



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO



LARYSSA CAROLINE MACIEL GOMES

Efeitos da suplementação da polpa do Açaí (*Euterpe oleracea Martius*) na resposta reguladora dos linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Ouro Preto - MG
2022

LARYSSA CAROLINE MACIEL GOMES

Laryssa.gomes@aluno.ufop.edu.br

Efeitos da suplementação da polpa do Açaí (*Euterpe oleracea Martius*) na resposta reguladora dos linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Trabalho de conclusão de curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para finalização da graduação sob a orientação da prof.^a Dr.^a Joana Ferreira do Amaral.

OURO PRETO

2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO



Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:

“Efeitos suplementação da polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) na resposta reguladora nos linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil”.

Aos quatorze dias do mês de janeiro de 2022, remotamente (on-line) pelo aplicativo Google Meet no link: <https://meet.google.com/kte-ctxz-kpz>, para a Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante **Laryssa Caroline Maciel Gomes** orientada pela Prof^a. Joana Ferreira do Amaral. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovar a estudante.

Membros da Banca Examinadora:

Joana Ferreira do Amaral
Joana Ferreira do Amaral
Ouro Preto
2022.01.18 13:00:42-03'00"
Prof^a. Joana Ferreira do Amaral
Presidente (DENCs/ENUT/UFOP)

SILVIA FERNANDES
MAURICIO:08800443656
Assinado de forma digital por SILVIA FERNANDES
MAURICIO:08800443656
Dados: 2022.01.18 15:03:09 -03'00"
Prof^a. Silvia Fernandes Maurício
Examinadora (DENCs/ENUT/UFOP)

THAIS DA SILVA
SABIAO:08392073606
Assinado de forma digital por THAIS DA SILVA
SABIAO:08392073606
Dados: 2022.01.18 20:22:32 -03'00"
Doutoranda Thais Sabião
Examinadora (PPGSN/ENUT/UFOP)

Campus Universitário Morro do Cruzeiro
35400-000 – Ouro Preto - MG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe e ao Mateus que sempre me deram força para continuar, sem vocês eu não estaria aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por todas as conquistas alcançadas, sem ele eu não estaria aqui. Em segundo lugar, agradeço à minha mãe, que sempre foi meu porto seguro, independente de qualquer coisa. Agradeço ao meu pai, pelo amor e incentivo por todos esses anos.

Agradeço ao Wellington, que me deu diversas oportunidades de estudo e pelas conversas intermináveis para o meu crescimento pessoal. À Fernanda, por todos os anos de amor, conversas, conselhos e carinho. Aos meus irmãos e avós, por serem sempre presentes em minha vida e que de certa forma sempre me incentivaram.

Agradeço ao meu namorado Mateus, pelos anos de companheirismo, carinho e por sempre ter acreditado em mim e me incentivado. Aos meus familiares e amigos por sempre serem meu porto seguro. Em especial, à Júlia que foi minha maior companheira ao longo dos anos de UFOP e também na execução deste trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas do 17.2 e professores, sem vocês meu crescimento pessoal e profissional não teria sido possível. Em especial, à minha professora e orientadora Joana, por me aceitar como aluna e por me auxiliar com muita dedicação nessa caminhada.

Por fim, agradeço à ENUT e a todos os seus servidores, por me acolherem tão bem nessa amada escola.

RESUMO

A mucosite intestinal (MI) é uma doença inflamatória de alta incidência em pacientes oncológicos, atingindo cerca de 10 a 40% na quimioterapia padrão e até 100% em dosagens altas. As consequências dessa doença são inúmeras, o que, muitas vezes, pode prejudicar a continuidade do tratamento. Atualmente, não há a utilização de métodos terapêuticos eficazes contra a doença. Diversos estudos experimentais já mostram os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do açaí (*Euterpe oleracea Martius*), fruto tipicamente brasileiro, amplamente encontrado na região norte do país e cada vez mais consumido pela população mundial. Diante desse cenário, o presente estudo buscou relacionar os efeitos anti-inflamatórios do açaí em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida pelo 5-FU através da dosagem da citocina IL-10. O modelo experimental se deu a partir do fornecimento de dieta com 2% de polpa de açaí para os camundongos BALB/c por 14 dias e que foram divididos em oito grupos, sendo eles: 3D - Controle; Mucosite; Açaí e Açaí-Mucosite; 7D - Controle; Mucosite; Açaí e Açaí-Mucosite. No décimo quinto dia, parte dos animais receberam injeção intraperitoneal única de 5-FU (200mg/kg), sendo os 4 primeiros grupos eutanasiados 3 dias após (3D) e os outros 4 grupos eutanasiados 7 dias após a injeção (7D). Após a eutanásia, foram coletados os tecidos dos camundongos, incluindo o Linfonodo Mesentérico de todos os grupos, para posterior análise da concentração IL-10. A extração de proteína foi realizada de acordo com protocolos pré-definidos. A ingestão de 2% de açaí para os grupos do 3D não foram estatisticamente significantes, podendo ser devido ao menor tempo para manifestação da doença e recuperação do tecido. Para os grupos de 7D, os resultados se mostraram satisfatórios, sendo que a concentração de IL-10 mostrou-se com níveis mais baixos para os grupos de mucosite e açaí mucosite e com níveis um pouco mais elevados para os grupos controle e açaí, com significância estatística. A partir dos resultados encontrados comparando-se os grupos 3D e 7D, foi possível inferir que com 7 dias após a indução da MI, para os animais suplementados com a polpa do açaí a 2%, o organismo já parece ser capaz de se recuperar e responder de forma a diminuir os efeitos da doença. Contudo, vale ressaltar que os mecanismos de ação da mucosite em relação aos processos inflamatórios são de grande complexidade, podendo ter diferentes desfechos dependendo do organismo em que atua. Dessa forma, há a necessidade de se desenvolver estudos mais aprofundados sobre os efeitos dos flavonóides presentes no *Euterpe oleracea Martius* (Açaí) nos linfonodos mesentéricos (LnM) de camundongos Balb/c com MI induzida por 5-FU.

Palavras-chave: Mucosite, 5-fluorouracil, Açaí, Inflamação, IL-10.

ABSTRACT

Intestinal mucositis (IM) is an inflammatory disease of high incidence in cancer patients, reaching about 10 to 40% in standard chemotherapy and up to 100% in high doses. The consequences of this disease are numerous, which can often impair the continuity of treatment. Currently, there is no use of effective therapeutic methods against the disease. Several experimental studies have already shown the antioxidant and anti-inflammatory effects of açai (Euterpe oleracea Martius), a typically Brazilian fruit, widely found in the northern region of the country and increasingly consumed by the world population. Given this scenario, the present study sought to relate the anti-inflammatory effects of açai in BALB/c mice with intestinal mucositis induced by 5-FU by measuring the cytokine IL-10. The experimental model was based on the supply of a diet with 2% of açai pulp to BALB/c mice for 14 days, which were divided into eight groups, namely: 3D - Control; mucositis; Acai and Acai-Mucosite; 7D - Control; mucositis; Acai and Acai-Mucosite. On the fifteenth day, part of the animals received a single intraperitoneal injection of 5-FU (200mg/kg), the first 4 groups being euthanized 3 days later (3D) and the other 4 groups euthanized 7 days after the injection (7D). After euthanasia, the tissues of the mice were collected, including the Mesenteric Lymph Node of all groups, for further analysis of the IL-10 concentration. Protein extraction was performed according to predefined protocols. The intake of 2% of açai for the 3D groups was not statistically significant, which may be due to the shorter time for disease manifestation and tissue recovery. For the 7D groups, the results were satisfactory, with the IL-10 concentration showing lower levels for the mucositis and açai mucositis groups and slightly higher levels for the control and açai groups, with statistical significance. From the results found comparing the 3D and 7D groups, it was possible to infer that 7 days after the induction of IM, for the animals supplemented with 2% açai pulp, the organism already seems to be able to recover and respond in order to lessen the effects of the disease. However, it is worth mentioning that the mechanisms of action of mucositis in relation to inflammatory processes are of great complexity, and may have different outcomes depending on the organism in which it acts. Thus, there is a need to develop further studies on the effects of flavonoids present in Euterpe oleracea Martius (Açai) on the mesenteric lymph nodes (LnM) of Balb/c mice with MI induced by 5-FU.

Keywords: Mucositis, 5-fluorouracil, Acai, Inflammation, IL-10.

LISTA DE ABREVIATURAS

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

5-FU - 5 Fluoracil

LnM - Linfonodo Mesentérico

MI - Mucosite Intestinal

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1- β

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

ROS - Espécies reativas de oxigênio

NF- κ B - Fator nuclear κ B

RT - Radioterapia

CT - Quimioterapia

MMP - Metaloproteinase da matriz

COX-2 - Ciclooxygenase-2

TS - Timidilato sintase

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

AR - Artrite reumatóide

CCA - Centro de Ciência Animal

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CTL - Dieta Controle

MUC - Mucosite

PBS - Tampão fosfato-salino

IP - Intraperitoneal

TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano

NaCl - Cloreto de sódio

EDTA - Deoxicolato de sódio

SDS - Duodecil sulfato de sódio

DP - Desvio Padrão

DPD - Diidropirimidina desidrogenase

DHFU - Dihidrofluorouracil

FUMP - Monofosfato de fluorouridina

FUDP - Difosfato de fluorouridina

FUTP - Trifosfato de fluorouridina

FdUMP - Monofosfato de fluorodeoxiuridina

FdUDP - difosfato de fluorodeoxiuridina

FdUTP - trifosfato de fluorodeoxiuridina

TS - timidilato sintetase

TK - timidina cinase

FUDR - fluorodeoxiuridina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Segunda fase Mucosite: Regulação e geração de sinais de mensageiro de acordo com Stephen et al., 2004

Figura 2 - Regulação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) de acordo com Stephen et al., 2004

Figura 3 - Terceira fase Mucosite: Sinalização e amplificação de acordo com Stephen et al., 2004

Figura 4 - Metabolismo Hepático do 5-FU (Longley, Harkin e Johnston, 2003).

Figura 5 - Esqueletos básicos de flavonóides

Figura 6 - Açaizeiro

Figura 7 - Desenho esquemático do delineamento experimental.

Figura 8 - Concentração de IL-10 de 3 dias em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico, com desvio padrão.

Figura 9 - Concentração de IL-10 de 3 dias em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico, com desvio padrão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de flavonóides e descrição de suas características básicas.

Tabela 2: Composição das dietas experimentais AIN-93M padrão e contendo açai.

Tabela 3: Concentração de IL-10 em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Mucosite Inflamatória	
2.2. Flavonoides	20
2.3. Açai (Euterpe oleracea Martius)	22
JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo Geral	25
4.2. Objetivos Específicos	25
METODOLOGIA	26
5.1 Protocolo experimental	26
5.1.1 Animais e dieta experimental	26
5.1.2 Delineamento experimental	27
5.1.3 Indução da mucosite intestinal	28
5.1.4 Eutanásia e coleta de material biológico	29
5.2 Variáveis avaliadas	29
5.2.1 Ingestão alimentar, peso corporal e registro da sobrevivência	29
5.3 Dosagens bioquímicas e imunoenzimáticas	30
5.3.1 Extração de proteínas	30
5.3.2 Determinação da concentração de IL-10 no Linfonodo Mesentérico	30
5.4 Análise estatística	31
RESULTADOS	31
6.1 Linfonodo Mesentérico	31
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde no mundo. Isso pode ser observado através de dados obtidos pela estimativa mundial GLOBOCAN (2018), produzida pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer. Tal pesquisa aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. Em relação ao Brasil, um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima que o país terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019).

A mucosite é o termo utilizado para caracterizar uma doença inflamatória provocada pela quimioterapia ou radioterapia em pacientes oncológicos (PEREIRA, 2013). Essa reação pode ocorrer em 10 a 40% dos pacientes que recebem a quimioterapia padrão e pode chegar até 100% nos pacientes que recebem dosagem alta. Seus principais sintomas são dor e eritema na cavidade oral, náuseas, vômitos, edema, dor abdominal e diarreia, quando se trata de sintomas gastrointestinais (ARAÚJO, 2013). Esse quadro pode levar a interrupções ou prejuízos no tratamento quimioterápico utilizado, o que influenciará diretamente na resposta clínica e sobrevida do paciente (PESSOA, 2019).

Um dos principais fármacos utilizados no tratamento quimioterápico em pacientes oncológicos é o 5-Fluorouracil (5-FU). Isso porque ele tem a função de inibir moléculas de DNA e/ou RNA, fazendo com que não haja a síntese e metabolismo de novas células (LEOCÁDIO, 2013). Por intervir no processo de síntese de RNA e do DNA, o 5-FU afeta em maior percentual as células com alto índice mitótico, como as da medula óssea e do trato gastrointestinal, podendo gerar efeitos adversos como a mucosite nesses órgãos (LEOCÁDIO, 2013). Segundo Pessoa, os tratamentos clínicos para mucosite, em sua maioria, são os paliativos, através do uso de agentes microbianos, antiinflamatórios e protetores de mucosa. (PESSOA, 2019). Isso faz com que surja a necessidade de se desenvolver um tratamento que seja mais eficaz e menos prejudicial ao paciente.

Os flavonoides são substâncias presentes no grupo dos compostos fenólicos, os quais possuem ampla distribuição em frutas, legumes, vegetais e grãos, sendo os mais comuns a quercetina (flavonois), antocianinas, resveratrol e flavonona (hesperidina). Tais compostos são importantes para o organismo devido a sua função antioxidante e anti-inflamatória. Seu papel e metabolismo no organismo ainda não são totalmente conhecidos, fazendo com que haja a necessidade de se realizar estudos mais aprofundados na área (PIMENTEL et al, 2019).

O açaí (*Euterpe oleracea Martius*) é um fruto proveniente do açaizeiro, uma palmeira nativa da América do Sul, e é amplamente encontrado em regiões do Norte e Nordeste do Brasil. Ao longo dos anos, ele vem sendo amplamente comercializado ao longo do país, tendo boa aceitação pelos consumidores. Uma das propriedades mais importantes e mais estudadas do açaí é a sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, as quais ocorrem devido à presença de flavonóides, como as antocianinas, chegando a possuir até dez vezes mais antioxidantes do que a uva, a qual já tem suas propriedades amplamente estudadas (MAGALHÃES, 2018). Um estudo mostrou que o fruto chega a ter uma concentração de 3,1919 mg de antocianinas/g de peso seco (SCHAUSS et al, 2006).

Alguns estudos experimentais realizados por grupos de pesquisadores da Universidade Federal de Ouro Preto já demonstraram o grande potencial anti-inflamatório e antioxidante do açaí. Segundo resultados encontrados por Magalhães (2018), utilizando-se modelo de MI induzida por 5-FU em camundongos, foi possível encontrar efeito favorável através da suplementação com polpa do *Euterpe oleracea Martius*, o qual é um alimento rico em flavonóides, na regeneração tecidual e na evolução ponderal, com potencial atuação em vias pró-inflamatórias. Contudo, ainda não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse a relação entre o consumo da polpa do açaí e o efeito anti-inflamatório em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Dessa forma, foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos dos flavonóides presentes no *Euterpe oleracea Martius* (Açaí) nos linfonodos mesentéricos (LnM) de camundongos Balb/c com MI induzida por 5-FU através da suplementação com a polpa do açaí a 2%.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mucosite Inflamatória

A mucosite é uma inflamação decorrente de tratamentos quimioterápicos e radioterápicos em pacientes oncológicos, a qual pode afetar, com frequência, a cavidade oral e/ou o trato gastrointestinal. Isso ocorre pois, muitas vezes, os medicamentos utilizados durante esses processos são pouco seletivos, atingindo também células saudáveis, aliado à alta taxa de proliferação de tecidos da mucosa digestiva, desde a boca até o ânus (PEREIRA, 2013).

Durante muito tempo, acreditou-se que o efeito dos tratamentos oncológicos nos pacientes eram derivados de lesões diretas no tecido epitelial. Contudo, segundo dados obtidos por Stephen e cols (2004), evidências morfológicas já mostram que o dano causado nesse tecido é precedido por danos nos tecidos endotelial e conjuntivo. Aliado a isso, foi possível observar, ainda, significativa relação entre citocinas pró-inflamatórias e a toxicidade da mucosa, evidenciados através de níveis aumentados de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e interleucina IL-1 β no sangue de pacientes em tratamento quimioterápico.

Stephen e cols. (2004) dividiram o processo de lesão do Trato Gastrointestinal em cinco fases: iniciação, regulação positiva, sinalização e amplificação, ulceração com inflamação e a cura. A fase chamada de iniciação começa através da ação dos agentes quimioterápicos e radioativos, os quais são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo que causam, diretamente, lesões e danos às células, tecidos e vasos sanguíneos.

A fase de regulação inicia-se quando as ROS geram danos no DNA, com posterior morte celular nos tecidos epiteliais, ativação de macrófagos que geram lesão tecidual ou maior produção de TNF- α e ativação de vias que induzem diretamente a apoptose, como a via da ceramida, exemplificados na Figura 1. Aliado a isso, a quimio/radioterapia ativam a transcrição do fator nuclear- κ B (NF- κ B), o qual tem a capacidade de levar a regulação positiva de alguns genes de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, expressão de moléculas de adesão, ativação da via ciclooxigenase-2 e consequente angiogênese, como mostrado na Figura 2. Tudo isso tende a gerar lesão tecidual e posterior apoptose (STEPHEN et al., 2004).

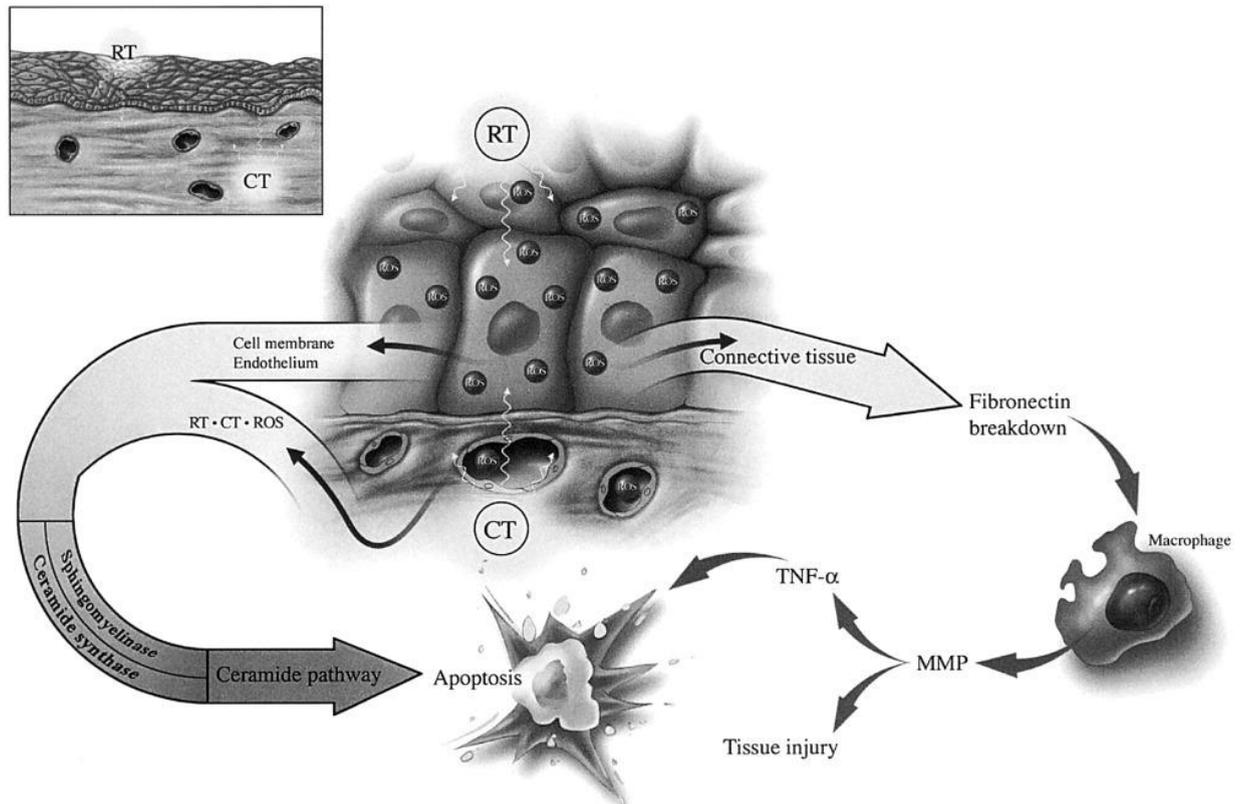


Figura 1 - Segunda fase Mucosite: Regulação e geração de sinais de mensageiro de acordo com Stephen et al. (2004).

Durante a regulação positiva e geração de sinais de mensageiros, enzimas (esfingomielinase e ceramida sintase) que catalisam a síntese de ceramida são ativadas diretamente por radioterapia (RT) ou quimioterapia (CT) ou indiretamente por espécies reativas de oxigênio (ROS) e fator de necrose tumoral (TNF- α). A via da ceramida fornece um canal alternativo para a apoptose de células epiteliais submucosas e basais. Além disso, a degradação da fibronectina leva à ativação de macrófagos e subsequente lesão tecidual mediada pela metaloproteinase da matriz (MMP) e produção de TNF- α adicional.

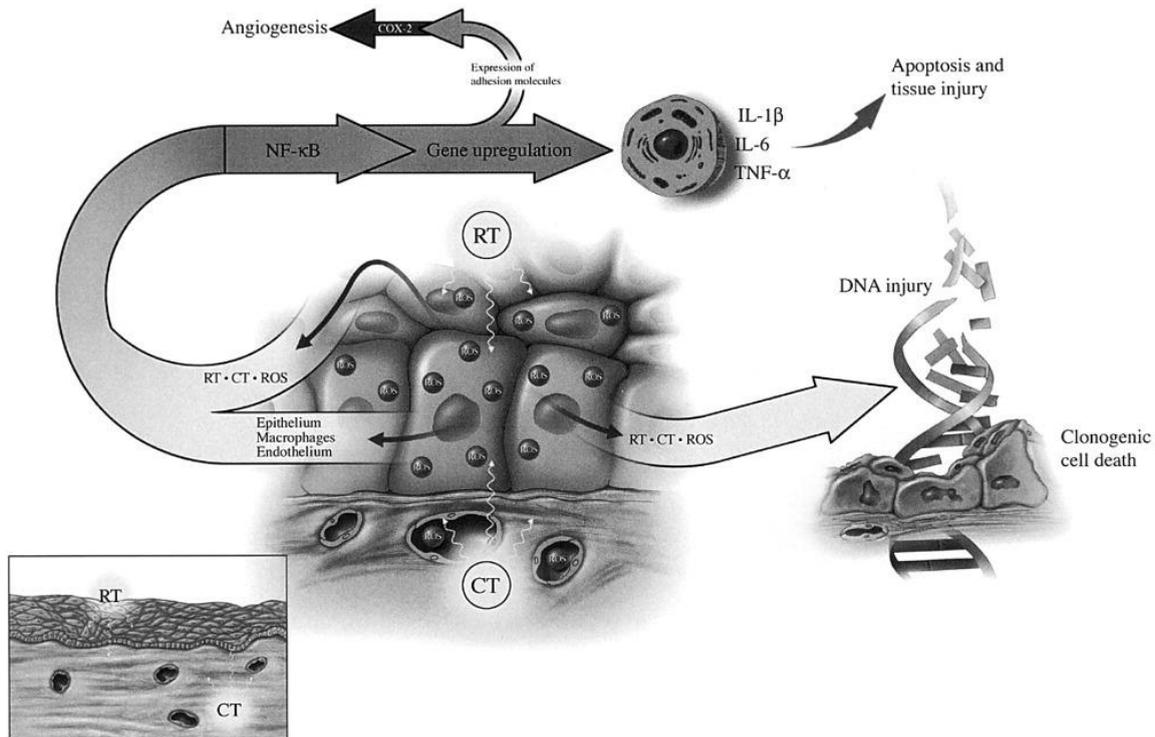


Figura 2 - Regulação do fator nuclear-κB (NF-κB) de acordo com Stephen et al. (2004).

A quimioterapia (CT) ou radioterapia (RT) pode iniciar a mucosite diretamente, causando quebras nas fitas de DNA, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou através da ativação enzimática ou de fator de transcrição em múltiplos elementos celulares dentro da mucosa. ROS podem danificar outras células e tecidos diretamente e também estimular mediadores secundários de lesão, incluindo fatores de transcrição como fator nuclear-κB (NF-κB). Quando os sinais do mensageiro são regulados e gerados, vários eventos ocorrem simultaneamente. ROS causam danos ao DNA levando à morte celular clonogênica. A ativação de fatores de transcrição em resposta a ROS, RT ou CT resulta na regulação positiva de genes, incluindo os genes fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e as interleucinas (IL-1β) e IL-6, levando a lesão de tecido e apoptose de células dentro da submucosa e lesão primária de células dentro do epitélio basal. Outros genes também são regulados positivamente, levando à expressão de moléculas de adesão, ciclooxigenase-2 (COX-2), e subsequente angiogênese (STEPHEN et al., 2004).

Posteriormente, durante a fase denominada como de sinalização e amplificação, há a atuação de citocinas inflamatórias diretamente na expansão das lesões de mucosa. Isso foi evidenciado através da ação da TNF-α como ativador de vias que geram lesões, como as de ceramida, caspase e de transcrição mediada por NF-κB, como apresentado na Figura 3 (STEPHEN et al., 2004).

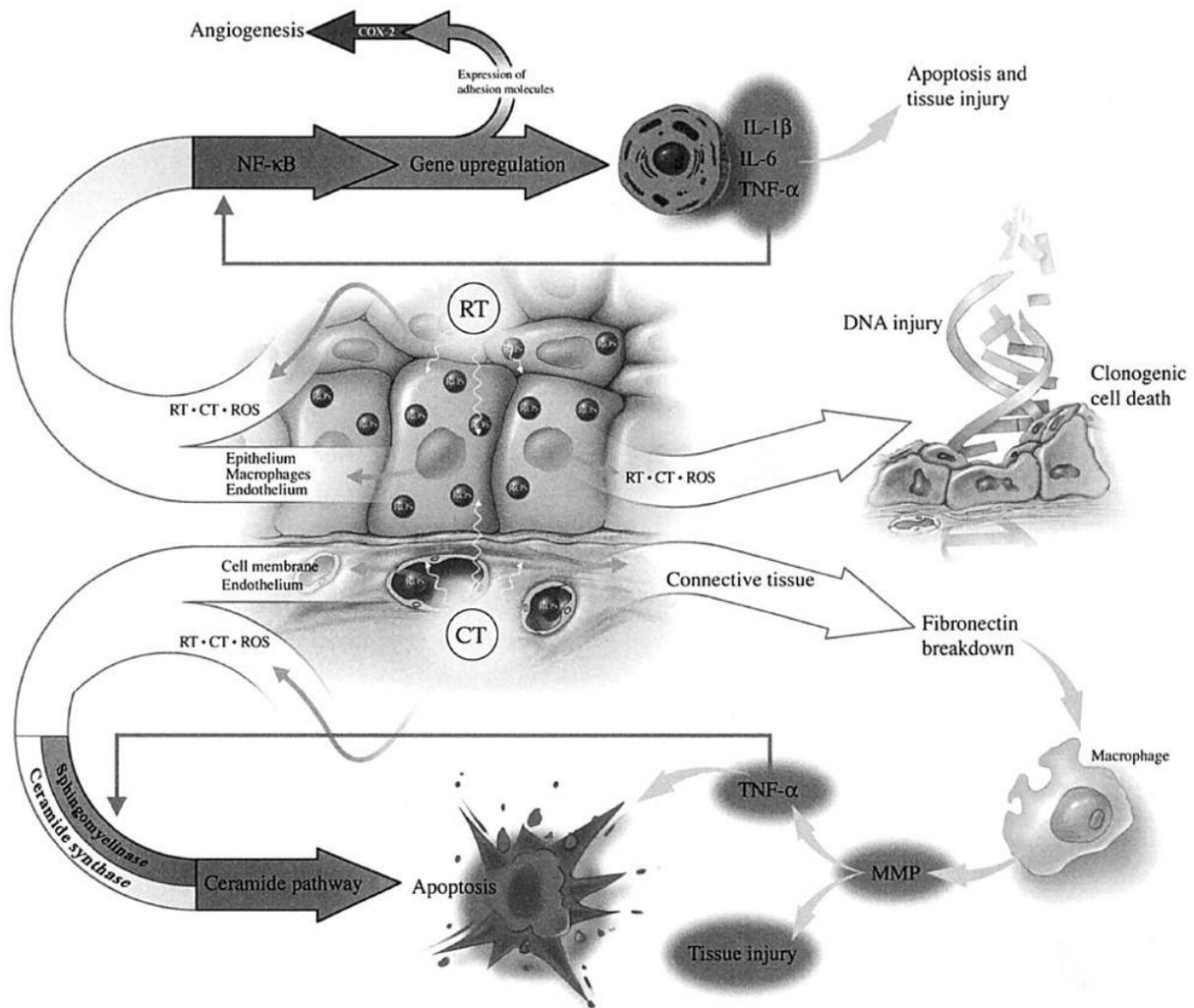


Figura 3 - Terceira fase Mucosite: Sinalização e amplificação de acordo com Stephen et al. (2004). Durante a fase de sinalização e amplificação, uma consequência da inundação de mediadores liberados em resposta ao insulto inicial é uma série de loops de feedback positivo que servem para amplificar e prolongar a lesão do tecido por meio de seus efeitos nos fatores de transcrição e nas vias da ceramida e da caspase (não mostrado). Consequentemente, a regulação positiva do gene ocorre com aumentos resultantes na produção de citocinas prejudiciais. Como os eventos prejudiciais estão focados na submucosa e no epitélio basal, a aparência clínica da superfície da mucosa permanece aparentemente normal. CT: quimioterapia; IL: interleucina; MMP: metaloproteínase de matriz; NF-κB: fator nuclear-κB; ROS: espécies reativas de oxigênio; RT: radioterapia; TNF-α, fator de necrose tumoral-α (STEPHEN et al., 2004).

A fase de ulceração é a que tem maior associação à inflamação e a mais sintomática. Durante esse período, é possível observar lesões mais graves, como úlceras, com infiltrado inflamatório formado por células polimorfonucleares e inflamatórias redondas, ocasionado por todos os processos supracitados e que estimulam a colonização de células bacterianas gram-positivas, gram-negativas e anaeróbias. Como consequência desse processo, há uma amplificação na produção de citocinas, maior área de inflamação e dor, com consequente

aumento do risco de bacteremia e sepse. Isso faz com que a mucosite se torne um fator limitante no processo de tratamento do tumor, podendo comprometer a continuidade dos métodos quimio/radioterápicos.

Na última fase da mucosite, denominada por Stephen e cols (2004) como cura, há regeneração através da cicatrização dos tecidos afetados e restabelecimento da flora microbiana local. Contudo, essa fase depende do cenário clínico em que o paciente se encontra e, apesar de a mucosa intestinal estar aparentemente normal, o ambiente foi completamente modificado pelos processos inflamatórios sofridos. Isso pode acarretar em problemas futuros, como a maior suscetibilidade a episódios futuros de mucosite recorrente e suas complicações associadas ao tratamento de câncer.

Dentre os principais estudos relacionados à mucosite, o principal fármaco de indução utilizado é o 5-FU, o qual é um medicamento antimetabólico amplamente utilizado em tratamentos de pacientes oncológicos, principalmente para câncer colorretal. Porém, ele é um medicamento com baixa especificidade, ou seja, sua ação não se limita apenas às células neoplásicas. Estudos comprovam que as células mais afetadas são as de alto índice mitótico, como as da medula óssea, que resulta em granulocitopenia e trombocitopenia e do trato gastrointestinal, resultando em mucosite oral, mucosite intestinal, esofagite, gastrite, faringite, colite e diversas outras inflamações (LEOCÁDIO, 2013).

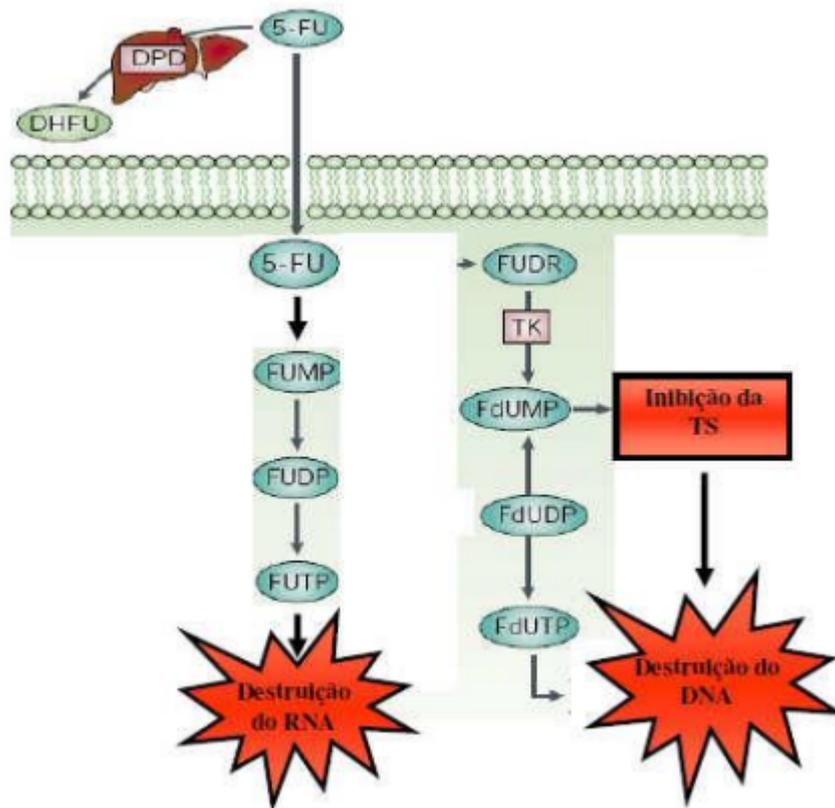


Figura 4 - Metabolismo do 5-FU (Longley, Harkin e Johnston, 2003). 5-FU – 5-Fluorouracil; DPD – diidropirimidina desidrogenase; DHFU – dihidrofluorouracil; FUMP – monofosfato de fluorouridina; FUDP – difosfato de fluorouridina; FUTP – trifosfato de fluorouridina; FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS – timidilato sintetase; TK – timidina cinase; FUDR - fluorodeoxiuridina.

As principais formas de toxicidade do 5-FU em relação às células do organismo animal, seriam através da incorporação do trifosfato de fluorouridina (FUTP) no RNA; Ou pela incorporação do difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) no DNA genômico; Ou, ainda, pela inibição da enzima timidilato sintetase (TS) que está relacionada à síntese de nucleotídeos (LONGLEY, et al, 2003). Dessa forma, por ter ação sobre enzimas, RNA e DNA das células, pode levar a pessoa a ter diversos sintomas como náuseas, vômitos e diarreia, além dos possíveis agravamentos, como a anorexia e a mucosite. Os efeitos podem variar de acordo com a dose, o esquema posológico, a via de administração e o estado geral do paciente (LEOCÁDIO, 2013). Por serem efeitos que podem agravar o caso dos pacientes oncológicos, esse medicamento acaba inviabilizando a continuidade desse tratamento. Dessa forma, faz-se extremamente necessário encontrar soluções para esses efeitos adversos.

2.2. Flavonoides

Os flavonóides compõem uma classe de substâncias naturais as quais não são capazes de serem produzidas pelo organismo humano. Em relação à estrutura, são formados por componentes aromáticos de 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, porém com uma diversidade estrutural muito grande. Isso se dá devido à grande capacidade que possuem de sofrer modificações, como a hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação e entre outros.

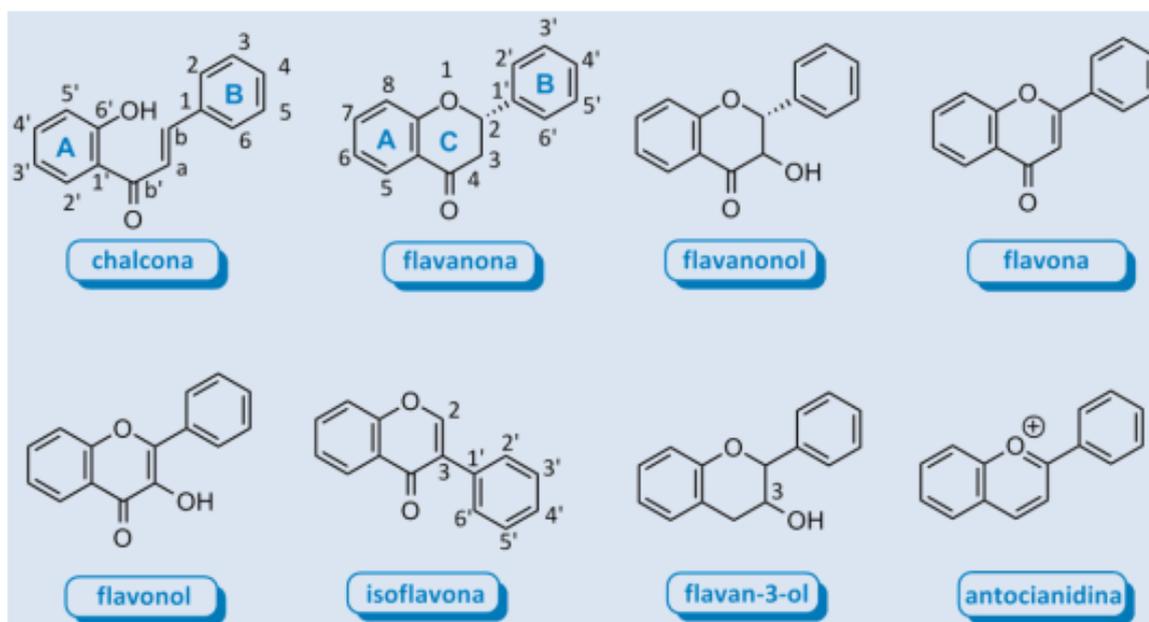


Figura 5 - Esqueletos básicos de flavonóides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009)

Tais compostos são geralmente provenientes de alimentos vegetais, como legumes, frutas, chás de ervas e mel. As principais classes e características dos diferentes tipos de flavonóides estão presentes na Tabela 1. Dentre os efeitos já conhecidos desses compostos no organismo humano, destacam-se a capacidade oxidativa, a qual é a que tem maior comprovação científica, atividade antiinflamatória e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti - hepatotóxica, atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais.

CLASSES	COLORAÇÃO	EXEMPLOS	COMENTÁRIOS
Antocianinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina; Delfinidina; Peonidina.	Antocianinas estão predominantemente em frutas e flores e provavelmente foram os primeiros flavonóides a serem isolados – provenientes de pigmentos florais, conforme indicam seus próprios nomes. São usadas como corantes.
Flavanas (mono, bi e triflavans)	Incolor	Catequina; Epicatequina Luteoforol; Procianidina. Theaflavina	Flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes e bebidas como chás e água de coco. O sabor peculiar de algumas bebidas, frutas, chás e vinhos é devido, principalmente, à presença das biflavanas.
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido.	Hesperidina; Naringenina.	Flavanonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Amarelo pálido	Apigenina; Luteolina; Diosmetina; Tangeretina; Nobiletina	Flavonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. Mas também em cereais, frutas, ervas e vegetais. Conferem o pigmento amarelo em flores. Os compostos mais comuns são a apigenina e a luteolina.
Flavonóis	Amarelo pálido	Quercetina; Rutina; Mircetina; Kaempherol	Os flavonóis estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas. A quercetina é o principal representante da classe.
Isoflavonóides	Incolor	Daidzeína; Genisteína.	Isoflavonóides são encontrados quase que exclusivamente em legumes, particularmente na soja.

Tabela 1: Principais classes de flavonóides e descrição de suas características básicas. Fonte:

https://paulasennafarma.webnode.com.br/files/200000094-1f27420215/17_f.pdf

Segundo estudo realizado por Lima e cols (2000), para avaliar o efeito dos flavonóides em coelhos machos albinos com hipercolesterolemia, foi possível inferir que a naringenina e chitosan, têm efeitos sobre lipídios no soro de coelhos com hiperlipidemia induzida por Triton. Em relação à atividade antiinflamatória, atuam na modulação de células envolvidas com a inflamação, inibindo a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró inflamatórias, como a TNF- e IL-1, modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (COUTINHO et al., 2009).

Devido ao grande número de flavonóides presentes em diferentes produtos de origem animal e à sua comprovada eficácia em diferentes mecanismos benéficos para a vida humana, fez-se necessário um estudo mais específico em relação à sua ação antiinflamatória.

2.3. Açaí (*Euterpe oleracea Martius*)

O *Euterpe oleracea Martius*, fruto popularmente conhecido como açaí é proveniente do açazeiro e encontrado em abundância na região amazônica. Tal fruto vem sendo reconhecido por suas inúmeras propriedades nutricionais e antioxidantes. A maior produção do açaí fica entre os meses de agosto a dezembro, porém, pode ser cultivado o ano todo. Em relação ao seu consumo pela população, já é possível encontrar no mercado alimentício, diversos produtos a base deste fruto, como bebidas energéticas, sorvetes, doces, geleias, licores e entre outros produtos (SILVA, 2021). Seus frutos possuem formato globosos e não podem ser consumidos in natura, necessitando serem processados. Após o processamento do açaí, é gerado uma polpa, a qual é rica em carboidratos, fibras, vitamina E, proteínas, minerais e ácidos graxos essenciais, como o ômega 6 e 9.



Figura 6 - Açazeiro - Fonte:

<https://ferdinandodesousa.com/2021/01/06/amazonia-sustentavel-o-acai-e-o-palmito-do-acazeiro/>

Acredita-se que o baixo teor de fibras na dieta seja um dos possíveis agravantes para a elevada incidência de câncer, principalmente o colorretal, além de doenças cardíacas. Dessa forma, por ser rico em fibras, o açaí pode ser capaz de ajudar no trânsito intestinal e prevenir,

de certa forma, possíveis agravos como o câncer. Além disso, segundo Lobo e Veslasques, 2016, este fruto já foi considerado por muitos estudos como um alimento nutracêutico, devido a suas funções nutritivas e terapêuticas. Entre elas, as mais estudadas seriam as antiinflamatórias e antioxidantes, as quais são atribuídas à presença de compostos como os flavonóides, antocianinas e os compostos fenólicos (LOBO; VESLASQUES, 2016).

Lobo *et al.*, 2016, através de um estudo de revisão bibliográfica sobre as propriedades do açaí, concluiu que o açaí é uma importante fonte de nutrientes com alto poder como alimento funcional devido à presença de nutrientes que contribuem na prevenção de diversas doenças, principalmente as crônicas degenerativas. De acordo com estudo realizado por Silva, 2018 que utilizou a polpa de açaí como alimento para camundongos C57BL/6 portadores de artrite reumatóide, foi possível concluir que o consumo de açaí na dieta mostrou efeito protetor sobre a AR, com redução na produção de anticorpos, do edema e infiltrado inflamatório, como consequência da melhora no balanço oxidante/antioxidante local e modulação na produção de citocinas e balanço de células Treg/Th17 de forma sistêmica (SILVA, 2018, dados não publicados). Contudo, o estudo ainda requer um pouco mais de detalhamento para entender melhor os mecanismos pelos quais a polpa do açaí atua.

Considerando os trabalhos apresentados anteriormente e os conhecimentos prévios sobre as propriedades benéficas dos flavonóides presentes no açaí para diversas doenças inflamatórias, faz-se necessário um estudo mais detalhado de seus efeitos em relação à mucosite intestinal.

3. JUSTIFICATIVA

A mucosite é um fator limitante para a continuidade do tratamento de pacientes oncológicos, uma vez que pode provocar sintomas que deixam o paciente ainda mais debilitado. Devido à elevada incidência de pacientes oncológicos que desenvolvem a mucosite relacionada ao tratamento antineoplásico com o 5-FU, faz-se necessário um estudo mais detalhado de mecanismos que possam amenizar ou prevenir os sintomas gerados por ela.

Através das buscas para realização deste trabalho, foram encontrados diversos estudos que buscam amenizar os efeitos e sintomas causados pela mucosite. Contudo, foi encontrado apenas um estudo que tenta relacionar o uso do açaí como importante fator para prevenção/tratamento na mucosite intestinal. Tal estudo, realizado por Magalhães, 2018, mostrou efeito favorável dos componentes da polpa do *Euterpe oleracea Martius* na regeneração tecidual e na evolução ponderal, na capacidade antioxidante em condição de estresse oxidativo mediada por agente citotóxico, além de propor potencial atuação de seus compostos em vias pró-inflamatória. Dessa forma, faz-se necessário dar continuidade a estudos cada vez mais elaborados e conclusivos que possam relacionar os efeitos dos flavonóides presentes no *Euterpe oleracea Martius* (Açaí) nos linfonodos mesentéricos (LnM) de camundongos com MI induzida por 5-FU através da suplementação com a polpa do açaí a 2%.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação com flavonóides presentes na polpa de açaí sobre a lesão dos linfonodos mesentéricos e do estado inflamatório em camundongos com mucosite induzida por 5-Fluorouracil.

4.2. Objetivos Específicos

- Induzir a mucosite intestinal experimental;
- Realizar a extração de proteínas para análise bioquímica e imunoenzimática;
- Quantificar a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 nos linfonodos mesentéricos;

5. METODOLOGIA

5.1 Protocolo experimental

5.1.1 Animais e dieta experimental

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c 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 aclimatação foi fornecida uma dieta controle AIN-93M (REEVES, P.G; NIELSEN, F.H; FAHEY, G.C, 1993) contendo ou não açaí a 2%, como mostrado na Tabela 2 (DE SOUZA, M.O; SILVA, M; SILVA, M., et al, 2010). 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 n°. 2016/17 (ver anexo).

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

Tabela 2: Composição das dietas experimentais AIN-93M padrão e contendo açaí.

5.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas para camundongos contendo no máximo quatro camundongos para cada um dos seguintes grupos: C (dieta controle + tampão salino); AÇ (dieta açaí + tampão salino); M (dieta controle + 5-FU); AÇM(dieta açaí + 5-FU). Após sete dias de aclimatação recebendo uma dieta padrão para roedores adultos, foram inseridas as respectivas dietas por um período de quatorze dias consecutivos (RIBEIRO, J.C., et al, 2010; MACHADO, F.S., et al, 2015). No décimo quinto dia pela manhã foi realizada a indução da MI. Os grupos C e AÇ receberam injeção intraperitoneal (ip) de tampão fosfato-salino (PBS - *Phosphate-Buffered Saline*) estéril. Executou-se a eutanásia três (D3) (GENEROSO, S. DE V., et al, 2015) e sete (D7) (SONG, M. K.; PARK, M. Y.; SUNG, M. K., 2013) dias após a indução da mucosite (Figura 7).

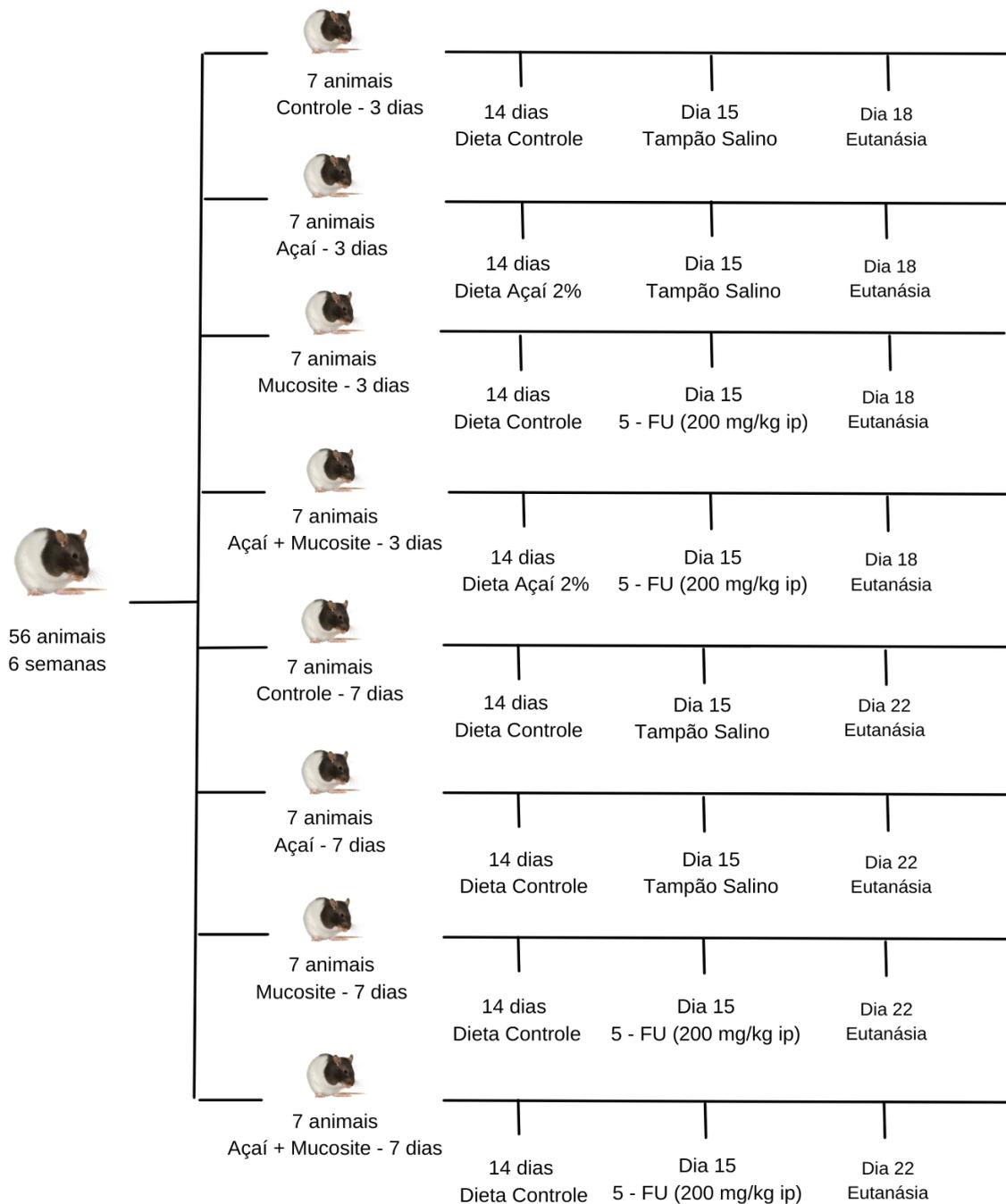


Figura 7 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Grupos: C (dieta controle + tampão salino); AÇ (dieta açai + tampão salino); M (dieta controle + 5-FU); AÇM (dieta açai + 5-FU); ip, intraperitoneal; D0, dia da indução da MI; 3D, eutanásia 3 dias após a indução; 7D, eutanásia 7 dias após a indução; n= 8 para os grupos controle e n= 12 para os grupos que receberam 5-FU.

5.1.3 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 (SONG, M.

K., et al, 2013) de cada animal dos grupos mucosite (M e AÇM). A droga foi veiculada em solução PBS estéril e injetada num volume total de 150µl no quadrante inferior esquerdo.

5.1.4 Eutanásia e coleta de material biológico

Ao findar dezoito (3D) e vinte e dois dias (7D) 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 (FERRARIS.; VINNAKOTA, 1995). 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 1.200 rmp durante 20 min (SOUZA; FIORINI; GONÇALVES, et al, 2017). 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.

5.2 Variáveis avaliadas

5.2.1 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 (3D e 7D). 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.

5.3 Dosagens bioquímicas e imunoenzimáticas

5.3.1 Extração de proteínas

Primeiramente, foi preparado uma solução tampão RIPA, contendo: tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS 0,05M), cloreto de sódio (NaCl 0,15M), EDTA 0,0013M, deoxicolato de sódio 1% , duodecil sulfato de sódio (SDS 0,1%) e inibidores de protease na proporção 1:1000. Os órgãos foram descongelados e pesados, tentando-se atingir a alíquota de 100 mg de tecido. Após a pesagem, a solução tampão RIPA foi utilizada na proporção de 100mcL de solução para 10mg de tecido (10:1). Processou-se a amostra no homogeneizador elétrico, sob baixa rotação por 30 seg, deixando-a em descanso por 1 min no gelo. O procedimento foi repetido por 3 vezes. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas na centrífuga a 10.000 g por 10 minutos a 4C° e coletou-se o sobrenadante. Por fim, foi aliquoteado 50 mcL da amostra, o qual foi armazenado a temperatura de -80C°.

5.3.2 Determinação da concentração de IL-10 no Linfonodo Mesentérico

A quantificação da concentração IL-10 nos tecidos coletados dos animais foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, por meio de anticorpos primários monoclonais anti IL-10. Utilizando-se, placas de poliestireno com 96 poços.

Nas placas foi colocada a solução de anticorpo de captura 100µL por poço e incubado em overnight a 25°C. Essas foram lavadas 3 vezes em solução sabão (PBS/0,005% de tween20). Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 100µL de solução PBS/BSA 1% (Solução bloqueio e diluente de padrão e amostras) e incubado por 1 hora a 25°C. Logo após, a placa foi novamente lavada 3 vezes em solução sabão e foi realizada a pipetagem do padrão nos poços destinados da placa. Em cada poço do padrão foi adicionado 100µL de solução de bloqueio. Adicionado 200µL do padrão no primeiro poço e procedido de diluição seriada nos demais, resultando um total de 7 pontos da curva e em duplicata. O ponto destinado ao branco só recebeu a solução de bloqueio em duplicata. Nos poços referentes às amostras foram colocadas (50µL) do sobrenadante em duplicata, e então incubado por 2 horas a 25°C. Realizou-se novamente a lavagem das placas na solução sabão por 6 vezes, adicionou-se a solução de detecção 100µL por poço e incubado por 1 hora a 25°C. As placas foram lavadas 6 vezes na solução sabão e colocado 100µL de solução de substrato: 2,1 g Ácido cítrico (anidro: 1,92 g) em água milli-Q com volume final de 100 mL, 4,02 g

Na₂HPO₄·7H₂O (anidro: 2,13 g) em água milli-Q com volume final de 150 mL, as quais foram preparadas separadamente e adicionadas até atingir pH 4,0 (solução 2 à solução 1). Foi incubado a 25°C por cerca de 30 minutos. Logo após, a reação foi interrompida adicionando solução de 1 mg TMB + 1mL DMSO + 13,5 mL Tampão citrato pH 4 + 2mL H₂O₂ 30 vol. por poço e realizada a leitura no comprimento de onda de 450nm por um leitor de ELISA (Bio-Rad Modelo 450 Leitor de Microplacas).

5.4 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 média 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 $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Linfonodo Mesentérico

No linfonodo mesentérico, órgão do sistema imune encontrado envolto no intestino, houve diferença significativa entre os grupos em relação a produção de IL-10 com a administração da dieta suplementada em 2% de açaí por 14 dias + 3 dias após a infusão do 5-FU. Porém, o comportamento da concentração da IL-10 com a administração da dieta por 14 dias + 7 dias após a infusão do 5-FU foi diferente, sendo maior no grupo Controle, como mostram a Tabela 3 e as Figuras 8 e 9.

GRUPO	TEMPO	MÉDIA GRUPO	DESVIO PADRÃO GRUPO
C	3 DIAS	0.89	0.60
M	3 DIAS	1.02	0.52
AÇ	3 DIAS	1.20	0.37
AÇM	3 DIAS	1.35	0.56
C	7 DIAS	1.57	0.57
M	7 DIAS	0.37	0.14
AÇ	7 DIAS	1.02	0.32
AÇM	7 DIAS	0.66	0.23

Tabela 3: Concentração de IL-10 em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em oito grupos: Controle (C) 3 dias: recebeu dieta controle por 18 dias; Controle (C) 7 dias: recebeu dieta controle por 22 dias; Açaí (AÇ) 3 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 18 dias; Açaí (AÇ) 7 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 22 dias; Mucosite (M) 3 dias: recebeu dieta controle por 18 dias e foi induzido mucosite; Mucosite (M) 7 dias: recebeu dieta controle por 22 dias e foi induzido mucosite; Açaí Mucosite (AÇM) 3 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 18 dias e foi induzido mucosite; Açaí Mucosite (AÇM) 7 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 22 dias e foi induzido mucosite. Homogenato de linfonodo mesentérico foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

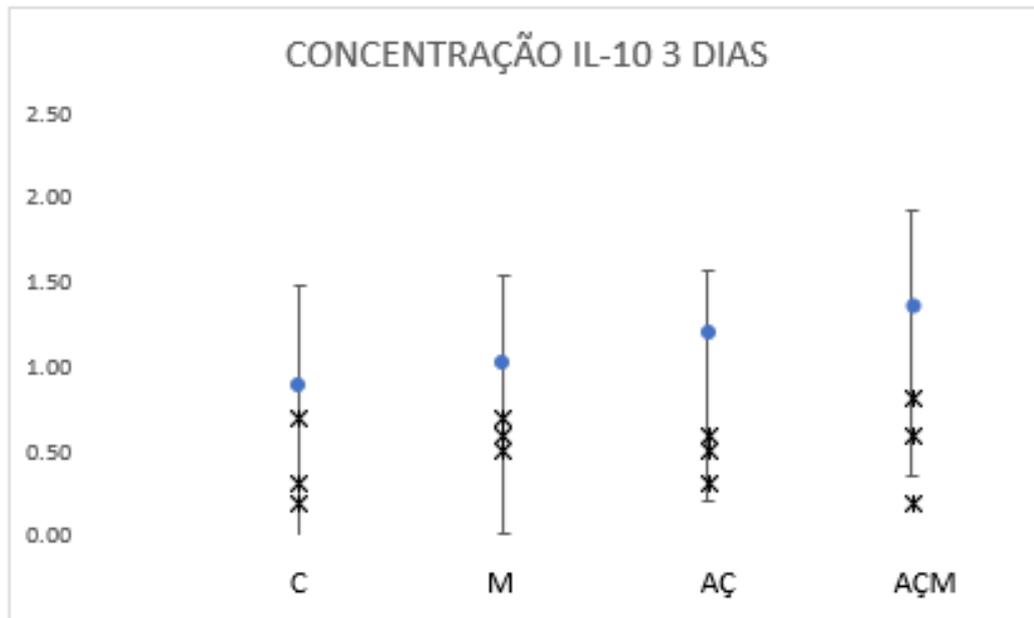


Figura 8: Concentração de IL-10 de 3 dias em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico, com desvio padrão. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em oito grupos: Controle (C) 3 dias: recebeu dieta controle por 18 dias; Açaí (AÇ) 3 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 18 dias; Mucosite (M) 3 dias: recebeu dieta controle por 18 dias e foi induzido mucosite; Açaí Mucosite (AÇM) 3 dias: recebeu dieta suplementada com açaí por 18 dias e foi induzido mucosite.. Homogenato de linfonodo mesentérico foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Os * inseridos no gráfico representam os valores obtidos através dos Testes T realizados entre os grupos mucosite versus controle, açaí versus mucosite e controle e mucosite açaí versus controle, mucosite ou açaí.

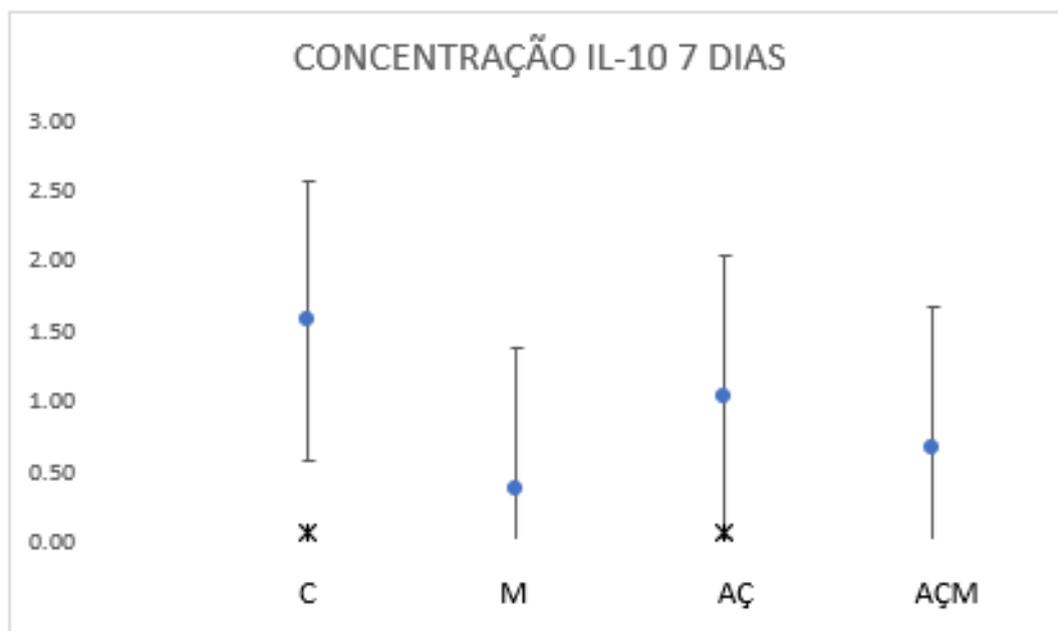


Figura 9: Concentração de IL-10 de 3 dias em 50 mcL de tecido do Linfonodo Mesentérico, com desvio padrão. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididas em oito grupos: Controle (C) 7 dias: recebeu dieta controle por 22 dias; Açai (AÇ) 7 dias: recebeu dieta suplementada com açai por 22 dias; Mucosite (M) 7 dias: recebeu dieta controle por 22 dias e foi induzido mucosite; Açai Mucosite (AÇM) 7 dias: recebeu dieta suplementada com açai por 22 dias e foi induzido mucosite. Homogenato de linfonodo mesentérico foram testados por ELISA sanduíche para IL-10. Foram realizados os testes Oneway ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Os * inseridos no gráfico representam os valores obtidos através dos Testes T realizados entre os grupos mucosite versus controle, açai versus mucosite e controle e mucosite açai versus controle, mucosite ou açai.

7. DISCUSSÃO

A mucosite intestinal é uma doença inflamatória que acomete boa parte dos pacientes oncológicos. Segundo Ferreira e cols (2021), a atrofia intestinal e, conseqüentemente, a função intestinal prejudicada desse órgão, são fenômenos bem documentados durante o desenvolvimento da mucosite. Kuchay e cols (2015), mostrou que uma única dose de 5-FU durante a quimioterapia em ratos foi suficiente para causar uma redução significativa na atividade das enzimas da borda em escova, o que levou a uma menor absorção de nutrientes nessa região, além de levar a maiores chances de ocorrência de processos infecciosos e inflamatórios. Por ser um fator limitante para a continuidade do tratamento de pacientes oncológicos, fazem-se necessários estudos mais aprofundados sobre mecanismos para reduzir a incidência e os efeitos da mucosite nesses casos.

O uso do açaí como importante composto anti-inflamatório e antioxidante já vem sendo comprovado em diversos estudos. Magalhães (2018), utilizou o açaí 2% como suplementação para camundongos, obtendo resultados satisfatórios em relação à mucosite. Os parâmetros avaliados por esse estudo foram, principalmente, a evolução ponderal e as citocinas anti e pró-inflamatórias. Outro estudo que utilizou o açaí como forma de suplementação foi o de Santana e cols (2014), em que demonstrou a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e o aumento das anti-inflamatórias, como a IL-10 entre os grupos controle positivo e controle negativo, ao estudar o efeito desse fruto na obesidade, doença a qual se compara à mucosite por também ser inflamatória.

Na tentativa de melhorar o quadro de mucosite sofrida pelos pacientes oncológicos, o presente estudo se deu através da suplementação de açaí em camundongos BALB/c com idade aproximada de seis semanas. Como mostrou o estudo de Magalhães (2018), em que a suplementação com esse fruto para camundongos BALB/c trouxe resultados positivos com significativa melhora nas vias pró-inflamatórias. Além disso, um estudo realizado por Silva (2019), mostrou que a dieta com açaí levou a um aumento expressivo de IL-10, citocina a qual possui um papel antiinflamatório muito importante e que, apesar de terem sido estudadas diferentes doenças, visto que no presente estudo foi analisada a mucosite e no estudo citado, foi analisada a artrite reumatóide (AR), ambas podem ser comparadas pois se tratam de doenças altamente inflamatórias.

De acordo com Hong, 2017, o 5-FU foi capaz de reduzir os níveis de diversas citocinas anti-inflamatórias, inclusive da IL-10, além de aumentar as pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-22, em tecidos de camundongos, como o cólon. Todos esses resultados indicam

que o 5-FU induziu a mucosite juntamente com respostas inflamatórias significativas (HONG, 2017). Segundo Couper e cols (2008), a IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora, uma vez que atua sobre as células de resposta inflamatória como Th1 e CD8 e sobre as respostas Th2 juntamente com outros compostos. Contudo, sua concentração deve ser sempre equilibrada, sem que haja excessos, de maneira a evitar uma regulação negativa em casos infecciosos, visto que é uma citocina anti-inflamatória.

De acordo com Moura e cols (2012), a IL-10 possui papel fundamental no tratamento da mucosite. Ao estudar o envolvimento de citocinas na mucosite induzida em hamsters, ele chegou à conclusão de que a doença é capaz de aumentar os níveis de diferentes citocinas pró-inflamatórias, além de diminuir as concentrações da IL-10, acreditando que essa diminuição da última tenha uma relação significativa com a intensificação da dor referida e de outros sintomas pelos pacientes. Apesar de ter estudado a mucosite oral, os resultados podem também serem comparados à mucosite intestinal, uma vez que os efeitos tendem a ser bem semelhantes por todo o trato gastrointestinal. Tal achado corrobora com os resultados do presente estudo em que, de acordo com os dados coletados e analisados, para os grupos 7D de suplementação com o açaí, a concentração de IL-10 mostrou-se com níveis mais baixos para os grupos de mucosite e açaí mucosite e com níveis um pouco mais elevados para os grupos controle e açaí. Tais resultados condizem, ainda, com o estudo realizado por Silva (2019). Dessa forma, um maior controle em relação à quantidade de citocinas pró-inflamatória e das anti-inflamatórias se torna primordial para o restabelecimento da mucosa intestinal.

Ainda de acordo com os dados coletados, nos tecidos dos animais que receberam a suplementação com o açaí por 14 dias+3 (3D), a concentração da IL-10 se manteve em níveis mais baixos nos tecidos dos camundongos dos grupos controle e de mucosite. Além disso, mostraram significativo aumento para os grupos de açaí e açaí mucosite, sugerindo uma melhora no quadro de inflamação proveniente da mucosite. Contudo, estatisticamente, alguns valores do Teste T foram considerados sem significância para os grupos 3D, pois os valores foram maiores que $P < 0,05$, mostrando que não há diferença significativa entre eles. Tal achado foge um pouco de outros estudos já analisados anteriormente.

As diferenças estatísticas entre os grupos 3D e 7D podem ser devido ao tempo em que os animais ficaram expostos à mucosite. No caso dos grupos 3D, o desfecho em relação ao efeito do açaí na mucosite pode ter se dado de forma mais irregular entre os animais, com maior desvio padrão, devido ao menor tempo de exposição à doença, o que pode significar que os organismos ainda estavam no processo de produção da IL-10. Já para os grupos 7D, os

resultados com maior significância podem ser devido ao maior tempo com a doença, tendo uma resposta mais regular.

A partir dos resultados encontrados comparando-se os grupos 3D e 7D, é possível inferir que com 7 dias após a indução da MI e com a suplementação com a polpa do açaí 2%, o organismo já parece ser capaz de se recuperar e responder de forma a diminuir os efeitos da doença. Dessa forma, deve-se considerar que os mecanismos inflamatórios que conduzem a MI são complexos e não necessariamente possuem a mesma atuação em todos os organismos, além de possuírem outros mecanismos fisiopatológicos capazes de conduzir e controlar a expressão das diferentes citocinas.

Alguns fatores causaram limitações para este estudo, como a dificuldade em encontrar outros estudos semelhantes que utilizassem o açaí ou outros flavonóides como tratamento da mucosite. Além disso, não foram encontrados estudos que abordassem os efeitos dessa doença no órgão escolhido, o linfonodo mesentérico. Contudo, por ser um órgão do sistema imunológico com importante atuação nos processos inflamatórios, cabe ressaltar que a escolha dele foi de grande relevância para o estudo.

8. CONCLUSÃO

Em síntese, o presente estudo mostrou que a dieta com polpa do açaí a 2% para os grupos 7D foram capazes de aumentar os níveis de IL-10 nos linfonodos mesentéricos dos camundongos BALB/c portadores de mucosite induzida por 5-FU e que, para os grupos 3D, o desvio padrão foi maior não sendo capaz de gerar uma significância estatística.

Contudo, vale ressaltar que os mecanismos de ação da mucosite em relação aos processos inflamatórios são de grande complexidade, podendo ter diferentes desfechos dependendo do organismo em que atua. Além disso, devido ao fato de que o 5-FU possui três mecanismos de ação, pode haver variedade na expressão de diferentes citocinas. Dessa forma, há a necessidade de se desenvolver estudos mais aprofundados sobre a relação do açaí e seus componentes com a mucosite intestinal.

9. REFERÊNCIAS

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.

Couper, K. N.; Blount, D. G.; Riley, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

Coutinho, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. *Rev. Virtual Quim.*, 2009, 1 (3), 241-256. Data de publicação na Web: 26 de Junho de 2009. Disponível em: <<http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v1n3a06.pdf>>. Acesso em: 18 setemb. 2021.

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.

Ferreira, A. R. da S.; Martson, A. G.; Boer, A. de; Wardill, H. R.; Alffenaar, J.W.; Harmsen, H. J. M.; Tissing, W. J. E. Does Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis Affect the Bioavailability and Efficacy of Anti-Infective Drugs? *Biomedicines* 2021, 9(10), 1389; <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101389>.

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.

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.

Hong, L. L.; Lan, L.; Xiao, S. W.; Lie, Y. Q.; Ping, W.; Shui, P. Q.; Hui, W.; Fei, H.; Bei, B. Z.; Hai, L. S.; Xiao, J. W. Alteração da microbiota intestinal e perfis inflamatórios de citocinas/quimiocinas em mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil. *Front Cell Infect*

Microbiol. 2017; 7: 455. Publicado online em 26 de outubro de 2017. doi: 10.3389 / fcimb.2017.00455.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019. 120 p. : il. color.

Kuchay, RAH; Bhatia, A .; Mahmood, A .; Anwar, M .; Mahmood, S. Brush fronteira atividade enzimática e expressão de genes marcadores apoptóticos em ratos alimentados com licopeno com 5-Fu induzida por mucosite gastrointestinal. Nutr. Envelhecimento 2015 , 3 , 1-8.

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.

Leocádio, P. C. L. Efeito do pré-tratamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos. 2013.

Lima, L.R.P., T.T; Oliveira, T. T.; Nagem. T. J.; Pinto. A. S.; Stringheta, P. C.; Oliveira, M. G. A.; Tinoco, A. L. A.; Oliveira, M. L.; Silva, J. F. Controle da Hiperlipidemia em Coelho Tratados com flavonóides e corantes Naturais do Urucum. Acrta Farm. Bonaerense vol. 20 (1): 53-7. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

Lobo, A. C. M.; Velasque, L. F. L. Revisão de literatura sobre os efeitos terapêuticos do açaí e sua importância na alimentação. Departamento de Farmácia Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM, Ourinhos, SP. Brasil. Biosaúde, Londrina, v. 18, n. 2, 2016.

Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer, v.3, p.330–338, 2003.

Lopes, R. M.; Oliveira, T. T. de; Nagem, T. J. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em:

https://paulasennafarma.webnode.com.br/_files/200000094-1f27420215/17_f.pdf. Acesso em: 17 dezembro 2021.

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.

Magalhães, T. A. F. M. Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea Martius*) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil. 2018. 115 p. Dissertação (Graduação em Nutrição). Núcleo de Pesquisas em Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

Moura, J. F. B. Envolvimento de citocinas (TNF-, IL-1 e IL-10) e óxido nítrico na patogênese da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem - efeito protetor da pentoxifilina, inibidor da óxido nítrico sintase induzida e de fitoterápicos. 2012. 171p. Dissertação (Pós-graduação em cirurgia). Departamento de cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

Pereira, Venúcia B M. Novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-Fluorouracil em camundongos C57BL/6 / Venúcia Bruna Magalhães Pereira. - 2013. 104f.: il. color., enc.; 30 cm.

Pimentel, C. V. de M. B., Philippi, S. T. Alimentos funcionais e compostos bioativos - 1. ed. - Barueri [SP]: Manole, 2019.

Portinho, J. A.; Zimmermann, L. M.; Bruck, M. R. Efeitos benéficos do açaí. *International Journal of Nutrology*, v.5, n.1, p. 15-20, jan./abr. 2012. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0040-1701423.pdf>>. Acesso em: 19 setemb. 2021.

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.

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.

Santana, M. R. Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), do açaí Jussara (*Euterpe edulis* Martius) e do jambolão (*Syzygium cumini*) em camundongos submetidos à dieta de cafeteria. 2014. 55p Dissertação (Pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

Santos, D. S. dos; Rodrigues, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*. Macapá, v. 7, n. 3, p. 29-35, set./dez. 2017.

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.

Silva, C. T. Artrite reumatóide experimental: o papel do consumo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no estresse oxidativo e na inflamação. 2018. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

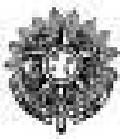
Silva, M. A. de A. Avaliação do consumo de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) na modulação da resposta inflamatória na artrite reumatóide experimental. 2021. Dissertação (Graduação em Nutrição) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

Soares, P. M. G. Mucositis intestinal experimental induced by 5-fluorouracil : role IL-1 β , IL-4 and PAF and evaluation of the alterations of motility gastrointestinal. 2008.

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.

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.

Stephen T. Sonis DMD et al. Perspectivas sobre lesão da mucosa induzida por terapia de câncer. *ACS Journals*. Volume 100 , Edição S9. 1 de maio de 2004. Páginas 1995-2025. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.20162#>. Acesso em: 19 setemb. 2021.



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

Campus Universitário - Monte do Cruzeiro - 35000-913, Sala 29
35-100-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
E-mail: ceua@univ.ufop.br



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

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

Senhor(a) Pesquisador(a),

Considerando o adendo enviado no 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 refinada 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.