonucleares. Também foi constatada redução de proteínas carboniladas e aumento de grupos sulfidril no soro das voluntárias. Além de promoverem neutralização direta de espécies reativas, sugere-se que os fitoquímicos presentes no açaí promovem a dissociação do fator de transcrição nuclear eritróide (Nrf2) do seu inibidor citosólico Keap1 (*Kelch-like ECH associating protein 1*), possibilitando sua translocação para o núcleo e ligação ao elemento de resposta a antioxidantes (ARE), uma sequência de ativação reguladora. Esse evento promove a transcrição de enzimas de detoxificação, como a SOD e a CAT^(27, 52, 57).

Recentemente, um estudo similar realizado por Pala *et al.*⁽⁵⁸⁾ demonstrou efeito antiaterogênico da ingestão de polpa de açaí no mesmo modelo experimental. Foi constatado aumento da concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL), da atividade da enzima PON e da TAC no soro das voluntárias. Em contrapartida, houve diminuição da produção de ERO e da concentração da lipoproteína de alta densidade na forma oxidada (LDL-ox) e de MDA. Outro trabalho⁽⁵⁹⁾ realizado em humanos, constatou melhora da função vascular e da capacidade antioxidante plasmática após ingestão de uma bebida à base de açaí (150g de polpa - 694 mg de fenólicos totais) juntamente com uma refeição rica em gordura por homens com sobrepeso.

A produção de espécies reativas desencadeada pelo dano provocado por quimioterápicos, dentre eles o 5-FU, ao DNA provoca ativação do NF-κB com consequente iniciação da resposta inflamatória. Em adição, agentes oxidantes também exercem papel fundamental na retroalimentação e severidade da MI juntamente com mediadores pró-inflamatórios^(25, 60-62).

Xie *et al.*⁽⁶³⁾ encontraram redução dos níveis séricos, bem como, da expressão gênica e nível proteico de TNF-α e IL-6 em macrófagos de camundongos deficientes de apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e tratados com suco de açaí (5%) durante cinco semanas. Observaram também menor lesão na aorta, aumento de HDL sérico, diminuição de biomarcadores de peroxidação lipídica (ácidos hidroxiicosatetraenóicos) no fígado e soro, assim como aumento da expressão das enzimas antioxidantes GSR, GPX e PON1 nos animais hiperlipidêmicos tratados com o suco de açaí por vinte semanas. Outro estudo realizado por Xie *et al.*⁽⁶⁴⁾ obteve resultados semelhantes quanto a supressão de TNF-α e IL-6 por meio da administração do flavonoide velutina, proveniente da polpa do açaí, em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Também foi observado capacidade da velutina em inibir a ativação do NF-κB.

Poulose *et al.*⁽⁹⁾ demonstraram efeito neuroprotetor em células microgлияis de murinos (BV-2) tratadas com diferentes frações de polifenóis da polpa de açaí extraídos por acetona, acetato de etila, metanol e etanol. Após estimulação celular com LPS, esses extratos proporcionaram diminuição da produção de NO e da expressão da enzima iNOS, da proteína p38, do NF-κB e da enzima COX-2. A concentração do TNF-α foi reduzida pelos extratos alcoólicos. De maneira semelhante, da Silva *et al.*⁽⁶⁵⁾ constataram que a administração de um extrato do açaí rico em antocianinas, reestabeleceu a razão GSH/GSSG, protegeu a membrana plasmática contra peroxidação lipídica e diminuiu a expressão do Nrf2 em astrócitos com citotoxicidade induzida por alta concentração de manganês.

Em outro estudo *in vitro*, Dias *et al.*⁽⁶⁶⁾ observaram que extratos polifenólicos de açaí reduziram os níveis de ERO e modularam a expressão gênica de importantes mediadores pró-inflamatórias em miofibroblastos não cancerosos de cólon humano (CCD18Co). Foi

constatada capacidade dos componentes do açaí em atenuar a inflamação por modulação negativa de mRNA para membros da via do NF- κ B, como: TNF- α , COX-2, receptor *tool-like* 4 (TLR-4), TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor 6*), moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), assim como, do próprio NF- κ B. Esses resultados sugerem que os polifenóis do açaí possuem capacidade de minimização de processos inflamatórios intestinais pelo seu diversificado espectro de atuação. Semelhantemente, Noratto *et al.*⁽⁶⁷⁾ constataram inibição da ativação do NF- κ B, decréscimo da expressão e nível proteico de IL-6 e IL-8, bem como inibição da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares de humanos (HUVEC). Essas células foram tratadas com um extrato polifenólico de açaí e submetidas ao estresse oxidativo e inflamação induzidos por alta dose de glicose e LPS, respectivamente.

Em um estudo *in vivo*, Moura *et al.*⁽⁶⁸⁾ observaram que camundongos expostos a fumaça de cigarro e tratados por gavagem com um extrato de açaí durante cinco dias, apresentaram melhora do perfil antioxidante e inflamatório devido a menor expressão de TNF- α , menor migração de macrófagos e neutrófilos alveolares e menor teor de nitrito. Foi constatada também menor atividade das enzimas MPO, SOD, CAT e GPX e aumento da razão GSH/GSSG no tecido pulmonar. Machado *et al.*⁽⁶⁹⁾, obtiveram impedimento da elevação da concentração de IL-1 β , IL-18 e TNF- α no tecido cerebral de ratos com encefalopatia hepática induzida por tetracloreto de carbono. Esses animais foram previamente tratados via sonda orogástrica com polpa de açaí (7 μ l/g de peso corporal) durante quatorze dias.

Uma pesquisa recente⁽⁷⁰⁾ observou efeito antiangiogênico e anti-inflamatório em ratas com câncer mamário. Esses animais receberam tratamento prévio com 200mg/kg de um extrato do açaí por sonda orogástrica durante dezesseis semanas. Foi constatado aumento da sobrevida, menor número de células inflamatórias e de macrófagos ativados, redução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de seu receptor (VEGFR-2) e da COX-2, bem como, redução das concentrações de prostaglandina E2 (PGE 2), VEGF e IL-10 no grupo com câncer e tratado. Apesar dos mecanismos de atuação dos componentes do açaí serem pouco elucidados, esses achados sugerem que o uso do açaí como tratamento adjuvante à quimioterapia pode apresentar-se como uma opção no sentido de melhorar a adesão ao tratamento.

Referências

1. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8598-603.
2. Menezes EMdS, Torres AT, Sabaa Srur AU. Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea*, Mart.) nutritional value. *Acta Amaz*. 2008;38(2):311-6.
3. dos Santos GM, Ceará UFd, Arraes Maia G, Ceará UFd, Machado de Sousa PH, Ceará UFd, et al. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). *ALAN*. 2008;58(2):187-92.
4. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res*. 2010;695(1-2):22-8.
5. Lee JY, Kim N, Choi YJ, Nam RH, Lee S, Ham MH, et al. Anti-inflammatory and Anti-tumorigenic Effects of Açai Berry in *Helicobacter felis*-infected mice. *J Cancer Prev*. 212016. p. 48-54.
6. Peixoto H, Roxo M, Krstin S, Rohrig T, Richling E, Wink M. An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. *J Agric Food Chem*. 2016;64(6):1283-90.
7. Silva HRd, Assis DdCd, Prada AL, Keita H, Amado JRR, Carvalho JCT. *Euterpe oleracea* Mart. (acai): an old known plant with a new perspective. 2016.
8. Portinho JA, Zimmermann LM, Bruck MR. Efeitos Benéficos do Açai. *International Journal of Nutrology*. 2012.
9. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012;60(4):1084-93.
10. Ppmac. Medicinais - aromáticas - condimentares: Açai, açazeiro. 2015 [Available from: <http://www.ppmac.org/?q=content/a%C3%A7a%C3%AD-a%C3%A7azeiro>].
11. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8604-10.
12. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2004;52(6):1539-45.
13. Faller ALK, Fialho E. Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2009;43(2):211-8.
14. Brasil Fi. Os antioxidantes 2009 [Available from: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>].
15. Lichtenthaler R, Rodrigues RB, Maia JG, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. *Int J Food Sci Nutr*. 2005;56(1):53-64.

16. Schauss AG. Advances in the study of the health benefits and mechanisms of action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart., known as "Açaí". In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Fruits, Vegetables, and Herbs: Academic Press*; 2016. p. 179-220.
17. Albarici TR, Pessoa JDC, Forim MR. Efeito das Variações de pH e Temperatura Sobre as Antocianinas na Polpa de açaí - Estudos Espectrofotométricos e Cromatográficos. *Comunicado Técnico*. 2006.
18. Kang J, Thakali KM, Xie C, Kondo M, Tong Y, Ou B, et al. Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*. 2012;133(3):671-7.
19. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Cienc Rural*. 2006;36(4):1283-7.
20. Zielinski AA, Avila S, Ito V, Nogueira A, Wosiacki G, Haminiuk CW. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. *J Food Sci*. 2014;79(4):C510-6.
21. Ribeiro SMR, de Queiroz JH, Pelúzio MdCG, Costa NMB, da Matta SLP, de Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. 21. 2005.
22. Anazetti MC, Melo PS. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular 2007 [Available from: http://www.colegiogregormendel.com.br/gm_colegio/pdf/2012/textos/3ano/biologia/65.pdf.
23. Day BJ. Antioxidant therapeutics: Pandora's box. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:58-64.
24. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-75.
25. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.
26. Sousa CMdM, Silva HRe, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLSd, Araújo DS, et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quím Nova*. 2007;30(2):351-5.
27. Levenon AL, Hill BG, Kansanen E, Zhang J, Darley-Usmar VM. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. *Free Radic Biol Med*. 2014;71:196-207.
28. BEHLING EV, SENDÃO MC, FRANCESCATO HDC, ANTUNES LMG, BIANCHI MLP. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentação e Nutrição*. 2004.
29. Azqueta A, Collins A. Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients*. 2016;8(12).
30. Taverniti V, Fracassetti D, Del Bo C, Lanti C, Minuzzo M, Klimis-Zacas D, et al. Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. *J Agric Food Chem*. 2014;62(33):8346-51.
31. Farzaei MH, Rahimi R, Abdollahi M. The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(3):196-210.

32. Ferri C, Desideri G, Ferri L, Proietti I, Di Agostino S, Martella L, et al. Cocoa, blood pressure, and cardiovascular health. *J Agric Food Chem*. 2015;63(45):9901-9.
33. Giovinazzo G, Grieco F. Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70(4):454-62.
34. Guerra JFdC, Maciel PS, de Abreu ICME, Pereira RR, Silva M, Cardoso LdM, et al. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. 2015;14:192–202.
35. Wei XL, Fang RT, Yang YH, Bi XY, Ren GX, Luo AL, et al. Protective effects of extracts from Pomegranate peels and seeds on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:389.
36. Burton-Freeman BM, Sandhu AK, Edirisinghe I. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. *Adv Nutr*. 2016;7(1):44-65.
37. Fathy SM, Drees EA. Protective effects of Egyptian cloudy apple juice and apple peel extract on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and inflammatory status in diabetic rat pancreas. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:8.
38. Forbes-Hernandez TY, Gasparini M, Afrin S, Bompadre S, Mezzetti B, Quiles JL, et al. The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56 Suppl 1:S46-59.
39. Ford CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A, McArdle A, et al. Identification of (poly)phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. *Br J Nutr*. 2016;115(10):1699-710.
40. Lee N, Shin MS, Kang Y, Park K, Maeda T, Nishioka H, et al. Oligonol, a lychee fruit-derived low-molecular form of polyphenol mixture, suppresses inflammatory cytokine production from human monocytes. *Hum Immunol*. 2016;77(6):512-5.
41. Matias AA, Rosado-Ramos R, Nunes SL, Figueira I, Serra AT, Bronze MR, et al. Protective Effect of a (Poly)phenol-Rich Extract Derived from Sweet Cherries Culls against Oxidative Cell Damage. *Molecules*. 2016;21(4):406.
42. de Lacerda Neto LJ, Ramos AG, Santos Sales V, de Souza SD, Dos Santos AT, de Oliveira LR, et al. Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: Mechanisms involved in the gastroprotective activity. *Chem Biol Interact*. 2017;261:56-62.
43. Kingler M, Kumar S, Kumar V. Some Important Dietary Polyphenolic Compounds: An Anti-inflammatory and Immunoregulatory Perspective. *Mini Rev Med Chem*. 2017.
44. Archela E, Dall'Antonia LH. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. 2013;34(2):193-210.
45. Magrone T, Jirillo E. The interplay between the gut immune system and microbiota in health and disease: nutraceutical intervention for restoring intestinal homeostasis. *Curr Pharm Des*. 2013;19(7):1329-42.
46. Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Aloud BM, Raj P, et al. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct*. 2014;5(8):1785-94.

47. Lee YJ, Ahn Y, Kwon O, Lee MY, Lee CH, Lee S, et al. Dietary Wolfberry Extract Modifies Oxidative Stress by Controlling the Expression of Inflammatory mRNAs in Overweight and Hypercholesterolemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Agric Food Chem*. 2017;65(2):309-16.
48. Harzallah A, Hammami M, Kepczynska MA, Hislop DC, Arch JR, Cawthorne MA, et al. Comparison of potential preventive effects of pomegranate flower, peel and seed oil on insulin resistance and inflammation in high-fat and high-sucrose diet-induced obesity mice model. *Arch Physiol Biochem*. 2016;122(2):75-87.
49. Li R, Kim MH, Sandhu AK, Gao C, Gu L. Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*) or Wine Phytochemicals Reduce Intestinal Inflammation in Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *J Agric Food Chem*. 2017;65(4):769-76.
50. Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. 2010;118(2):208–14.
51. Spada PD, de Souza GG, Bortolini GV, Henriques JA, Salvador M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *J Med Food*. 2008;11(1):144-51.
52. Bonomo LdF. O extrato aquoso de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modula a resistência ao estresse oxidativo no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* através de mecanismos diretos e indiretos: Universidade Federal de Ouro Preto; 2014.
53. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CE, Amaral RV, Resende AC, Souza PJ, et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) in a rodent model of acute and neuropathic pain. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:208.
54. Silva DF, Vidal FC, Santos D, Costa MC, Morgado-Diaz JA, do Desterro Soares Brandao Nascimento M, et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:175.
55. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26(7-8):804-10.
56. Bonomo Lde F, Silva DN, Boasquivis PF, Paiva FA, Guerra JF, Martins TA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS One*. 2014;9(3):e89933.
57. Barbosa PO, Pala D, Silva CT, de Souza MO, do Amaral JF, Vieira RA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. *Nutrition*. 2016;32(6):674-80.
58. Pala D, Barbosa PO, Silva CT, de Souza MO, Freitas FR, Volp ACP, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. *Clin Nutr*. 2018;37(2):618-23.
59. Alqurashi RM, Galante LA, Rowland IR, Spencer JP, Commane DM. Consumption of a flavonoid-rich acai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *Am J Clin Nutr*. 2016;104(5):1227-35.
60. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100(9 Suppl):1995-2025.

61. Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis.* 2010;16(7):597-600.
62. Soares PM, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AM, Brito GA, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;63(1):91-8.
63. Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, et al. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):327-33.
64. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, et al. The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF-alpha and IL-6 production through inhibiting NF-kappaB activation and MAPK pathway. *J Nutr Biochem.* 2012;23(9):1184-91.
65. da Silva Santos V, Bisen-Hersh E, Yu Y, Cabral IS, Nardini V, Culbreth M, et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(7):390-404.
66. Dias MM, Martino HS, Noratto G, Roque-Andrade A, Stringheta PC, Talcott S, et al. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. *Food Funct.* 2015;6(10):3249-56.
67. Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *J Agric Food Chem.* 2011;59(14):7999-8012.
68. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine.* 2012;19(3-4):262-9.
69. Machado FS, Marinho JP, Abujamra AL, Dani C, Quincozes-Santos A, Funchal C. Carbon Tetrachloride Increases the Pro-inflammatory Cytokines Levels in Different Brain Areas of Wistar Rats: The Protective Effect of Acai Frozen Pulp. *Neurochem Res.* 2015;40(9):1976-83.
70. Alessandra-Perini J, Perini JA, Rodrigues-Baptista KC, de Moura RS, Junior AP, Dos Santos TA, et al. *Euterpe oleracea* extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):116.

1. Justificativa

Devido a considerável incidência de MI induzida por 5-FU, os sintomas provocados e a ausência de terapia específica e aprovada para essa alteração, são necessários estudos que busquem estratégias eficazes e viáveis para sua prevenção e/ou tratamento, uma vez que esse quimioterápico é um dos agentes mais utilizados na oncoterapia.

O desenvolvimento de pesquisas voltadas para a amenização da injúria intestinal nesse contexto tem sido crescente nos últimos anos. No entanto, não foram encontrados estudos que avaliaram a atuação do açaí e/ou seus componentes na mucosite induzida por quimioterapia. O açaí, uma fruta muito popular no Brasil e consumida pela população de diferentes regiões do país e do mundo, possui atrativa composição nutricional devido ao rico teor de polifenóis, fibra alimentar e ácidos graxos insaturados. Em virtude disso, diversas pesquisas demonstram sua importante capacidade antioxidante, assim como potencial capacidade anti-inflamatória. Também observamos efeito promissor da administração de açaí em trabalhos do nosso grupo, o que nos instigou em avaliar seu efeito na MI.

Considerando as propriedades do *Euterpe oleracea* Martius e que ao iniciarem tratamentos quimioterápicos há um pré-preparo do paciente oncológico, investigamos a hipótese de que a ingestão da polpa de açaí antes da administração de 5-FU, promove redução da injúria ao ID, melhora da reposta antioxidante e atenuação da inflamação. Dessa maneira, seria proporcionado maior resistência do paciente aos sintomas provocados pela oncoterapia, diminuindo as intervenções médicas de abrandamento ou até mesmo de interrupção do tratamento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de um pré-tratamento com polpa de açaí sobre a lesão da mucosa e o estado antioxidante e inflamatório em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.

2.2. Objetivos específicos:

Investigar, em camundongos pré-tratados com polpa de açaí e com mucosite intestinal, o seguinte:

- A ingestão alimentar, a evolução ponderal e a sobrevida;
- A manifestação da diarreia;
- A análise histopatológica e morfométrica no jejuno;
- A resposta antioxidante por meio da determinação da atividade das enzimas SOD e CAT, da concentração de gSH e de polifenóis totais no jejuno;
- A resposta inflamatória por meio da determinação da concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β) no jejuno e da concentração de sIgA e da atividade da enzima MPO no intestino delgado.

3. Metodologia

3.1. Protocolo experimental

3.1.1. Animais e dieta experimental

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c^(1, 2) com idade aproximada de seis semanas, pesando entre 17g e 20g, foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Durante todo o experimento até o momento da eutanásia, os animais foram mantidos na sala para isogênicos do CCA. O ambiente dispõe de temperatura controlada (20°C e 25°C) com ciclo claro-escuro de 12 horas. Após uma semana de aclimação foi fornecida uma dieta controle AIN-93M⁽³⁾ contendo ou não açaí a 2%⁽⁴⁾ (tabela 4.1). A polpa de açaí utilizada foi previamente pasteurizada em processo industrial, não contém conservantes e foi adquirida em um supermercado local na forma congelada. A água oferecida foi previamente autoclavada e, assim como as dietas, fornecida livremente. O estudo foi deferido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP), protocolo nº. 2016/17 (ver anexo).

Tabela 4.1: Composição das dietas experimentais AIN-93M padrão e contendo açaí.

Nutrientes	Dietas (g/kg)	
	Controle	Açaí
Caseína	150,00	150,00
Amido de milho	710,00	690,00
Óleo de soja	40,00	40,00
Colina	2,50	2,50
Metionina	1,80	1,80
Mix de minerais	35,00	35,00
Mix de vitaminas	10,00	10,00
Celulose	50,00	50,00
Açaí	0,00	20,00
Valor calórico	4007,20	4025,74

3.1.2. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas para camundongos contendo no máximo quatro indivíduos para cada um dos seguintes grupos: CTL (dieta controle + tampão salino); CTL+Açaí (dieta açaí + tampão salino); MUC (dieta controle + 5-FU); MUC+Açaí (dieta açaí + 5-FU). Após sete dias de aclimação recebendo uma dieta padrão para roedores adultos, foram inseridas as respectivas dietas por um período de quatorze dias consecutivos^(5, 6). No décimo quinto dia pela manhã foi realizada a indução da MI. Os grupos CTL e CTL+Açaí receberam injeção intraperitoneal (ip) de tampão fosfato-salino (PBS - *Phosphate-Buffered Saline*) estéril. Executou-se a eutanásia três (D3)⁽¹⁾ e sete (D7)⁽⁷⁾ dias após a indução da mucosite (Figura 4.1).

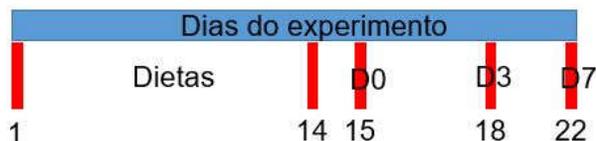
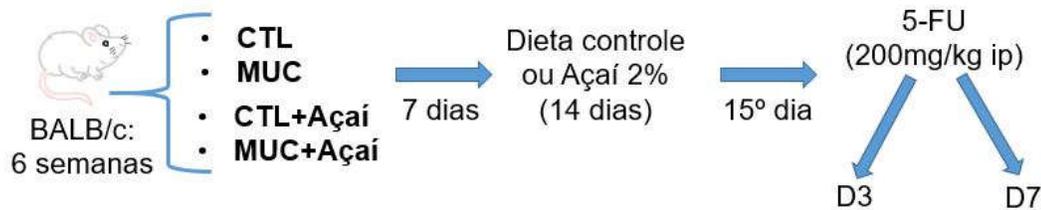


Figura 4.1: Desenho esquemático do delineamento experimental. Grupos: CTL (dieta controle + tampão salino); CTL+Açaí (dieta açaí + tampão salino); MUC (dieta controle + 5-FU); MUC+Açaí (dieta açaí + 5-FU); ip, intraperitoneal; D0, dia da indução da MI; D3, eutanásia 3 dias após a indução; D7, eutanásia 7 dias após a indução; n= 8 para os grupos controle e n= 12 para os grupos que receberam 5-FU.

3.1.3. Indução da mucosite intestinal

Na manhã do décimo quinto dia (D0) a partir da administração das dietas, foi injetada por via intraperitoneal uma dose única de 5-FU (Faldfluor®, Libbs) a 200mg/kg⁽⁷⁾ de cada animal dos grupos mucosite (MUC e MUC+Açaí). A droga foi veiculada em solução PBS estéril e injetada num volume total de 150µl no quadrante inferior esquerdo.

3.1.4. Eutanásia e coleta de material biológico

Ao findar dezoito (D3) e vinte e dois dias (D7) a partir da administração das dietas, os animais foram anestesiados com uma solução de 100µL a base de PBS, cloridrato de ketamina (25%) e cloridrato de xilazina (25%), seguida por deslocamento cervical. Em seguida, realizou-se a laparotomia para retirada do intestino delgado. Sobre uma placa de gelo, o jejuno foi dissecado tendo como parâmetro 20% da porção inicial (duodeno) a partir do piloro e 20% da porção final até a válvula ileocecal (íleo), como proposto por Ferraris e Vinnakota⁽⁸⁾. Os 60% restantes corresponderam às duas metades; jejuno proximal (JP) e jejuno distal (JD).

Em seguida o intestino delgado foi lavado internamente com 10ml (2,5ml para cada secção) de uma solução gelada e estéril de cloreto de sódio (0,9%). O fluido intestinal foi coletado em tubo cônico tipo Falcon de 15ml e logo centrifugado a 1.200rpm durante 20min⁽⁹⁾. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Paralelamente, uma parte do jejuno proximal e do jejuno distal, foi seccionada e acondicionada em criotubos de 2ml, imediatamente imersa em nitrogênio líquido e armazenada a temperatura de -80°C. O tecido jejunal restante foi acomodado em cassete histológico e embebido em solução de formalina a 10% (pH 7,4) para posterior análise histológica.

3.2. Variáveis avaliadas

3.2.1. Ingestão alimentar, peso corporal e registro da sobrevida

O conteúdo alimentar de cada gaiola e o peso dos animais foram documentados diariamente no período da manhã, a partir do dia da administração das dietas experimentais até a eutanásia (D3 e D7). O consumo alimentar diário foi obtido pela quantidade de dieta fornecida em cada dia, subtraindo pela sobra do dia subsequente e, por fim, dividindo pelo número de animais de cada agrupamento. O registro de sobrevida também foi realizado diariamente observando sinais de debilidade (pelo arrepiado, prostração e isolamento) de cada animal.

3.2.2. Avaliação da diarreia

A ausência ou presença de diarreia foi documentada diariamente a partir do D0 até o dia da eutanásia (D3 e D7). Foi utilizado o seguinte escore (adaptado) proposto por Kurita *et al.*⁽¹⁰⁾, para classificar a severidade das excreções fecais causada por quimioterápico: 0= ausência de diarreia, 1= diarreia leve (conteúdo fecal levemente úmido e macio), 2= diarreia moderada (conteúdo fecal úmido e amorfo, com moderada quantidade de excremento na região perianal), 3=diarreia grave (conteúdo fecal aquoso, com presença de sangue e grande quantidade de excremento na região perianal)⁽¹¹⁾.

3.3. Histologia

3.3.1. Preparo do tecido para análise histopatológica e morfométrica

Amostras do jejuno proximal e distal previamente fixadas em solução de formalina, foram enxaguadas em água corrente durante 5 minutos. O processamento consistiu em imersão dos cassetes em soluções contendo álcool em concentração crescente (70%, 80%, 90%, 100%-I e 100%-II) por 30 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em dois banhos de xilol absoluto durante 15 minutos cada e em seguida banhadas por 30 minutos em paraplast derretido. O próximo passo, resumiu-se na inclusão dos cassetes em formas de aço inoxidável cobertas com paraplast.

Para permitir maior aderência dos referidos cortes às lâminas de vidro no processo da microtomia, as lâminas foram previamente gelatinizadas em gelatina comercial (incolor e sem sabor) na proporção de 5g para 1l de água destilada. Os cortes de 4µm de espessura foram montados cuidadosamente em banho maria sob temperatura controlada de aproximadamente 45°C.

Para permitir a saída do paraplast, as lâminas foram banhadas por duas vezes em xilol absoluto durante 15 minutos cada. A hidratação consistiu em imersão dos cortes em soluções contendo álcool em concentração decrescente (100% por 5 minutos e 90%, 80% e 70% por 3 minutos cada). Após imersão em água destilada durante 5 minutos, os cortes

foram corados por hematoxilina de Harris durante 7 minutos e por eosina durante 1 minuto. Realizou-se, entre os corantes, uma lavagem com água destilada por 5 minutos. Foi usado um diferenciador (álcool acidulado) após a hematoxilina para favorecer o processo de coloração: 5 gotas de HCl P.A. para 100ml de álcool absoluto.

Por fim, as lâminas foram desidratadas nas mesmas concentrações crescentes de álcool (10 segundos para cada álcool) e diafanizadas em dois banhos de xilol absoluto por 10 minutos cada. O processo de montagem consistiu na utilização de Entellan® para aderência das lamínulas de vidro sobre os cortes histológicos.

3.3.2. Análise histopatológica

Cortes histológicos de jejuno proximal e distal, foram analisados em exame duplo cego por uma patologista e uma aluna treinada. O escore histopatológico utilizado foi elaborado baseando-se no proposto por Soares *et al.*⁽¹²⁾. Para esta análise utilizou-se um microscópio digital Olympus® trinocular (CX31RTSF) na objetiva de 40x, percorrendo e avaliando todo o corte. Para captura das imagens esse aparelho foi conectado a uma câmera digital AmScope® (MU300), acoplada ao programa ToupView (x64, versão 3.7). Utilizou-se a régua de 50µm para representar as imagens no aumento utilizado. A tabela 4.2 apresenta o escore adotado:

Tabela 4.2: Classificação histopatológica.

Escores	Achados microscópicos
0	Aspectos histológicos normais.
1	Mucosa e submucosa: vilosidades e criptas preservadas, maior infiltrado de células inflamatórias, raros focos de vacuolização e edema focal. Muscular: raros focos de vacuolização.
2	Mucosa e submucosa: alteração da arquitetura das vilosidades, criptas majoritariamente preservadas, maior infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema focais. Muscular: vacuolização focal.
3	Mucosa e submucosa: alteração da arquitetura das vilosidades e presença de vacuolização, alteração na arquitetura das criptas, necrose das criptas, maior infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: vacuolização e edema.

3.3.3. Análise morfométrica

Cortes histológicos de jejuno proximal e distal, foram analisados utilizando um microscópio digital Olympus® trinocular (CX31RTSF) na objetiva de 10x. A captura das imagens foi realizada como descrito anteriormente. Utilizou-se o programa ImageJ (1.8.0) calibrado na régua de 100µm para obtenção da altura de 20 vilosidades (ápice da vilosidade até sua base) e da profundidade das 20 criptas (profundidade da invaginação entre as vilosidades) adjacentes. A razão vilos/cripta, outro parâmetro que permite avaliar o grau de injúria intestinal, foi calculada a partir da altura da vilosidade dividida pela profundidade da cripta adjacente⁽¹²⁾.

3.4. Dosagens bioquímicas e imunoenzimáticas

3.4.1. Resposta antioxidante

- Preparo das amostras de jejuno para avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT

Primeiramente, amostras de jejuno distal (D3 e D7) foram trituradas (100mg/ml) com auxílio de um homogeneizador elétrico, em tampão fosfato de sódio (pH 7,2), contendo: fosfato de sódio monobásico hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 0,03M e fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,07M. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado.

- Avaliação da atividade da enzima SOD no jejuno

A atividade da enzima SOD foi determinada baseando-se no método proposto por Madesh e Balasubramanian⁽¹³⁾. Em resumo, as reações consistem na capacidade da enzima em neutralizar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produzido pela oxidação do pirogalol em meio alcalino. O corante MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio brometo] é reduzido a cristais de formazan em reação dependente de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzindo um composto de cor arroxeadada. Por meio da quantificação em unidades relativas, têm-se que, a capacidade de uma unidade de atividade enzimática (1U) da SOD em inibir a redução do MTT, é igual a 50%⁽¹⁴⁾.

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 30 µl das amostras (sem diluir) e do tampão fosfato de sódio (descrito anteriormente) nos poços das amostras, branco e padrão. A seguir acrescentou-se em todos os poços 6µl de MTT (1,20mM diluído no tampão), seguido de 15µl de pirogalol (14,9mM diluído no tampão), em todos os poços, exceto no branco. O volume do tampão foi calculado para obtenção de um volume final de 150µl por poço. Após esses procedimentos, a placa foi incubada em estufa com temperatura de 37°C

durante 5 minutos. Logo em seguida, foi adicionado 150µl de dimetil sulfóxido (DMSO) P.A. em todos os poços para promover parada das reações e solubilização dos cristais formados. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 570nm. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteínas totais.

- Avaliação da atividade da enzima CAT no jejuno

A atividade da enzima CAT foi determinada baseando-se no método proposto por Aebi⁽¹⁵⁾. Em resumo, a capacidade antioxidante da enzima é avaliada de maneira cinética em espectrofotometria com comprimento de onda a 240nm⁽¹⁶⁾. Os decaimentos permitem obter a variação das absorbâncias, por meio da atividade enzimática em converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) adicionado em H₂O e O₂.

Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de H₂O₂ a 5,7M em tampão fosfato de sódio (descrito anteriormente). Em seguida, preparou-se no momento da dosagem, uma solução de trabalho contendo 50µl da solução estoque e 9.950µl do tampão. Foi utilizado uma cubeta de quartzo (de 1ml) para zerar o aparelho com tampão fosfato. Para leitura das amostras, foi adicionado na cubeta, 990µl de uma mistura contendo 10µl do homogenato (sem diluir) e solução de trabalho. O cronômetro foi disparado no início da leitura e os valores das absorbâncias foram registrados a cada 30 segundos durante 2 minutos. O delta foi obtido pela média da subtração do valor de absorbância inicial pelo final. Os resultados foram expressos em U de CAT por mg de proteínas totais. Segue:

$$\text{Catalase (U/mg de proteínas)} = \frac{\Delta A}{\text{mg de proteínas totais}} * \epsilon$$

Onde:

ΔA: variação da absorbância;

ε: Coeficiente de extinção molar = (0,071mM⁻¹ x cm⁻¹ / 1U).

- Preparo das amostras para determinação de gSH e polifenóis totais

Primeiramente, amostras de jejuno distal foram trituradas (100mg/ml) com auxílio de um homogeneizador elétrico, em tampão EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, C₁₀H₁₆N₂O₈) a 0,02M⁽¹⁷⁾. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado.

- Determinação de gSH no jejuno

A concentração dos grupos sulfidrilas totais foi determinada baseando-se no método proposto por Sedlak e Lindsay⁽¹⁸⁾, comumente utilizado para este fim⁽¹⁹⁾. Em resumo, os grupos tióis ou sulfidrilas (-SH) reagem com o ácido 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico); DTNB ou reagente de Ellman, o qual, em pH alcalino é reduzido para ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico (TNB), produzindo um composto de cor amarelada^(19, 20). Este método foi

empregado partindo do pressuposto de que parte dos grupos sulfidrilas são provenientes da GSH⁽²¹⁾.

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 40µl das amostras (sem diluir), do branco (água destilada) e dos padrões (L-cisteína diluída em trietanolamina - TEA a 0,02M para as concentrações de 0,00 a 1000µM/l). Em seguida foi utilizada uma solução de Tris-HCL (pH 8,2), contendo Tris-base (0,2M) e EDTA (0,02M). Acrescentou-se em todos os poços, 150µl desta solução, seguido de 50µl de DTNB (0,002M diluído em metanol). Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 412nm. Os resultados foram expressos por mg de proteínas totais.

- **Determinação de polifenóis totais no jejuno**

A concentração dos polifenóis totais foi determinada baseando-se no método proposto por Singleton e Rossi⁽²²⁾. Em resumo, o reagente Folin-Ciocalteu composto por tungstato de sódio e molibdato de sódio, dentre outras substâncias, interage com os grupos fenólicos (fenolato), de maneira que os íons tungstato e molibdato sejam reduzidos produzindo um composto de cor azulada. O pH alcalino promove decomposição das moléculas oxidadas⁽²³⁾.

Como descrito anteriormente, as amostras utilizadas nessa dosagem, foram obtidas a partir do homogenato de jejuno em EDTA a 0,02M⁽²⁴⁾. Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 20µl das amostras (diluídas 2x em água destilada), do branco (água destilada) e dos padrões (ácido gálico para as concentrações de 5 a 100mg/l). Por conseguinte, foi acrescentado em cada poço 100µl de uma solução de Folin-Ciocalteu na proporção de 1:10 (v/v), seguido de incubação por 3 minutos na ausência de luz. Por fim, adicionou-se 80µl de uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 0,7M e incubou-se durante 60 minutos na ausência de luz. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 760nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de tecido.

3.4.2. Resposta inflamatória

- **Determinação da concentração de TNF-α e IL-1β no jejuno**

Primeiramente, foi preparado uma solução tampão em 25ml de PBS estéril (pH 7,2), contendo: NaCl (0,4M), EDTA (0,9mM), albumina bovina sérica (BSA - 75,7mM), Tween® 20 (0,4mM) e penicilina G (10.000U/ml) na proporção de 1:100 (v/v). No momento do preparo do homogenato, foi adicionado as seguintes antiproteases nas respectivas concentrações finais: fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF - P7626, Sigma®) a 195nM, leupeptina a 25µM (L2884, Sigma®), Pepstatina A a 1µM (P4265, Sigma®) e 2µl de aprotinina A (A1250000, Sigma®)^(2, 25). Por fim, completou-se o volume com PBS para 50ml em um balão volumétrico. Amostras de jejuno proximal (D3 e D7) foram trituradas (100mg/ml) com auxílio

de um homogeneizador elétrico e em seguida, centrifugadas a 10.000rpm por 10min a 4°C e o sobrenadante coletado. A dosagem dos referidos mediadores pró-inflamatórios foi realizada por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) utilizando os kits R&D Systems® para IL-1 β (DY401) e PeproTech® para TNF- α (900-K54). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos pelo logaritmo₁₀ da concentração do mediador em pg/ml.

- Determinação da concentração de sIgA no fluido intestinal

A dosagem da sIgA foi realizada segundo MARTINS^(2, 26) com procedimentos comuns ao ELISA. Primeiramente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de camundongos anti-IgA (M-8769, Sigma®) na proporção de 1:10.000. As placas foram incubadas em câmara úmida na temperatura de 4°C, “*overnight*”. Para o bloqueio, foi adicionado 200 μ l por poço de PBS-caseína e incubou-se por 1h em temperatura ambiente (RT). Após este passo, foi adicionado nos primeiros 12 poços 20 μ l das amostras e do padrão (1 μ g/ml de anticorpo purificado, 0106-01 - SouthernBiotech®). Completou-se o volume desses poços para 200 μ l com PBS-caseína (branco: 200 μ l do tampão). Os demais poços continham 100 μ l de PBS-caseína para posterior diluição seriada, de maneira que houve sobra deste mesmo volume para descarte final. Incubou-se por 1h, RT. Para a detecção da imunoglobulina A, foi adicionado anticorpo de camundongo conjugado a peroxidase anti-IgA (A-4789, Sigma®) na proporção de 1:10.000, e em seguida incubou-se por 1h a 37°C. Os próximos passos, consistiram na adição do complexo streptavidina-peroxidase e na revelação com OPD (ortofenilenodiamina) e H₂O₂. As reações foram paradas utilizando ácido sulfúrico 2N. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 492nm. Os resultados foram expressos em μ g por ml de fluido intestinal.

- Avaliação da atividade da enzima MPO no fluido intestinal

A atividade da enzima MPO foi determinada baseando-se no método proposto por Bradley *et al.*⁽²⁷⁾. A técnica se resume em inferir a quantidade de neutrófilos residentes e recrutados no processo inflamatório, uma vez que, essas células secretam em seus grânulos azurófilos (primários), aproximadamente três vezes mais MPO em relação às células mononucleares. O reagente TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) e o H₂O₂ exercem a função de substrato e de cofator enzimático, respectivamente⁽²⁸⁾.

Primeiramente, foi preparado duas soluções, solução 1 (pH 5,5): tampão fosfato de sódio contendo fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ - 80mM) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄*7H₂O - 80mM para pH 5,5). Solução 2: acetato de sódio (C₂H₃NaO₂ - 1,6M com ácido acético glacial para pH 3,0). Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 75 μ l das amostras e do branco (solução 1). Em seguida acrescentou-se 5 μ l

de TMB (7,9mM diluído em DMSO) em todos os poços. Após este passo, a placa foi incubada em estufa com temperatura de 37°C durante 5 minutos. Foi preparada uma solução de trabalho com H₂O₂ comercial, contendo 500µl de H₂O₂ (45,6mM) para cada 4,5ml da solução 1. Por conseguinte, foi adicionado 50µl desta solução de trabalho em todos os poços, incubando novamente na mesma temperatura (37°C) durante 10 minutos. Por fim, foi acrescentado 125µl por poço da solução 2 para promover parada da reação. A curva padrão foi elaborada com número conhecido de neutrófilos suspensos na solução 1. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 630nm. Os resultados foram expressos em MPOx10⁴ por mg de proteínas totais.

3.4.3. Determinação de proteína totais no jejuno e fluido intestinal

O conteúdo de proteínas totais foi determinado baseando-se no método proposto por Lowry *et al.*⁽²⁹⁾, comumente utilizado para determinação de proteínas. Em resumo, o reagente Folin-Ciocalteu é reduzido pelas proteínas na presença do íon cobre II (que age como um catalisador), produzindo um composto de cor azulada⁽³⁰⁾. Inicialmente foi preparado as seguintes soluções: solução A= sulfato de cobre (CuSO₄) a 0,01M e citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇) a 0,02M. Solução B: carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 0,19M e hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M. Solução C: solução A e solução B na proporção de 1:50 (v/v). Solução D: reagente Folin-Ciocalteu na proporção de 1:1 (v/v). Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 200µl da solução C em todos os poços, por conseguinte foi acrescentado 20µl das amostras, do branco (água destilada) e dos padrões (albumina bovina para as concentrações de 0,05 a 1,50mg/ml) e logo incubou-se por 15 minutos na ausência de luz. Por fim, foi acrescentado 20µl da solução D, incubando por 30 minutos na ausência de luz. Os valores das absorbâncias foram lidos em espectrofotômetro de microplacas UV-Vis a 660nm. Esta dosagem foi realizada em todas as análises deste trabalho que foram expressas por mg de proteínas totais.

3.5. Análise estatística

Os resultados que apresentaram distribuição paramétrica segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov, foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP), submetidos a comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA ou two-way ANOVA, acompanhados pelo pós-teste de Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição paramétrica segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov, foram representados pela mediana e valores mínimos e máximos, submetidos a comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, acompanhados pelo pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism* versão 6.01. A significância estatística foi considerada quando p<0,05.

Referências

1. Generoso Sde V, Rodrigues NM, Trindade LM, Paiva NC, Cardoso VN, Carneiro CM, et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis.* 2015;14:54.
2. Barros PA, Generoso SV, Andrade ME, da Gama MA, Lopes FC, de Sales ESEL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer.* 2017;69(1):168-75.
3. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
4. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2010;26(7-8):804-10.
5. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res.* 2010;695(1-2):22-8.
6. Machado FS, Marinho JP, Abujamra AL, Dani C, Quincozes-Santos A, Funchal C. Carbon Tetrachloride Increases the Pro-inflammatory Cytokines Levels in Different Brain Areas of Wistar Rats: The Protective Effect of Acai Frozen Pulp. *Neurochem Res.* 2015;40(9):1976-83.
7. Song MK, Park MY, Sung MK. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *J Cancer Prev.* 2013;18(4):322-9.
8. Ferraris RP, Vinnakota RR. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. *J Nutr.* 1995;125(8):2172-82.
9. Souza AL, Fiorini Aguiar SL, Gonçalves Miranda MC, Lemos L, Freitas Guimaraes MA, Reis DS, et al. Consumption of Diet Containing Free Amino Acids Exacerbates Colitis in Mice. *Front Immunol.* 2017;8.
10. Kurita A, Kado S, Kaneda N, Onoue M, Hashimoto S, Yokokura T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(3):211-20.
11. Melo ML, Brito GA, Soares RC, Carvalho SB, Silva JV, Soares PM, et al. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61(5):775-84.
12. Soares PM, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AM, Brito GA, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;63(1):91-8.
13. Madesh M, Balasubramanian KA. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian J Biochem Biophys.* 1998;35(3):184-8.
14. Araújo J, Cunha O. Efeitos da ingestão subcrônica de arsênio sobre os testículos de camundongos adultos. In: UFV, editor. 2011.

15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
16. de Campos L. Estudo clínico, bioquímico e histológico comparativo do efeito das fototerapia LED, laser de baixa e alta potencia na mucosite oral e do efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares em *hamsters* tratados com 5-Fluorouracil. In: FOUSP, editor. 2013.
17. Leitão RFdC. Estudo do papel do óxido nítrico nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato e efeito da glutamina e alanil-glutamina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil. In: UFC, editor. 2007.
18. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205.
19. Dias CRdBR. Estudo comparativo da marcação do anticorpo anti-CD20 com ¹⁸⁸Re. In: IAEA, editor. 2010.
20. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBdF, Manfredini V, et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quím Nova.* 2007;30(5):1323-38.
21. de Menezes A-APM. Biomonitoramento toxicogenético em sangue periférico de pacientes com gastrite em terapia com omeprazol. In: UFPI, editor. 2018.
22. Singleton VL, Rossi JR JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144-58.
23. Archela E, Dall'Antonia LH. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas.* 2013;34(2):193-210.
24. Liu AB, Tao S, Lee MJ, Hu Q, Meng X, Lin Y, et al. Effects of gut microbiota and time of treatment on tissue levels of green tea polyphenols in mice. *Biofactors.* 2018.
25. Martins FS, Elian SD, Vieira AT, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, et al. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(4):359-64.
26. Martins FS, Silva AA, Vieira AT, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch Microbiol.* 2009;191(8):623-30.
27. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78(3):206-9.
28. Ferreira MAND. Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO). In: UFMG, editor. 2006.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
30. Zaia DAM, L, Zaia CTBV, L, Lichtig J,. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova.* 1998;21(6):787-93.

1. Análise da ingestão alimentar, da evolução ponderal e da sobrevivência

Buscamos avaliar se a indução da MI e a adição de polpa de açaí à dieta afetaram a ingestão alimentar e a evolução ponderal dos animais no D3 e no D7. A Figura 5.1 ilustra o comportamento alimentar diário. A Figura 5.1A mostra que os grupos que receberam a polpa de açaí mantiveram maior ingestão alimentar do décimo quarto dia ao final do experimento e que a exposição ao 5-FU não provocou diminuição da ingestão em comparação com o grupo CTL. É possível notar uma queda importante da ingestão alimentar a partir do décimo sétimo dia no grupo MUC (vs CTL e vs CTL+Açaí). Isso ocorreu no grupo MUC+Açaí a partir do dia vinte, se assemelhando aos demais grupos no vigésimo primeiro dia (Figura 5.1B). Curiosamente, após a indução da MI a ingestão dos grupos MUC+Açaí (vs CTL+Açaí) aumentou nos dois períodos avaliados (Figura 5.1A e 5.1B).

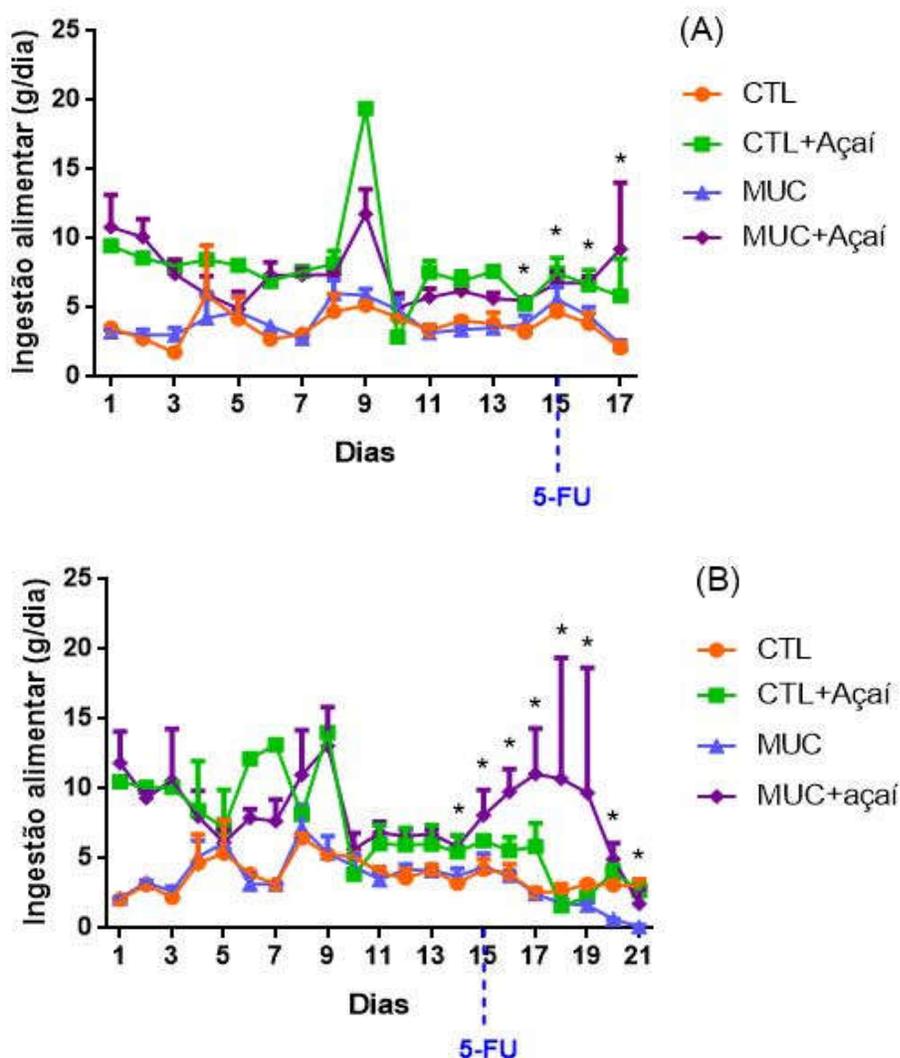


Figura 5.1: Ingestão alimentar diária (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando two-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. *(A): CTL+Açaí diferente de MUC do dia 15 ao 17; CTL+Açaí e MUC+Açaí diferentes de CTL do dia 14 ao 17; MUC+Açaí diferente de MUC do dia 14 ao 17; MUC+Açaí diferente de

CTL+Açaí no dia 17; *p<0,05 para todas as comparações. **(B)**: MUC+Açaí diferente de CTL do dia 14 ao 19; MUC+Açaí diferente de CTL+Açaí do dia 16 ao 19; CTL+Açaí diferente de CTL no dia 17; CTL+Açaí diferente de MUC nos dias 17 e 20; CTL e CTL+Açaí diferentes de MUC no dia 21; *p<0,05 para todas as comparações; n= 8 para todos os grupos.

Avaliando o comportamento alimentar de todos os grupos até o D3 e até o D7, observamos equivalência nesses dois períodos da eutanásia (Figura 5.2 e tabela 5.1). Entre os grupos que não receberam polpa de açaí (CTL vs MUC), não houve alteração na ingestão alimentar. No entanto, os grupos MUC apresentaram redução da ingestão comparados com os grupos CTL+Açaí. Observa-se que houve aumento da ingestão alimentar dos grupos que receberam o pré-tratamento (CTL+Açaí e MUC+Açaí) em relação aos grupos CTL, não havendo alteração deste parâmetro entre os grupos CTL+Açaí e MUC+Açaí. Percebe-se também que a adição de polpa de açaí à dieta provocou aumento da ingestão entre os grupos que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí).

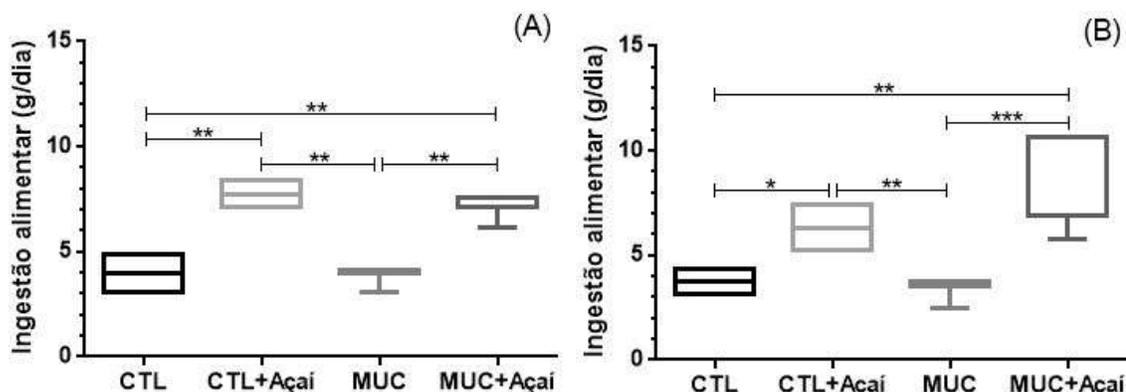


Figura 5.2: Avaliação da ingestão alimentar diária (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela mediana e variação (min-max). Comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis foram acompanhadas pelo pós-teste de Dunn. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,005; n= 8 para todos os grupos.

Tabela 5.1: Ingestão alimentar a partir da administração das dietas dos grupos experimentais avaliados.

Grupos	Ingestão alimentar (g/dia)	
	D3	D7
CTL	3,97 (3,08-4,86)	3,77 (3,18-4,36)
CTL+Açaí	7,75 (7,09-8,42) (†)	6,34 (5,25-7,42) (††)
MUC	4,07 (3,07-4,13) (‡)	3,5 (2,5-3,78) (‡)
MUC+Açaí	7,16 (6,18-7,55) (§)()	6,88 (5,76-10,66) (§)()

Os resultados são representados pela mediana e variação (min-max). Comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis foram acompanhadas pelo pós-teste de Dunn. † e ††, diferentes de CTL, p<0,01 e p<0,05, respectivamente; ‡, diferentes de CTL+Açaí, p<0,01; § diferentes de CTL, p<0,01; || e ||| diferentes de MUC, p<0,01 e p<0,005, respectivamente; n= 8 para todos os grupos.

Em relação ao acompanhamento ponderal diário, a Figura 5.3 mostra que os grupos MUC que foram eutanasiados no vigésimo segundo dia da experimentação (D7), apresentaram perda de peso importante em reação aos grupos controle (CTL e CTL+Açaí) nos dias 21 e 22. No entanto, a análise da variação ponderal entre o primeiro e último dia do D3 e do D7, permite observar que o comportamento dos grupos foi similar, apesar da perda de peso ser mais acentuada nesse último período (Figura 5.4).

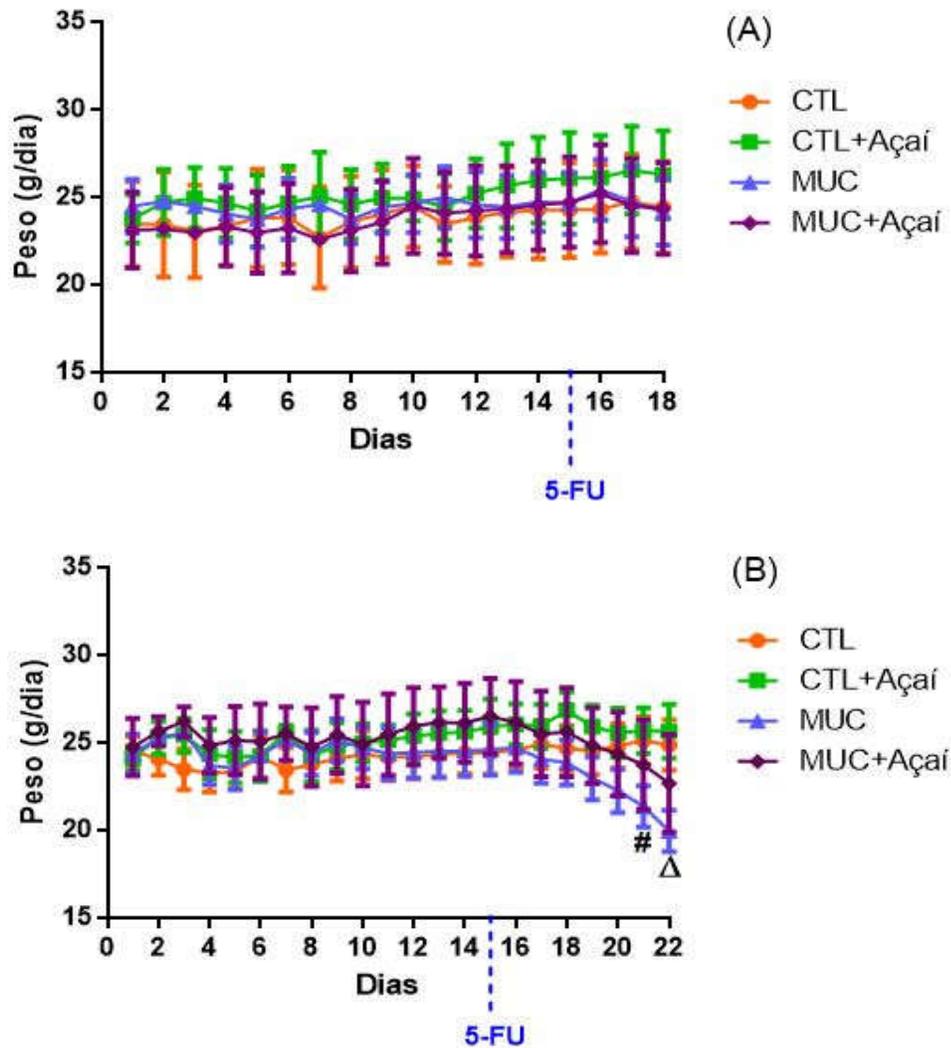


Figura 5.3: Evolução ponderal (g/dia) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando two-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. #, MUC diferente de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,01$ e $p < 0,005$, respectivamente; Δ , MUC diferente de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,001$; $n = 8$ para todos os grupos.

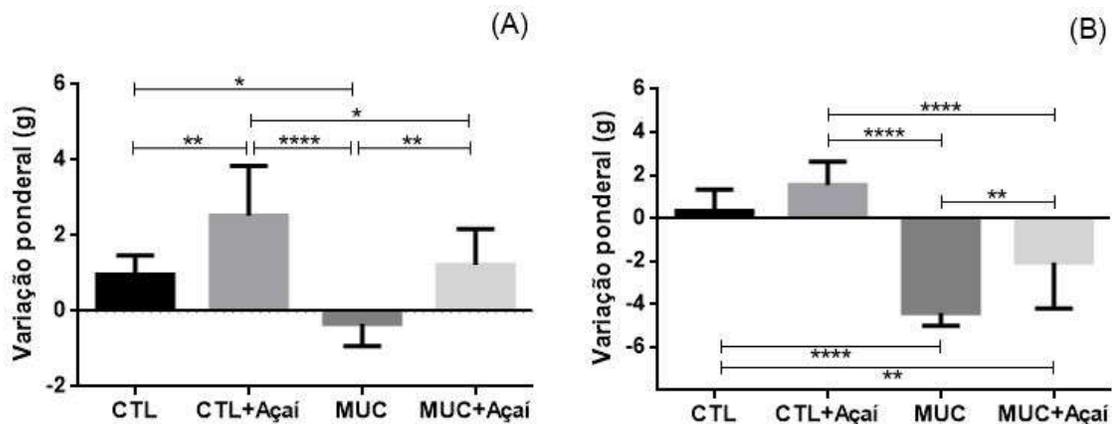


Figura 5.4: Variação ponderal (g) no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$; $n = 8$ para todos os grupos.

Pode-se observar (Figura 5.4) que os grupos que receberam 5-FU sem adição de polpa de açaí à dieta (MUC), apresentaram perda de peso comparado com os grupos controle (CTL e CTL+Açaí). Os resultados também demonstram que apesar da ingestão de açaí não impedir a perda de peso provocada pela MI (CTL+Açaí vs MUC+Açaí), houve resistência a essa perda entre os grupos MUC e MUC+Açaí. Observa-se também, que apenas no D3 houve ganho ponderal entre os grupos controle e que somente no D7 houve perda de peso entre o grupo CTL e o grupo MUC+Açaí. Não houve alteração na ingestão alimentar e peso para todos os grupos avaliados no D3 e no D7 quando comparados entre si. Quanto a sobrevivência dos animais, foi observado óbito de 25% no grupo MUC+Açaí no último dia da experimentação (dia 22 - D7).

2. Avaliação da diarreia

A diarreia se manifestou nos grupos expostos ao 5-FU a partir do quinto dia (D5) após a administração do quimioterápico. Mediante a análise por escores é possível observar agravamento desse parâmetro até o D7. Não houve alteração proveniente das dietas entres os grupos analisados (tabela 5.2).

Tabela 5.2: Presença e gravidade de diarreia em diferentes dias nos grupos experimentais.

Dias	CTL	CTL+Açaí	MUC	MUC+Açaí
D5	0 (0)	0 (0)	0 (0-2)	0 (0-2)
D6	0 (0)	0 (0)	2,5 (2-3) (†)	3 (0-3) (†)
D7	0 (0)	0 (0)	3 (2-3) (§)	3 (2-3) ()

Escore: 0= ausência de diarreia, 1= diarreia leve (conteúdo fecal levemente úmido e macio), 2= diarreia moderada (conteúdo fecal úmido e amorfo, com moderada quantidade de excremento na região perianal), 3=diarreia grave (conteúdo fecal aquoso, com presença de sangue e grande quantidade de excremento na região perianal). Os resultados são representados pela mediana e variação (min-max). Comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis foram acompanhadas pelo pós-teste de Dunn. †, diferentes de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,01$; § e || diferentes de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,005$ e $p < 0,01$, respectivamente; $n = 8$ para todos os grupos.

3. Histologia

3.1. Análise histopatológica

As tabelas a seguir (5.3 e 5.4) mostram a análise histológica do jejuno por meio de escores nos dois períodos a partir da administração do 5-FU. Pode-se perceber que em todo o jejuno, o dano intestinal apresentou caráter homogêneo três e sete dias após a exposição ao quimioterápico. Nota-se também, que a injúria tecidual foi maior no D3 e que os componentes da polpa de açaí proporcionaram importante resistência ao dano nos grupos MUC+Açaí sete dias após a indução da MI (Tabelas 5.3 e 5.4 e Figura 5.5). Em todos os grupos que receberam 5-FU o infiltrado inflamatório não apresentou caráter intenso mantendo um perfil similar até o D7. Nos grupos MUC+Açaí-D3, houve maior presença de células polimorfonucleares na mucosa e submucosa. A manifestação de vacuolização nas vilosidades e necrose nas criptas foi significativa apenas no jejuno proximal para o grupo MUC-D3, pois 80% dos animais apresentaram essas alterações ($p < 0,05$ vs CTL e vs CTL+Açaí - Figura 5.6).

Tabela 5.3: Escores histopatológicos do jejuno proximal (JP) e do jejuno distal (JD) dos grupos experimentais avaliados três dias após a indução da mucosite.

Grupos	Segmento	
	JP	JD
CTL	0 (0)	0 (0)
CTL+Açaí	0 (0)	0 (0)
MUC	3 (3-3) (†)	3 (3-3) (†)
MUC+Açaí	3 (2-3) (‡)	3 (2-3) (‡)

Os resultados são representados pela mediana e variação (min-max). Comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis foram acompanhadas pelo pós-teste de Dunn. †, diferentes de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,01$; ‡ diferentes de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,05$; $n = 5$ para todos os grupos.

Tabela 5.4: Escores histopatológicos do jejuno proximal (JP) e do jejuno distal (JD) dos grupos experimentais avaliados sete dias após a indução da mucosite.

Grupos	Segmento	
	JP	JD
CTL	0 (0)	0 (0)
CTL+Açaí	0 (0)	0 (0)
MUC	2 (2-3) (†)	2 (2-3) (†)
MUC+Açaí	1 (1-1)	1 (1-1)

Os resultados são representados pela mediana e variação (min-max). Comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis foram acompanhadas pelo pós-teste de Dunn. † diferentes de CTL e CTL+Açaí, $p < 0,01$; $n = 5$ para todos os grupos.

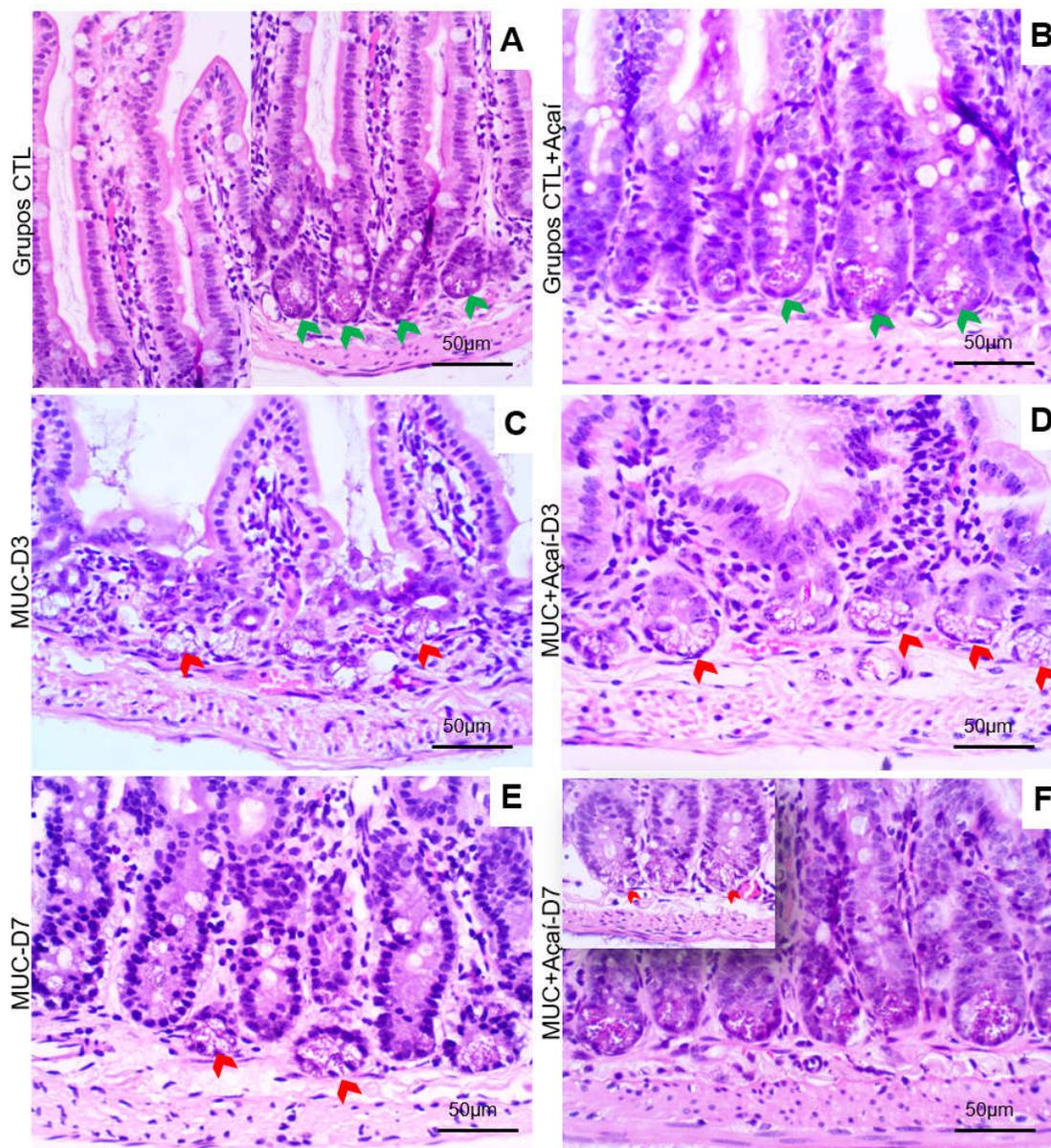


Figura 5.5: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno dos grupos CTL no D3 e D7 (A), CTL+Açaí no D3 e D7 (B), MUC no D3 (C), MUC+Açaí no D3 (D), MUC no D7 (E) e MUC+Açaí no D7 (F). Aspecto histológico do tecido normal (A e B); alteração da arquitetura das vilosidades e criptas, maior infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema (C e D); maior parte das criptas preservadas e aparentemente mais profundas, maior infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema focais (E); criptas preservadas e aparentemente mais profundas, maior infiltrado de células inflamatórias, raros focos de vacuolização e edema focal (F). As pontas de seta da cor verde indicam células de Paneth normais e da cor vermelha indicam presença de vacuolização/ degeneração hidrópica nessas células. Escala de 50µm.

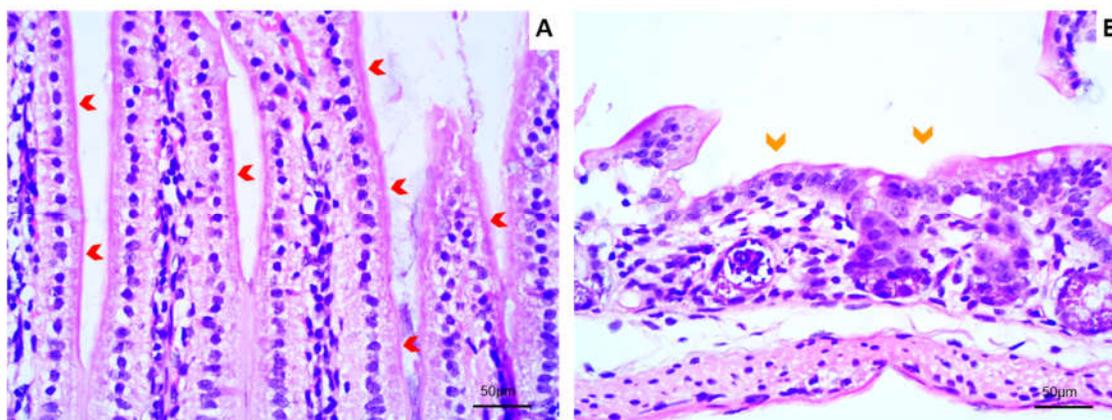


Figura 5.6: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno proximal dos grupos MUC no D3. Degeneração hidrópica ou vacuolar ao longo das vilosidades (A), atrofia das vilosidades e erosão/necrose das criptas (B). As pontas de seta da cor vermelha indicam vacúolos de degeneração hidrópica distribuídos ao longo das vilosidades. As pontas de seta da cor laranja indicam áreas de necrose das criptas. Escala de 50µm.

3.2. Análise morfométrica

A morfometria nos permite observar que, em todo o jejuno, as vilosidades sofreram encurtamento três dias após a administração do 5-FU apenas nos grupos MUC. No D7 a mucosite também afetou a altura das vilosidades, contudo a ingestão de polpa de açaí promoveu recuperação desta medida no jejuno proximal. No JD não houve alteração desse parâmetro (Figura 5.7).

Nota-se também que a profundidade das criptas foi maior apenas sete dias após a exposição ao quimioterápico. No JP todos os grupos com mucosite foram afetados e no JD apenas o grupo que recebeu polpa de açaí (Figura 5.8). Similarmente, a Figura 5.9 mostra que no D7 a MI provocou importante encurtamento das vilosidades em relação a profundidade das criptas no jejuno proximal. Ainda assim, os componentes da polpa de açaí foram capazes de promover recuperação deste parâmetro (MUC vs MUC+Açaí) se equiparando ao grupo saudável que recebeu o pré-tratamento. Neste mesmo período, o jejuno distal também apresentou diminuição da razão vilos/cripta no grupo MUC, mas o grupo MUC+Açaí não foi afetado. As figuras 5.10 e 5.11 ilustram esses achados.

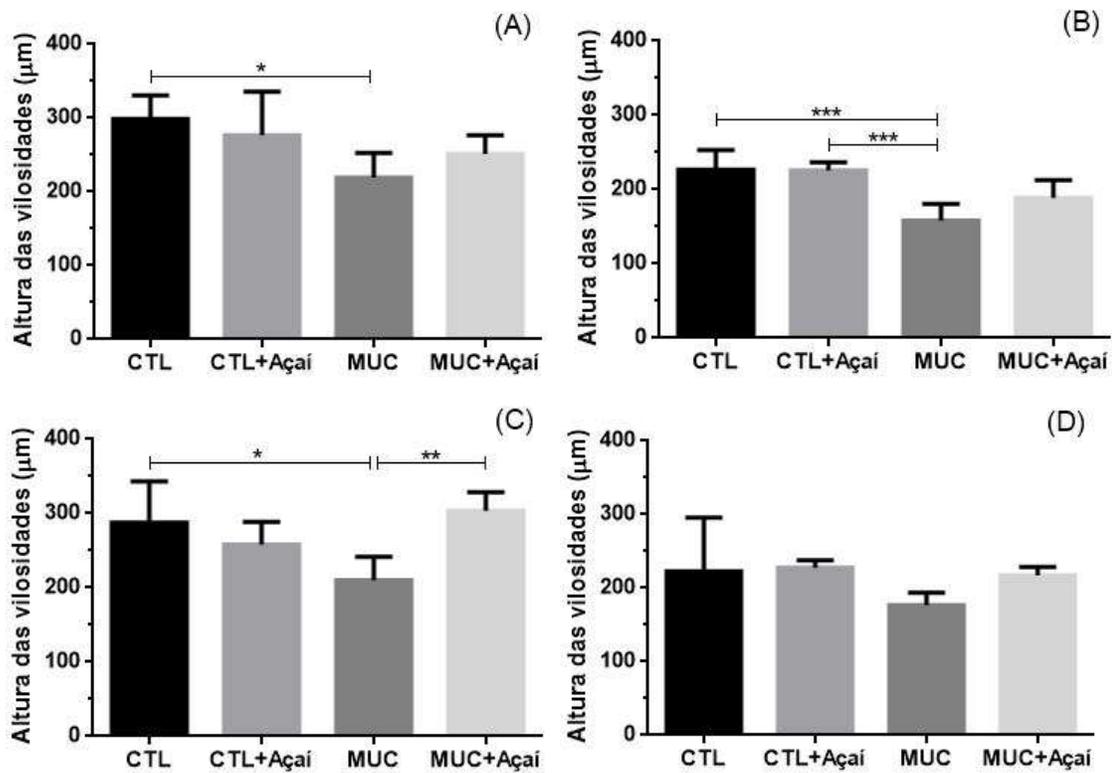


Figura 5.7: Avaliação da altura das vilosidades (µm) no jejunó proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média ± DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,005$; $n = 5$ para todos os grupos.**

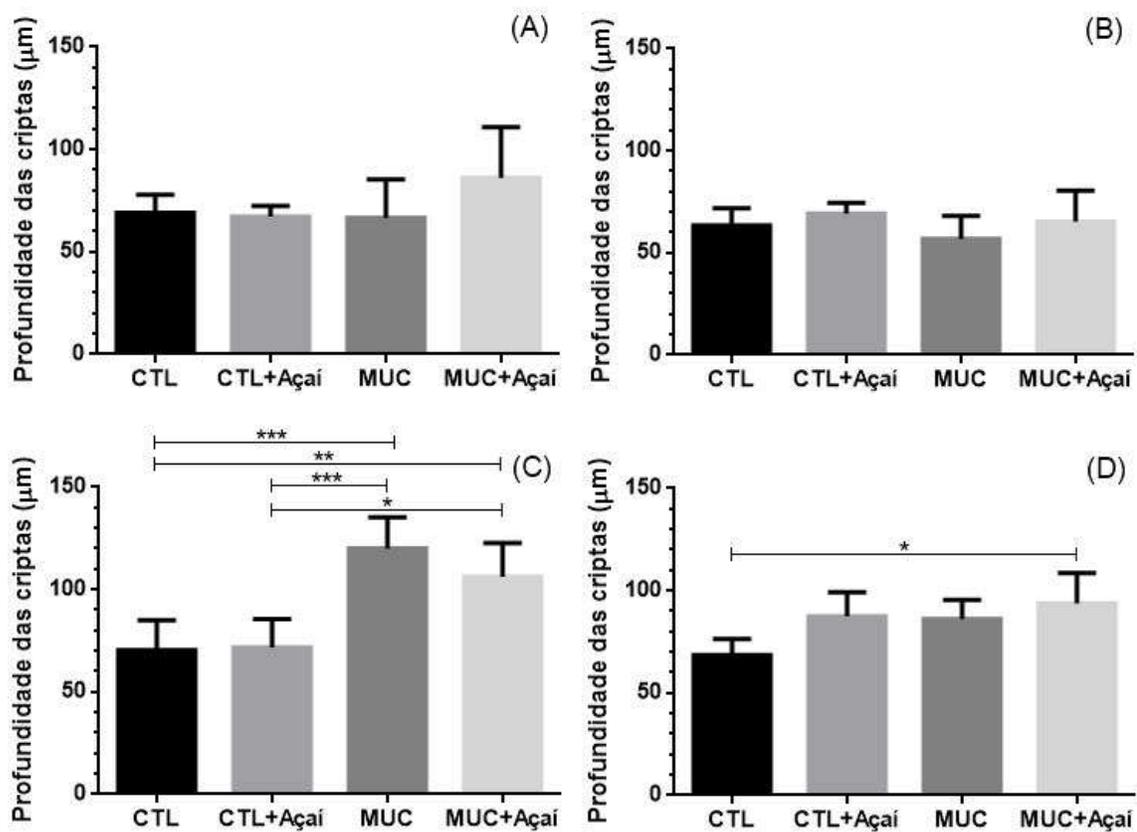


Figura 5.8: Avaliação da profundidade das criptas (μm) no jejuno proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$; $n = 5$ para todos os grupos.

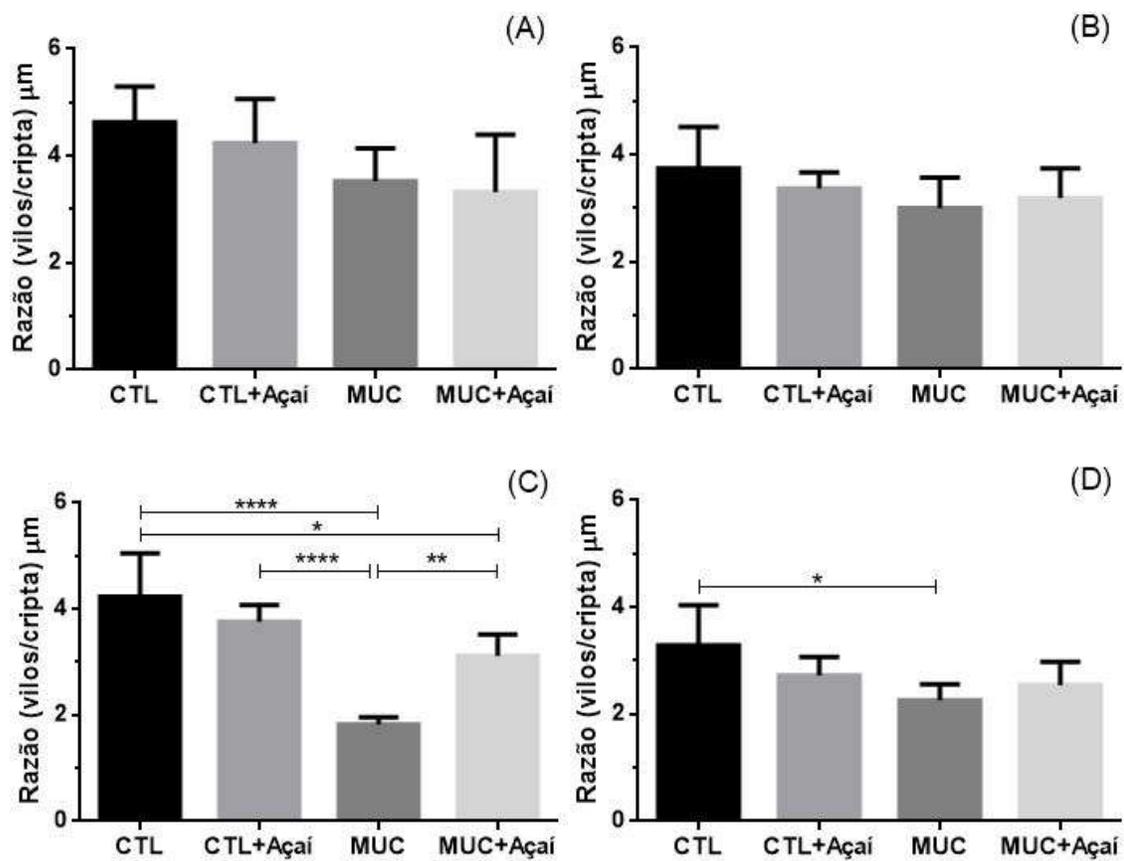


Figura 5.9: Avaliação da razão (vilos/cripta - µm) no jejunum proximal (A e C) e distal (B e D) no D3 (A e B) e no D7 (C e D). Grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média ± DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. *p<0,05; **p<0,01 e **p<0,001; n= 5 para todos os grupos.**

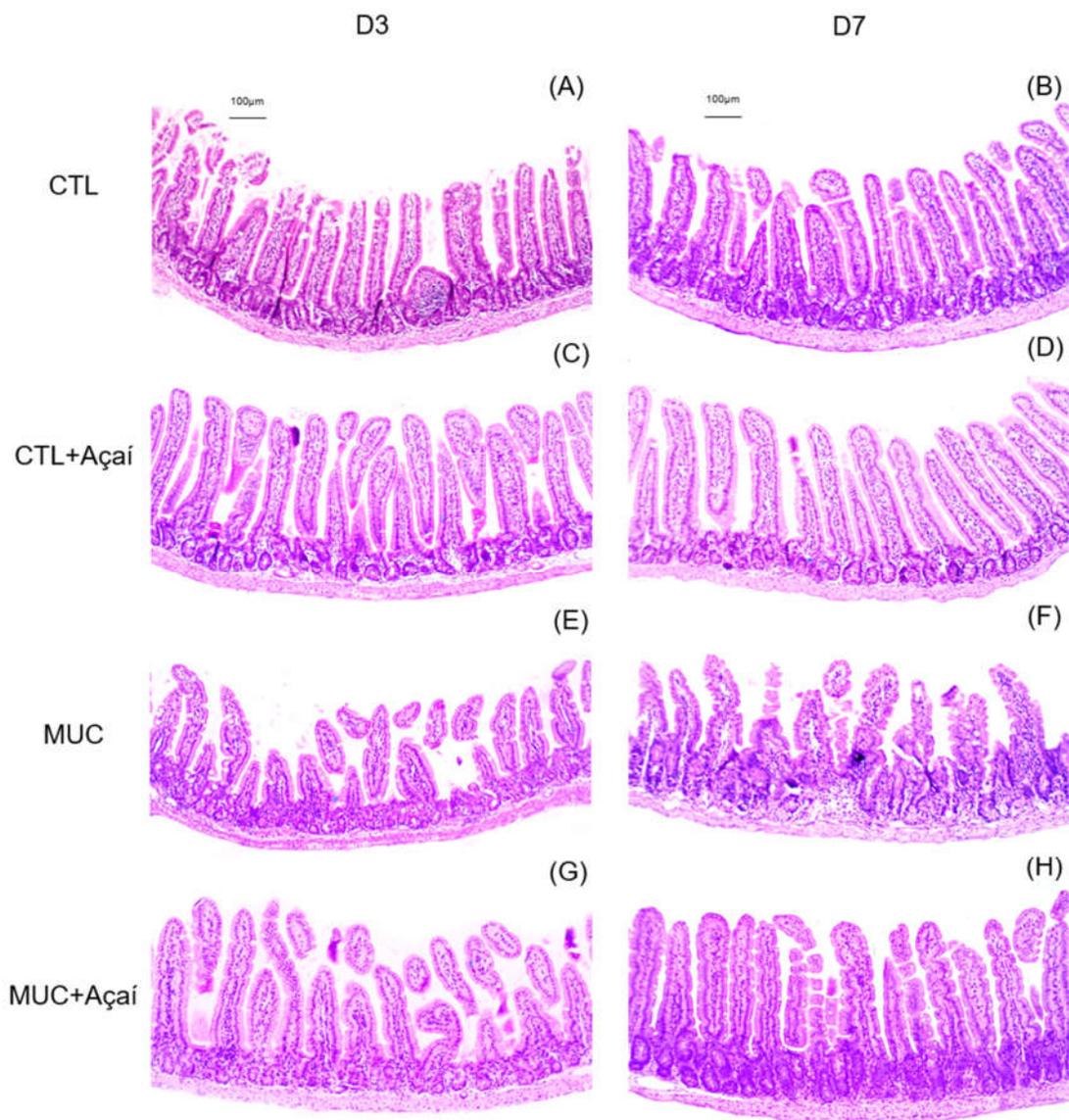


Figura 5.10: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno proximal no D3 (A, C, E e G) e D7 (B, D, F e H) dos grupos: CTL (A e B), CTL+Açaí (C e D), MUC (E e F) e MUC+Açaí (G e H). Aspecto histológico do tecido normal, mostrando arquitetura preservada com vilosidades altas e criptas próximas (A, B, C e D); arquitetura tecidual alterada, com vilosidades encurtadas e irregulares (E e F) e criptas mais profundas (F); arquitetura tecidual alterada, com vilosidades irregulares (G); organização tecidual reestabelecida com vilosidades altas e criptas próximas, porém mais profundas (H). Escala de 100µm.

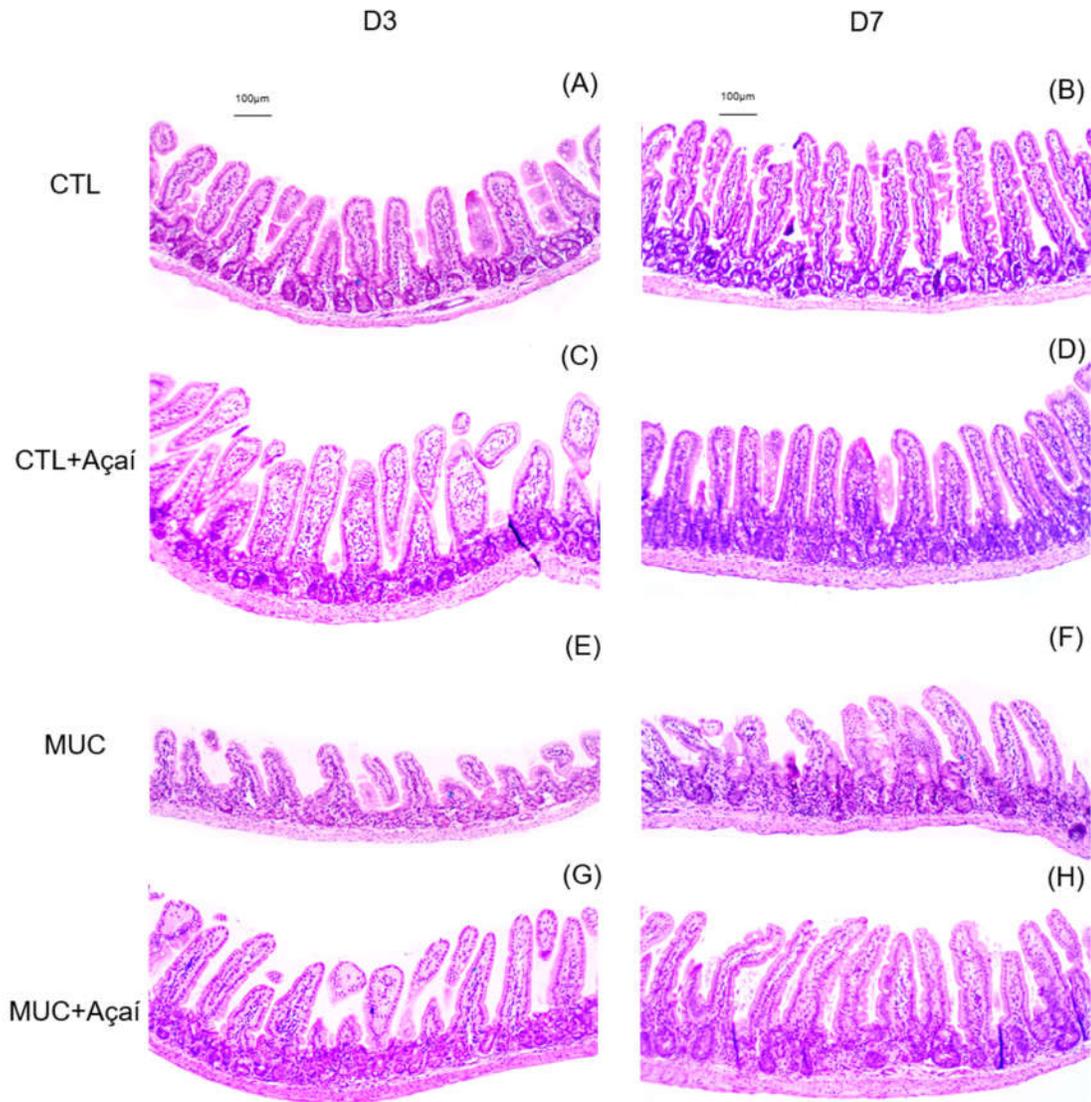


Figura 5.11: Fotomicrografia de cortes histológicos de jejuno distal no D3 (A, C, E e G) e D7 (B, D, F e H) dos grupos: CTL (A e B), CTL+Açaí (C e D), MUC (E e F) e MUC+Açaí (G e H). Aspecto histológico do tecido normal, mostrando arquitetura preservada com vilosidades altas e criptas próximas (A, B, C e D); arquitetura tecidual alterada, com vilosidades encurtadas (E) e aparentemente menores (F) e criptas mais profundas (F); arquitetura tecidual alterada, com vilosidades irregulares (G); organização tecidual reestabelecida com vilosidades altas e criptas próximas, porém mais profundas (H). Escala de 100µm.

4. Análise da resposta antioxidante

4.1. Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT e da concentração de grupos sulfidril totais (gSH)

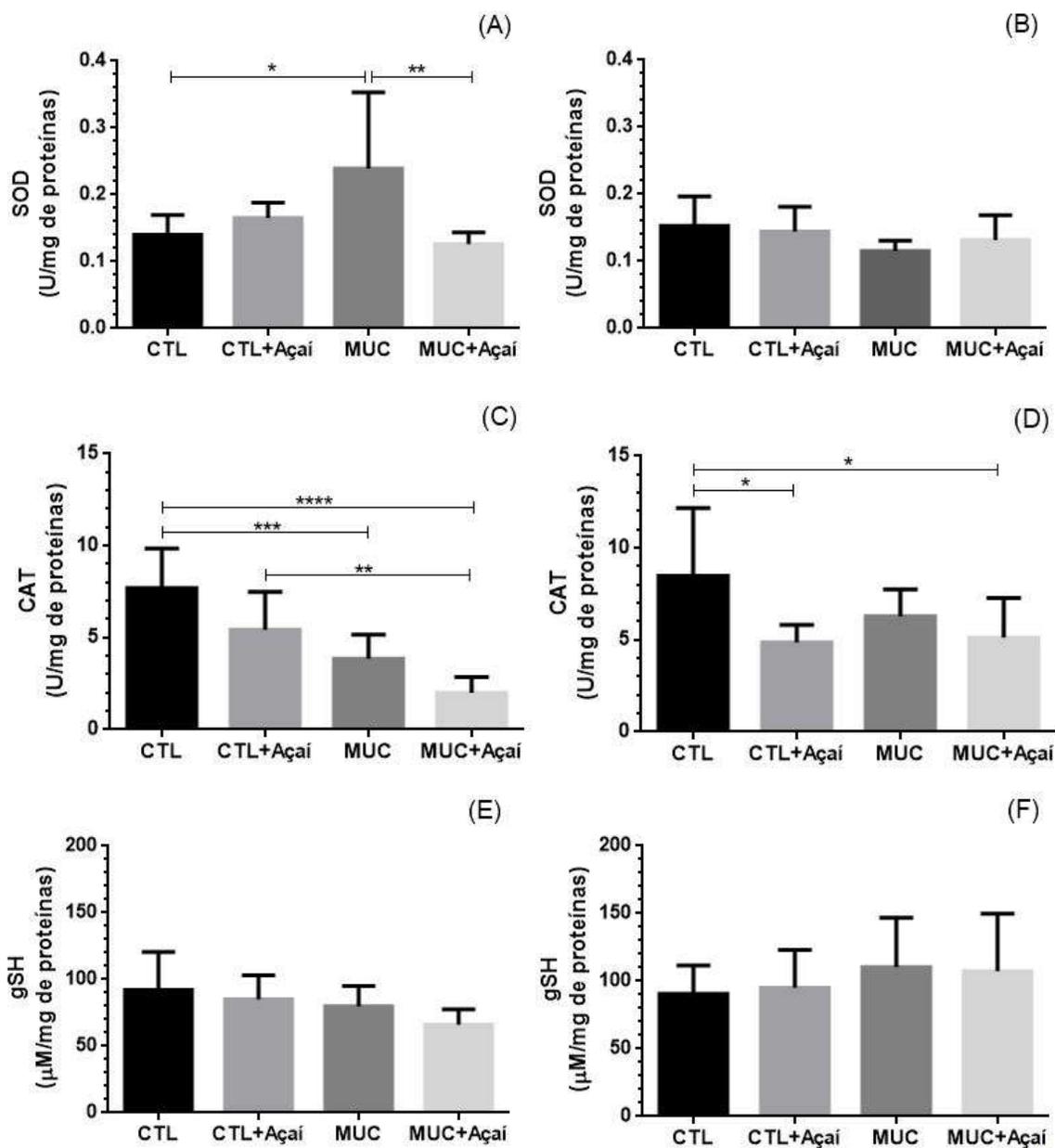


Figura 5.12: Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT e de gSH no D3 (A, C e E) e no D7 (B, D e F) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,005$ e **** $p<0,001$; n = 7, 7, 8, 8 (A); n = 7, 8, 8, 8 (B); n = 8, 7, 8, 8 (C); n = 7, 8, 8, 8 (D); n = 6, 6, 8, 7 (E) e n = 6, 6, 8, 8 (F).**

Observando Figura 5.12A, podemos perceber que a MI provocou aumento da atividade da enzima SOD (CTL vs MUC) e o pré-tratamento com polpa de açaí no grupo

com essa alteração, promoveu diminuição de sua atividade (MUC vs MUC+Açaí). Para esse mesmo período a Figura 5.12C mostra que a MI provocou redução da atividade da enzima CAT, uma vez que os grupos que receberam 5-FU apresentaram diminuição da ação dessa enzima comparados com grupos controle. No D7 não houve alteração da atividade da enzima SOD para nenhuma das comparações (Figura 5.12B), no entanto, a enzima catalase apresentou redução de sua atividade nos grupos que receberam açaí (CTL+Açaí e MUC+Açaí) comparados com o grupo CTL (Figura 5.12D). Não foi encontrada alteração na concentração de grupos sulfidríla totais no D3 e no D7 (Figuras 5.12E e 5.12F).

4.2. Avaliação do teor de polifenóis totais

A Figura abaixo mostra que a concentração de polifenóis totais apontou similaridade entre os grupos analisados nos dois períodos (Figura 5.13A e 5.13B), não havendo alteração do conteúdo fenólico jejunal entre os mesmos.

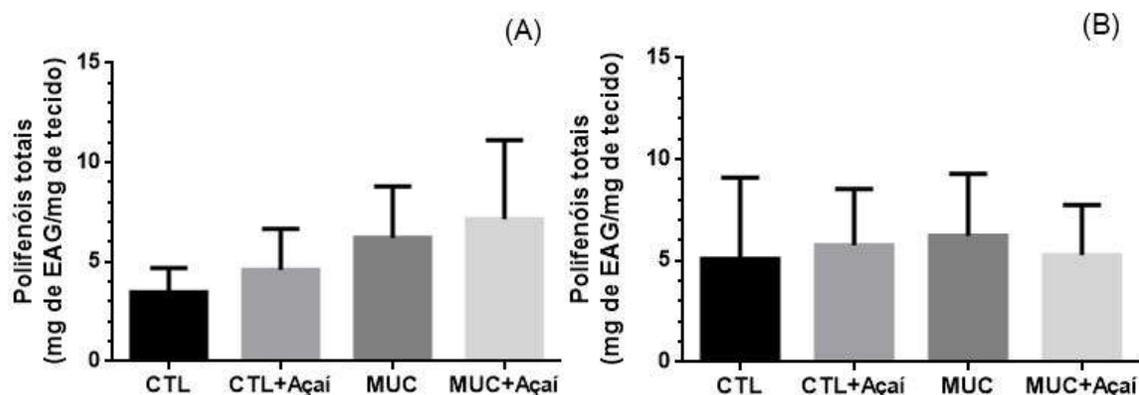


Figura 5.13: Avaliação do teor de polifenóis totais no D3 (A) e D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey; n= 6, 6, 8 e 8 em (A) e (B).

5. Análise da resposta inflamatória

5.1. Determinação da concentração de TNF- α e IL-1 β

A dosagem dos referidos mediadores pró-inflamatórios não apresentou alteração entre os grupos analisados no D3 e no D7 (Figura 5.14).

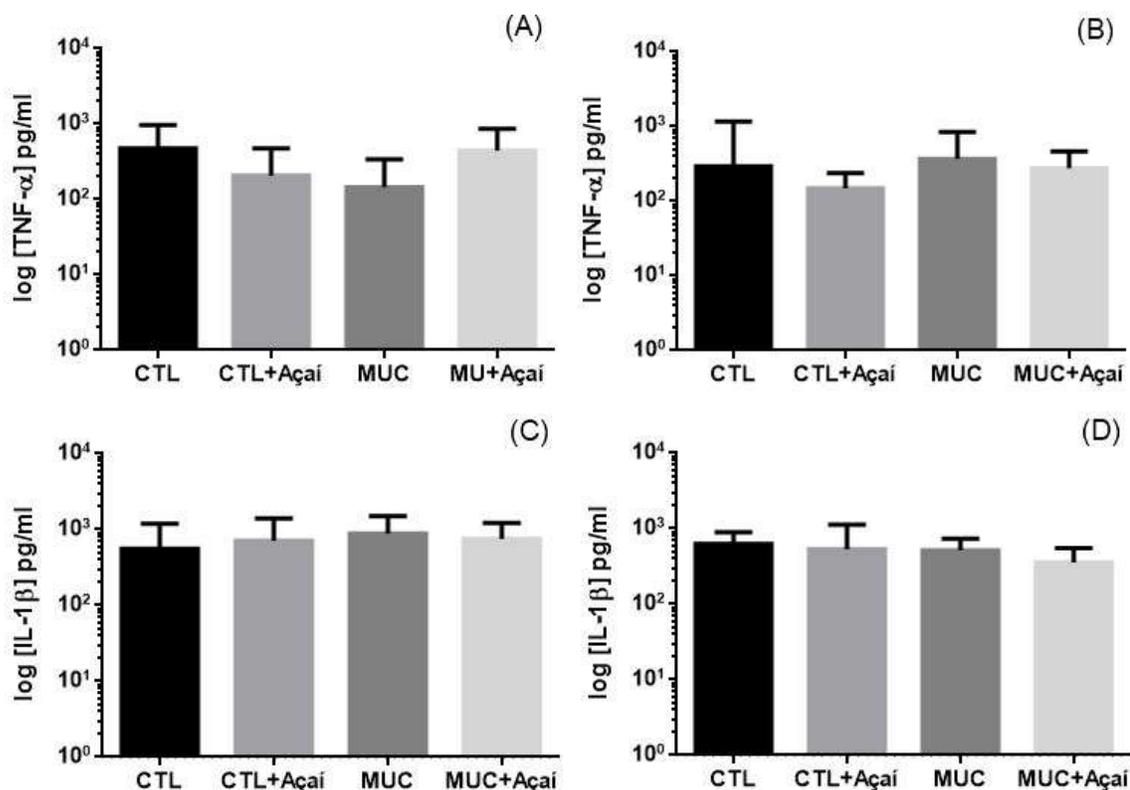


Figura 5.14: Avaliação da concentração dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-1 β no D3 (A e C) e no D7 (B e D) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média dos logaritmos₁₀ \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey; n= 6, 6, 5, 5 (A); n= 5, 5, 5, 5 (B); n= 5, 5, 6, 6 (C) e n= 6, 6, 6, 6 (D).

5.2. Determinação da concentração de sigA

Os resultados apresentados na Figura 5.15A mostram que a ingestão de polpa de açaí pelo grupo que recebeu 5-FU (MUC+Açaí), proporcionou aumento da secreção de IgA três dias após a administração do quimioterápico (vs CTL, vs CTL+Açaí e vs MUC). Todavia, no D7 houve similaridade na concentração dessa imunoglobulina no lúmen do intestino delgado (Figura 5.15B).

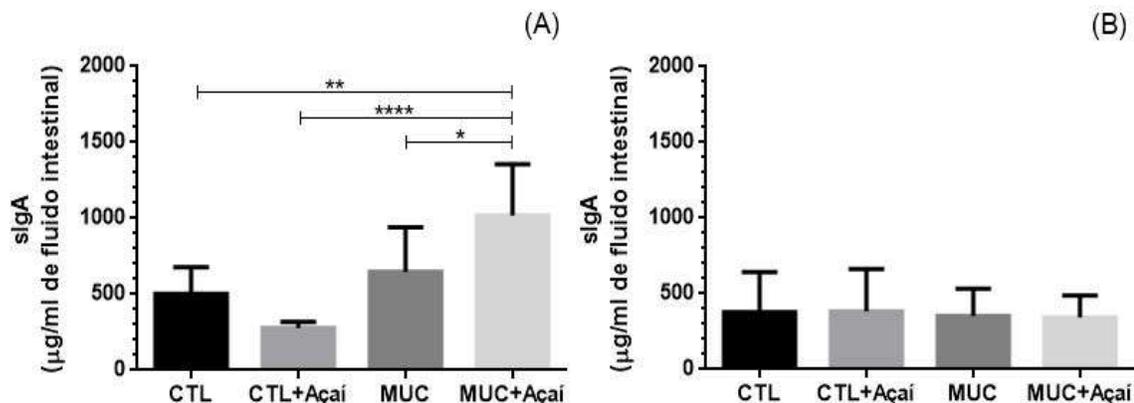


Figura 5.15: Avaliação da concentração de sigA no D3 (A) e no D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$; $n = 8, 6, 8, 8$ (A) e $n = 8, 8, 8, 8$ (B).

5.3. Avaliação da atividade da enzima MPO

Pode-se observar que no D3 (Figura 5.16A) a atividade da mieloperoxidase foi maior apenas no grupo MUC+Açaí (vs CTL). No entanto, sete dias após a administração do 5-FU, sua ação foi elevada em ambos os grupos com MI em relação aos grupos controle (MUC e MUC+Açaí vs CTL e vs CTL+Açaí - Figura 5.16B).

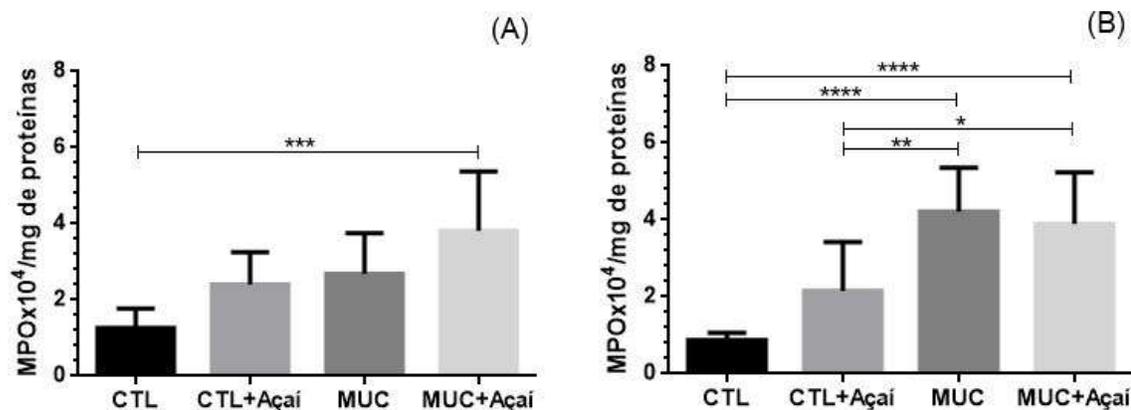


Figura 5.16: Avaliação da atividade da enzima MPO no D3 (A) e no D7 (B) entre os grupos controle (CTL e CTL+Açaí) e que receberam 5-FU (MUC e MUC+Açaí). Os resultados são representados pela média \pm DP. Comparações múltiplas utilizando one-way ANOVA foram acompanhadas pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ e **** $p < 0,001$; $n = 8$ para todos os grupos.

1. Discussão

A MI compromete a digestão e absorção de nutrientes, além de provocar sintomas muita das vezes insuportáveis que afetam a ingestão alimentar. Dentre esses sintomas podemos destacar a incidência de cólicas abdominais, náuseas, vômito e diarreia. Como consequência, a perda de peso é característica dessa alteração e o acompanhamento alimentar e ponderal são parâmetros importantes na avaliação da mucosite na clínica e na pesquisa⁽¹⁻⁷⁾.

Observando as análises da ingestão alimentar e do acompanhamento ponderal podemos perceber que no geral, a ingestão foi maior nos grupos que receberam o pré-tratamento e isso possivelmente refletiu no ganho de peso entre os grupos controle no D3. Esse evento também pode sugerir que houve real aumento da ingestão alimentar da dieta com açaí por esses grupos nos dois períodos avaliados. Em estudos anteriores, observamos em outros modelos experimentais que a adição de açaí à dieta provoca aumento da ingestão por roedores (dados não mostrados). Não há estudos que sustentem esse achado, mas sugerimos que as propriedades organolépticas da polpa de açaí estimulam maior consumo, pois as dietas fornecidas possuem praticamente o mesmo valor calórico.

Corroborando com a queda ponderal observada no presente trabalho, Song *et al.*⁽⁵⁾ constataram perda de peso no D3 e D7 após a administração de 5-FU (200 mg/kg) em camundongos BALB/c. Observamos que o grupo que recebeu somente 5-FU eutanasiado no D7 apresentou redução da ingestão comparado ao grupo controle no vigésimo primeiro dia da experimentação, o que possivelmente refletiu na perda de peso mais expressiva nesse período. De maneira semelhante, Han *et al.*⁽⁴⁾ observaram maior perda ponderal entre o D5 e D7 utilizando o mesmo modelo experimental do presente trabalho.

Apesar de todos os grupos com MI apresentarem perda de peso observamos que os grupos que ingeriram polpa de açaí resistiram a essa perda, o que pode ser consequência da maior ingestão dessa dieta ao longo dos dias. Em adição, a proteção tecidual provocada pelos componentes da polpa de açaí até o D7 provavelmente contribuiu para a manutenção de um perfil alimentar semelhante até o final da experimentação. Outro estudo também observou menor perda ponderal por meio da administração de ω -3 em camundongos com MI induzida por 5-FU (300 mg/kg)⁽⁸⁾.

Constatamos óbito apenas entre os animais que receberam a intervenção dietética e 5-FU. Contudo, esse grupo apresentou resistência a perda de peso e melhora dos parâmetros histológicos avaliados. Em um acompanhamento da sobrevivência Han *et al.*⁽⁴⁾, observaram óbito a partir do D6 em camundongos que receberam uma dose única de 5-FU a 300mg/kg. Igualmente ao nosso estudo, no D7 havia sobrevivência de 75%. Portanto, sugerimos que a ingestão de polpa de açaí não evitou nem promoveu o óbito desses

animais. Em adição, também observamos menores sinais de debilidade nos camundongos desse grupo, ao contrário dos animais que receberam apenas o quimioterápico.

Observamos manifestação e evolução da diarreia entre o D5 e D7, se agravando diariamente. Corroborando com nossos resultados, Song *et al.*⁽⁵⁾ e Han *et al.*⁽⁴⁾ constataram manifestação máxima desse parâmetro entre os dias quatro e sete após a administração da droga. Nesses estudos também foi utilizado camundongos BALB/c e a dose de 200mg/kg de 5-FU. Foi observada correlação entre dias que houve maior perda de peso e a gravidade da diarreia. No presente trabalho constatamos efeito similar entre esses parâmetros, pois a perda de peso foi se agravando até o D7, paralelamente ao surgimento de eventos diarreicos.

A quimioterapia pode causar efeitos adversos, dentre eles a constipação ou diarreia. Dentre os quimioterápicos, o 5-FU é uma droga que normalmente causa diarreia e não constipação. A diarreia é associada ao aumento das evacuações e dos movimentos intestinais, e pode ou não ser dolorosa e acompanhada da presença de sangue e muco⁽¹⁾. Segundo Gibson e Keefe⁽¹⁾ as fluoropirimidinas são responsáveis por causarem diarreia extensa sendo um dos principais efeitos colaterais em indivíduos que recebem 5-FU⁽⁹⁾.

A hiperplasia de rebote das células das criptas pode ocorrer como consequência de uma injúria intestinal mais elevada (D3). Células secretoras e absorptivas amadurecem à medida que migram das criptas em direção ao ápice das vilosidades^(1, 10, 11). Isso possivelmente justifica a manifestação de diarreia mais tardia em nossos grupos que receberam 5-FU.

No presente trabalho, o fato da diarreia não ter sido manifestada no período de maior injúria intestinal (D3) não está compreendido, mas segundo Gibson e Keefe⁽¹⁾ sua patologia na quimioterapia é complexa e produto de muitos mecanismos, dentre eles, a mudança da microbiota intestinal. Não foi observada alteração significativa do tratamento dietético na manifestação e severidade da diarreia, contudo seria prematuro afirmar que não houve efeito dos componentes da polpa de açaí na PI bem como, na microbiota colônica avaliando apenas esse parâmetro.

A literatura menciona que o aumento da migração neutrofílica transepitelial intestinal pode induzir alterações na permeabilidade do epitélio, o que pode estar relacionado a manifestação da diarreia⁽¹²⁾. Isso também elucida o fato dos eventos diarreicos observados em nosso estudo terem se pronunciado a partir do D5, pois podem estar relacionados a migração mais tardia de maior número de neutrófilos discutida mais a frente.

Keefe⁽¹³⁾ expos que o trato gastrintestinal (TGI) possui a mesma rota embriológica de desenvolvimento e que suas peculiaridades são inerentes às diferenciações celulares devido às funções específicas que cada área executa. A partir dessa teoria é provável que a mucosite se manifeste de maneira similar ao longo do trato alimentar, com algumas diferenças intrínsecas em cada região⁽¹⁾. Esses estudos fundamentaram nossa metodologia

de coleta e escolha do jejuno para as análises realizadas, e comportam nossos achados histopatológicos em relação à MI se manifestar de modo similar no jejuno proximal e distal. Corroborando com esses achados, Ferreira *et al.*⁽¹⁴⁾ observaram a mesma condição de injúria induzida por 5-FU ao longo dos segmentos do ID de camundongos utilizando a dose de 200mg/kg. Leocádio *et al.*⁽¹⁵⁾ constataram o mesmo perfil de dano tecidual no jejuno proximal e distal de camundongos que também receberam a mesma dose de 5-FU utilizada neste trabalho.

Semelhante ao estudo realizado por Soares *et al.*⁽⁹⁾ em ratos (5-FU - 150mg/kg), o presente trabalho constatou maior dano tecidual de acordo com o escore histopatológico, três dias após a indução da mucosite. Neste trabalho, no D3 os grupos com MI que receberam ou não o pré-tratamento apresentaram escore máximo (escore 3). Apesar de alguns animais dos grupos que receberam polpa de açaí e 5-FU apresentarem menor injúria (escore 2), essa diferença não foi significativa. As alterações observadas consistiram em deformidade e/ou desorganização na arquitetura das vilosidades e das criptas, maior infiltrado de células inflamatórias, presença de degeneração vacuolar das células de Paneth e da camada muscular, bem como, presença de edema. Esses achados corroboram com estudos pioneiros da área, que relataram efeitos danosos de quimioterápicos à mucosa intestinal com pico máximo no D3^(2, 3, 11).

A avaliação da MI realizada por Keefe *et al.*⁽³⁾ em seres humanos, demonstra resposta ao dano similar a estudos com murinos. Foi observado maior gravidade da citotoxicidade por quimioterápicos no D3, evidenciada por decréscimo da contagem mitótica, aumento considerável da apoptose, redução do comprimento das criptas e da área das vilosidades. Nesse período Leocádio *et al.*⁽¹⁵⁾, Generoso *et al.*⁽⁸⁾ e Al-Asmari *et al.*⁽⁶⁾ e Whittaker *et al.*⁽¹⁶⁾ também constataram importante dano tecidual, evidenciado por alteração na arquitetura das vilosidades e criptas, bem como, hipoplasia no intestino de roedores que receberam 5-FU.

Como observado em nosso estudo, a presença de degeneração hidrópica/vacuolar e necrose são provenientes do dano genotóxico causado pelo 5-FU às células. Isso ativa vias pró-apoptóticas e também provoca aumento do estresse oxidativo por meio do desacoplamento da citocromo c da mitocôndria para o citosol, o que ocasiona redução da energia celular por decaimento dos níveis de ATP^(17, 18). Como consequência, a depleção de ATP é acompanhada por influxo descontrolado de íons extracelulares, principalmente de Na⁺ abaixo de seus gradientes eletroquímicos, provocando esse tipo de degeneração celular que pode evoluir para a necrose⁽¹⁹⁾. O edema comumente observado na MI e constatado em nossa análise, é ocasionado no processo de recrutamento de células imunológicas em resposta a liberação de mediadores pró-inflamatórios no processo de desenvolvimento da mucosite^(11, 20).

Em nosso estudo, sete dias a partir da injeção de 5-FU, os grupos com MI que não receberam o pré-tratamento, apresentaram transição entre o estado de injúria tecidual mais intenso (escore 3) e mais resolutivo (escore 2). Todavia, em todos os animais dos grupos que receberam a polpa de açaí e 5-FU foi evidenciado maior aspecto de resolução tecidual (escore 1). Corroborando com esse achado, Ribeiro *et al.*⁽²¹⁾ sugeriram que os fitoquímicos presentes na polpa de açaí podem ser armazenados em diferentes órgãos e interagir com componentes celulares promovendo citoproteção.

Estudos demonstram benefícios de compostos dietéticos na proteção tecidual na mucosite induzida por 5-FU no D3. Cheah *et al.*⁽²²⁾, Ferreira *et al.*⁽¹⁴⁾, Generoso *et al.*⁽⁸⁾ e Al-Asmari *et al.*⁽⁶⁾ constaram atenuação do dano intestinal no grupo que recebeu pré-tratamento com extrato aquoso de semente de uva (GSE), AGCC, ω -3 e vitamina E, respectivamente.

Todavia, nossa análise histopatológica demonstrou que a ingestão de açaí promoveu evidente recuperação tecidual apenas sete dias após a indução da MI. Em um modelo de mucosite oral induzida por 5-FU utilizando Hamsters Golden Syrian, Sá *et al.*⁽²³⁾ observaram efeito similar utilizando um tratamento com glicina. Nesse estudo, a suplementação com o aminoácido promoveu redução da injúria tecidual somente no D7. Whittaker *et al.*⁽¹⁶⁾ também não constaram melhora da injúria tecidual três dias após a injeção de 5-FU (150mg/kg) em ratos que foram pré-tratados com extratos de amêndoas. Os autores relacionaram esses resultados ao menor tempo do estudo.

Kang e Kim⁽²⁴⁾ sugeriram potencial efeito cicatrizante de extratos aquosos de açaí como agente de cura na mucosa oral de ratos. Esse efeito foi inferido aos compostos do fruto que promoveram regeneração tecidual a partir do dia três à indução da lesão oral com ácido acético (50%). Similarmente ao nosso trabalho, foi observado reepitelização seis dias após a provocação da injúria no grupo tratado. No referido estudo, esse mesmo grupo também apresentou regeneração mais rápida do tecido. Nesse sentido, sugerimos que após o dano citotóxico, a ingestão de polpa de açaí foi capaz de promover evidente diminuição do escore histopatológicos em um período de menor agressividade intestinal provocada pelo 5-FU.

No presente trabalho foi constatado diminuição da altura das vilosidades em todo o jejuno três dias após a administração do 5-FU. A esse respeito, Keefe *et al.*⁽³⁾ concluíram que a apoptose das criptas intestinais, que ocorre entre 6 e 48h após a administração de quimioterápicos, precede a atrofia das vilosidades do ID e que a hipoplasia intestinal atinge seu patamar máximo três dias após à exposição a essas drogas^(4, 9, 11, 25). Semelhante a esse nosso achado, diferentes estudos constataram decaimento da altura das vilosidades intestinais três dias após a administração de uma dose única de 5-FU em murinos^(4, 6, 9, 25, 26).

Soares *et al.*⁽⁹⁾ constatou recuperação da altura das vilosidades a partir do D5 no jejuno. No entanto em nosso estudo, observamos que a altura das vilosidades também foi afetada no D7. Ressaltamos que diferentes espécies de animais que recebem

quimioterápicos podem responder de maneira peculiar a seus efeitos citotóxicos⁽³⁾, o que possivelmente elucida esse evento.

Este trabalho observou que a ingestão de polpa de açaí impediu a hipotrofia e promoveu recuperação da altura das vilosidades jejunais três e sete dias após a indução da MI, respectivamente. Em relação a esse parâmetro, sugerimos que fitoquímicos do açaí, dentre eles as antocianinas, promoveram resistência à injúria mais expressiva (D3) e mais branda (D7) causada pelo 5-FU. Corroborando com esse achado, estudos que avaliaram o efeito de componentes dietéticos na MI induzida por 5-FU, constataram menor redução desse parâmetro no intestino de roedores que receberam AGCC, ω -3 e vitamina E^(6, 8, 14).

A análise histopatológica corrobora com a recuperação da altura das vilosidades no D7 entre os grupos com mucosite tratados e não tratados. No entanto, essa correlação não foi observada no D3. Sugerimos que apesar do dano celular estar ocorrendo com maior intensidade nesse período, os componentes do açaí foram capazes de promover proteção a nível tecidual por meio da manutenção da altura das vilosidades em um ambiente com maior citotoxicidade.

Nosso trabalho não constatou diminuição na profundidade das criptas jejunais no período mais crítico da MI (D3). Acerca deste achado, Pritchard *et al.*⁽²⁷⁾ demonstraram que a toxicidade do 5-FU no ID é dependente da via pró-apoptótica da p53 e que sua atuação máxima ocorreu após cerca de 24h, com decaimento até o D3 nas criptas do ID de camundongos BDF1 com MI (5-FU - 400mg/kg). De maneira análoga, Soares *et al.*⁽⁹⁾ e Han *et al.*⁽⁴⁾ observaram aumento da apoptose até 24h após a exposição a 150mg/kg e 200mg/kg de 5-FU respectivamente, demonstrando que a morte celular programada nas criptas mediada pela droga não é dose-dependente⁽³⁾.

Soares *et al.*⁽⁹⁾ também observou aumento do índice mitótico intestinal a partir do D3. Baseando nesses achados e na nossa análise histopatológica nesse período, sugerimos que em nosso modelo experimental a profundidade das criptas não apresentou alteração morfológica devido a provável redução da apoptose, seguida de certa proliferação das células. Esse evento possivelmente ocorreu juntamente com a degeneração vacuolar e com alteração do tipo de morte celular para a necrose, desencadeada pelo 5-FU. De maneira similar Wu *et al.*⁽²⁵⁾, Han *et al.*⁽⁴⁾, Maioli *et al.*⁽²⁶⁾ e Generoso *et al.*⁽⁸⁾ não constaram alteração na profundidade das criptas três dias após a indução da MI. Whittaker *et al.*⁽¹⁶⁾ observaram que no jejuno não houve encurtamento das criptas no D3, ao contrário do íleo, que respondeu com hipoplasia das mesmas. Os autores expuseram que as alterações nas criptas têm sido incoerentes na literatura. Pois apesar do encurtamento das mesmas ser mais provável, pode haver inalteração desse parâmetro, assim como aumento da profundidade. Nesse sentido, sugerimos que cada segmento do ID pode apresentar dano tecidual característico do modelo experimental utilizado.

No ID agentes citotóxicos atuam nas células das criptas em diferentes níveis de hierarquia, levando em primeira instância a hipoplasia das mesmas, seguida de regeneração⁽¹¹⁾. Portanto, o aumento da profundidade das criptas observado em nossa análise histopatológica e morfométrica do grupo com MI no D7, pode ser devida ao fato da renovação celular ser mediada por possíveis mecanismos que estimulam a hiperplasia, no sentido de compensar o dano epitelial provocado inicialmente⁽²⁸⁾. Estudos pioneiros mencionaram o surgimento de hiperplasia de rebote nas criptas após tratamentos quimioterápicos, expondo que após intenso dano tecidual as células intestinais são capazes de regenerarem rapidamente a partir do D5, com posterior recuperação do tecido^(1, 11). Soares *et al.*⁽⁹⁾ também observaram aumento da profundidade das criptas a partir do D3, analisando o intestino de ratos após a administração de uma dose única de 5-FU (150mg/kg).

Estudos utilizando um extrato de semente de uva⁽²⁸⁾ e ácidos graxos ω -3⁽⁸⁾ na dieta de camundongos constataram diminuição da profundidade das criptas ileais nos grupos tratados e com inflamação intestinal. No presente trabalho, foi observado efeito oposto no grupo que recebeu polpa de açaí no D7, nos permitindo sugerir que quando envolvidos em condições de agressão intestinal os componentes do açaí favorecem ou não interferem no efeito rebote.

Este trabalho também demonstrou queda na razão vilos/cripta nos grupos que receberam somente 5-FU, corroborando com estudos semelhantes ao nosso^(8, 26). É possível observar que a alteração dessa razão nos grupos que receberam o quimioterápico é um reflexo das modificações nas vilosidades e criptas no D7. Nota-se também que a intervenção dietética recuperou esse parâmetro no jejuno proximal e promoveu resistência à injúria no jejuno distal. Utilizando ácidos graxos ω -3, Generoso *et al.*⁽⁸⁾ também constataram recuperação dessa razão no intestino de camundongos com MI induzida por 5-FU (300mg/kg).

Segundo a morfometria, o dano tecidual foi mais proeminente no JP. Corroborando com esses resultados, a análise histopatológica demonstrou maior presença de vacúolos de degeneração hidrópica nas vilosidades e necrose das criptas no jejuno proximal no grupo com mucosite e sem tratamento no D3. Esses achados sugerem que em nosso modelo experimental o jejuno proximal se mostrou mais susceptível aos danos provocados pelo 5-FU. Contudo, toda a análise histológica apresentada neste trabalho demonstrou manifestação mais homogênea da MI ao longo de todo o jejuno, assim como proposto por Gibson e Keefe⁽¹⁾.

Nosso trabalho é pioneiro em demonstrar os efeitos da polpa de açaí na MI no D3 e D7. De acordo com a análise histológica, podemos afirmar que a mucosite intestinal induzida por 5-FU foi estabelecida em nosso modelo e que a ingestão de polpa de açaí promoveu melhora em parâmetros analisados. Diferentemente de Soares *et al.*⁽⁹⁾ e Al-

Asmari *et al.*⁽⁶⁾, não foi observado infiltrado inflamatório intenso para todos os grupos, assim como não foi constatada presença de células polimorfonucleares na camada muscular.

Avaliando a resposta antioxidante, constatamos aumento da atividade da enzima SOD no grupo sem intervenção dietética três dias após a exposição ao 5-FU, o que também correlacionou com nossos achados histológicos nesse período. O estresse oxidativo pode ser considerado o cerne da patogênese da MI por alterar diversas vias de sinalização celular com consequente comprometimento da integridade e funcionamento normal dos tecidos^(11, 20). Em relação a isso, a literatura menciona ativação de respostas ao estresse ligada ao Nrf2. Esse evento está relacionado à tentativa de proteção contra o desenvolvimento da mucosite, promovendo a expressão de genes envolvidos, dentre eles, o da enzima SOD⁽²⁰⁾.

Todavia, foi observado diminuição da atividade dessa enzima nos grupos que receberam a intervenção dietética e o quimioterápico. Estudos anteriores descrevem importante capacidade antioxidante dos componentes do açaí em diversos modelos experimentais e relacionaram seu poder antioxidante a atividade de enzimas como a SOD e a CAT. De Souza *et al.*⁽²⁹⁾ sugeriram que a suplementação com polpa do açaí pode neutralizar espécies reativas, prevenindo a oxidação de biomoléculas, o que demandaria menor atividade de determinadas enzimas. Utilizando a mesma linha de raciocínio, podemos sugerir que os fitoquímicos do açaí foram capazes de promover a neutralização de espécies reativas, como o ânion superóxido, em um período de maior estresse oxidativo e injúria intestinal (D3). Por outro lado, não observamos nenhuma alteração na atividade da SOD no D7, possivelmente por haver menor presença do substrato dessa enzima no meio.

Encontramos no presente trabalho uma redução da atividade da enzima CAT induzida pelo quimioterápico no intestino no D3. Sabe-se que, em condições de maior concentração de peróxido de hidrogênio a enzima CAT desempenha um papel importante⁽³⁰⁾. Corroborando com nosso achado, um estudo recente demonstrou queda da atividade dessa enzima no intestino delgado de ratos que receberam 5-FU (100mg/kg). Isso foi relacionado a alta concentração de peróxido de hidrogênio encontrada na MI⁽⁷⁾. Supomos que a fase mais expressiva (D3) dessa alteração provoca aumento da demanda da CAT devido a elevada presença de seu substrato no meio. Em nosso estudo, o pré-tratamento não demonstrou efeito nesse parâmetro no D3. A esse respeito, sugerimos que o elevado nível de peróxido de hidrogênio prevaleceu sobre a capacidade de neutralização dessa espécie reativa por componentes do açaí em nosso modelo.

A ingestão de açaí promoveu redução da ação da CAT independente da exposição ao 5-FU no D7. Isso também demonstra a capacidade de neutralização direta de espécies reativas dos fitoquímicos do açaí. Em estudos anteriores que avaliaram o efeito do *Euterpe oleracea* Martius, é possível notar diversificada alteração na atividade das enzimas de detoxificação, isso pode ser devido a ampla atuação de seus componentes no organismo^(29, 31, 32).

Diferente do esperado, no presente trabalho não foi constatado alteração do nível de grupos sulfidril para nenhum dos grupos. Os grupos sulfidril ou grupos tióis estão presentes nas proteínas celulares e estão sujeitos a formarem pontes dissulfeto quando oxidados. Esses grupos podem ser considerados biomarcadores da atuação de drogas em tecidos biológicos, pois decrescem ou aumentam de maneira inversamente proporcional ao estado oxidativo^(33, 34).

Sob condições de homeostase, a GSH compõe a maior parte dos grupos sulfidril de baixo peso molecular e que podem ser encontrados nas células dos animais e das plantas^(35, 36). Em modelos experimentais de mucosite induzida por 5-FU em ratos, estudos constataram queda importante da atividade das enzimas GSH, GPX e da concentração de grupos sulfidril no intestino delgado^(7, 9). Pesquisas mencionados anteriormente neste trabalho demonstraram capacidade dos componentes do açai em modular o sistema glutaciona peroxidase^(32, 37, 38). Até o momento, não há estudos na literatura que sustentem nosso achado, no entanto sabe-se que há maior eficiência do sistema glutaciona em neutralizar concentrações baixas de peróxido de hidrogênio⁽³⁰⁾, o que possivelmente explicaria a manutenção dos resíduos de GSH em nosso modelo experimental.

Ribeiro *et al.*⁽²¹⁾ demonstraram competência de um tratamento prévio com polpa de açai por quatorze dias anterior à administração de um agente genotóxico. Demonstraram também que seus compostos podem ser armazenados em diferentes órgãos e interagir com constituintes celulares. Nesse sentido, buscamos avaliar o teor de polifenóis totais no tecido jejunal. Contudo, não foi possível detectar diferença entre a concentração de compostos fenólicos presentes nos grupos que receberam a intervenção dietética.

Nosso resultado pode ser biologicamente esclarecido. Primeiramente devemos considerar que mesmo quando presente em quantidade considerável na dieta, a biodisponibilidade desses componentes diminui por não serem totalmente absorvíveis no estômago e intestino. Em segundo lugar muitos polifenóis, como as antocianinas e proantocianidinas são muito pouco absorvidos no intestino delgado na forma intacta e estão sujeitas a extenso catabolismo pela microbiota intestinal, permitindo assim, que os produtos hidrolisados sejam então absorvidos no intestino grosso^(39, 40).

A partir do exposto, inferimos que boa parte dos polifenóis absorvíveis da polpa de açai administrada, possivelmente não foi catabolizada no intestino delgado, mas muito provavelmente pela microbiota colônica. A intervenção dietética foi realizada quatorze dias antes da indução da mucosite e consideramos que nesse período todos os animais estavam saudáveis. Assim, acreditamos que os compostos fenólicos dentre outros componentes presentes na polpa de açai, promoveram maior proteção ao intestino delgado por terem sido administrados dias antes do dano intestinal ter se instaurado e ter comprometido a atividade normal do intestino e da microbiota. Como consequência, provavelmente houve menor

biodisponibilidade desses componentes para o organismo nos períodos em que dosamos o teor de fitoquímicos totais.

Como descrito anteriormente, o estresse oxidativo provocado pela quimioterapia antineoplásica estimula a ativação de vias de sinalização celular, dentre elas a do NF- κ B. A literatura expõe que o TNF- α e a IL-1 β favorecem a severidade e manutenção da injúria na MI^(11, 20, 41). A manutenção da concentração de IL-1 β no presente trabalho pode ser inicialmente justificada pela normalização de seu nível intestinal três, assim como, sete dias após a administração da droga. A esse respeito, Wu *et al.*⁽²⁵⁾ observaram aumento do nível sérico de IL-1 β e de sua expressão no jejuno, com um pico após 24h e normalização após 72h (D3) em camundongos BALB/c (5-FU - 200mg/kg). Um estudo utilizando o mesmo modelo experimental, constatou aumento da ativação do NF- κ B e da expressão de TNF- α no ID, no entanto não houve alteração na expressão de IL-1 β comparado ao grupo controle (D7)⁽⁶⁾. Mediante esses resultados, sugere-se participação importante da IL-1 β na iniciação da injúria intestinal na mucosite induzida por 5-FU.

Todavia, devido à manutenção do nível intestinal de TNF- α encontrada no presente trabalho, acreditamos que em nosso modelo experimental a MI desenvolveu uma resposta Th2 e não Th1. Foi observada migração de neutrófilos mais tardia entre os grupos que receberam o quimioterápico, o que pode estar relacionado a manutenção da concentração de IL-1 β e TNF- α nesses grupos e que possivelmente outros mediadores pró-inflamatórios possam estar orquestrando a resposta ao 5-FU e aos componentes do açaí em nosso modelo experimental. Deve-se considerar que os mecanismos que provocam a MI são complexos e que a ativação do NF- κ B não é unidirecional e outros estímulos fisiopatológicos controlam a expressão de citocinas⁽⁵⁾.

A imunoglobulina A (IgA), promove neutralização de micro-organismos invasores, contribuindo para a primeira linha de defesa da mucosa intestinal. Para que a secreção de IgA ocorra, a influência das citocinas da resposta Th2 (IL-6 e IL-4) promove a ativação de células B⁽⁴²⁾. Nossos resultados demonstram manutenção da concentração de IgA secretória nos animais com MI que não receberam a polpa de açaí no D3. Diferente desse achado, estudos que serão relatados a seguir, reportaram a diminuição de sIgA em seres humanos e murinos que receberam 5-FU.

Foi constatado decaimento dessa imunoglobulina na saliva de pacientes com câncer^(43, 44), bem como, no fluido intestinal de camundongos que receberam infusão contínua de 5-FU por cinco dias (10 mg/kg IV)⁽⁴⁵⁾ e uma dose única da droga (300mg/kg ip - 24h)⁽⁴⁶⁾. Isso pode ser devido a hipoplasia do tecido linfático associado ao intestino (GALT) observada em animais expostos ao 5-FU em menores doses⁽⁴⁵⁾. Todavia, corroborando com nosso achado, em um estudo realizado por Maioli *et al.*⁽²⁶⁾ que utilizou camundongos que receberam 5-FU (300mg/kg), também não foi observada alteração da concentração de sIgA no grupo com MI que não recebeu a intervenção dietética no D3. Uma possível explicação

para esse evento pode estar relacionada à manutenção da população de células B do GALT em alguns modelos experimentais de MI induzida por 5-FU.

Tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos, a lesão acarretada e as alterações provenientes da dieta afetam drasticamente a coordenação da imunidade adquirida no TGI⁽⁴²⁾. No presente trabalho, o aumento da concentração de sIgA nos grupos pré-tratados e que receberam 5-FU (D3) corrobora com a literatura, demonstrando que compostos bioativos da dieta podem atuar em vias imunológicas no sentido de promoverem maior proteção à mucosa.

Fukatsu *et al.*⁽⁴⁷⁾ observaram restauração da concentração de sIgA no lavado broncoalveolar utilizando um modelo de infusão IV de 5-FU, acrescido de um fornecimento simultâneo de 10 ml/kg de uma emulsão de óleo de peixe (10%). Foi sugerido que a infusão de óleo de peixe pode prevenir o comprometimento da imunidade da mucosa induzido por 5-FU. Nesse mesmo estudo, esse achado não foi significativo no intestino delgado, no entanto, nossa intervenção dietética foi consistente em demonstrar aumento desse anticorpo no fluido do ID de animais que receberam 5-FU (D3).

Holderness *et al.*⁽⁴⁸⁾ demonstrou ativação robusta de linfócitos T por meio da atuação dos polissacarídeos isolados da polpa de açaí em células T $\gamma\delta$ de humanos, de camundongo e de bovinos. Esse estudo sugeriu que a atividade do açaí na resposta imune pode ser devida, em parte, aos polissacarídeos presentes na polpa. A fração polifenólica não demonstrou regulação da resposta inflamatória nas células analisadas.

A partir dos nossos resultados da concentração de sIgA, acreditamos que, em nosso modelo, os componentes da polpa de açaí promoveram uma resposta Th2 e sugerimos que a IL-4 e IL-6 também possam ter sido o gatilho para o aumento do infiltrado neutrofílico três dias após a indução da MI no grupo pré-tratado. Sugerimos que os compostos da polpa do açaí, dentre eles os polissacarídeos, estimulam a liberação de sIgA em um estado de maior citotoxicidade celular (D3) induzida por 5-FU, correlacionando com nossos achados histológicos e com a maior migração neutrofílica nesse período.

De maneira semelhante, um modelo de colite utilizado por Souza *et al.*⁽⁴⁹⁾ relacionou o aumento da concentração de sIgA à elevação do infiltrado inflamatório e alterações histológicas na mucosa do cólon de camundongos pré-tratados com uma dieta monomérica de aminoácidos. No presente trabalho não foi observado aumento da concentração dessa imunoglobulina em um estado menos injuriado (D7), possivelmente por menor demanda da atuação desse tipo de defesa intestinal mediada pelos componentes do açaí na (s) via (s) envolvida (s).

A MPO é uma enzima pró-inflamatória chave secretada abundantemente por neutrófilos ativados e pode ser considerada um marcador útil para a identificação bioquímica de doenças inflamatórias intestinais. Essa enzima promove a liberação de espécies reativas como o ácido hipocloroso e o oxigênio singlete, responsáveis por lesarem as membranas

celulares de micro-organismos invasores^(6, 50, 51). O infiltrado e a migração neutrofílica transepitelial tem sido relacionado de maneira importante em doenças inflamatórias intestinais⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ e na MI induzida por 5-FU^(9, 54). McCormick *et al.*⁽⁵²⁾ sugeriram que mecanismos quimiotáticos pró-inflamatórios podem estimular a migração de neutrófilos através do epitélio intestinal.

Diferente do esperado, o presente estudo constatou presença maciça de atividade neutrofílica apenas sete dias após à exposição a droga. Um estudo que avaliou a atividade intestinal da MPO em diferentes dias após a administração do 5-FU (150mg/kg) em ratos, constatou diminuição de sua ação a partir do D5⁽⁹⁾. No entanto, similarmente ao nosso trabalho, um modelo de mucosite oral utilizado por Sá *et al.*⁽²³⁾ demonstrou infiltrado inflamatório agudo mais tardio, caracterizado pela importante presença de neutrófilos no D7 nos grupos que também não receberam intervenção dietética.

Considerando a teoria de que a mucosite por quimioterápicos se manifesta de modo similar em todo o TGI⁽¹⁾, o estudo de Sá *et al.*⁽²³⁾ corrobora com este resultado. Nossa análise histopatológica revelou permanência de degeneração vacuolar no grupo MUC-D7, o que sugere consequência de uma possível ação amplificada do estresse oxidativo celular instalado inicialmente pelo 5-FU (D3). Isso pode estar alimentando a atividade neutrofílica por meio de mediador (es) pró-inflamatório (s). Em relação a isso, sugerimos uma provável atuação da IL-4 e IL-8 (CXCL-8 ou KC), nos grupos com MI e que não receberam o quimioterápico. Soares *et al.*⁽⁵⁵⁾ demonstrou que a IL-4 atua como uma citocina pró-inflamatória no dano intestinal induzido por 5-FU e que esse envolvimento é dependente da migração de neutrófilos e da produção da quimiocina KC (IL-8), dentre outros mediadores pró-inflamatórios. A IL-8 pode ser produzida pelas células epiteliais e é considerada uma poderosa quimiocina de neutrófilos na MI induzida por 5-FU orquestrada pela IL-4^(50, 55, 56).

Soares *et al.*⁽⁹⁾ observaram aumento da atividade da MPO em todos os seguimentos do intestino de ratos com mucosite induzida por 5-FU (150mg/kg) no D3. Cheah *et al.*⁽²²⁾ constataram efeito análogo em ratos com MI (5-FU - 150mg/kg) e o pré-tratamento com GSE reduziu a atividade dessa enzima. Utilizando a mesma dose de 5-FU do presente trabalho, Leocádio *et al.*⁽¹⁵⁾ obtiveram o mesmo aumento desse marcador no intestino de camundongos no D3, sendo que a ingestão de L-arginina durante dez dias, promoveu redução do infiltrado neutrofílico igualando aos grupos controle. Outro estudo também constatou aumento da atividade dessa enzima três dias após a indução da MI em ratos (5-FU - 150 mg/kg ip), enquanto que a ingestão previa de vitamina E promoveu redução da atividade intestinal da MPO⁽⁶⁾.

Portanto, sugerimos que nosso modelo de mucosite induziu o influxo neutrofílico através do epitélio do ID. No entanto, essa migração foi mais tardia, diferentemente dos referidos estudos. Visto que a injúria epitelial está relacionada à uma marcada infiltração de neutrófilos na fase inflamatória da mucosite mediada por quimioterapia⁽¹¹⁾. Ao contrário do

esperado, o presente estudo constatou que o grupo pré-tratado e com MI apresentou maior atividade da mieloperoxidase assim como maior infiltrado de células polimorfonucleares no D3. Semelhantemente, Whittaker *et al.*⁽¹⁶⁾ constataram aumento da atividade da MPO no jejuno de ratos (5-FU - 150mg/kg) que receberam um extrato de amêndoas por onze dias nesse mesmo período. Foi sugerido efeito imunoestimulador desse tratamento no intestino delgado e isso foi imputado ao teor do ω -6 presente no extrato.

A partir dessas constatações e da secreção aumentada de sIgA observada em nosso estudo, sugerimos que em nosso modelo experimental a ingestão de açaí promoveu efeito oposto a outros compostos dietéticos. Propomos estimulação de componentes do açaí, dentre eles, os polissacarídeos e ω -6, em vias pró-inflamatórias que atuam em resposta à citotoxicidade do 5-FU, no sentido de combaterem a agressão intestinal e de acelerar a regeneração tecidual, pois como observado na análise histopatológica, sete dias após a indução da MI o jejuno estava quase que completamente regenerado, diferentemente do grupo que recebeu somente 5-FU.

Surpreendentemente, no D7 foi observado o mesmo perfil de atividade da MPO no grupo com MI que recebeu o pré-tratamento. Esse achado não corrobora com nossos resultados anteriores, pois diferentemente do grupo não tratado, foi observado maior regeneração tecidual e menor requerimento da atividade da enzima CAT sete dias após a exposição ao 5-FU. Todavia, sugere-se que a permanência da atividade da MPO nesse grupo pré-tratado e com MI, se deve possivelmente à manutenção da maior presença de neutrófilos intestinais estimulada por componentes do açaí até que o tecido intestinal esteja completamente regenerado. Essas células não exercem somente efeito deletério mas também facilitam a regeneração da mucosa liberando mediadores necessários para a resolução da inflamação⁽⁵³⁾. Visto que a resolução da resposta inflamatória e consequente regeneração tecidual são completas a partir do momento em que as células inflamatórias retomam ao número e fenótipo normais do tecido⁽²³⁾.

Soares *et al.*⁽⁵⁵⁾ constaram diminuição do número de neutrófilos e da concentração da IL-8, TNF- α e IL-1 β no duodeno de camundongos IL-4 -/- que receberam 5-FU. Contudo, nesse mesmo trabalho foi observado aumento dos níveis duodenais desses mesmos componentes da resposta imune nos animais IL-4 +/+. Todavia, esse mesmo grupo de pesquisadores⁽⁵⁶⁾, demonstrou que a atividade da IL-4 na MI mediada por 5-FU, também depende da IL-6, sendo que a concentração dessa citocina (IL-6), não foi alterada no duodeno de camundongos que receberam um antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), mostrando que a IL-6 pode independe de IL-1 na MI induzida por 5-FU. Sonis⁽²⁰⁾ expôs que a IL-6 participa dos mecanismos de iniciação e manutenção da mucosite juntamente com o TNF- α e a IL-1 β . Outro estudo que avaliou a concentração de IL-6 no ID de camundongos com MI (5-FU - 200mg/kg), observou aumento dessa citocina no grupo mucosite⁽¹⁴⁾. A partir dos nossos resultados da análise da resposta infamatória, podemos assim sugerir que em

nosso modelo experimental as citocinas IL-4, IL-6 e IL-8 podem estar mais atuantes nos grupos com MI, não nos permitindo constatar se a ingestão prévia de polpa de açaí promove ou não alguma resposta nesse contexto.

2. Conclusões

Utilizando um modelo de MI induzida por 5-FU, demonstramos efeito favorável dos componentes da polpa do *Euterpe oleracea* Martius na regeneração tecidual e na evolução ponderal. Nosso estudo também demonstrou capacidade antioxidante do açai em condição de estresse oxidativo mediada por agente citotóxico e propôs potencial atuação de seus compostos em vias pró-inflamatórias. Sugerimos também, uma habilidade de componentes do açai, como os polifenóis, polissacarídeos e ácidos graxos, em atuar nessas vias no sentido de mobilizar mecanismos de defesa na finalidade de combater agentes agressores e de acelerar o reparo da mucosa intestinal.

3. Considerações finais

O fornecimento de material biológico limitante nos grupos com MI, gera limitações quanto as análises possíveis de serem realizadas. No entanto, o presente trabalho encontrou desafios que foram possíveis de serem transpassados. Outras análises são sugeridas, dentre elas, a dosagem de biomarcadores do estresse oxidativo (MDA, proteínas carboniladas e NO), a determinação de outras citocinas (IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10), da atividade do fator de transcrição NF- κ B (NF- κ B fosforilada) e das enzimas MPO e EPO no jejuno.

Referências

1. Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*. 2006;14(9):890-900.
2. Keefe DMK. The effect of cytotoxic chemotherapy on the mucosa of the small intestine / by Dorothy Mary Kate Keefe. 1998.
3. Keefe D, Brealey J, Goland G, Cummins A. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*. 2000;47(5):632-7.
4. Han X, Wu Z, Di J, Pan Y, Zhang H, Du Y, et al. CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(8):547-54.
5. Song MK, Park MY, Sung MK. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *J Cancer Prev*. 2013;18(4):322-9.
6. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Asmari SA, Al-Rawi A, Al-Omani S. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. *J Complement Integr Med*. 2016;13(4):377-85.
7. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2018;28(4):262-7.
8. Generoso Sde V, Rodrigues NM, Trindade LM, Paiva NC, Cardoso VN, Carneiro CM, et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis*. 2015;14:54.
9. Soares PM, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AM, Brito GA, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;63(1):91-8.
10. Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*. 1999;116(1):7-14.
11. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004;100(9 Suppl):1995-2025.
12. Edens HA, Levi BP, Jaye DL, Walsh S, Reaves TA, Turner JR, et al. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J Immunol*. 2002;169(1):476-86.
13. Keefe DM. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. *Support Care Cancer*. 2004;12(1):6-9.
14. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RR, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids*. 2012;47(7):669-78.

15. Leocadio PC, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DC, et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. *Nutr Cancer*. 2015;67(3):486-93.
16. Whittaker AL, Zhu Y, Howarth GS, Loung CS, Bastian SEP, Wirthensohn MG. Effects of commercially produced almond by-products on chemotherapy-induced mucositis in rats. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017;8(4):176-87.
17. McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;99(3):157-68.
18. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):323-33.
19. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus*. 22(5):E2.
20. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.
21. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res*. 2010;695(1-2):22-8.
22. Cheah KY, Howarth GS, Yazbeck R, Wright TH, Whitford EJ, Payne C, et al. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(4):382-90.
23. Sá OMdS. Efeitos da glicina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamster. 2010.
24. Kang MH, Kim BH. Oral Wound Healing Effects of Acai Berry Water Extracts in Rat Oral Mucosa. *Toxicol Res*. 2018;34(2):97-102.
25. Wu ZQ, Han XD, Wang Y, Yuan KL, Jin ZM, Di JZ, et al. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(1):87-96.
26. Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN, Paiva NC, Cardoso VN, Fernandes SO, et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *J Negat Results Biomed*. 2014;13:6.
27. Pritchard DM, Potten CS, Hickman JA. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res*. 1998;58(23):5453-65.
28. Yang G, Wang H, Kang Y, Zhu MJ. Grape seed extract improves epithelial structure and suppresses inflammation in ileum of IL-10-deficient mice. *Food Funct*. 2014;5(10):2558-63.
29. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26(7-8):804-10.

30. Ribeiro SMR, de Queiroz JH, Pelúzio MdCG, Costa NMB, da Matta SLP, de Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. 21. 2005.
31. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006;54(22):8604-10.
32. Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, et al. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):327-33.
33. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
34. Barbosa PO, Pala D, Silva CT, de Souza MO, do Amaral JF, Vieira RA, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. *Nutrition*. 2016;32(6):674-80.
35. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-60.
36. Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR. Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216(1):313-20.
37. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):262-9.
38. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 2012;60(4):1084-93.
39. Archela E, Dall'Antonia LH. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. 2013;34(2):193-210.
40. Williamson G, Clifford MN. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2017;139:24-39.
41. Williams DA. Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001(29):26-30.
42. Fukatsu K, Kudsk KA. Nutrition and Gut Immunity. *Surg Clin North Am*. 2011;91(4):755-70.
43. Jankovic L, Jelic S, Filipovic-Ljeskovic I, Ristovic Z. Salivary immunoglobulins in cancer patients with chemotherapy-related oral mucosa damage. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31b(3):160-5.
44. Harrison T, Bigler L, Tucci M, Pratt L, Malamud F, Thigpen JT, et al. Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist*. 1998;18(3):109-12.
45. Nagayoshi H, Fukatsu K, Ueno C, Hara E, Maeshima Y, Omata J, et al. 5-Fluorouracil infusion reduces gut-associated lymphoid tissue cell number and mucosal immunoglobulin A levels. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2005;29(6):395-400.

46. Barros PA, Generoso SV, Andrade ME, da Gama MA, Lopes FC, de Sales ESEL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer*. 2017;69(1):168-75.
47. Fukatsu K, Nagayoshi H, Maeshima Y, Ueno C, Saitoh D, Mochizuki H. Fish oil infusion reverses 5-fluorouracil-induced impairments in mucosal immunity in mice. *Clin Nutr*. 2008;27(2):269-75.
48. Holderness J, Schepetkin IA, Freedman B, Kirpotina LN, Quinn MT, Hedges JF, et al. Polysaccharides Isolated from Açai Fruit Induce Innate Immune Responses. *PLoS One*. 2011;6(2).
49. Souza AL, Fiorini Aguiar SL, Gonçalves Miranda MC, Lemos L, Freitas Guimaraes MA, Reis DS, et al. Consumption of Diet Containing Free Amino Acids Exacerbates Colitis in Mice. *Front Immunol*. 2017;8.
50. Izzo RS, Witkon K, Chen AI, Hadjiyane C, Weinstein MI, Pellecchia C. Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1992;87(10):1447-52.
51. Kanofsky JR, Wright J, Tauber AI. Effect of ascorbic acid on the production of singlet oxygen by purified human myeloperoxidase. *FEBS Lett*. 1985;187(2):299-301.
52. McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol*. 1993;123(4):895-907.
53. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):354-66.
54. Du J, Shen X, Zhao Y, Hu X, Sun B, Guan W, et al. Wip1-deficient neutrophils significantly promote intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Curr Mol Med*. 2015;15(1):100-8.
55. Soares PM, Mota JM, Souza EP, Justino PF, Franco AX, Cunha FQ, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*. 2013;61(1):46-9.
56. Soares PMG. Mucositis intestinal experimental induced by 5-fluorouracil : role IL-1 β , IL-4 and PAF and evaluation of the alterations of motility gastrointestinal. 2008.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Monte do Cruzeiro - ICEB-4, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax (31) 3559-1370
E-mail: ceua@ufop.edu.br



OFÍCIO CEUA Nº. 182/2016, de 14 de Dezembro de 2016

Ilustríssima(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Joana Ferreira Amaral
DENCs/ENUT

Senhor(a) Pesquisador(a),

Considerando o adendo enviado na dia 30/11/2016, estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. 2016/17, intitulado "Efeito imunomodulador da dieta na mucosite: o papel da retirada estimulação antigênica das proteínas da dieta e do consumo de açai (*Euterpe oleracea* mart.) na inflamação induzida por 5-fluorouracil em camundongos BALB/c."

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.