



LIGA DE ENSINO DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO UNIVERSITÁRIO DO RIO GRANDE DO NORTE

CURSO DE NUTRIÇÃO

NILVÂNIA GALDINO DE OLIVEIRA

*UNCÁRIA TOMETOSA (UNHA DE GATO) NO TRATAMENTO DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR METOTREXATO EM
CAMUNDONGOS*

NILVÂNIA GALDINO DE OLIVEIRA

**UNCÁRIA TOMENTOSA (UNHA DE GATO) NO TRATAMENTO DA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR METOTREXATO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Nutrição do Centro Universitário do Rio Grande do Norte como requisito final para conclusão de bacharel em Nutrição.

Orientadora: Profª MSc Érika Alessandra Melo Costa

UNI-RN
BIBLIOTECA

RB: 36540

Cód de Barra: 1001995

Data: 14 / 06 / 13

612.39

048u

2012

6x.01

Catalogação na Publicação – Biblioteca do UNI-RN
Setor de Processos Técnicos

Oliveira, Nivânia Galdino de.

Uncária tomentosa (unha de gato) no tratamento da mucosite intestinal induzida por metotrexato em camundongos. / Nivânia Galdino de Oliveira. – Natal, 2012.
31f.

Orientador: Prof^a. Msc. Érika Alessandra Melo Costa.

Monografia (Graduação em Nutrição) – Centro Universitário do Rio Grande do Norte.

1. Mucosite – Monografia. 2. Metotrexato – Monografia. 3. Uncaria Tomentosa – Monografia. I. Costa, Érika Alessandra Melo. II. Título.

RN/UNI-RN/BC

CDU 612.39

NILVÂNIA GALDINO DE OLIVEIRA

**UNCÁRIA TOMETOSA (UNHA DE GATO) NO TRATAMENTO DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR METOTREXATO EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição do Centro
Universitário do Rio Grande do Norte, aprovado em 04/12/2012 pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Érika Alessandra Melo Costa
Orientadora

Carina Leite de Araújo de Oliveira
Membro Examinador

Kétsia Bezerra Medeiros
Membro Examinador

Dedico este trabalho a DEUS que me orientou e me fez forte em todos os momentos dessa jornada. Aos meus amados pais, Francisco Nilvan de Oliveira e Vânia Maria Galdino, por sempre acreditarem na minha capacidade e por serem minha fonte de força e perseverança. A minha orientadora Érika Alessandra Melo Costa pela sabedoria na orientação e por sua compreensão e auxílio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela a oportunidade de viver e por ter me guiado na escolha de uma profissão tão linda e acima de tudo, por ele sempre está comigo me dando força e confiança na busca dos objetivos de vida.

Aos meus pais pelo exemplo de vida e de luta, pelos esforços em prol do meu sonho, por me incentivarem, por me amarem e por acreditarem sempre na minha capacidade.

À minha família, em especial minha avó Antônia Fernandes pelo cuidado, carinho, atenção, amizade e companheirismo. A minha querida tia Joana Leopoldina, por sempre confiar em mim e valorizar a minha profissão. As minhas irmãs lindas, Vanessa e Geovanna que apesar de morarem distantes e de serem tão pequenas são meus Anjos da guarda. Ao meu Tio Gonzaga Júnior pelo apoio e incentivo. Ao meu namorado Sharley Almeida, por acreditar na minha capacidade e pela compreensão nos momentos de ausência.

Às minhas, inicialmente colegas e hoje grandes amigas (Ana Karina, Florência Martinez, Laryssa Lopes e Filasmonique Moura) pelos momentos de dificuldades e alegrias que passamos juntas durante esses 4 anos. Vocês continuaram presentes em minha vida.

Às minhas amigas e futuras colegas de profissão, Taliérica Karina, Joyce Costa, Juliana da Mata e Andressa Alves e ao Bioterista Leandro Moura de Freitas. Foram vocês que me deram todo apoio durante meu experimento.

À Farmácia de manipulação, Ao Pharmaceutico, pelo apoio com o fornecimento da *Uncaria tomentosa* para o experimento.

À minha querida orientadora Professora Érika Melo, por quem tenho admiração e carinho, por sua gentileza em me receber como orientanda, pela ética, atenção, disponibilidade e paciência e pela oportunidade de novos conhecimentos.

À professora Christina, bióloga da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que teve toda atenção e paciência, auxiliando nas análises histológicas do estudo.

Quero agradecer também, a todas minhas queridas professoras pelo carinho, amizade, confiança, respeito e credibilidade que me proporcionaram. Foram

vocês que contribuíram na formação dos meus conhecimentos. Ficarão guardadas no meu coração para sempre.

Às minhas Preceptoras de estágio curricular que me receberam de braços abertos e que transmitiram seus conhecimentos com toda dedicação.

Ao Hospital Naval de Natal pela oportunidade do estágio extracurricular, especialmente às nutricionistas Niethia Lira, Ruth Edel e Vilma Montenegro, que me deram apoio, incentivo e acima de tudo conhecimentos práticos na área. Sou extremamente grata a elas, por participarem de maneira efetiva e tão positiva na minha formação acadêmica, servindo como grandes exemplos para o meu futuro profissional.

A Técnica de Nutrição Silvia Maria da Silva, por sua atenção, amizade e carinho.

Finalmente, meus sinceros agradecimentos à todos aqueles que colaboraram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho, e me acompanharam neste momento tão importante da minha vida acadêmica e pessoal. A todos vocês, muito Obrigada!

RESUMO

A inflamação é uma reação de defesa do organismo, que ocorre de forma inespecífica, frente a agentes agressores de natureza física, química ou biológica. A inflamação intestinal (mucosite), pode se manifestar clinicamente como mal estar, vômitos, anorexia, dor abdominal e diarreia. Essa pode ser originada por doenças inflamatórias intestinais ou por uso de medicamentos como quimioterápicos. A *Uncaria tomentosa* é utilizada como uma alternativa de tratamento para várias doenças por apresentar propriedades antiinflamatórias, imunomodulatória e pró-apoptótica. O estudo teve como objetivo investigar o efeito antiinflamatório da *Uncaria tomentosa* no intestino delgado de camundongos com mucosite intestinal. O experimento durou 5 dias e utilizou 24 camundongos machos da linhagem Swiss, com idade média de 2 meses e peso médio aproximado de 42,4g no início do experimento. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Para a dieta foi utilizada a ração comercial padrão para roedores. Os animais foram divididos em 04 grupos, sendo o GRUPO 1 (Controle) e oferecido ração comercial e água ad libitum durante os dias de pesquisa; O GRUPO 2 (Mucosite), submetido à indução da mucosite intestinal através do metotrexato nos 3 últimos dias consecutivos do experimento. O GRUPO 3 (*Uncaria tomentosa*) recebeu ração comercial e água ad libitum além da administração por gavagem do extrato, contendo 0,536g da *Uncaria tomentosa*. O GRUPO 4 (*Uncaria tomentosa* + Mucosite) teve o mesmo procedimento do grupo anterior com acréscimo do medicamento metotrexato nos 3 últimos dias. Foi observado que o GRUPO 4 apresentou a maior perda de peso (1,5g) quando comparado com os demais grupos. O GRUPO 3 teve uma perda de peso menor (1,33g) e a perda de peso do GRUPO 2 foi de apenas 0,5g. Apenas o GRUPO 1 (controle) teve ganho de peso (0,17g). Observou-se que o grupo mucosite, teve o comprimento das vilosidades diminuído em relação aos demais grupos. O grupo *Uncaria tomentosa*, apresentou vilosidades intestinais e criptas com profundidades menores quando comparadas ao grupo controle. Comparando o *Uncaria tomentosa* que teve indução de mucosite, com os demais grupos, houve um aumento do tamanho da altura das vilosidades. Com relação a profundidade das criptas, observou-se que o grupo *Uncaria tomentosa* teve média menor em relação aos outros grupos e o grupo mucosite apresentou maior média na profundidade das criptas. O metotrexato gerou desestruturação na mucosa intestinal do duodeno. A *Uncaria tomentosa* teve eficácia na recuperação da integridade da mucosa intestinal dos animais com mucosite, promovendo o aumento das vilosidades do duodeno e diminuição na profundidade das criptas. Sugere-se que a *Uncaria tomentosa* possa ter propriedades não só anti-inflamatórias, mas também estimular a perda de peso.

Palavras-chave: Mucosite, metotrexato, *Uncaria tomentosa*.

ABSTRACT

Inflammation is a defense reaction of the organism, which occurs nonspecifically, against physical, chemical or biological aggressors. The intestinal inflammation (mucositis) is clinically manifested as malaise, vomiting, anorexia, abdominal pain and diarrhea. This can be caused by inflammatory bowel disease or use of medications such as chemotherapy drugs. The cat's claw is used as an alternative treatment for various diseases due to its anti-inflammatory, immunomodulatory and pro-apoptotic activity. Thus, the study aimed to assess whether or not it interferes positively in the evolution of animal body weight. The experiment lasted 5 days and used 24 male mice of the Swiss strain, with an average age of 02 months and weighing approximately 42.4 g at baseline. The animals were kept under controlled ambient temperature of $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 12 hours photoperiod. For diet was used standard commercial feed for rodents. The animals were divided into 04 groups, with group 1 (control) and given commercial feed and water at libitum during days of research, GROUP 2 (Mucositis), submitted to intestinal mucositis induced by methotrexate in the last 03 consecutive days the experiment. GROUP 3 (cat's claw) received commercial feed and water at libitum addition to administration by gavage of the extract, containing 0.536 g of cat's claw. GROUP 4 (cat's claw+ Mucositis) had the same procedure as the previous group with the addition of the drug methotrexate in the past 3 days. It was observed that the group 4 presented a bigger weight loss (1.5 g) when compared to the other group. The third group had a lower weight loss (1.33 g) and the weight loss of Group 2 was only 0.5 g. Only the group 1 (control) had gained weight (0.17 g). It was observed that the group mucositis the length of the villi was lower than and the other groups. The group cat's claw presented intestinal villi and crypts with smaller depths when compared to the control group. Comparing the group cat's with mucositis, with the other groups, there was an increase in the size of the villus height. Regarding crypt depth was observed that the group cat's claw had lower mean compared to the other groups and the group had higher average mucositis in crypt depth. It is suggested that cat's claw not only presents anti-inflammatory properties, but also encourages weight loss. The methotrexate generated disruption in the intestinal mucosa of the duodenum. The cat's claw was effective in restoring the integrity of intestinal mucosa of animals with mucositis, which increases duodenal villus and crypt depth decreased.

Keywords: Mucositis, methotrexate, *Uncaria tomentosa*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1	INFLAMAÇÃO INTESTINAL	11
3.2	<i>UNCARIA TOMENTOSA</i>	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	ANIMAIS E DIETA	16
4.2	DESENHO DOS GRUPOS DE ESTUDOS	16
4.3	SUPLEMENTAÇÃO	18
4.4	EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL	18
4.5	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE MUCOSITE	18
4.6	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	18
4.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
5.1	ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL	20
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	21
	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1.0- INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta celular que tem importância vital na recuperação da homeostase quando o organismo é atacado por agentes nocivos ou sujeito a lesões mecânicas dos tecidos. Ela é classicamente definida como uma reação de defesa do organismo, que ocorre de forma inespecífica, a princípio local, frente a agentes agressores de natureza física, química ou biológica (MARQUES, 2008; PINTO et al., 1997).

A mucosite (oral e intestinal) é uma lesão inflamatória que pode ocorrer no aparelho digestivo decorrente do tratamento antineoplásico. É um termo que descreve uma síndrome caracterizada por ulcerações e sintomas gastrointestinais e clínicos como vômitos, anorexia e, principalmente, diarreia. As manifestações orais e intestinais constituem um aspecto importante proveniente da toxicidade de agentes neoplásicos, afetando a habilidade de tolerar a quimioterapia e o custo geral do tratamento e pode ser originada pelo uso de medicamentos como quimioterápicos (LIMA, 2004; MARQUES, 2008; PINTO et al., 1997).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atuam de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, gerando assim apoptose em células saudáveis que estejam em divisão celular ativa (ALMEIDA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006). Existem alguns nutrientes específicos com capacidade de modular as respostas imunológicas e inflamatórias em animais e seres humanos. O fitoterápico, *Uncaria tomentosa* é exemplo de uma planta com propriedades medicinais (BARNI e SANTOS, 2011; SOUZA e CIMERMAN, 2010).

A *Uncaria tomentosa* pertence à família Rubiaceae e é popularmente conhecida como unha de gato. Esta é comumente encontrada em áreas tropicais da América do Sul e Central e utilizada na forma de extrato pelos povos indígenas

como uma alternativa de tratamento para várias doenças, devido as suas propriedades antiinflamatórias, imunomodulatória e pró-apoptóticas (MORENO, 2007).

A propriedade de suprimir a inflamação crônica apresentada pela planta está relacionada com a inibição do fator nuclear kappa-B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), que é um importante regulador das respostas imune e anti-inflamatória, e com a inibição do fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), sendo esta última propriedade considerada o mecanismo primário da ação imunomodulatória proporcionada por essa espécie (IMMICH, 2011).

Os efeitos antioxidantes e imunoestimulantes presentes na Unha de Gato estão provavelmente relacionados a grandes concentrações de flavonóides presentes, o que pode melhorar o tratamento de doenças como câncer, artrite, gastrite, asma e doenças dermatológicas (VATTIMO e SILVA, 2011).

Corroborando com esses conhecimentos, torna-se importante avaliar a ação antiinflamatória da *Uncaria tomentosa* em camundongos com mucosite intestinal induzida pelo metotrexato a fim de colaborar com os conhecimentos desse fitoterápico para justificar uma possível alternativa de tratamento para pacientes com mucosite intestinal associada ao tratamento antineoplásico.

2.0- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito antiinflamatório da *Uncaria tomentosa* no intestino delgado de camundongos com mucosite intestinal.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar evolução na massa corporal nos grupos de animais;
- Investigar a morfologia intestinal do segmento duodeno de camundongos com mucosite intestinal suplementados com *Uncaria tomentosa*;
- Comparar a morfologia intestinal do segmento duodeno dos grupos estudados.

3.0- REFERENCIAL TEÓRICO

3.1- INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Inflamação é uma reação de defesa a diferentes tipos de agressões, (química, física ou biológica) aos tecidos. É uma resposta inespecífica caracterizada por várias alterações que são necessárias para cura e reconstituição dos tecidos afetados (MONTEIRO, 2006). Na inflamação aguda, ocorrem diversas alterações vasculares, neurológicas e celulares, manifestando-se por dor, calor, rubor, edema e perda de função (SANTOS V. M., CUNHA, S. F. C., CUNHA, D. F. 2000).

A inflamação pode ser dividida em três fases: fase aguda; fase de resposta imune; e fase crônica. A inflamação aguda é a resposta inicial à lesão tecidual e é mediada pela liberação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Essas substâncias, em especial, a histamina, aumentam o fluxo sanguíneo local e também a permeabilidade dos capilares venosos, sendo assim, grandes quantidades de líquido e de proteína são transportadas da circulação para os tecidos, gerando edema localizado. A segunda fase da inflamação (fase de resposta imune) aparece quando as células imunológicas são ativadas em resposta a organismos estranhos. A inflamação crônica (última fase) que nem sempre acontece, envolve a liberação de diversos mediadores que não são provenientes da resposta imune e entre eles, estão o interferon, interleucinas além de macrófagos e linfócitos (SILVA et al., 2002).

A inflamação intestinal é conhecida como mucosite intestinal e manifesta-se clinicamente como mal estar, vômitos, anorexia, além de dor abdominal e, principalmente diarreia. Essa pode ser originada por doenças inflamatórias intestinais ou por uso de medicamentos como os quimioterápicos (LIMA, 2004).

A mucosite intestinal é um processo complexo com várias fases de eventos biológicos interligados. Na fase epitelial, há uma redução da renovação epitelial que resulta em atrofia. É na fase de ulceração que ocorre neutropenia grave no paciente, pois há uma lesão e morte das células basais epiteliais, resultando em

mudanças atróficas que culminam na real falha, deterioração e quebra da barreira mucosa. É na última fase que haverá a resolução da mucosite, com proliferação e diferenciação celular, retorno normal das células sanguíneas periféricas e controle da flora bacteriana. O trato gastrointestinal é vulnerável a esse tipo de inflamação por causa da alta proliferação e frequência de renovação celular (BELARMINO FILHO, 2010; LUCETTI, 2009).

A frequência da observação da mucosite intestinal induzida por quimioterapia varia e é influenciada pelo diagnóstico do paciente, idade, nível de saúde, tipo, dose e frequência da droga administrada. Esse efeito colateral é bastante comum nos pacientes portadores de câncer submetidos a tratamento com agentes quimioterápicos diversos, em especial, os antimetabólitos (LUCETTI, 2009).

O metotrexato (MTX) é um quimioterápico antimetabólito análogo do ácido fólico e um dos fármacos mais utilizados no tratamento do câncer. É considerado um fármaco essencial para pacientes com câncer uterino, leucemia, cânceres de mama, de urotélio e de cabeça e pescoço, linfomas e osteosarcomas. Os antagonistas do ácido fólico, frequentemente chamados de antifolato, são drogas usadas como agentes antineoplásicos, antimicrobianos, antiinflamatórios e imunossupressores (LIMA, 2004).

O MTX é um agente imunomodulador cuja ação consiste na inibição da enzima necessária para a síntese de DNA, RNA, timidinato e proteínas. Os efeitos imunossupressivos e tóxicos do metotrexato são devido à inibição do diidrofolato redutase, enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico, o que evita a redução do diidrofolato a tetraidrofolato ativo. Os efeitos adversos mais frequentemente observados, quando se é utilizado essa droga, são anemia, neutropenia, náuseas e vômitos, mucosite e elevação de enzimas hepáticas (MOTA, 2012).

O folato atua como coenzima em processos de redução e de transformação de unidades de carbono, incluindo nucleotídeos e certos aminoácidos. Ele é vital para a divisão celular e para a homeostase devido ao papel essencial das folato-coenzimas na síntese do ácido nucléico, na formação da metionina e na liberação, oxidação e redução de unidades de carbono necessárias

para o metabolismo normal, dessa forma, a ação do metotrexato impede o metabolismo do ácido fólico (ARAÚJO, 2012).

O metotrexato além de diminuir a proliferação celular, pode também aumentar a taxa de apoptose das células T, modulação da expressão de moléculas de adesão celular e redução da produção de citocinas e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (BRENOL, 2010).

Os antimetabólitos, como é o caso do metotrexato, exercem seus principais efeitos durante a fase S (síntese de DNA) do ciclo celular. Dessa forma, interferem no crescimento das células de rápida proliferação em todo o organismo, entre elas, as células do revestimento do trato gastrointestinal (LIMA, 2004).

A ocorrência de mucosite e seu grau de intensidade podem retardar ou impedir a continuação do tratamento antineoplásico, pois as alterações funcionais advindas de processos inflamatórios e pós-inflamatórios podem ter contribuição de alterações estruturais do músculo liso gastrointestinal (BELARMINO FILHO, 2010).

Existem possibilidades de controlar o processo inflamatório intestinal em suas diversas manifestações com o uso de nutrientes moduladores como é o caso da planta *Uncaria tomentosa* (VATTIMO e SILVA, 2011).

3.2- UNCARIA TOMENTOSA

De acordo com Pereira (2006), a *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como unha de gato (FIGURA1) é uma planta natural da região Amazônica e florestas tropicais da América. Seu nome popular está associado aos espinhos curvados encontrados na base de cada par de folhas. Essa planta tem sido usada tradicionalmente pelos indígenas peruanos e brasileiros pelas suas propriedades imuno-estimulante e anti-inflamatória há centenas de anos e os rumores de suas curas milagrosas despertaram, nos últimos trinta anos, o interesse científico e comercial.



André L. de Rezende Cardoso

FIGURA 1: *Uncaria tomentosa* (Folhas e espinhos)Fonte: http://www.flickr.com/photos/andre_cardoso/6357770421

É necessário avaliar a origem e a atividade antimitótica do extrato obtido pela *Uncaria tomentosa*, pois o método de extração da planta e o processamento da matéria bruta podem interferir no conteúdo bioativo do produto final (PILARSKI et al, 2007).

O crescente estudo e interesse pela planta faz com que ela seja submetida à extração indiscriminada e intensiva, o que poderá levá-la à diminuição da variabilidade genética ou até mesmo a extinção. Um dos principais problemas da unha de gato é a diversidade genética dentro da espécie devido a cruzamentos ou por ecótipos ligados à distribuição geográfica, gerando heterogeneidade das características químicas desejadas (PEREIRA et al., 2006)

Segundo Souza e Cimerman, (2010), o conhecimento científico sobre a *Uncaria tomentosa* emergiu na década de 1970, através dos estudos pioneiros de Klaus Keplinger (jornalista e etnologista austríaco) e a partir desta época a unha de gato começou a ser vendida como fitoterápico. Ele afirma que inúmeros estudos foram publicados na Europa e Estados Unidos, explorando o significativo valor medicinal da unha de gato e o interesse dos laboratórios internacionais pelo produto resultou no registro de seus extratos, os quais foram amplamente comercializados para uso oral como um poderoso estimulante do sistema imunológico (C-MED-100® e Krallendom®). Dessa forma, foram atribuídas à unha de gato múltiplas propriedades medicinais, sendo empregada para gastrite, úlcera péptica, artrite, câncer, hemorragias, irregularidade menstrual, infecção urinária, asma, assim como antiinflamatório e ativador do sistema imunológico.

Muitos constituintes químicos foram identificados nessa planta, incluindo glicosídeos do ácido quinóico, esteróis, taninos, procianidinas, flavonoides, triterpenos polihidroxilados e pelo menos 17 diferentes alcalóides (IMMICH, 2011).

Os alcalóides oxindólicos e pentacíclicos são os compostos mais estudados da unha de gato em função de suas características antiinflamatórias, imunomoduladoras, antioxidantes e citoprotetoras. Os glicosídeos do ácido quinóico presentes na *Uncaria tomentosa* foram avaliados em culturas de células, apresentando ação antiviral e anti-inflamatória (SOUZA e CIMERMAN, 2010).

Foi demonstrado que o tratamento com extratos etanólicos de *Uncaria tomentosa* inibiu a secreção de TNF- α , dependente do lipolissacárido bacteriano (LPS), endotoxina bacteriana, libertada a partir da membrana externa, das bactérias gram-negativas que atuam como um imuno-estimulante, mas reforçou a secreção de IL-1 β , dependente do LPS. A IL-1 β , é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória. O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação no receptor por antagonistas de receptores de citocinas, assim como o IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1. IL-1Ra é uma proteína da família das interleucinas originalmente descrita como uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1 (MARQUES, 2008; COSTA et, 2008).

Isto pode ser clinicamente relevante, uma vez que o bloqueio específico do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), geralmente usando terapias à base de anticorpos, tem sido um processo utilizado para o tratamento de algumas doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide e a doença de Crohn (MARQUES, 2008).

Experimentalmente, a unha de gato apresentou ação protetora contra múltiplas forças oxidativas. Sabe-se que a cascata inflamatória, subjacente a diversas patologias humanas, envolve uma complexa rede de moléculas e células.

Os extratos de *Uncaria tomentosa* já demonstraram agir em vários pontos de eventos inflamatórios, incluindo a via de inibição da síntese de uma importante citocina (TNF- α). De fato, a unha de gato demonstrou tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* inibir a produção de TNF- α (SOUZA e CIMERMAN, 2010).

4.0- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E DIETA

O referido estudo experimental utilizou 24 camundongos machos da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério do Centro Universitário do Rio Grande do Norte (UNI-RN). Os animais utilizados no estudo tinham idade média de 02 meses, sendo classificados como camundongos jovens, com peso médio aproximado de 42,4g no início do experimento e finalizaram com peso médio de 39,2g. Em todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, com temperatura ambiente controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Para a dieta foi utilizada a ração comercial padrão para roedores da marca Purina (São Paulo, Brasil), com as seguintes características: umidade (máx.) 13%; proteína (min) 23%; extrato etéreo (min) 4,0; matéria fibrosa (máx.) 8%; matéria mineral (máx.) 10%; cálcio (máx.) 1,5%; fósforo (min) 0,8% e água *ad libitum*.

4.2. DESENHO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os camundongos foram divididos em 04 grupos ($n=6/\text{grupo}$) e submetidos a 05 dias de experimentação (FIGURA 4).

Grupo 1 - Grupo controle (SHAM): foi oferecido ração comercial e água *at libitum* durante os 5 dias de pesquisa e realizada, por gavagem, a administração de 0,4mL de água;

Grupo 2 - Grupo mucosite: foi oferecido ração comercial e água *at libitum* durante os 5 dias de pesquisa e realizada, por gavagem, a administração de 0,4mL de água. Este grupo foi submetido à indução da mucosite intestinal através do medicamento metotrexato (2,5mg/kg/dia) de acordo com o protocolo de mucosite nos 03 últimos dias consecutivos do experimento;

Grupo 3 – Grupo *Uncaria tomentosa*: administrou-se por gavagem 0,536g do fitoterápico *Uncaria tomentosa* em 0,4 mL/dia da durante os 5 dias de experimento. A ração comercial e a oferta de água foram *at libitum*.

Grupo 4 – Grupo *Uncaria tomentosa* mais Mucosite (uso do suplemento *Uncaria tomentosa* e do metotrexato): os animais deste grupo tiveram o mesmo procedimento do grupo anterior com acréscimo do medicamento metotrexato (2,5mg/kg) nos 3 últimos dias do experimento (de acordo com o protocolo de mucosite).

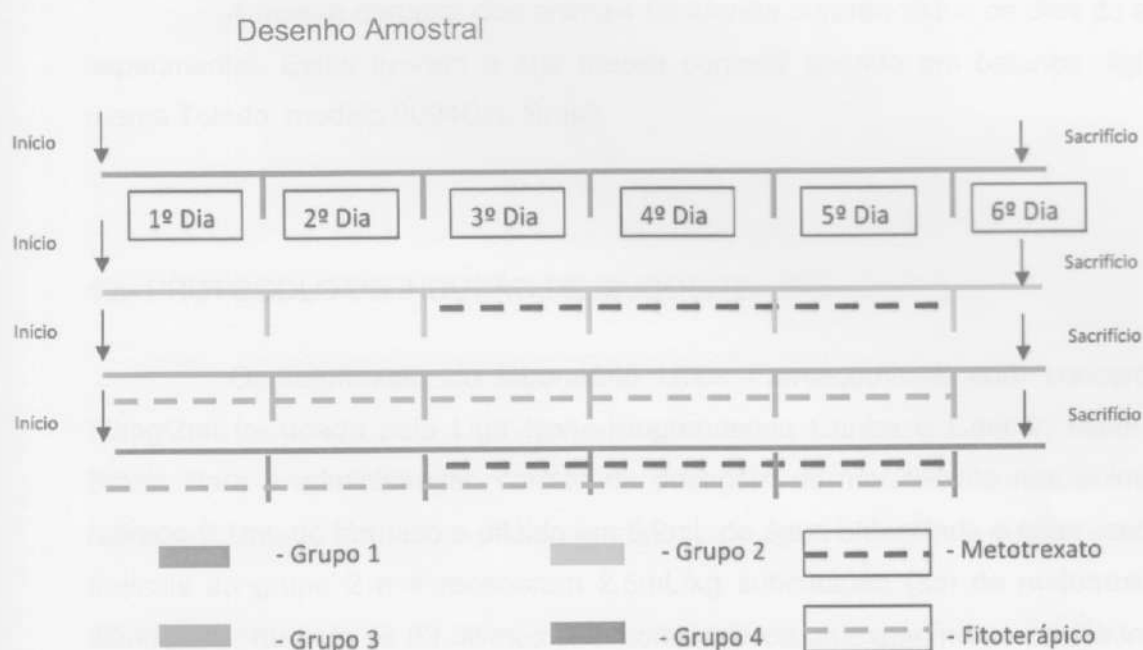


FIGURA 2: Representação esquemática do estudo ilustrando os protocolos de tratamento dos diferentes grupos. Grupo 1 é o grupo controle. Grupo 2 recebeu 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias consecutivos do experimento por dose subcutânea e foi como controle positivo. O grupo 3 recebeu por gavagem 0,4 mL de *Uncaria tomentosa* nos 05 dias do estudo. Grupo 4 recebeu por gavagem 0,4 mL da *Uncaria tomentosa* nos 05 dias do estudo e 2,5mg/kg de Metotrexato nos 03 últimos dias consecutivos do experimento por dose subcutânea. Todos os animais foram sacrificados 24 horas após o término da suplementação da *Uncaria tomentosa* e/ou do recebimento do metotrexato.

4.3- SUPLEMENTAÇÃO

Para a suplementação dos animais foi utilizado o fitoterápico *Uncaria tomentosa* formulado e cedido pela farmácia de manipulação Ao Pharmaceutico. A erva foi suplementada por gavagem numa quantidade de 0,4mL do extrato seco contendo 0,536g de *Uncaria tomentosa*, durante os 5 dias nos grupos em tratamento (grupo 3 e 4 – FIGURA 2).

4.4- EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL

A massa corporal dos animais foi aferida durante todos os dias do ensaio experimental. Estes tiveram a sua massa corporal pesada em balança digital de marca Toledo, modelo 9094C/4, Brasil.

4.5- PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE MUCOSITE

O metotrexato do laboratório Libbs Farmacêutica® com concentração 50mg/2ml foi doado pela Liga Norte-Riograndense Contra o Câncer, Natal (RN), Brasil. Para a administração correta da dosagem do metotrexato nos animais foi retirado 0,1mL do fármaco e diluído em 5,9mL de água bidestilada e esterilizada. Os animais do grupo 2 e 4 receberam 2,5mL/kg subcutânea (sc) de metotrexato (já diluído)/dia, durante os 03 últimos dias consecutivos do experimento para a indução da mucosite intestinal de acordo com o descrito na literatura (XIAN, 2000; CARNEIRO-FILHO et al., 2004; DADHANIA et al., 2010).

4.6- SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados 24h após a última suplementação com *Uncaria tomentosa* e/ou uso do metotrexato por deslocamento cervical. Os animais foram anestesiados previamente com quetamina (130mg/Kg) e xilazina (0,3mg/Kg).

Após o deslocamento cervical, foram submetidos à laparotomia para retirada do fígado e do intestino delgado. Ambos foram conservados em formol a 10% para processamento histológico.

4.7- ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a análise histomorfométrica foram coletados 3 cm do duodeno para análise da morfologia do epitélio duodenal, os mesmos foram fixados em formol a 10%. Os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. As lâminas foram preparadas com o material intestinal no Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e foram fixados a lâminas de vidro e pré-coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram codificadas e enumeradas de acordo com os grupos em tratamento. As leituras de todas as lâminas foram realizadas em microscópio óptico com objetiva milimétrica da marca Olympus, no Departamento de Morfologia/UFRN.

Para a padronização da leitura das lâminas, 10 vilosidades e 10 criptas adjacentes às vilosidades foram visualizadas para a sua quantificação em comprimento e profundidade respectivamente, através de uma ocular milimetrada com aproximação de 10x. A medida das vilosidades foi verificada considerando desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até a região apical da vilosidade mensurada (altura do vilo), e as criptas intestinais foram definidas como o ponto de encontro entre dois vilos medidos até o início da camada submucosa (FIGURA 3) (BELARMINO FILHO, 2010). Uma média dos vilos e criptas foram calculadas posteriormente através do software Excel versão 2007.

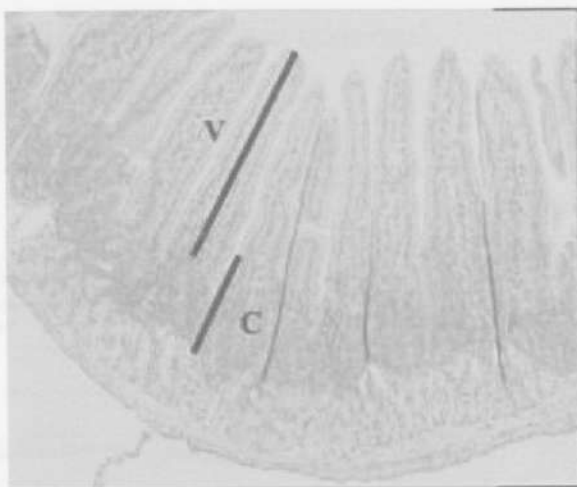


FIGURA 3: Esquema demonstrativo da medida de vilosidades e criptas intestinais.

5.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL

Analizando o efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a evolução da massa corporal dos diferentes grupos de camundongos, observou-se que o Grupo 4 obteve uma maior perda de peso (1,5g) quando comparado com os demais grupos. O grupo 3 teve uma perda de peso maior (1,33g) quando comparado ao grupo 2 e 1. A perda de peso do grupo 2 foi de apenas 0,5g. Apenas o grupo 1 teve ganho de peso (0,17g) (FIGURA 4).

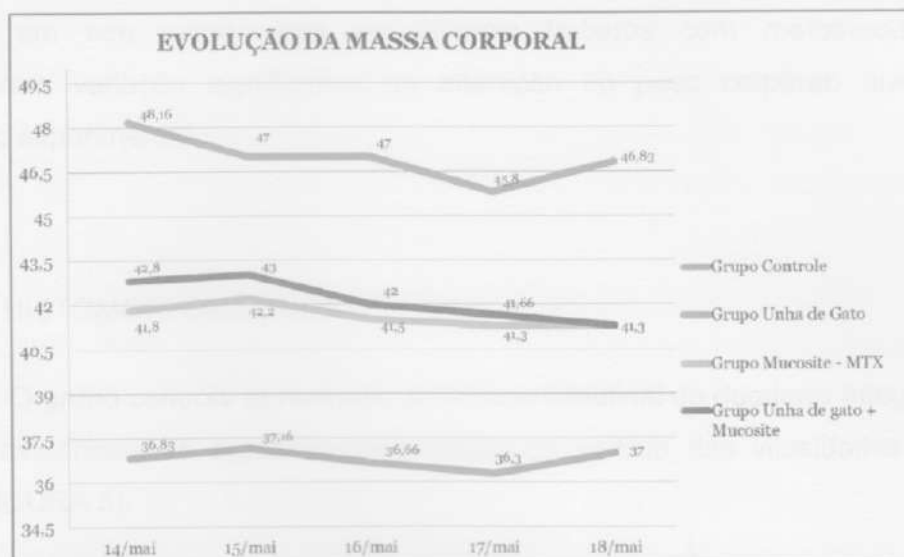


FIGURA 4: Distribuição da massa corporal dos Grupos experimentais. Resultado da coleta de dados do estudo experimental, 2012.

O grupo *Uncaria tomentosa* com indução da mucosite apresentou perda de peso maior do que os demais grupos. Sugere-se a essa observação que é possível uma interação negativa do fitoterápico com o fármaco indicando a possibilidade de propriedades não somente anti-inflamatórias, mas também propriedades que estimulam à perda de peso. O grupo suplementado com *Uncaria tomentosa* também reduziu a massa corporal em relação ao grupo controle. Vattimo e Silva (2010) constataram em seu estudo que dentre os grupos estudados, entre eles o grupo suplementado com *Uncaria tomentosa*, não obtiveram variações significativas de peso. No estudo de Augusto (2010), foram utilizados 40 *hamsters* divididos em grupos de 10 camundongos, cada grupo recebeu a suplementação por gavagem da *Uncaria tomentosa* que possuía uma concentração de alcalóide de 1%. Todos os grupos perderam peso. Foi a partir do 2º dia de experimento quando houve a segunda dose de *Uncaria tomentosa* que os animais dos grupos experimentais começaram a perder peso. Esses estudos corroboram com o estudo atual.

O grupo mucosite teve diminuição de peso, o que demonstra uma possível interação do fármaco com dano intestinal e consequentemente uma menor absorção de nutrientes. No estudo de Lima (2004), os ratos submetidos à mucosite intestinal induzida por metotrexato tiveram perda significativa de massa corpórea a partir do 1º dia, mantendo esse perfil por todo o período experimental. Alves (2005)

observou em seu estudo que os animais tratados com metotrexato não apresentaram variação significativa na alteração do peso corpóreo durante o tratamento experimental.

5.2- ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

O grupo controle apresentou a mucosa intestinal do duodeno íntegra, não havendo evidências de agressão inflamatória do epitélio das vilosidades e das criptas (FIGURA 5).

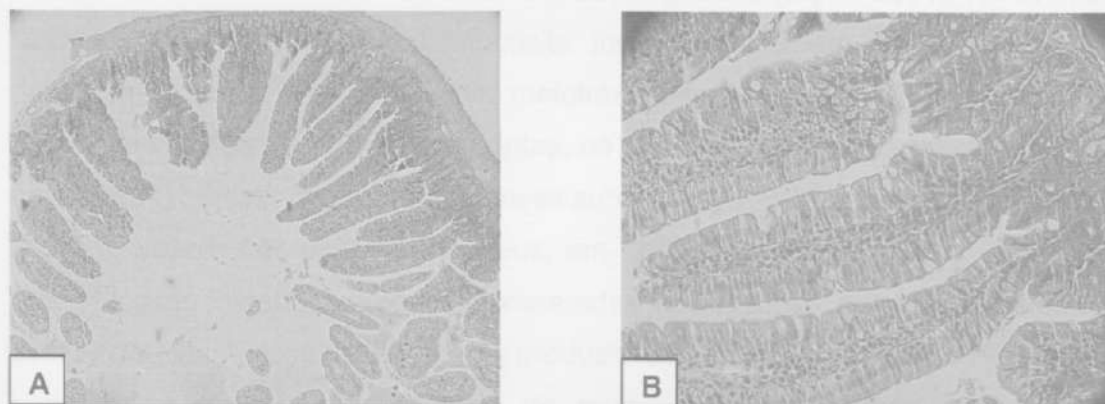
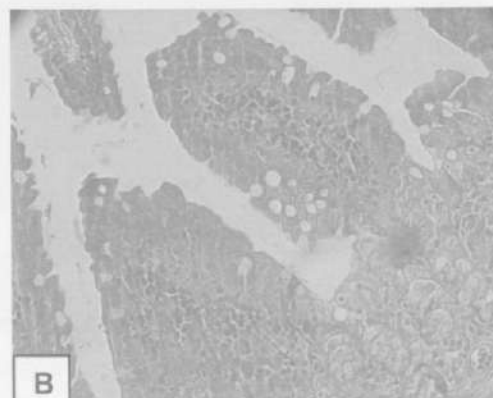
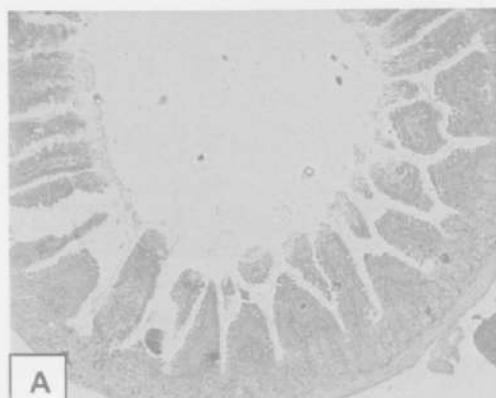


FIGURA 5: Secções histológicas com coloração de hematoxilina & eosina das vilosidades e criptas do segmento duodeno, do intestino delgado de camundongos do grupo controle (Figuras A e B com aproximação de 10X e 40x respectivamente em microscópio óptico).

Observou-se que o grupo mucosite, que recebeu a indução da mucosite intestinal através do medicamento metotrexato (2,5 mg/kg/dia) nos 3 últimos dias do experimento, teve o comprimento das vilosidades menor em relação ao grupo controle e aos demais grupos (FIGURA 6). Foi observado um aumento da proliferação do tecido linfoide (FIGURA 6-C), demonstrando o processo inflamatório que o fármaco desencadeou no tecido. A mucosite é um dos efeitos colaterais que pode prejudicar severamente a função intestinal e usualmente surge por volta de 3 a 5 dias após a terapia com o metotrexato. Essa alteração, quando ocorre, é um sinal de toxicidade, o que obriga a descontinuidade do tratamento quimioterápico. A dose, o esquema terapêutico e a via de administração da droga, serão responsáveis por determinar a ocorrência ou não desses efeitos adversos (LIMA, 2004). No estudo de Carneiro-filho et al (2004) a mucosite intestinal induzida por antineoplásicos, demonstrou que o tratamento com metotrexato em ratos induziu uma importante atrofia de vilos com aumento das criptas, no duodeno, jejuno e íleo destes animais. Lima (2004) administrou diferentes doses subcutâneas de metotrexato (1,5, 2,5 e 3,5 mg/kg), durante três dias consecutivos, em ratos, e observou lesões significativas nas mucosas intestinais quando comparadas aos animais normais, considerados como controle. A dose de 2,5 mg/kg produziu uma mucosite intestinal neste estudo com importante redução da taxa de mortalidade em relação à maior dose (3,5mg/kg).



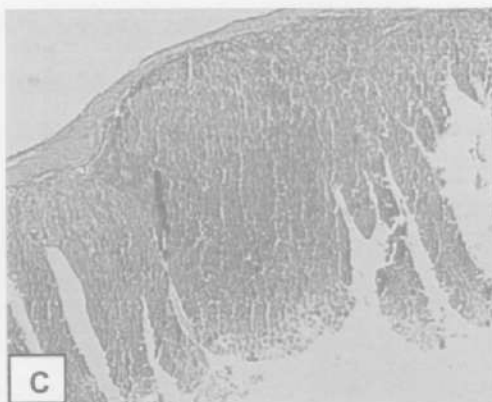


FIGURA 6: Secções histológicas com coloração de hematoxilina & eosina das vilosidades, criptas e placa de linfócitos no segmento duodeno, do intestino delgado de camundongos do grupo Mucosite - (Figuras A e B com aproximação de 10X e 40x respectivamente em microscópio óptico). Placa de linfócitos reagindo em defesa à agressão medicamentosa (Figura C – com aproximação de 10x)

Os animais do grupo *Uncaria tomentosa*, apresentaram vilosidades intestinais menores e criptas com profundidades menores quando comparadas ao grupo controle porém não foram observadas evidências de agressões assim como também não foi observado no grupo controle (FIGURA 7).

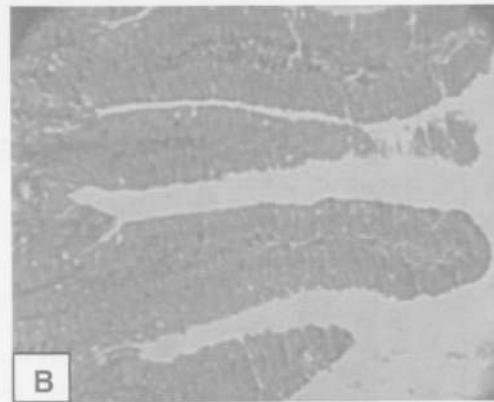
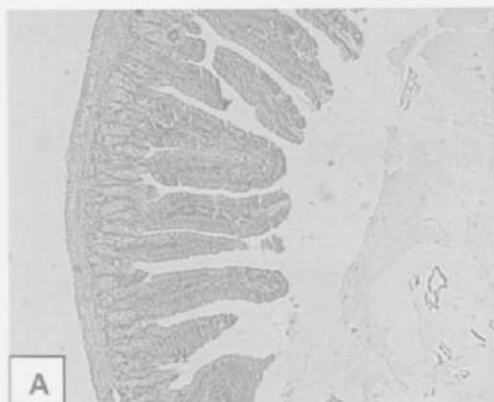


Figura 7: Secções histológicas com coloração de hematoxilina & eosina das vilosidades e criptas do segmento duodeno, do intestino delgado de camundongos do grupo *Uncaria tomentosa* (Figuras A e B com aproximação de 10X e 40x respectivamente em microscópio óptico).

Ao observar o grupo *Uncaria tomentosa* com indução de mucosite, percebeu-se que em relação ao grupo controle e aos demais grupos, houve um aumento do tamanho da altura das vilosidades (FIGURA 8).

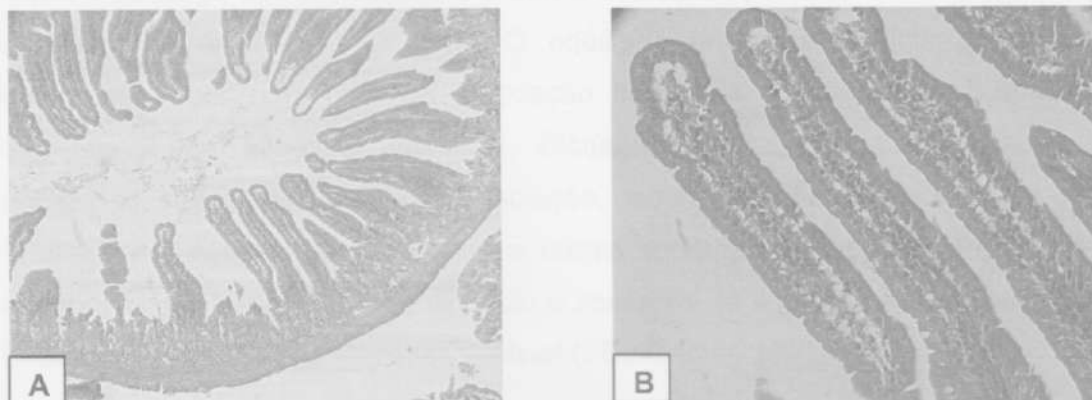


FIGURA 8: Secções histológicas com coloração de hematoxilina & eosina das vilosidades e criptas do segmento duodeno, do intestino delgado de camundongos do grupo mucosite suplementado com *Uncaria tomentosa* (Figuras A e B com aproximação de 10X e 40x respectivamente em microscópio óptico).

A FIGURA 9 demonstra a média da altura das vilosidades entre os grupos estudados.

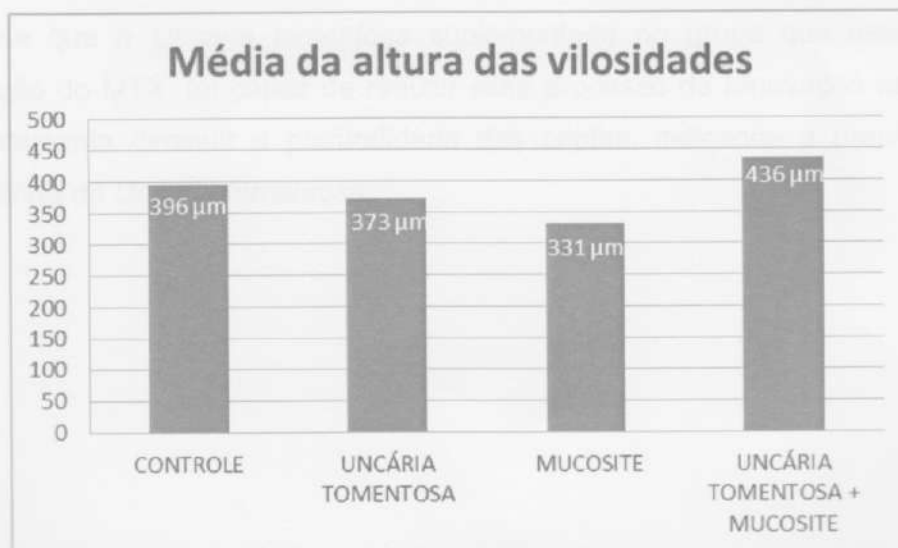


FIGURA 9: Avaliação média da altura das vilosidades do duodeno nos diferentes grupos do experimento.

O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de eventos citológicos primários e associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo das vilosidades e a perda de células por descamação, que ocorre naturalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos é determinado por uma taxa de renovação constante e, portanto, a capacidade digestiva e de absorção intestinal. Distúrbios nessa mucosa, causados por patógenos, substâncias químicas e radiação, podem alterar a permeabilidade desta, facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias nocivas, modificando o metabolismo, a capacidade de digestão e absorção de nutrientes e causando ainda inflamações crônicas na mucosa intestinal (PELICANO, 2003).

Ao analisar a profundidade das criptas do duodeno dos grupos em estudo (FIGURA 10), pode-se observar que o grupo suplementado com a *Uncaria tomentosa* teve uma média menor quando comparado com os demais grupos (92 μm). Observou-se também que o grupo mucosite apresentou maior média em relação às criptas dos outros grupos (144 μm). Este resultado indica que um forte processo de hiperplasia inflamatória com o objetivo de garantir a taxa de renovação das células, a fim de compensar as perdas de células na região apical das vilosidades devido ao dano causado pelo medicamento (ROSA et al, 2010). Observou-se que a *Uncaria tomentosa* suplementada no grupo que recebeu a administração do MTX, foi capaz de reduzir esse processo de renovação celular e consequentemente diminuir a profundidade das criptas, indicando a propriedade antiinflamatória da *Uncaria tomentosa*.

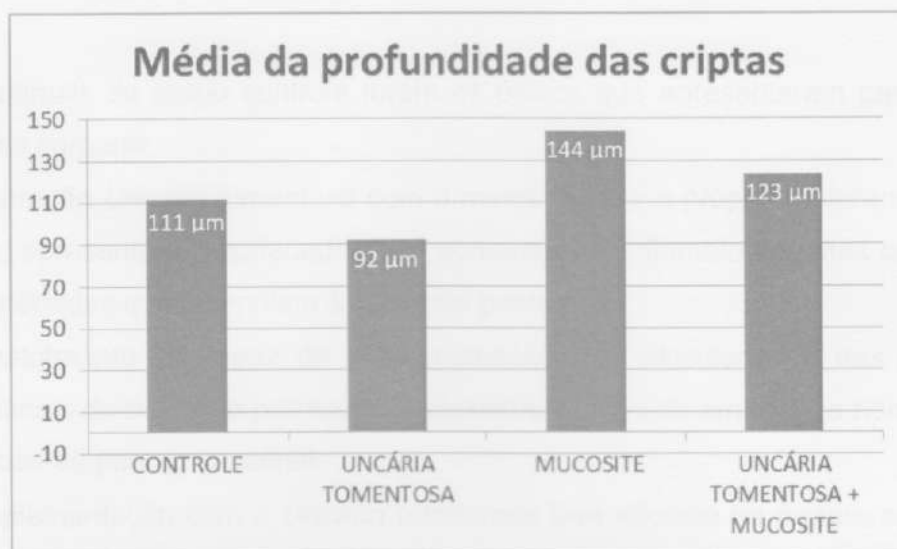


FIGURA 10: Avaliação média da profundidade das criptas do duodeno no diferentes grupos do experimento.

6.0- CONCLUSÃO

- Os animais do grupo controle foram os únicos que apresentaram ganho de massa corporal;
- A interação *Uncaria tomentosa* com o metotrexato e o próprio fitoterápico por si só, apresentem propriedades não somente anti-inflamatórias, mas também propriedades que estimulam à perda de peso.
- O metotrexato foi capaz de gerar agressão nas vilosidades e nas criptas intestinais do duodeno promovendo desestruturação da arquitetura normal da mucosa da parede intestinal.
- A suplementação com a *Uncaria tomentosa* teve eficácia na recuperação da integridade da mucosa intestinal dos animais com mucosite, promovendo inclusive o aumento das vilosidades do segmento duodeno e diminuição na profundidade das criptas;

REFERENCIAS

- ALMEIDA de, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Revista Quimica Nova**, Minas Gerais, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVES, A. P. N. N. **Efeito do metotrexato e do bisfosfonato alendronato em modelo do carcinossarcoma 256 de Walker na mandíbula de ratos**. 2005. 102 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- ARAÚJO, M. M. **Efeito do processamento por ionização, calor e micro-ondas na degradação do ácido fólico**. 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.
- AUGUSTO, C. M. et al. Avaliação do Extrato de *Uncaria tomentosa* na revenção de Mucosite Oral Induzida: Estudo Experimental em Animais. **Revista de Odontológica do Brasil Central**, São Paulo, n. 18, p. 57-61, 2010.
- BARNI, G. C.; SANTOS, Z. de A. Imunonutrição em pacientes com sepse?. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 3, p. 143-151, 2011.
- BELARMINO FILHO, J. N. **Modulação da resposta inflamatória com dexametasona reverte a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BRENOL, C. V. **Avaliação de polimorfismo de inserção/deleção de 14 PB do gene HLA-G na expressão clínica e resposta terapêutica ao metotrexato da artrite reumatoide**. 2010. 101 f. Tese. (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre. 2010.
- CARNEIRO-FILHO, B. A. et al. Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate – Inducet Rat Intestinal mucositis. **Digestive Diseases and Siences**, v. 49, n. 1 p. 65-72, 2004.

COSTA, R. D. et al. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(Suplemento II)**, p. 99-103, 2008.

DADHANIA, V.P.; TRIPATHI, D.N.; VIKRAM, A.; RAMARAO,P.; JENA, G.B. Intervention of α -lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. **Chemico-Biological Interactions**, n.183, p. 85-97, 2010.

FLORA, A. P. L.; DICI, I. Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Paraná, v. 21, p. 131, 2006.

IMMICH B. F. **Avaliação das Atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de Extrato e Frações Biologicamente ativas de *Uncaria tomentosa***. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

LIMA, V. **Evidencias da Participação de TNF- α e COX-2 nas Mucosites Oral e Intestinal Induzidas Por 5-Fluoracil e Metotrexato em Animais**. 2004. 212 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2004.

LUCETTI, L. T. **Efeito da pentoxifilina e da dexametasona na resposta inflamatória e nas alterações da motilidade digestiva associadas à mucosite intestinal induzida po 5- fluorouracil em ratos**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2009.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante**. 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra, Coimbra. 2008.

MONTEIRO, M. C. S. A. **Restabelecimento da barreira morfo-funcional intestinal através da suplementação com glutamina, alanil-glutamina, e peptídeos em camundongo com mucosite intestina induzida por 5-fluorouracil**. 2006. 107f.

Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

Moreno, S.R.F. et al. Effect of oral ingestion of an extract of the herb *Uncaria tomentosa* on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, n. 40, p. 77-80, 2007.

MOTA da, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, n. 52, p. 135-174, 2012.

PELICANO, E. R. L. et al. Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista portuguesa de Ciências veterinárias**, São Paulo, n. 98, p. 125-134, 2003.

PEREIRA, R. de C. A. et al. Germinação, Avaliação do Ácido Giberélico e Posição do Explante no Alongamento In Vitro de *Uncaria Guianenses* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha de Gato). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras/ MG, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

PILARSKI, R. et al. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations. **Pharmacological Reports**, n. 59, p. 565-572, 2007.

PINTO, L. P. et al. **Patologia Básica: sinopse**. Natal, RN. Editora UFRN, 1997.

ROSA, D.D.; SALES, R.L.; MORAES, L.F.S.; LOURENÇO, F.C.; NEVES, C.A.; SABARENSE, C.M.; RIBEIRO, S.M.R.; PELUZIO, M.C.G. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**. n. 3, v. 25, 2010

SANTOS, V. M., CUNHA, S. F. C., CUNHA, D. F. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. **Revista da Associação Médica Brasileira**. n. 46, p. 232-236, 2000.

SILVA, S. R., et al. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE dos alcalóides de espécies do gênero *Uncaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25, 2002. Anais... [S.I.]: SBQ, 2002.

SOUZA, A. L., CIMERMAN, S. *Uncaria tomentosa* (Cat's claw): Uma potencial estratégia terapêutica para herpes labial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 12, p. 51-57, 2010.

VATTIMO, M. de F. F., SILVA, N. O. *Uncaria tomentosa* e a lesão renal aguda isquêmica em ratos. Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo- USP. IN: estratégia terapêutica para herpes labial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v.12, p. 51-57, 2010.

XIAN, C.J.; COUPER, R.; HOWARTH, G.S.; READ, L.C.; KALLINCOS, N. C. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 4, p. 945-952, 2000.