

Efeito das proteínas do látex de *Plumeria pudica* na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos

Effect of *Plumeria pudica* latex proteins on intestinal mucositis caused by 5-fluorouracil in mice

Efecto de las proteínas del látex de *Plumeria pudica* sobre la mucositis intestinal causada por 5-fluorouracilo en ratones

Recebido: 06/02/2025 | Revisado: 14/02/2025 | Aceitado: 15/02/2025 | Publicado: 20/02/2025

Gabriella Linhares de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2481-9646>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: gabriellalinhaires9@gmail.com

Bruna da Silva Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3729-4316>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: bruna_silvasouza@hotmail.com

Ana Clara Silva Sales

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4978-235X>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: clarasales02@gmail.com

Francisca Dayane Soares da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2465-2025>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: daianejao19@hotmail.com

Thalis Ferreira de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1258-0375>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: thalisf90@gmail.com

Ana Patrícia de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1994-9481>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: apatriciabiomed@gmail.com

Jand Venes Rolim Medeiros¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7234-3382>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: jandvenes@ufdpar.edu.br

Leonardo Peres de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9179-2925>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: leoperes@ufdpar.edu.br

Andressa Freitas dos Santos Barreto²

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1076-6424>
Universidade Federal do Piauí, Brasil
E-mail: andressa.freitas.sb@gmail.com

Ana Jérсия Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7182-7097>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: anajersia@gmail.com

José Delano Barreto Marinho Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2493-6159>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: delanomarinho@gmail.com

Jéssica Maria Teles Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1844-9995>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: jessicamtsouza@gmail.com

Jefferson Soares de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4192-8238>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: jefferson.oliveira@gmail.com

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, (UFDPar), Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Piauí, (UFPI), Brasil.

Resumo

A *Plumeria pudica* produz um látex rico em proteínas (PLPp) com propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e antidiarreicas, além de reduzir a periodontite e atuar como protetor na colite ulcerativa. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das proteínas do látex na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, de forma a contribuir com informações significativas para a solução desse problema e, se possível, tornar-se uma ferramenta terapêutica para a mucosite intestinal. Para tal, fêmeas de camundongos da linhagem Balb/c foram divididas em três grupos: salina, 5-FU e PLPp + 5-FU. A mucosite foi induzida com três doses de 5-FU, enquanto o PLPp foi administrado uma hora antes de cada aplicação do quimioterápico, por três dias. O intestino delgado foi coletado para análises histopatológicas, morfométricas, de estresse oxidativo (MDA, GSH e SOD) e inflamatórias (MPO e NO₃/NO₂). A citotoxicidade in vitro do PLPp foi avaliada isoladamente e combinado ao 5-FU. A PLPp reduziu os níveis de MPO e NO₃/NO₂, demonstrando uma ação anti-inflamatória, embora não tenha revertido as alterações histopatológicas. Além disso, a PLPp não apresentou citotoxicidade nas células HCT 116 testadas, e sua associação com o 5-FU não reduziu a CI50 do quimioterápico. Concluiu-se que o PLPp protege a mucosa intestinal contra o estresse oxidativo e a inflamação induzidos pelo 5-FU, embora sua atividade proteolítica pode comprometer a eficácia farmacológica.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Efeito protetor; Estresse oxidativo; Inflamação.

Abstract

Plumeria pudica produces a protein-rich latex (PLPp) with anti-inflammatory, antinociceptive and antidiarrheal properties, in addition to reducing periodontitis and acting as a protector in ulcerative colitis. The present study aimed to evaluate the effects of latex proteins on intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil, in order to contribute with significant information for the solution of this problem and, if possible, become a therapeutic tool for intestinal mucositis. For this purpose, female Balb/c mice were divided into three groups: saline, 5-FU and PLPp + 5-FU. Mucositis was induced with three doses of 5-FU, while PLPp was administered one hour before each chemotherapy application, for three days. The small intestine was collected for histopathological, morphometric, oxidative stress (MDA, GSH and SOD) and inflammatory (MPO and NO₃/NO₂) analyses. The in vitro cytotoxicity of PLPp was evaluated alone and in combination with 5-FU. PLPp reduced MPO and NO₃/NO₂ levels, demonstrating an anti-inflammatory action, although it did not reverse the histopathological alterations. Furthermore, PLPp did not show cytotoxicity in the HCT 116 cells tested, and its association with 5-FU did not reduce the IC₅₀ of the chemotherapy drug. It was concluded that PLPp protects the intestinal mucosa against oxidative stress and inflammation induced by 5-FU, although its proteolytic activity may compromise the pharmacological efficacy.

Keywords: Cytotoxicity; Protective effect; Oxidative stress; Inflammation.

Resumen

Plumeria pudica produce un látex rico en proteínas (PLPp) con propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas y antidiarreicas, además de reducir la periodontitis y actuar como protector en la colitis ulcerosa. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de las proteínas del látex sobre la mucositis intestinal inducida por 5-fluorouracilo, con el fin de contribuir con información significativa para la solución de este problema y, de ser posible, convertirse en una herramienta terapéutica para la mucositis intestinal. Para este propósito, los ratones Balb/c hembra se dividieron en tres grupos: solución salina, 5-FU y PLPp + 5-FU. La mucositis se indujo con tres dosis de 5-FU, mientras que PLPp se administró una hora antes de cada aplicación de quimioterapia, durante tres días. Se recogió el intestino delgado para análisis histopatológicos, morfométricos, de estrés oxidativo (MDA, GSH y SOD) e inflamatorios (MPO y NO₃/NO₂). Se evaluó la citotoxicidad in vitro de PLPp solo y en combinación con 5-FU. PLPp redujo los niveles de MPO y NO₃/NO₂, demostrando una acción antiinflamatoria, aunque no revirtió los cambios histopatológicos. Además, PLPp no mostró citotoxicidad en las células HCT 116 analizadas y su asociación con 5-FU no redujo la IC₅₀ del fármaco de quimioterapia. Se concluyó que PLPp protege la mucosa intestinal contra el estrés oxidativo y la inflamación inducida por 5-FU, aunque su actividad proteolítica puede comprometer la eficacia farmacológica.

Palabras clave: Citotoxicidad; Efecto protector; Estrés oxidativo; Inflamación.

1. Introdução

O látex é um fluido leitoso liberado das plantas ao sofrerem trauma mecânico ou herbivoria por insetos, sendo produzida e armazenada em células especializadas denominadas de laticíferos (Huang et al., 2020). Essa substância é constituída por moléculas pertencentes a várias classes de metabólitos secundários e proteínas, que desempenham importantes funções biológicas nas plantas, assim como apresentam propriedades farmacológicas benéficas para o ser humano (Gai et al., 2017; Warowicka et al., 2020).

Com o avanço da tecnologia, as técnicas de extração e purificação de moléculas tornaram mais acessível o estudo da propriedade medicinal advindo das proteínas do látex, aplicada em diferentes testes terapêuticos (Luz, 2012; Marciano, 2017). A partir disso, foi possível comprovar efeitos biológicos dessas moléculas, que incluem anti-inflamatório, antitumoral, antinociceptiva e anticonvulsivante (Alencar et al., 2017; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Soares et al., 2005; Lima et al., 2012).

Dentre as espécies produtoras de látex, tem-se a *Plumeria pudica*, espécie pertencente à família Apocynaceae. Estudos recentes com as proteínas laticíferas da planta revelaram por meio de diferentes modelos animais experimentais, que o material possui ação anti-inflamatória e antinociceptiva, antidiarreica, baixo potencial de toxicidade aguda e subcrônica, assim como efeito redutor da periodontite e protetor na colite ulcerativa, apontando assim que a fração rica em proteínas obtidas do látex de *P. pudica* (PLPp) atua de forma inibindo eventos inflamatórios e de estresse oxidativo tecidual (Fernandes et al., 2015; Santana et al., 2018; Souza et al., 2021; Oliveira et al., 2021; Oiveira et al., 2019).

Dentre os diversos efeitos indesejados que acometem os pacientes durante o tratamento oncológico, é possível destacar a mucosite intestinal que é definida como a inflamação e ulceração da mucosa que reveste o trato alimentar, mediada pelas citocinas pró- inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sangild et al., 2018; Lee et al., 2017). Esse processo ocorre em virtude da ação não específica dos agentes quimioterápicos (metotrexato, irinotecano e 5- fluorouracil), de modo a acometer também células saudáveis em rápida divisão (Focaccetti et al., 2015). A mucosite intestinal é um obstáculo significativo para o tratamento contra o câncer, de forma a debilitar ainda mais a qualidade de vida do paciente reduzindo a tolerância à quimioterapia, consequentemente comprometendo sua eficiência (Escalante et al., 2017).

Atualmente não há terapia eficaz para esta condição, sendo utilizado na prática clínica, medicamentos atenuantes para o controle da mucosite, como agentes antimicrobianos, antidiarreicos e analgésicos (Elad et al., 2020). Nesse contexto, faz-se necessário a busca por moléculas bioativas que sejam capazes de reduzir ou amenizar esse efeito colateral e, eventualmente, melhorar o bem-estar dos pacientes e a eficácia do tratamento (Jesus, 2018).

Diante disso, tendo como base no potencial farmacológico da fração proteica da *P. pudica* no que se refere a ação anti-inflamatória, antioxidante e baixo potencial de toxicidade, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das proteínas do látex na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, de forma a contribuir com informações significativas para a solução desse problema e, se possível, tornar-se uma ferramenta terapêutica para a mucosite intestinal.

2. Metodologia

2.1 Coleta e processamento do látex de *Plumeria pudica*

A espécie coletada foi identificada e sua exsiccata depositada no Herbário Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Delta do Parnaíba sob o número 2432 para identificação botânica. O número do cadastro de acesso ao patrimônio genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado é A5697723. Sendo as coletas realizadas na cidade de Parnaíba, Piauí, Brasil (Latitude: 2°54'28.4''S; Longitude: 41°46'37,1''W; altitude de 5 metros acima do nível do mar) empregando a metodologia de obtenção do látex de *Plumeria pudica* de acordo com Fernandes et al. (2015).

O látex foi coletado após o corte do ápice caulinar da planta em tubos do tipo Falcon sobre um volume de água destilada na proporção 1:1 (v:v). As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 3600 rpm 25°C, para a separação das frações sólida (borracha) e líquida do látex. O sobrenadante foi transferido para membrana de diálise com capacidade de retenção molecular com peso acima de 8kDa, o processo de diálise ocorreu em água destilada durante 48 horas. Logo após, o material presente dentro da membrana foi novamente centrifugado utilizando as condições descritas acima e o sobrenadante, rico em proteínas, submetido à liofilização e denominada PLPp (proteínas do látex de *Plumeria pudica*), depositado no

Herbário Delta do Parnaíba – UFDPAr, Parnaíba, Piauí, Brasil.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c (*Mus musculus*) com peso entre 25-30g, oriundos do Biotério da Universidade Federal do Delta do Parnaíba. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente climatizando (20 ± 2 °C), obedecendo ao ciclo de claro/escuro (12h/14h) e recebendo ração e água ad libitum.

2.3 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (CEUA/UFDPAr), sob o protocolo de número 010/20.

2.4 Indução e tratamento da mucosite intestinal

Os grupos experimentais foram divididos em três grupos: salina, 5-FU e PLPp, sendo cada grupo constituído por 6 animais. Para a indução da mucosite intestinal utilizou-se o modelo de Carneiro-Filho et al. (2004), com adaptações, conforme descrição a seguir. Suspensões frescas de 5-FU (150 mg/kg) divididas em 3 doses de 50 mg/kg (uma dose por dia), foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) para indução da mucosite. O tratamento dos animais foi realizado utilizando PLPp na dose de 40 mg/kg (i.p.), por apresentar melhor resposta anti-inflamatória (Fernandes et al., 2015), dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) 1 hora antes de cada administração de 5-FU, totalizando 3 dias de tratamento.

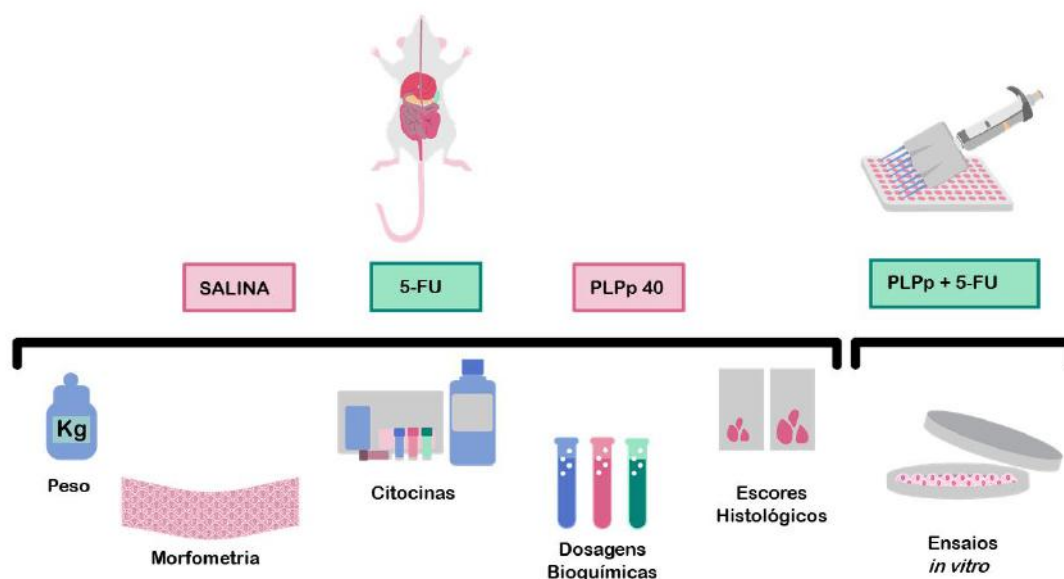
2.5 Eutanásia e coleta das amostras de tecido

Após 4 horas de experimento, os animais foram eutanasiados com uma dose letal, na qual foi administrada a combinação de anestésicos cetamina e xilazina, 300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. Em seguida, as porções intestinais do duodeno e íleo foram coletadas para a realização das análises histológicas e o jejuno para dosagens bioquímicas.

2.6 Parâmetros avaliados

A Figura 1 demonstra o fluxograma com o delineamento experimental e os respectivos parâmetros avaliados em cada ensaio.

Figura 1 - Delineamento experimental.



Fonte: Autores (2025).

2.7 Análise ponderal

Ao longo do período experimental, os animais foram pesados antes da administração dos compostos. Os valores obtidos foram expressos em grama (g) a partir da média do peso do primeiro e terceiro dia.

2.8 Dosagens bioquímicas

2.8.1 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

O estresse oxidativo foi mensurado a partir do produto da peroxidação lipídica, o MDA, seguindo a metodologia de Uchiyama e Mihara (1978). Amostras de jejuno pesando 35 mg foram maceradas em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15M, na proporção de 1:10, resultando em homogenato a 10%. Aliquotas de 250 μ L do homogenato foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1% e 500 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C por 45 minutos, resfriada em água gelada seguida da adição de 2 mL de n-butanol e posterior centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm 4 °C. A absorbância do sobrenadante (fase butanólica) foi mensurada em 520 e 535 nm no UV-VIS. O cálculo da concentração de MDA foi realizado por meio da diferença entre os valores obtidos nas duas leituras e os resultados expressos em nmol de MDA por grama de tecido.

2.8.2 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

A glutathiona é um tiol não proteico responsável por desempenhar um papel protetor contra o estresse oxidativo e sua concentração foi estimada de acordo com Sedlak e Lindsay (1968). Fragmentos de jejuno pesando 50 mg foram homogeneizados em EDTA 0,02M, na proporção 1 mL/100 mg de tecido. Logo após, 400 μ L do homogenato foi misturado com 320 μ L de água destilada e 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 50%, e centrifugados a 3000 rpm 4 °C durante 15 minutos. Em um tudo, adicionou 400 μ L do sobrenadante, 800 μ L de tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 20 μ L de ácido 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01 M, seguido de agitação por 3 minutos. A absorbância foi medida a 412 nm no espectrofotômetro e os resultados expressos em μ g de GSH por grama de tecido.

2.8.3 Determinação da concentração de superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase é outra molécula responsável pela defesa antioxidante das células expostas ao oxigênio e para determinação da sua atividade foi utilizado o método de Das, Samanta e Chayne (2000). Amostras de jejuno pesando 35 mg foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM 10%, na proporção 1 mL/100 mg de tecido e centrifugadas a 4000 rpm 4 °C durante 15 minutos. Em seguida, no Eppendorf adicionou-se 100 µL do sobrenadante, 1010 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), 75 µL de L-metionina 20 mM, 40 µL de Triton X- 100 1%, 75 µL de cloreto de hidroxilamina 10 mM e 100 µL de EDTA 50 µM, seguido de incubação em banho seco a 37 °C por 5 minutos. Após a finalização do processo, adicionou 80 µL de riboflavina 50 µM e expôs o material a luz durante 10 minutos. Ao fim, em uma microplaca de 96 poços adicionou 100 µL das amostras e 100 µL do reagente de Griess e aguardou por 10 minutos. A absorbância foi lida no Elisa, utilizando-se um filtro de 550 nm e os resultados expressos em USOD/µg de proteína.

2.8.4 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A partir da enzima mieloperoxidase presente nos grânulos do neutrófilos é possível mensurar a extensão do infiltrado inflamatório no tecido lesionado. O ensaio da atividade desta enzima seguiu a metodologia de Bradley et al. (1982). Fragmentos de jejuno pesando 30 mg foram macerados em hexadecil-trimetil-amônio brometo (HTAB) e centrifugados a 4000 rpm 4 °C por 20 minutos. Seguidamente, pipetou 10 µL do sobrenadante em duplicata na microplaca de 96 poços com adição de 200 µL da solução de o-dianisidina contendo 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1%, 3 mL de tampão fosfato de potássio, 27 mL de água destilada e 5 mg de o-dianisidina. A leitura foi realizada no Elisa a 450 nm entre os tempos 0 e 1 minuto, com o resultado expresso em UMPO/mg de tecido.

2.8.5 Dosagem de nitrato e nitrito (NO₃/NO₂)

A produção de óxido nítrico, foi mensurada de forma indireta, através de seus metabólitos, nitrato e nitrito, utilizando o reagente de Griess, de acordo com o método de Green et al. (1982) com modificações. As amostras de jejuno pesando 25 mg foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) 1,15%, na proporção 1 mL/100 mg de tecido e logo após centrifugadas a 3000 rpm 4 °C por 30 minutos. Em uma microplaca de 96 poços adicionou-se 50 µL do sobrenadante do homogenato e 50 µL de reagente de Griess, por 10 minutos agitou de forma leve e delicada. A leitura foi realizada no Elisa a 540 nm e os resultados expressos em micromoles (µM) de nitrito.

2.9 Análise histopatológica e morfométrica

Fragmentos das porções de duodeno (porção proximal a válvula pilórica), jejuno (porção central) e íleo (porção proximal a válvula ileocecal) foram coletados e fixados em formol 10% tamponado (pH 7,0) por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação em série crescente de concentrações de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%) por 45 minutos em cada solução. Em seguida, o material passou por diafanização, no qual foi banhado em Xilol I e II durante 45 minutos em cada. Então, as amostras foram incluídas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura em micrótomo manual rotativo. As lâminas de cada porção foram confeccionadas com cortes transversais e longitudinais, e coradas com hematoxilina e eosina.

Na análise histopatológica foi utilizado o sistema de escores descrito e adaptado de MacPherson e Pfeiffer (1978) para determinar o grau de inflamação da parede intestinal (Tabela 1).

Tabela 1 - Escores histopatológicos para determinação do grau de inflamação da parede intestinal.

Escore	Achados histológicos
0	Achados histológicos normais
1	Mucosa: perda de arquitetura/erosão das vilosidades; células inflamatórias esparsas; vacuolização e edema.
2	Mucosa: perda de arquitetura/erosão das vilosidades e criptas; infiltrados inflamatórios extensos; vacuolização e edema.
3	Mucosa: perda de arquitetura/erosão das vilosidades e criptas; infiltrados inflamatórios intensos; vacuolização e edema. Camada muscular com indícios inflamatórios (edema e células inflamatórias).

Fonte: Autores (2025).

Na análise morfométrica, verificou-se os parâmetros altura das vilosidades e profundidade das criptas, a fim de avaliar a integridade da mucosa intestinal. A altura da vilosidade foi medida da junção vilo-cripta até o seu topo e a profundidade da cripta foi medida a invaginação entre vilosidades adjacentes. Cinco vilosidades e criptas bem orientadas e intactas de cada amostra foram mensuradas e os dados tabulados e analisados estatisticamente.

As secções foram fotomicrografadas e analisadas por um histopatologista experiente utilizando o programa ZEN 2 (Versão 2.4).

2.10 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para a realização deste ensaio foi utilizado a linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT 116), cultivadas em meio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células foram incubadas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

O efeito da PLPp sozinha e associada ao 5-FU foi avaliado pelo método do MTT, um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para determinação da viabilidade celular. Neste método, o sal de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetilazol 1-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), originalmente de coloração amarela, é convertido a cristais de formazan (coloração púrpura), por meio de uma reação catalisada por enzimas dependentes de NADPH, presentes em células metabolicamente viáveis (Mosmann, 1983).

Para o teste, 5 mg de PLPp foram dissolvidos em 600 µL de solução salina estéril, resultando em uma solução-estoque com concentração de 8,4 mg/mL. A solução foi homogeneizada cuidadosamente, evitando-se agitação brusca e a formação de bolhas.

O 5-fluorouracil (5-FU) utilizado para o experimento foi adquirido da Cayman Chemical®. Para o teste, uma solução de 10 mM de 5-FU foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente submetida a microdiluição seriada em meio DMEM completo, de modo que as células fossem expostas a concentrações variando de 50 a 0,781 µM do quimioterápico, conforme descrito a seguir.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma concentração de 6 x10⁴ células/mL, e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Foram realizados os seguintes tratamentos: 5-FU (50 a 0,781 µM), 5-FU + PLPp 5 µg/mL, 5-FU + PLPp 50 µg/mL.

Os compostos isolados foram testados em concentração única de 50 µg/mL de PLPp ou diluição seriada nas concentrações que variaram de 50 a 0,78 µM para o 5-FU. Para avaliar o efeito da associação entre o 5-FU e a PLPp, as colunas da placa de 96 poços referentes ao tratamento em associação tiveram o meio de cultura removido e substituído por um meio de cultura fresco contendo PLPp na concentração de 5 ou 50 µg/mL. Em seguida, adicionou-se o 5-FU nas diferentes concentrações previamente descritas (50 a 0,78 µM).

Após o tratamento, as células foram incubadas por 69 horas, nas mesmas condições previamente citadas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e 150 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados aos poços. As placas foram, então, incubadas novamente por mais 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi cuidadosamente removida e 150 µL de dimeltisulfóxido (DMSO) foram adicionados aos poços para solubilização dos cristais de formazan. Após completa homogeneização, a absorbância foi mensurada em 595 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro de placas. Por meio dos valores de absorbância obtidos no teste foi possível calcular as concentrações inibitórias médias (CI50) do 5-FU ou PLPp sozinhos e em associação com as concentrações testadas de PLPp.

Todos os dados são referentes a pelo menos dois experimentos independentes em triplicata, em ambiente estéril e cabine de fluxo laminar.

2.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8. Os dados morfométricos foram analisados utilizando médias e seus respectivos desvios padrões, e posteriormente comparados utilizando os testes One-way, ANOVA ou Kruskal-Wallis com pós-testes de comparações múltiplas de Tukey ou Dunn, respectivamente. Para os dados dos escores histológicos utilizou o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Em relação as dosagens bioquímicas, aplicou-se one-way, em seguida o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e a diferença estatística considerada significativa quando $p < 0,05$.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* de PLPp foi analisado segundo as médias e os respectivos erros padrão da média. A avaliação do efeito de PLPp sobre a atividade citotóxica do 5-FU foi analisado segundo as concentrações inibitórias médias (CI50), obtidas por cálculo de regressão não linear, ambos os experimentos em triplicata. Os dados foram apresentados como valores de CI50 e intervalo de confiança (IC).

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito da PLPp sobre a análise ponderal dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Tabela 2 - Valores referentes ao peso ponderal dos animais em seus respectivos dias.

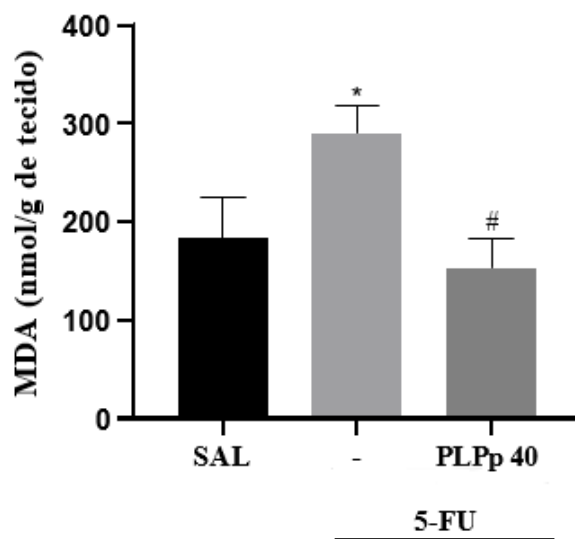
Grupos	Dias	
	1º dia	3º dia
Salina	23,4 ± 0,4 g	24,0 ± 0,0 g
5-FU	28 ± 0,89 g	26 ± 0,89 g
PLPp	24,57 ± 0,36 g	24,57 ± 0,36 g

Fonte: Autores (2025).

3.2 Efeito da PLPp sobre os níveis teciduais de MDA em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

A partir da quantificação de malondialdeído foi revelado que os animais submetidos ao tratamento com 5-FU apresentaram nível aumentado de MDA ($290,29 \pm 13,92$ nmol/g de tecido) quando comparados ao grupo que recebeu solução salina ($183,04 \pm 21,00$ nmol/g de tecido). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com a fração proteica causou a diminuição significativa do nível de MDA ($153,54 \pm 15,05$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo 5-FU (Figura 2).

Figura 2 - Efeito de PLPp sobre os níveis de malondialdeído (MDA) presente no jejuno dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo e expressos em nmol/g de tecido. Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $p < 0,05$ vs grupo salina e # $p < 0,05$ vs grupo 5-FU.

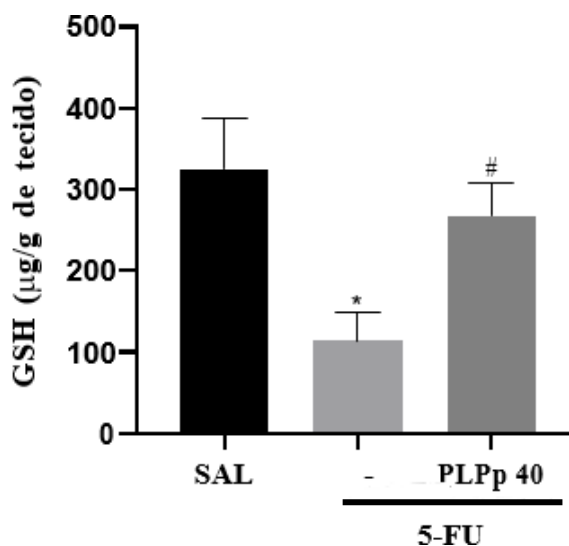


Fonte: Autores (2025).

3.3 Efeito da PLPp sobre os níveis teciduais de GSH em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Os dados obtidos da dosagem apontaram que o grupo 5-FU apresentou consumo significativo de GSH ($113,79 \pm 17,38 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo salina ($325,45 \pm 31,39 \mu\text{g/g}$ de tecido). Os animais do grupo PLPp expressaram maior quantidade de GSH tecidual ($266,97 \pm 20,51 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo 5-FU (Figura 3).

Figura 3 - Efeito de PLPp sobre os níveis de glutathiona (GSH) presente no jejuno dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo e expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Student- Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

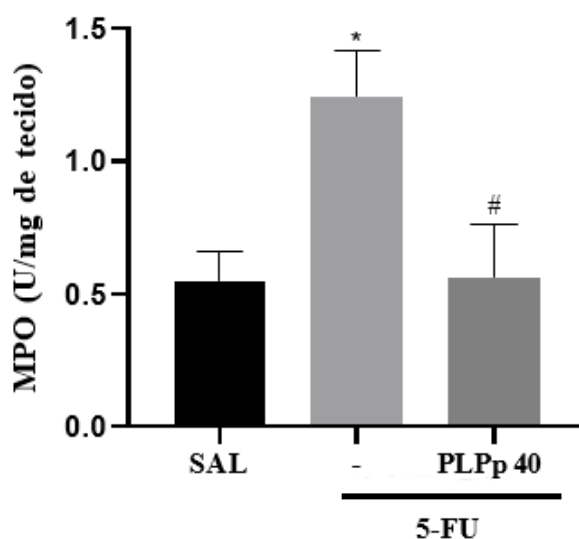


Fonte: Autores (2025).

3.4 Efeito da PLPp sobre a concentração tecidual de SOD em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

A análise bioquímica da enzima antioxidante revelou que o grupo 5- FU apresentou baixa atividade de SOD ($25,47 \pm 6,56$ U SOD/ μ g de proteína) quando comparado ao grupo salina ($63,44 \pm 4,86$ U SOD/ μ g de proteína). Por sua vez, PLPp aumentou o nível da enzima quando comparado ao grupo 5-FU ($77,31 \pm 12,48$ U SOD/ μ g de proteína) (Figura 4).

Figura 4 - Efeito de PLPp sobre a concentração de superóxido dismutase (SOD) presente no jejuno dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo e expressos em unidade de SOD por μ g de proteína. Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

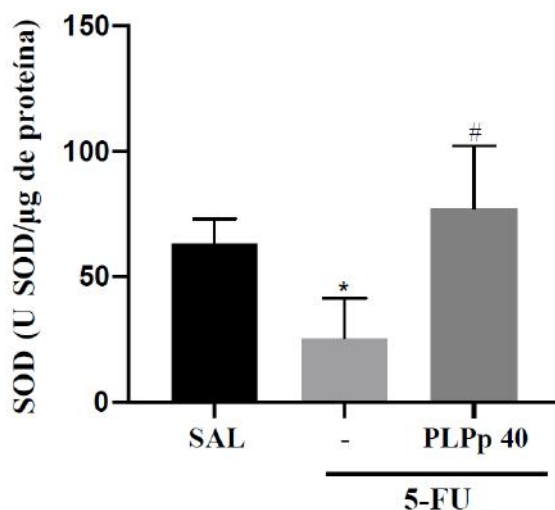


Fonte: Autores (2025).

3.5 Efeito da PLPp sobre a atividade de MPO tecidual em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

A atividade de MPO no tecido intestinal dos animais que receberam 5- FU foi significativamente aumentada ($1,24 \pm 0,08$ U/mg de tecido) quando comparada ao grupo salina ($0,54 \pm 0,05$ U/mg de tecido). Contudo, o pré-tratamento com PLPp reduziu de forma significativa a atividade dessa enzima ($0,56 \pm 0,09$ U/mg de tecido) quando comparado ao grupo 5-FU, demonstrando diminuição do infiltrado inflamatório na mucosa intestinal (Figura 5).

Figura 5 - Efeito de PLPp sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) presente no jejuno dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo e expressos em unidade por mg de tecido. Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

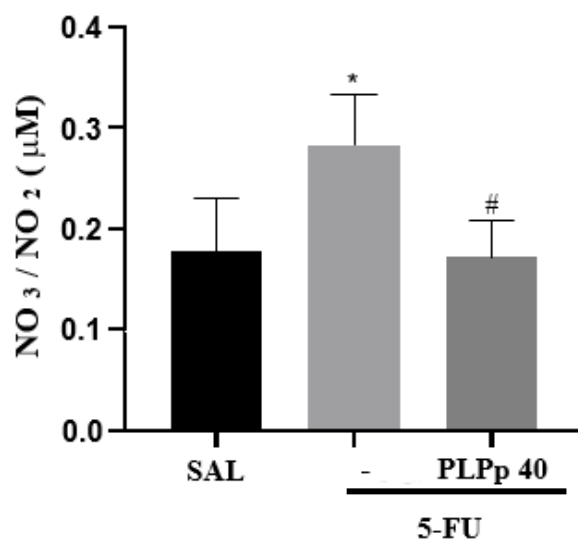


Fonte: Autores (2025).

3.6 Efeito da PLPp sobre a concentração tecidual de NO_3/NO_2 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

A concentração total de NO_3/NO_2 no tecido intestinal dos animais do grupo 5-FU estava significativamente aumentada ($0,2826 \pm 0,0251 \mu\text{M}$) em comparação ao grupo que recebeu salina ($0,1770 \pm 0,0263 \mu\text{M}$). A fração proteica diminuiu de forma significativa ($0,1722 \pm 0,0182 \mu\text{M}$) a concentração tecidual de NO_3/NO_2 quando comparado ao grupo 5-FU, restaurando este parâmetro ao nível do controle negativo (Figura 6).

Figura 6 - Efeito de PLPp sobre a concentração total de nitrato e nitrito (NO_3/NO_2) presente no jejuno dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M de seis animais por grupo e expressos em μM . Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

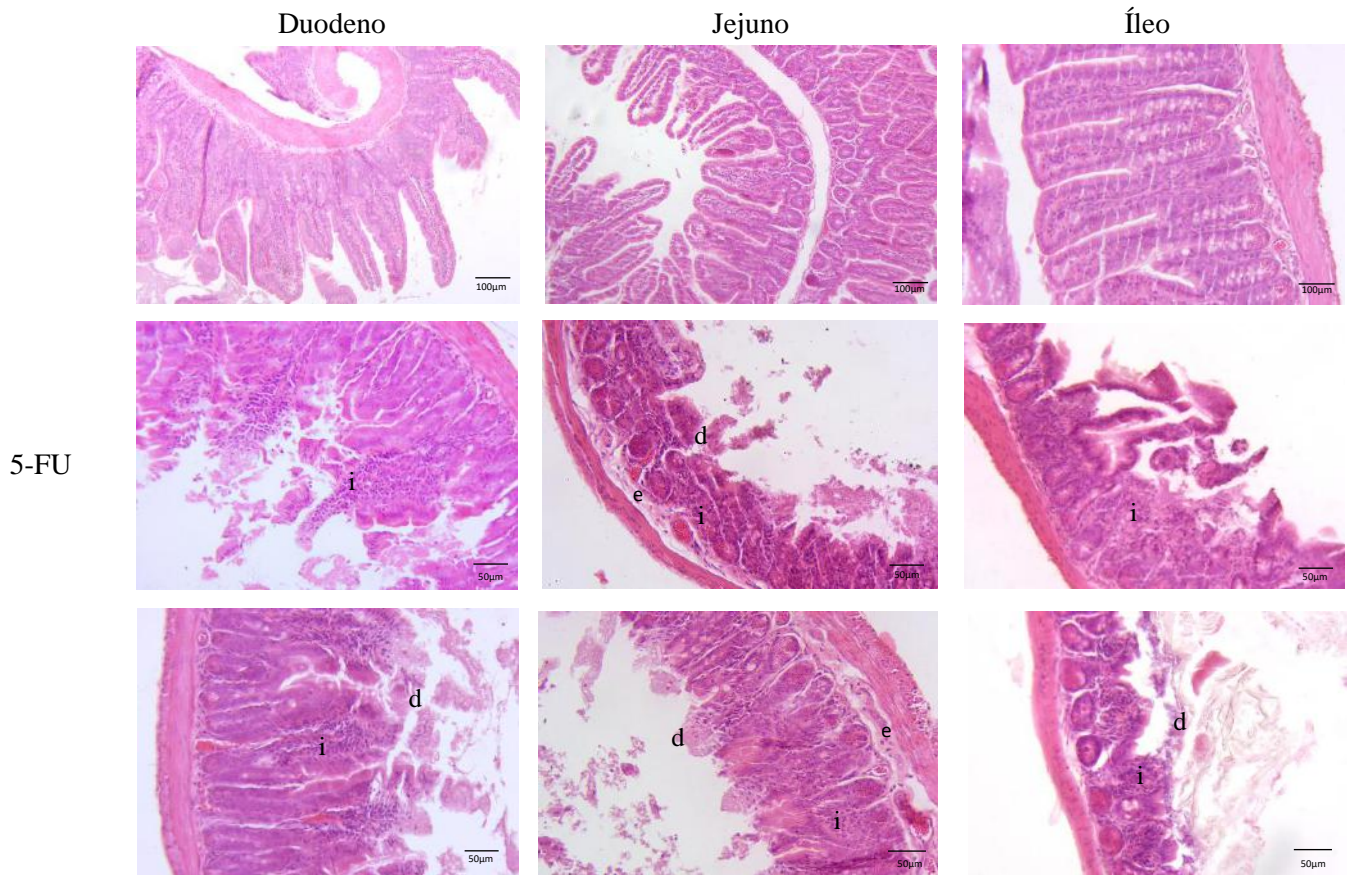


Fonte: Autores (2025).

3.7 Efeito da PLPp sobre as alterações histopatológicas em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Os camundongos que receberam solução salina apresentaram morfologia preservada quando comparados ao grupo 5-FU que tiveram a estrutura da mucosa do duodeno, jejuno e íleo severamente deterioradas. A partir da análise histopatológica destas porções foi possível evidenciar a perda da arquitetura, erosão, ruptura das vilosidades, a presença de infiltrados inflamatórios e a severa perda da arquitetura das criptas (Figura 7). As alterações achadas nos animais tratados com 5-FU e PLPp assemelham-se as observadas no tratamento com apenas 5-FU, sendo mais intensas na região do íleo, na qual a descamação e perda de arquitetura das vilosidades e criptas foi mais intensa. Apenas um indivíduo apresentou a morfologia intestinal preservada (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias do duodeno, jejuno e íleo de camundongos dos grupos salina, 5-FU e 5-FU+PLPp. Evidenciando a morfologia preservada do grupo salina e as principais alterações observadas nos grupos 5-FU e 5-FU+PLPp como a perda da arquitetura das vilosidades e criptas, edema (e), descamação das vilosidades (d) e a presença de infiltrados inflamatórios (i). Coloração: hematoxilina e eosina.



Fonte: Autores (2025).

3.8 Efeito da PLPp nos escores histopatológicos dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

O grupo salina apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo 5-FU e PLPp em ambos os segmentos intestinais, como demonstrado na Tabela 3. Entretanto, o pré- tratamento com PLPp não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos camundongos que receberam o quimioterápico.

Tabela 3 - Efeito da PLPp nos escores histopatológicos das porções intestinais dos camundongos. Os resultados foram apresentados como mediana e a amplitude dos escores. Para a análise estatística, utilizou o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn e $P < 0,05$. As letras iguais representam medianas com diferenças estatisticamente significante.

Grupos experimentais	Porções intestinais		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Salina	1(1-3)	0(0-1) _{a,b}	0(0-1) _{c,d}
5-FU	2.5(1-3)	2(1-2) _a	3(2-3) _c
PLPp	3(2-3)	2(2-3) _b	3(0-3) _d

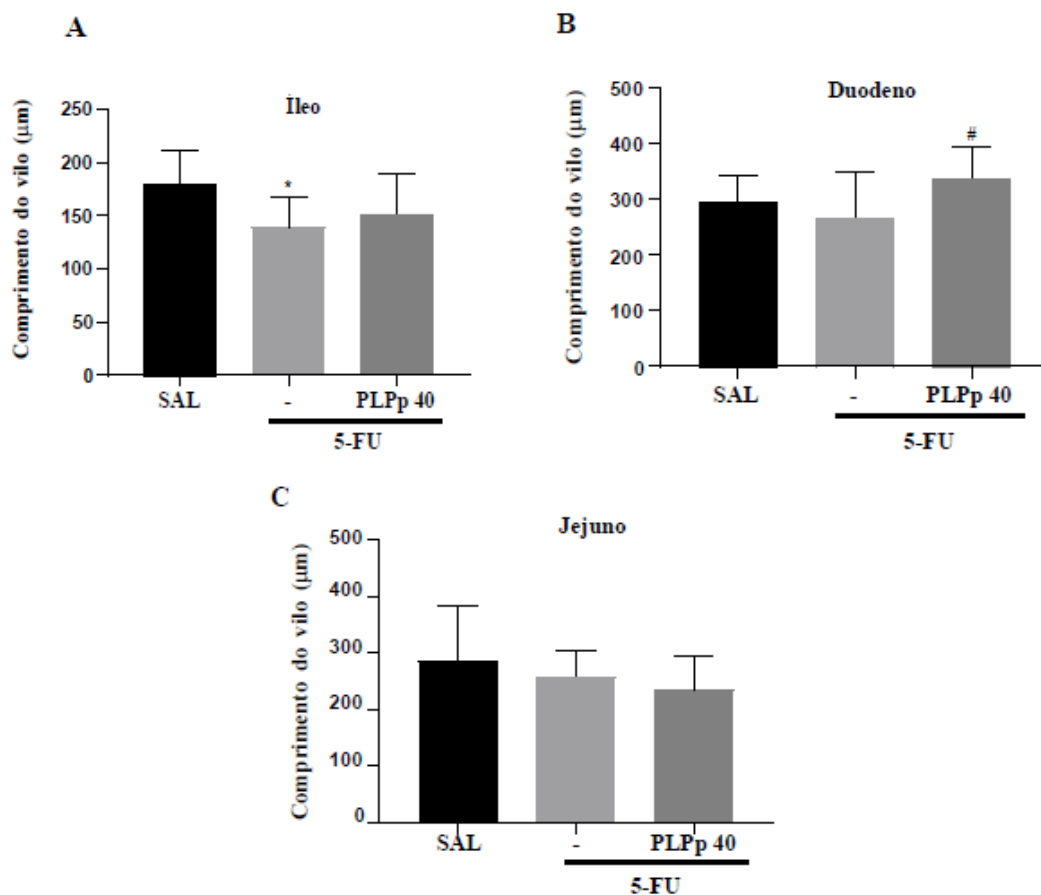
Fonte: Autores (2025).

3.9 Efeito PLPp nas alterações morfométricas na altura das vilosidades intestinais em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Esta análise permite mensurar a altura das vilosidades íntegras das porções do duodeno, jejuno e íleo (Figura 8). O tratamento com 5-FU provocou a redução significativa na altura das vilosidades apenas do íleo ($139,5 \pm 27,91 \mu\text{m}$) em comparação ao grupo que recebeu solução salina ($179,5 \pm 31,41 \mu\text{m}$) (Figura 8 A).

Entretanto, notou-se que no duodeno o pré-tratamento com PLPp aumentou significativamente a altura das vilosidades ($338,7 \pm 54,11 \mu\text{m}$) quando comparada ao grupo 5-FU ($267,1 \pm 81,99 \mu\text{m}$), a fração proteica atuou apenas neste seguimento (Figura 8 B). Vale ressaltar que nos três grupos experimentais foram identificadas poucas vilosidades que permaneceram íntegras ao ponto de realizar uma análise satisfatória.

Figura 8 - Efeito de PLPp sobre os comprimentos das vilosidades no intestino delgado dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. A) Íleo; B) Duodeno e C) Jejuno. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e expressos em μm . Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

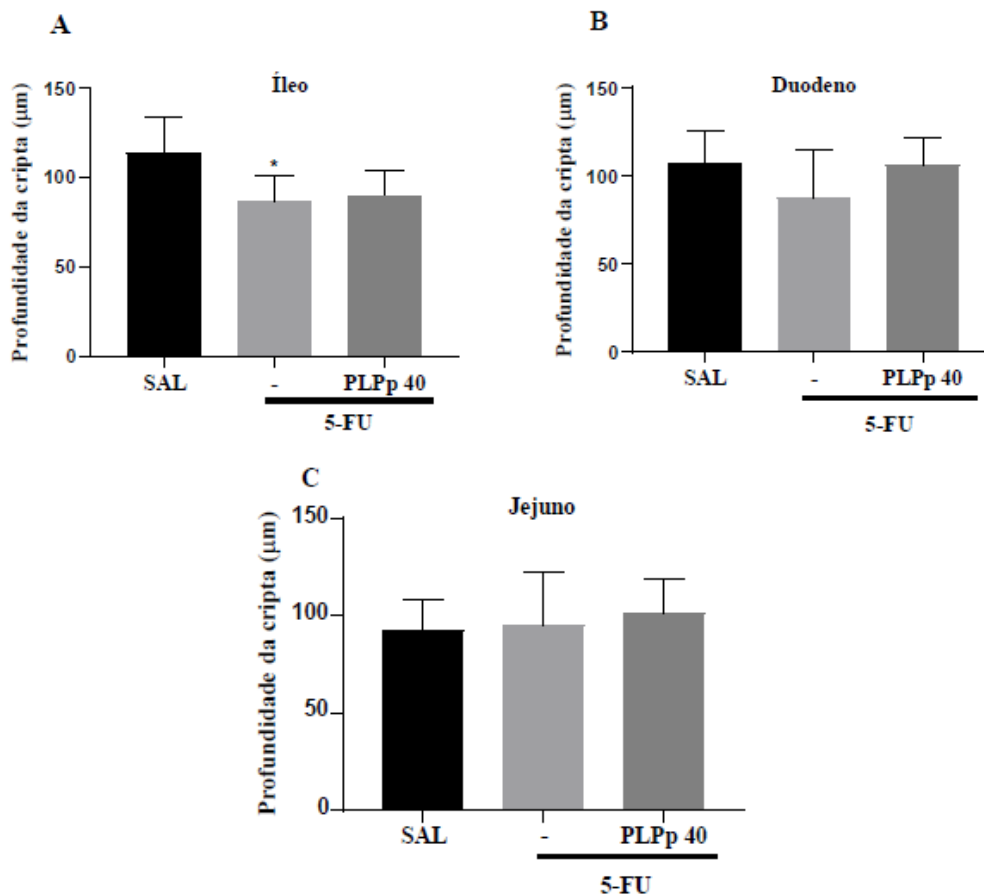


Fonte: Autores (2025).

3.10 Efeito PLPp nas alterações morfométricas na profundidade das criptas intestinais em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Em relação a medição das profundidades das criptas, foi possível observar que os animais que receberam 5-FU tiveram redução significativa na profundidade das criptas na porção ileal ($86,78 \pm 13,79 \mu\text{m}$) quando comparados ao grupo que recebeu solução salina ($113,4 \pm 20,75 \mu\text{m}$) (Figura 9 A). Por outro lado, a PLPp não apresentou diferença significativa com o 5-FU, ou seja, não evitou o aumento da profundidade nas criptas dos segmentos jejuno e duodeno (Figura 9 B e C).

Figura 9 - Efeito de PLPp sobre as profundidades das criptas no intestino delgado dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. A) Íleo; B) Duodeno e C) Jejuno. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e expressos em μm . Para a análise estatística, utilizou one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$, no qual * $P < 0,05$ vs grupo salina e # $P < 0,05$ vs grupo 5-FU.

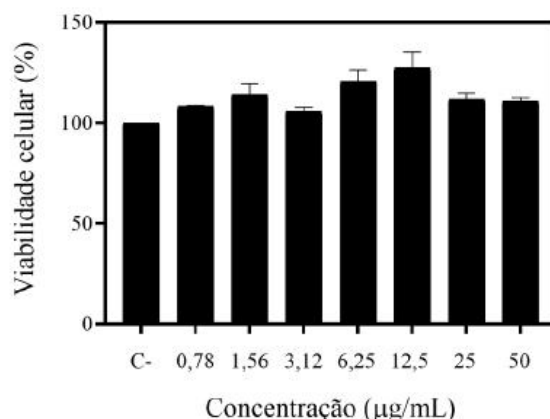


Fonte: Autores (2025).

3.11 Citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* de PLPp mostrou que as diferentes concentrações da amostra utilizadas mantiveram 100% da viabilidade celular, indicando ausência de toxicidade frente a linhagem celular HCT-116 (Figura 10).

Figura 10 - Percentual de viabilidade das células HCT-116 após exposição a diferentes concentrações de PLPp.



Fonte: Autores (2025).

No ensaio de avaliação do efeito de PLPp sobre a atividade citotóxica do 5-FU, foi possível observar que as duas concentrações da fração proteica utilizadas em associação ao quimioterápico não foram capazes de reduzir a CI50 para valores equivalentes à metade da CI50 do 5-FU sozinho, revelando que as proteínas laticíferas não apresentaram interação sinérgica com o fármaco, conseqüentemente, não sendo possível reduzir a toxicidade do mesmo. A PLPp não apresentou toxicidade frente às células da linhagem HCT-116, nas concentrações testadas, portanto, não foi possível determinar o valor da CI50 (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CI50 e intervalos de confiança (IC) encontrados para a PLPp e para o 5-FU sozinhos ou associados frente à linhagem HCT-116, após 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.

Grupos experimentais	PLPp	5-FU	5-FU + PLPp 5 µg/mL	5-FU + PLPp 50 µg/mL
CI50	> 50 µg/mL	11,26 µM	12,70 µM	11,61 µM
IC	-	8,72 - 14,76	10,62 - 15,27	8,82 - 15,34

Fonte: Autores (2025).

4. Discussão

A mucosite intestinal ainda é um efeito indesejado com alta incidência em pacientes oncológicos, comprometendo sua qualidade de vida. Por haver o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias e EROs (espécies reativas de oxigênio) na destruição da mucosa, propõe-se que agentes com ação anti-inflamatória e antioxidante possam melhorar o quadro clínico (Lee et al., 2017; Xiang et al., 2020). Sabendo das propriedades farmacológicas advindas das proteínas do látex de *Plumeria pudica*, o presente estudo verificou os efeitos de PLPp sobre os danos da mucosite intestinal induzida pelo 5-FU em camundongos.

A perda de peso é uma das principais manifestações observadas na mucosite, havendo relação com o comprometimento da capacidade de absorção dos alimentos ingeridos (Eduardo et al., 2018), necessitando de intervenções nutricionais em pacientes (Arends, 2018). Deste modo, avaliou-se o efeito da PLPp na perda de massa corpórea dos animais com mucosite intestinal. O resultado revelou que o pré-tratamento com as proteínas não causou alteração na massa ponderal dos animais quando comparado ao grupo 5-FU que teve declínio, não apresentando diferença estatística entre eles. Ali et al.

(2019) observaram diminuição do peso ponderal dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU, corroborando com o nosso achado.

O estresse oxidativo tecidual é outro marcador importante da mucosite intestinal, sua instalação acontece quando à superprodução de radicais livres e peróxidos, e a defesa antioxidante celular não consegue reverter a situação (Pisoschi & Pop, 2015; Baek & Lee, 2016). A administração do 5-FU provoca um drástico estresse oxidativo na mucosa do intestino, e é possível avaliar este processo através da peroxidação lipídica, identificado principalmente pela alta produção de MDA (Rtibi et al., 2018; Ali et al., 2019). Essa perturbação no estado redox normal celular pode ocasionar efeitos deletérios na estrutura e função dos componentes atingidos (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) (Sies, 2015; Vellosa et al., 2021).

Para combater o estresse oxidativo, o organismo faz uso dos sistemas antioxidantes endógenos de GSH e catalase. A molécula de glutatona é um composto tripeptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina, responsável por eliminar as espécies reativas de oxigênio das células, o que a torna agente crucial para desintoxicação celular. Com o desequilíbrio entre EROs e GSH, a capacidade protetora da molécula antioxidante é prejudicada, havendo diminuição da sua concentração tecidual. Alteração na homeostase de GSH leva à diferentes patologias, como câncer, distúrbios neurodegenerativos e hepáticos, diabetes e fibrose cística (Bansal & Simon, 2018; Liu et., 2021).

Outra molécula importante em desenvolver papel antioxidante é SOD, metaloenzima capaz de catalisar a conversão de radicais superóxidos (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), caracterizada como a primeira linha de defesa contra as lesões causadas por EROs e encontrada no meio intra e extracelular (Zhao et al., 2021). A quantificação deste antioxidante no interior da célula é considerada um importante marcador do estresse oxidativo (Li et al., 2022).

À vista disso, o presente estudo investigou o efeito de PLPp sobre os níveis teciduais dos parâmetros de estresse oxidativo na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados demonstram que o pré-tratamento dos animais com a fração proteica reduziu de forma significativa MDA, revertendo o aumento da peroxidação lipídica promovida pelo fármaco e elevou os índices antioxidantes de GSH e SOD. Esses dados indicam que PLPp desempenha um papel antioxidante na condição patológica.

Dados da literatura mostram que as proteínas advindas do látex de diferentes espécies possuem ação antioxidante em distintos modelos animais (Oliveira et al., 2019; Ramos et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Corroborando com o achado, estudo de Ramos et al. (2020) com as proteínas laticífera (PL) de *Calotropis procera* demonstrou a diminuição dos níveis de MDA em modelo de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. Resultado semelhante foi observado com estas mesmas proteínas por Rangel (2019), em um modelo de mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico irinotecano em camundongos.

No que se refere a proteção antioxidante, trabalhos com PLPp em modelos de inflamação induzida por etanol, ácido acético e óleo de rícino *in vivo* apontaram restauração dos níveis de GSH e SOD (Santana et al., 2018; Moita, 2019; Oliveira, et al., 2019). Em consonância com essas informações, Ramos et al. (2020) também relataram aumento dos antioxidantes endógenos na mucosite oral.

O processo inflamatório é um dos agentes chaves por trás da toxicidade gastrointestinal do tratamento quimioterápico. Descrito como uma resposta do organismo a estímulos biológicos, químicos e/ou físicos, envolvendo diferentes moléculas de superfície celular, mediadores solúveis e células. Dentre as células granulocíticas responsáveis pela resposta inicial da inflamação podemos destacar os neutrófilos, mediadores celulares primários, seus grânulos possuem a enzima MPO, com papel fundamental na produção de EROs. A partir desta enzima é viável avaliar a intensidade da inflamação, relevante indicador da inflamação na mucosa intestinal (Germolec et al., 2018; Quaresma et al., 2019).

A perturbação na mucosa intestinal causada pela ação dos quimioterápicos induz condições inflamatórias representadas pela alta concentração de citocinas e o recrutamento de células imunes (neutrófilos e eosinófilos). Juntos

promovem alterações nas proteínas de junção celular, acarretando no aumento da permeabilidade intestinal e o desenvolvimento de danos na integridade da mucosa (Li et al., 2017; Galdino et al., 2018).

Compreendendo que o recrutamento de neutrófilos é responsável por lesões na mucosa que reveste o trato gastrointestinal induzida por 5-FU, investigou-se o efeito de PLPp sobre a atividade de MPO em camundongos. Desse modo, foi demonstrado que o pré-tratamento com as proteínas reduziu de forma significativa o nível de MPO no tecido intestinal. Semelhantes a este resultado, trabalhos com PLPp revelaram atenuação da atividade de MPO em modelo de peritonite induzido por carragenina, colite ulcerativa induzido por ácido acético e periodontite induzida por ligadura (Fernandes et al., 2015; Oliveira et al., 2019; Oliveira et al., 2021). Na mucosite intestinal induzida por irinotecano, Alencar et al. (2017) observaram que as proteínas de *Calotropis procera* reduziram a concentração de MPO nos animais.

O óxido nítrico consiste em um gás solúvel produzido a partir de uma reação catalisada pela óxido nítrico sintase 2, possuindo função no metabolismo, sobrevivência e morte celular. No curso da resposta inflamatória, há geração e liberação de diferentes radicais livres, dentre eles, o óxido nítrico, significativo indutor de danos celulares. Nesta condição, é liberado por células relacionadas a imunidade e reações inflamatórias. A administração de 5-FU aumenta significativamente a produção de óxido nítrico nas porções intestinais (Araújo et al., 2020; Król & Kepinska, 2020).

Neste trabalho avaliou a ação de PLPp sobre o nível tecidual de nitrato e nitrito (NO_3/NO_2), produtos derivados do óxido nítrico, na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Como resultado, o pré-tratamento com a fração proteica inibiu a produção de óxido nítrico, indicando redução da inflamação no tecido. Esta ocorrência também foi verificada por Moita (2019) na lesão gástrica induzida por etanol.

Outro fator característico da mucosite intestinal é a destruição da integridade da mucosa que reveste o intestino, caracterizado pela redução da área das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e apoptose dos enterócitos, acompanhado da presença de infiltrado inflamatório e redução do comprimento do intestino delgado (Soares et al., 2013; Lee et al., 2014; Quaresma et al., 2019). Estudo realizado com pacientes em tratamento quimioterápico, revelou que a apoptose foi o dano histológico primário observado, dando destaque para o aumento de sete vezes da apoptose nas criptas no primeiro dia após o tratamento e o efeito máximo atingido no terceiro dia após o tratamento (Keefe et al., 2000).

A mucosa intestinal possui papel primordial de atuar como barreira entre o lúmen do órgão e o sistema imunológico subjacente, esta barreira epitelial é responsável pela permeabilidade seletiva da mucosa, limitando a troca de água, íons e macromoléculas, bem como evitando a passagem de germes (Odenwald & Turner, 2017). A destruição desta mucosa favorece o transpasse de moléculas pró-inflamatórias que ativam respostas inflamatórias e danos aos tecidos. Além disso, há o favorecimento de proliferação bacteriana nas lesões, promovendo mais inflamação por estimular a ativação e infiltração de macrófagos pró-inflamatórios, gerando um *loop* de inflamação no intestino (Chelakkot et al., 2018; Oliveira et al., 2021b).

Os animais submetidos ao tratamento com 50 mg/kg por 3 dias no presente estudo apresentaram redução do comprimento das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e células necróticas, demonstrando o comprometimento da mucosa intestinal. Estes achados corroboram com a descrição fisiopatológica descrita por Sonis (2004) e com os escores histológicos de MacPherson e Pfeiffer (1978). Entretanto, o pré-tratamento com PLPp não melhorou as alterações histopatológicas causadas pelo quimioterápico.

Estudo realizado por Freitas (2016) com diferentes subfrações de PL de *Calotropis procera* em modelo de mucosite oral induzida por 5-FU revelou que uma das frações submetida ao tratamento com iodoacetamida (IAA), inibidor seletivo da atividade de proteases cisteínicas, foi a responsável por desenvolver melhor reparação das lesões na mucosa oral dos animais, uma vez que só PL, ausente de IAA, não foi capaz de prevenir a geração de lesões na bochecha. Semelhante a este resultado, Rangel (2019) observou que PLII IAA, fração inibida para presença de atividade de proteases cisteínicas, melhorou as alterações histopatológicas (encurtamento dos vilos, vacuolização dos enterócitos, necrose de criptas e intenso infiltrado

inflamatório) induzidas por irinotecano na mucosite intestinal. Diante desses dados, sugere-se que a atividade proteolítica presente em PLPp pode estar influenciando de forma negativa na ação deste material na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Assim, realizar uma investigação sobre a atividade de PLPp com suas proteases cisteínicas inibidas poderia contribuir na confirmação desta hipótese.

Baseado em dados da literatura, o látex possui ação protetora contra patógenos e insetos, envolvendo alcaloides, cardenólídeos, borracha, proteínas e β -1,3-glucanases nesta função. Dando ênfase nas proteínas, dependendo da atuação de cada, pode haver danos em estruturas biológicas ou prejuízos a complexos de proteínas (Dussourd, 2017; Ramos et al., 2019). Já mencionado por Rangel (2019), relatou-se que o tratamento dos animais com PL de *Calotropis procera* acarretou em óbitos e diarreia severa em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano e 5-FU.

Ensaio *in vitro* realizados neste estudo tiveram como objetivo avaliar a citotoxicidade de PLPp nas células testadas e um possível sinergismo entre a amostra e o quimioterápico 5-FU. No primeiro experimento, revelou que PLPp manteve 100% a viabilidade celular nas diferentes concentrações empregadas, indicando que a fração proteica não é tóxica para as células HCT-116 em concentração que variaram de 0,78 a 50 μ g/mL. Em relação a investigação sobre efeitos citotóxicos, protetores e deletérios, é crucial que a primeira etapa da pesquisa seja sobre a citotoxicidade *in vitro* do produto em análise. Dependendo da finalidade do estudo, espera-se que o efeito tóxico para as células em cultura seja nenhum ou baixo (Bunel et al., 2014). Neste trabalho, a ausência de toxicidade foi um ponto importante para a realização do ensaio seguinte.

Além da toxicidade individual de PLPp, investigou-se o efeito da mesma em duas concentrações sobre a atividade citotóxica do 5-FU em células da linhagem HCT-116. Como resultado, a fração proteica não foi capaz de reduzir a CI50 do quimioterápico, apontando que as proteínas não reduziram a citotoxicidade do quimioterápico. A manifestação desta propriedade seria valiosa para uma possível estratégia em diminuir os efeitos colaterais promovidos pela quimioterapia.

Sabe-se que os quimioterápicos causam consideráveis efeitos adversos ao paciente, variando de acordo com o fármaco, dose, via de administração e fatores de risco da própria pessoa. Algumas das toxicidades podem ser prevenidas com uso de medicação apropriada, entretanto, quando não há essa possibilidade é necessário alterar o protocolo para que ocorra diminuição do efeito colateral. Essa modificação no curso do tratamento traz prejuízo tanto para a eficácia como também ao bem-estar do paciente. Então, encontrar alternativas de tratamento ou maneiras de amenizar esses fatores é ideal para o sucesso da terapia oncológica (Jesus, 2018; Jones & Ocen, 2020).

5. Conclusão

O presente trabalho revelou que o pré-tratamento dos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU com PLPp atenuou os parâmetros da inflamação mediante a diminuição do infiltrado inflamatório (MPO) e a concentração de NO₃/NO₂ no tecido duodenal dos camundongos. No que se refere ao estresse oxidativo, PLPp reverteu o aumento da peroxidação lipídica (MDA) e elevou os níveis do sistema antioxidante endógeno, GSH e SOD. Todavia, é necessário investigar a relação entre a fração proteica e a não melhora das alterações histológicas.

Referências

- Alencar, N. M. N., da Silveira Bitencourt, F., de Figueiredo, I. S. T., Luz, P. B., Lima-Júnior, R. C. P., Aragão, K. S., ... & Ramos, M. V. (2017). Side-effects of Irinotecan (CPT-11), the clinically used drug for colon cancer therapy, are eliminated in experimental animals treated with latex proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). *Phytotherapy Research*, 31(2), 312-320. Doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.5752>
- Araújo, L. C. R., Lins, M. A., de Lima, G. R., Moreschi, A. R. C., Lima, E. S., Hanan, S. A., ... & Bandeira, M. F. C. L. (2020). Atividade do o? leo de copai? ba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamato? ria. *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 53538-53553.
- Arends, J. (2018). How to feed patients with gastrointestinal mucositis. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 12(2), 168-173.
- Baek, J., & Lee, M. G. (2016). Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report*, 21(4), 164-169.

- Bansal, A., & Simon, M. C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2291-2298.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of investigative dermatology*, 78(3), 206-209.
- Bunel, V., Ouedraogo, M., Nguyen, A. T., Stévigny, C., & Duez, P. (2014). Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. *Planta medica*, 80(14), 1210-1226.
- Carneiro-Filho, B. A., Oriá, R. B., Rea, K. W., Brito, G. A., Fujii, J., Obrig, T., ... & Guerrant, R. L. (2004). Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Nutrition*, 20(10), 934-941.
- Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & molecular medicine*, 50(8), 1-9.
- Das, K., Samanta, L., & Chainy, G. B. N. (2000). A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 37(3), 201-204.
- Dussourd, D. E. (2017). Behavioral sabotage of plant defenses by insect folivores. *Annual review of entomology*, 62(1), 15-34.
- Eduardo, F. D. P., Bezinelli, L. M., Gobbi, M. F., Pereira, A. Z., Vogel, C., Hamerschlag, N., & Corrêa, L. (2018). Impact of oral and gastrointestinal mucositis on body weight alterations during hematopoietic stem cell transplantation. *Nutrition and cancer*, 70(2), 241-248.
- Elad, S., Cheng, K. K. F., Lalla, R. V., Yarom, N., Hong, C., Logan, R. M., ... & Zur, E. (2020). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*, 126(19), 4423-4431.
- Escalante, J., McQuade, R. M., Stojanovska, V., & Nurgali, K. (2017). Impact of chemotherapy on gastrointestinal functions and the enteric nervous system. *Maturitas*, 105, 23-29.
- Fernandes, H. B., Machado, D. L., Dias, J. M., Brito, T. V., Batista, J. A., Silva, R. O., ... & Oliveira, J. S. (2015). Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 269-277.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., ... & Albini, A. (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS one*, 10(2), e0115686.
- Gai, Y. P., Zhao, Y. N., Zhao, H. N., Yuan, C. Z., Yuan, S. S., Li, S., ... & Ji, X. L. (2017). The latex protein MLX56 from mulberry (*Morus multicaulis*) protects plants against insect pests and pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1475.
- Galdino, F. M. P., Andrade, M. E. R., de Barros, P. A. V., de Vasconcelos Generoso, S., Alvarez-Leite, J. I., de Almeida-Leite, C. M., ... & Cardoso, V. N. (2018). Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. *Journal of Functional Foods*, 49, 485-492.
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Immunotoxicity testing: Methods and protocols*, 57-79.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1), 131-138.
- Huang, P., Sun, M., & Zeng, J. (2020). Low-molecular compounds of latex-bearing plants and their biosynthesis. *Advances in botanical research*, 93, 99-118.
- Jesus, L. C. L. de. (2018). *Efeito terapêutico do leite fermentado por Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis CIDCA 133 em modelo de mucosite intestinal induzido pelo antineoplásico 5-Fluorouracil* [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais].
- Jones, R., & Ocen, J. (2020). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 48(2), 97-102.
- Keefe, D. M. K., Brealey, J., Goland, G. J., & Cummins, A. (2000). Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*, 47(5), 632-637.
- Król, M., & Kepinska, M. (2020). Human nitric oxide synthase—Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 56.
- Lee, C. S., Ryan, E. J., & Doherty, G. A. (2014). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(14), 3751.
- Lee, J. M., Chun, H. J., Choi, H. S., Kim, E. S., Seo, Y. S., Jeon, Y. T., ... & Sul, D. (2017). Selenium administration attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *Nutrition and cancer*, 69(4), 616-622.
- Li, H. L., Lu, L., Wang, X. S., Qin, L. Y., Wang, P., Qiu, S. P., ... & Wu, X. J. (2017). Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 455.
- Li, X., Cao, X., Ying, Z., Yang, G., Hoogendijk, E. O., & Liu, Z. (2022). Plasma superoxide dismutase activity in relation to disability in activities of daily living and objective physical functioning among Chinese older adults. *Maturitas*, 161, 12-17.
- Lima, R. C. S., Silva, M. C. C., Aguiar, C. C. T., Chaves, E. M. C., Dias, K. C. F., Macedo, D. S., ... & Vasconcelos, S. M. M. (2012). Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. *Epilepsy & Behavior*, 23(2), 123-126.

- Liu, T., Sun, L., Zhang, Y., Wang, Y., & Zheng, J. (2022). Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(1), e22942.
- Luz, P. B. (2012). *Fração proteica isolada do látex de Calotropis procera (AIT.) R.Br reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos* [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará]. Universidade Federal do Ceará.
- MacPherson, B. R., & Pfeiffer, C. J. (1978). Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, 17(2), 135-150.
- Marciano, J. S. P. (2017). *Identificação de proteínas presentes no soro do látex da Himatanthus succuba (Apocynaceae)* [Tese de Doutorado, Universidade de Ribeirão Preto]. Universidade de Ribeirão Preto.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2017). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(1), 9-21.
- Oliveira, J. S., Bezerra, D. P., de Freitas, C. D. T., Marinho Filho, J. D. B., de Moraes, M. O., Pessoa, C., ... & Ramos, M. V. (2007). In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Toxicology in vitro*, 21(8), 1563-1573.
- Oliveira, J. S., Costa-Lotufo, L. V., Bezerra, D. P., Alencar, N. M., Marinho-Filho, J. D. B., Figueiredo, I. S. T., ... & Ramos, M. V. (2010). In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 382, 139-149.
- Oliveira, L. E., Moita, L. A., Souza, B. S., Oliveira, N. M., Sales, A. C., Barbosa, M. S., ... & Oliveira, J. S. (2021). Latex proteins from *Plumeria pudica* reduce ligature-induced periodontitis in rats. *Oral Diseases*, 28(3), 786-795.
- Oliveira, M. M. B., Araújo, A. A., Ribeiro, S. B., de Sales Mota, P. C. M., Marques, V. B., da Silva Martins Rebouças, C., ... & de Medeiros, C. A. C. X. (2021). Losartan improves intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Scientific reports*, 11(1), 23241.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Quaresma, M., Damasceno, S., Monteiro, C., Lima, F., Mendes, T., Lima, M., ... & Soares, P. (2020). Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutrition and Cancer*, 72(8), 1355-1365.
- Ramos, M. V., Demarco, D., da Costa Souza, I. C., & de Freitas, C. D. T. (2019). Laticifers, latex, and their role in plant defense. *Trends in plant science*, 24(6), 553-567.
- Ramos, M. V., Freitas, A. P. F., Leitão, R. F., Costa, D. V., Cerqueira, G. S., Martins, D. S., ... & Brito, G. A. C. (2020). Anti-inflammatory latex proteins of the medicinal plant *Calotropis procera*: a promising alternative for oral mucositis treatment. *Inflammation Research*, 69, 951-966.
- Rangel, G. F. P. (2019). *Efeito de proteases isoladas da fração LP11 do látex de Calotropis procera na prevenção da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos* [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará]. Universidade Federal do Ceará.
- Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Sebai, H., & Marzouki, L. (2018). Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicology mechanisms and methods*, 28(4), 262-267.
- Santana, L. D. A. B., Aragão, D. P., Araújo, T. D. S. L., de Sousa, N. A., de Souza, L. K. M., Oliveira, L. E. S., ... & Oliveira, J. S. (2018). Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1147-1154.
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.
- Soares, P. M., Lima, S. R., Matos, S. G., Andrade, M. M., Patrocínio, M. C., de Freitas, C. D., ... & Vasconcelos, S. M. (2005). Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 125-129.
- Soares, P. M., Mota, J. M. S., Souza, E. P., Justino, P. F., Franco, A. X., Cunha, F. Q., ... & Souza, M. H. (2013). Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*, 61(1), 46-49.
- Sonis, S. T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 277-284.
- Souza, B. S., de Moraes Oliveira, N. V., Moita, L. A., Oliveira, L. E. S., de Brito, F. C., da Silva, F. R. P., ... & Oliveira, J. S. (2021). Acute and Subchronic Toxicity Assessment of Proteins from *Plumeria pudica* Latex in Mice. *Research, Society and Development*, 10(6), e58610616174-e58610616174.
- Velloso, J. C. R., Biavatti, M., Françaia, P. C. O., de Mello, B. J., de Almeida, A. C., & Bueno, G. E. (2021). Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 10152-10168.
- Warowicka, A., Nawrot, R., & Goździcka-Józefiak, A. (2020). Pharmacologically active compounds from latex-bearing plants. In *Advances in botanical research* (Vol. 93, pp. 119-151). Academic Press.
- Xiang, D. C., Yang, J. Y., Xu, Y. J., Zhang, S., Li, M., Zhu, C., ... & Liu, D. (2020). Protective effect of Andrographolide on 5-Fu induced intestinal mucositis by regulating p38 MAPK signaling pathway. *Life sciences*, 252, 117612.
- Zhao, H., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(35), 6939-6957.