

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Amanda Dias Gomes

**EFEITOS DO USO VITAMINA C ISOLADA E ASSOCIADA À ARGININA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Belo Horizonte

2023

Amanda Dias Gomes

**EFEITOS DO USO VITAMINA C ISOLADA E ASSOCIADA À ARGININA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso

Coorientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Belo Horizonte

2023

G633e Gomes, Amanda Dias.
Efeitos do uso vitamina C isolada e associada à arginina em modelo experimental de mucosite induzida por 5-fluorouracil [recurso eletrônico] / Amanda Dias Gomes. – 2023.
1 recurso eletrônico (81 f. : il.) : pdf.

Orientadora: Simone de Vasconcelos Generoso.
Coorientador: Valbert Nascimento Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Fatores imunológicos – Teses. 2. Vitamina C – Teses. 3. Mucosite – Teses. 4. Câncer – Teses. 5. Arginina – Teses. I. Generoso, Simone de Vasconcelos. II. Cardoso, Valbert Nascimento. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34

Folha de aprovação

17/05/2023 14:32

SEI/UFMG - 2305456 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITOS DO USO DE VITAMINA C ISOLADA E ASSOCIADA À ARGININA EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5- FLUOROURACIL

AMANDA DIAS GOMES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 15 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso (Orientadora e presidente da comissão) - UFMG
Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Coorientador) - UFMG
Dra. Luciana Mara Costa Moreira - UFMG
Dra. Penélope Lacrísio dos Reis Menta - UNICAMP

Assinatura dos membros da banca examinadora:

	Documento assinado eletronicamente por Penélope Lacrísio dos Reis Menta, Usuária Externa, em 16/05/2023, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Simone de Vasconcelos Generoso, Professora do Magistério Superior, em 16/05/2023, às 20:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior, em 16/05/2023, às 23:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .
	Documento assinado eletronicamente por Luciana Mara Costa Moreira, Usuário Externo, em 17/05/2023, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucineia e Gerson, aos meus irmãos e ao meu esposo, Fernando que sempre me incentivaram e se orgulham de mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, obrigada pela experiência. Obrigada por ter caminhado comigo durante toda essa jornada, obrigada por ter me acolhido nos momentos difíceis e por me ter feito forte e capaz de lidar com as situações que eu não conseguiria sozinha. O Senhor me deu sabedoria e me mostrou o quanto devo orgulhar do caminho que trilhei. O Teus sonhos são maiores que os meus SEMPRE.

Ao meu esposo, Fernando, obrigada por acreditar em mim, por ser meu melhor amigo e por me apoiar em tudo. Obrigada pelo amor, compreensão, paciência e incentivo. Amo você!

Aos meus pais, pelo amor incondicional, orgulho, incentivo e carinho.

Aos meus irmãos, por se orgulharem de mim e me terem como uma referência.

Às minhas colegas de apartamento Débora Pimenta e Débora Gonzaga, por tolerarem meu hábito noturno, pela companhia e por ter sido minha segunda família.

À Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso, serei eternamente grata pela orientação, confiança, carinho e por ter me ensinado tanto. Será sempre uma referência profissional para mim.

Ao coorientador Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, por ter disponibilizado seu laboratório, pela confiança, pelo incentivo e pelos ensinamentos e contribuições tanto com o trabalho como para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores, Dr. Geovanni Cassali, Dr^a. Jacqueline Leite, Dr. Flaviano Martins, por disponibilizarem seus laboratórios para as colaborações.

Aos colaboradores, Paola e Ramon, por terem sido fundamentais para minhas análises e por todos os ensinamentos, discussões e contribuições.

À Dr^a. Maria Emília de Andrade Rabelo e à doutoranda Luisa Martins Trindade pelos ensinamentos, experiências, oportunidades, vivências compartilhadas e sugestões.

Aos alunos de iniciação científica Isabelly Rodrigues, Arthur Favero, Ana Clara Ferreira, Ana Carolina Borges, Karla e Lara Pena por todo auxílio e dedicação na execução desse trabalho.

Aos colegas de laboratório e de colaborações, em especial Luíz e Kátia (meus mices), Nayara, Jorge, Camila, Flaviane e Fernanda Rezende, por todas as trocas, conselhos, apoio e incentivo.

À Adelaide e ao Batista pela ajuda constante no biotério, apoio, ensinamentos e atenção.

Aos colegas, em especial as nutricionistas do ambulatório Jenny de Andrade Faria, à Clarissa, Julia Helena e às alunas Cinthya e Tainara, obrigada pelas oportunidades e por terem me proporcionado um aprendizado que levarei sempre comigo.

Ao grupo PENCE, em especial a professora Maria Isabel Correia por todas as críticas construtivas, todas as considerações feitas para agregar ao trabalho e por todas as oportunidades.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!

“Se algum de vocês tem falta de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá livremente, de boa vontade; e lhe será concedida”.

Tiago 1:5

RESUMO

A mucosite intestinal é dano colateral causado pelos tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos pelos quais os pacientes oncológicos são submetidos. Até o momento não existem alternativas efetivas para minimizar ou prevenir os danos causados pela mucosite. Dessa forma, o uso de imunomoduladores tem sido alvo de estudos para avaliar seu papel frente a este problema. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com vitamina C isolada e associada com L-arginina na mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU. Camundongos machos, balb/c, de 6 a 7 semanas, recebendo dieta padrão e água à vontade, foram divididos em 4 grupos: Controle (CTL), Mucosite (MUC), Mucosite + Vitamina C (MUC+VIT), Mucosite + associação de arginina e vitamina C (MUC+ARG+VIT). Os camundongos dos grupos CTL e MUC receberam 0,2 mL de salina (NaCl 99%) por gavagem durante todo o período experimental. Enquanto que os animais do grupo MUC+VIT receberam, por gavagem, 0,2mL de solução contendo 60mg de vitamina C e os animais do grupo MUC+ARG+VIT receberam, por gavagem, 0,2 mL de solução contendo 60mg de vitamina C e 60 mg de arginina. No 7º dia os animais dos grupos MUC, MUC+VIT e MUC+ARG+VIT receberam injeção i.p de 300mg/kg de 5-Fu em dose única, para a indução da mucosite. Após 72 horas, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e realizada a coleta de amostras para as análises. Os animais com mucosite tiveram redução significativa do peso e consumo quando comparado aos animais do grupo controle. O grupo MUC apresentou maior permeabilidade intestinal em relação ao CTL e os grupos com ambos tratamentos foram capazes de manter a PI em níveis fisiológicos. A administração do quimioterápico não alterou a expressão da junção ZO-1 em nenhum dos grupos. Já a expressão de ocludina diminuiu em todos os grupos com mucosite quando comparado ao grupo CTL. A suplementação com Vitamina C isolada, apresentou melhores resultados nas análises histológicas, com manutenção da arquitetura intestinal e manutenção das vilosidades e criptas. Aumento nas atividades de peroxidase eosinófila (EPO) e mieloperoxidase (MPO) foram observados nos animais do grupo MUC. Entretanto, apenas o tratamento com vitamina C isolada preveniu o aumento do infiltrado inflamatório. A concentração de sIgA reduziu nos grupos com mucosite, aumento parcial foi observado em ambos os tratamentos. A expressão gênica de NFkB, TNF α e COX2 foi significativamente maior no grupo MUC em relação ao CTL. O grupo MUC+VIT apresentou expressão gênica dessas citocinas semelhante ao

CTL. A expressão de TNF α e COX2 do grupo MUC+ARG+VIT foi semelhante ao do grupo MUC. Adicionalmente, a expressão das citocinas IL1 β , IL10 e IL6 não foram diferentes entre os grupos. Na análise de estresse oxidativo, foi observado aumento na atividade das enzimas SOD, TBARS e hidroperóxidos no grupo MUC quando comparado ao controle. No entanto, a suplementação com ambos os tratamentos manteve em níveis basais apenas a atividade de TBARS. O uso da associação entre vitamina C e L-arginina não apresentou benefícios adicionais comparado a suplementação com a vitamina C isolada.

Palavras chaves: imunomoduladores, vitamina c, mucosite, câncer, L-arginina.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is collateral damage caused by the chemotherapy or radiotherapy treatments that cancer patients are undergoing. Until now there are no efficient alternatives to minimize or prevent the damage caused by mucositis. Thus, the use of immunomodulators has been the target of studies to evaluate its role in this problem. The aim of this study was to evaluate the effects of vitamin C supplementation alone and associated with L-arginine on experimental intestinal mucositis induced by 5-FU. Male Balb/c mice 6 to 7 weeks old, receiving standard diet and water were divided into 4 groups: Control (CTL), Mucositis (MUC), Mucositis + Vitamin C (MUC+VIT), Mucositis + association of arginine and vitamin C (MUC+ARG+VIT). Mice in the CTL and MUC groups received 0.2 mL of saline (NaCl 99%) by gavage throughout the experimental period. The animals in the MUC+VIT and MUC+ARG+VIT groups received by gavage 0.2 mL of a solution of 60 mg of vitamin C and 60 mg of vitamin C associated of 60 mg of arginine, respectively. On the 7th day the animals in the MUC, MUC+VIT and MUC+ARG+VIT groups received i.p. injection of 300mg/kg of 5-Fu in a single dose. After 72 hours the animals were anesthetized and euthanized by cervical dislocation and samples of tissues and blood were collected for analysis. The mice with mucositis showed a significant reduction in weight and consumption when compared to the animals CTL. The MUC group showed higher intestinal permeability (IP) when compared to CTL, and the groups with both treatments were able to preserve the PI at physiological levels. The administration of chemotherapy did not affect the expression of the ZO-1 junction in none of the groups, while the expression of occludin decreased in all groups with mucositis when compared to the CTL group. Vitamin C supplementation alone showed better results in histological analysis, with maintenance of intestinal architecture and villi and crypts. Eosinophilic peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO) increased activities were observed in the animals of the MUC group. However, only vitamin C treatment prevented the inflammatory infiltrate. The concentration of sIgA decreased in the groups with mucositis, and a partial increase was observed in both treatments. Gene expression of NFkB, TNF α and COX2 was significantly higher in the MUC group compared to CTL. The MUC+VIT group showed similar gene expression to CTL. However, there was no statistically significant difference between the MUC and MUC+ARG+VIT groups for the expression of TNF α and COX2. Additionally, the expression of the cytokines IL1 β , IL10 and IL6 did not show any statistical difference among the groups. Oxidative stress analysis showed

increased activity of the enzymes SOD, TBARS, and hydroperoxides in the MUC group. However, supplementation with both treatments maintained only TBARS activity at basal levels. The use of the association between vitamin C and L-arginine did not present additional benefits to affirm that the use of the association would be better than the monotherapies, since the use of vitamin C alone presented more benefits than the association of this immunomodulators.

Key words: immunomodulators, vitamin c, mucositis, cancer, L-arginine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1. Oncogênese e fatores de risco associados.....	21
Figura 2. Desenvolvimento da mucosite	27
Figura 3. Estrutura química do ácido ascórbico e a oxidação em ácido dehidroascórbico.	29
Figura 4. Estrutura química do aminoácido L-arginina.....	32
Figura 5. Delineamento experimental.....	39
Figura 6. Variação ponderal (A) e consumo alimentar (B) 72 horas após a administração de 5-FU.....	50
Figura 7. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.....	51
Figura 8. Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas tight junctions – ZO-1 e Ocludina - 72 horas após a indução da mucosite.	52
Figura 9. Análise histológica do íleo aumento de 20X e 40X.....	53
Figura 10. Escore histológico.	54
Figura 11. Análise morfométrica.....	54
Figura 12. Comprimento do intestino delgado.	55
Figura 13. Infiltrado inflamatório no íleo.	56
Figura 14. Concentração de slgA intestinal.....	56
Figura 15. Expressão gênica mRNA de NFkB, TNF α , COX 2, IL1 β , IL-10 e IL-6.	58
Figura 16. Atividade das enzimas SOD, TBARS e hidroperóxido 72h após de administração de 5-fu em camundongos.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados para determinação dos escores histológicos na porção do íleo.....	41
Tabela 2. Primers utilizados na análise de expressão gênica por Real Time PCR.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
μ	Micro
μL	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
5-FU	5-fluorouracil
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$	DTPA marcado com tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio livre
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
ASL	L-arginina succinato sintase
ASS	L-arginina succinato liase
BC	Biotério Central
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cpm	Contagem por minuto
CTL	Controle
DHA	Dehidroascórbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
EPO	Peroxidase eosinófilica
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HE	Hematoxilina e Eosina

HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitoneal
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
Kg	Quilogramas
MBq	Megabecquerel
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
mMol	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucosite
MUC+ARG+VIT	Mucosite + Arginina + Vitamina C
MUC+VIT	Mucosite + Vitamina C
Na ^{99m} TcO ₄	Pertecnetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NK	Natural Killer
nm	Nanômetros
NOS	Óxido Nítrico Sintase
ON	Óxido Nítrico
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Solução de tampão fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGE	Prostaglandinas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Permeabilidade Intestinal

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SEM	Desvio padrão da média
sIgA	Imunoglobulina do tipo A secretória
SnCl ₂ ·2H ₂ O	Cloreto estanoso
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Epécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tecnécio-99m	Tecnécio 99 metaestável
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNM	Classificação de Tumores Malignos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UICC	União Internacional Contra o Câncer
ZO-1	Zônula occludens - 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Câncer	19
2.2 Barreira intestinal	22
2.3 Estresse Oxidativo	23
2.4 5-FU e mucosite	24
2.5 Vitamina C	29
2.6 L arginina	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Animais	38
4.2 Preparo de L- Arginina e Vitamina C	38
4.3 Delineamento experimental	38
4.4 Mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil	39
4.5 Consumo alimentar e alteração ponderal	40
4.6 Determinação da permeabilidade intestinal	40
4.7 Análises histopatológicas	41
4.7.1 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	41
4.7.2 Análises morfométricas	42
4.7.2.1 Altura das vilosidades e profundidade das criptas	42
4.8 Avaliação de parâmetros imunológicos	42
4.8.1 Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)	42
4.8.2 Medida da atividade de peroxidase eosinófilica (EPO)	43
4.8.3 Dosagem de sIgA	44
4.8.4 Dosagem de citocinas e proteínas de junções	44
4.9 Análise de estresse oxidativo no íleo	46
4.9.1.1 Atividade de superóxido dismutase	46
4.10 Análises estatísticas	47

5 RESULTADOS	50
5.1 Variação ponderal e consumo alimentar	50
5.2 Permeabilidade Intestinal	50
5.3 Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas <i>tight junctions</i> – ZO-1 e Ocludina 51	
5.4 Análises histológicas	52
5.5 Avaliação do infiltrado inflamatório	55
5.6 Avaliação de sIgA intestinal	56
5.7 Expressão gênica de citocinas e quimiocinas por Real Time PCR	57
5.8 Estresse oxidativo	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	66
8 PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo associado a doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, por alterações nos mecanismos de proliferação celular, levando ao acúmulo de células alteradas (INCA, 2021). Sabe-se que o aumento na ocorrência de casos de câncer está relacionado à fatores hereditários e do estilo de vida que por sua vez, contribuem diretamente para o risco aumentado do desenvolvimento da doença. Entre estes fatores, é possível citar a genética, como contribuinte de cerca de 10 a 20% dos casos, e fatores ambientais, como a alimentação, o sobrepeso e a obesidade, o uso de drogas, a exposição a agentes cancerígenos, que correspondem a cerca de 80 a 90% dos casos (INCA, 2021).

As principais metas para o tratamento do câncer é a cura, prolongamento e melhora da qualidade de vida. As terapias mais utilizadas incluem procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea e imunoterapia aplicadas em associação ou isoladas (INCA, 2021). Na maioria dos casos é necessário combinar mais de um tipo de terapia para alcançar resultados satisfatórios.

Dados, de 2009 a 2017, do Observatório de Oncologia, mostraram que 34% dos pacientes que estavam em tratamento oncológico, fizeram a combinação de quimio e radioterapia e 46% apenas a quimioterapia. Estes tratamentos, apesar de eficazes, apresentam diversos efeitos colaterais, principalmente alterações gastrointestinais levando a perda da barreira intestinal e, mucosite intestinal.

A mucosite intestinal é efeito colateral adverso à toxicidade da quimioterapia e radioterapia em pacientes oncológicos. O quadro clínico caracteriza-se pela ulceração, inflamação e perda das células que compõe a barreira epitelial do trato digestivo (BOWEN et al., 2019). O dano na mucosa intestinal acomete cerca de 40% a 80% dos pacientes em tratamento com o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) e está associado a sintomas como dor, ulceração, inchaço, náuseas, vômitos, diarreia e constipação (BOWEN et al., 2019; SOUGIANNIS et al., 2021). Esta desordem patológica ocasiona anorexia e perda de peso e, conseqüentemente, piora do estado nutricional e qualidade de vida desses pacientes. Além disso, contribui para o aumento de infecções, de tempo de internação e dos custos do tratamento (BOWEN et al., 2019). Nestes casos, é necessário ajustes de dose ou interrupção do tratamento, comprometendo a eficácia do fármaco e resultando em maior taxa de mortalidade em pacientes com câncer (ANTUNIASSI, 2005; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; PINEDO; PETERS, 1988).

Em decorrência disto, busca-se estratégias que minimizem estes danos. Dentre elas, o uso de imunomoduladores têm sido estudado com o objetivo minimizar os efeitos observados da mucosite, melhorando a qualidade de vida de pacientes submetidos ao tratamento oncológico. Nos últimos anos, dados do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a suplementação com simbiótico (TRINDADE et al., 2018), ácidos graxos ômega-3 (GENEROSO et al., 2015), L-arginina (ANDRADE et al., 2023; LEOCÁDIO et al., 2015), ácido linoleico conjugado (DE BARROS et al., 2018), FOS (CARVALHO et al., 2021) probióticos (ALA et al., 2016) e, mais recentemente, associação de FOS com L-arginina (ANDRADE et al., 2023) apresentaram efeitos benéficos na mucosite intestinal. O uso de terapias combinadas, como a associação de imunomoduladores podem ser importantes adjuvantes na prevenção da mucosite intestinal (BOWEN et al., 2019). Neste contexto, a vitamina C por ser um potente antioxidante e modulador da resposta imunológica, associada ao aminoácido L-arginina, com propriedades benéficas já mostradas na mucosite intestinal, poderia ser uma alternativa mais efetiva para o tratamento associado à quimioterapia.

A vitamina C, por suas funções imunomoduladoras, tem sido estudada em várias condições como, durante a quimio-radiação convencional e no tratamento do câncer, (AL-REFAI, 2017; CHAITANYA et al., 2018; MAGRÌ et al., 2020). Alguns estudos tem mostrado que a vitamina C aumenta a quimioresponsividade ao tratamento com quimio e radioterapia (NAGY et al., 2003), melhora a arquitetura intestinal, a resposta imunológica e leva a diminuição da inflamação (AL-REFAI, 2017; CHAITANYA et al., 2018).

Assim, a proposta do presente trabalho foi investigar os efeitos da suplementação com vitamina C isolada e associada com L-arginina poderia trazer benefícios para o processo inflamatório intestinal decorrentes da mucosite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

Câncer é o termo associado a mais de 100 tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células por alterações nos mecanismos de proliferação celular, levando ao acúmulo de células alteradas (INCA, 2021). Estimativas feitas pelo Global Cancer Observatory, (2020) (GLOBOCAN), mostraram que 4 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer e cerca de

1,4 milhão morreram em 2020. Devido à falta de intervenções, o número de pessoas diagnosticadas até 2040 pode aumentar para mais de 6,2 milhões.

a pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19) foi um agravante para a epidemiologia do câncer. Devido ao fechamento de estabelecimentos de saúde, demissões, perda do seguro de saúde e medo da exposição ao COVID-19, houve ainda mais atrasos no diagnóstico e tratamento. Embora o impacto tenha sido maior durante o pico da COVID-19, em meados de 2020, a prestação de cuidados de saúde ainda não tinha se recuperado totalmente (SIEGEL MPH et al., 2023). Esse fato, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foi um dos grandes obstáculos para evolução em novas descobertas de tratamentos.

O desenvolvimento do câncer está relacionado à fatores hereditários (10 a 20% dos casos) e ao estilo de vida, como alimentação, sobrepeso e obesidade, uso de drogas, exposição a agentes cancerígenos, que correspondem a cerca de 80 a 90% dos casos (INCA, 2021). A carcinogênese é determinada pela frequência e período de exposição a esses agentes e, pela interação entre eles. Devem ser consideradas, no entanto, as características individuais, que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular. Após esse dano, que provoca modificações em alguns dos genes, as células se encontram geneticamente alteradas e sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, que por sua vez, de forma lenta e gradual, é transformada em célula maligna. Nessa fase, a suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo. Porém, em caso de contínua exposição, o câncer já está instalado e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (Figura 1) (INCA, 2021).

Para facilitar o diagnóstico e associação com os sinais clínicos, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) preconiza a utilização do sistema de estadiamento denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Nesse sistema, a extensão anatômica da doença é classificada utilizando como base a avaliação de três componentes: a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M). Esses parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Além disso, a classificação das neoplasias malignas também deve considerar: localização, tipo histopatológico, produção de substâncias e manifestações clínicas do tumor, além de

sexo, idade, comportamentos e características biológicas do paciente. O grau do estadiamento irá determinar a melhor conduta terapêutica (INCA, 2021; UICC, 2022).

As principais metas para o tratamento do câncer é a cura, prolongamento

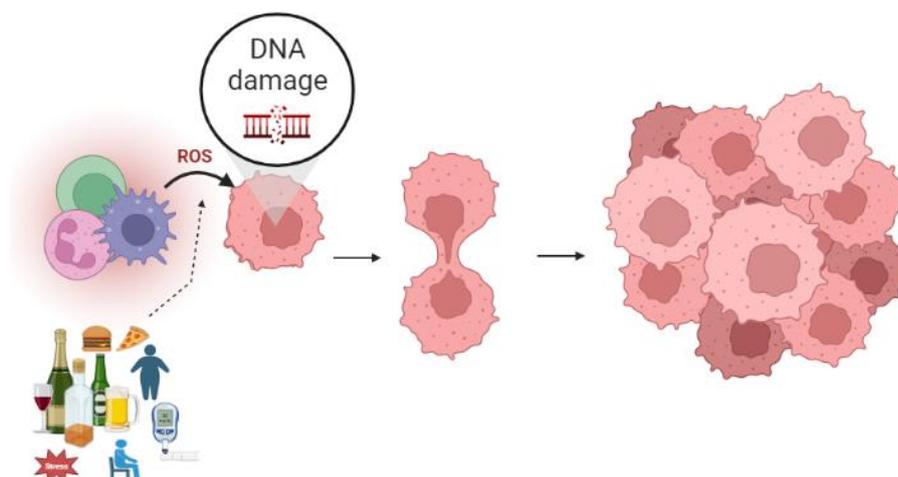


Figura 1. Oncogênese e fatores de risco associados.

Estresse, padrão alimentar, sedentarismo, obesidade, doenças metabólicas e alterações genéticas, levam a geração de espécies reativas de oxigênio, causando danos ao DNA das células, favorecendo um crescimento de células alteradas geneticamente (INCA, 2021). ROS = Espécies reativas de oxigênio; DNA = ácido desoxirribonucleico. Adaptado INCA, 2021. Criado no software BioRender.

e melhora da qualidade de vida. As terapias mais utilizadas incluem procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea e imunoterapia aplicadas em associação ou isoladas (INCA, 2021). Na maioria dos casos é necessário combinar mais de um tipo de tratamento para alcançar resultados satisfatórios. A escolha dependerá do tipo de câncer, grau do tumor, agressividade, bem como o estado físico e imunológico do paciente (MUNKER et al., 2018; PEREIRA et al., 2016).

Um levantamento de dados de 2009 a 2017, feito pelo Observatório de Oncologia, mostrou que dos pacientes que fizeram radioterapia, quimioterapia ou quimio e radioterapia, 34% fizeram as terapias combinadas e 46% apenas a quimioterapia (Global Cancer Observatory, 2020). Estes tratamentos, apesar de eficazes, apresentam diversos efeitos colaterais, principalmente alterações gastrointestinais que, podem comprometer o estado nutricional e levar a alterações na barreira intestinal (FORSGÅRD et al., 2016).

2.2. Barreira intestinal

O trato gastrointestinal (TGI), é responsável pelo maior sítio de comunicação do organismo com o meio externo. Atua nos processos de digestão e absorção de nutrientes, na homeostase intestinal e mais recentemente, é considerado parte da comunicação com o cérebro (ALLAIRE et al., 2018; CRYAN et al., 2019)

Como componente do revestimento do TGI, o epitélio intestinal é composto por uma camada única de células epiteliais, responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes. Morfologicamente, o epitélio se estende formando estruturas e invaginações, denominadas vilosidades e criptas de *Lieberkuhn*, que se projetam para dentro do lúmen, com a finalidade de aumentar a área de superfície da mucosa (GLEESON; CULLEN; DOWLING, 1972). Essas estruturas são formadas por quatro tipos celulares principais: enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e as células de *Paneth* (BLANDER et al., 2017).

Os enterócitos apresentam borda em escova, caracterizada por densa matriz de vilosidades em sua superfície apical e são ligadas por complexos juncionais que consistem em junções firmes (*tight junctions*), junções aderentes (*adherens junctions*) e desmossomos (*desmosomal junctions*). Esses complexos são responsáveis pelo controle do transporte paracelular do epitélio e o enfraquecimento resulta no aumento da permeabilidade intestinal (PI) (FASANO, 2020; GLEESON; CULLEN; DOWLING, 1972). Já, as células caliciformes, *Paneth* e as enteroendócrinas, são células secretoras importantes para o processo digestivo e função de barreira do epitélio (GALLO; HOOPER, 2012; KIM; HO, 2010).

As células caliciformes produzem e armazenam secreção de muco, composto por glicoproteínas e principalmente mucinas. Estas, são consideradas componentes da barreira física do intestino por formarem uma extensa camada de muco, tendo como principal função descrita, a ação antimicrobiana e secretora de imunoglobulina A (sIgA). Adicionalmente, as células de *Paneth* também atuam como antimicrobiano, devido a secreção de proteínas antimicrobianas (lisozima e defensina), dificultando o acesso de microrganismos à mucosa intestinal. Por fim, as células enteroendócrinas secretam diversos hormônios intestinais, dentre os quais peptídeos e catecolaminas (ALLAIRE et al., 2018; ANDREWS; MCLEAN; DURUM, 2018).

Além das barreiras físicas, o intestino contém o maior número e diversidade de compartimentos imunológicos e células imunológicas do corpo, como os tecidos

linfoides associados ao intestino (GALT) (MÖRBE et al., 2021). O GALT possui a capacidade de expressar moléculas de ativação e secretar citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), interleucinas (IL) IL-1, IL-4, IL-13, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), citocinas anti-inflamatórias, IL-10, IL-4, IL-13, citocinas regulatórias e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (FORCHIELLI; WALKER, 2005)

Dessa forma, o funcionamento adequado de todos os componentes da barreira intestinal é fundamental para garantir uma resposta imunológica adequada com manutenção da homeostase. Uma vez que a ativação de células imunológicas e o aumento de infiltrado de células inflamatórias podem afetar a integridade da barreira intestinal, principalmente na presença de inflamações intestinais, como doenças inflamatórias intestinais e mucosite (CREMON et al., 2018; FRANZÈ et al., 2016; REGAN et al., 2013).

2.3. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio entre o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e uma baixa atividade dos mecanismos antioxidantes (PREISER, 2012; RAHAL et al., 2014). Um aumento do estresse oxidativo pode induzir danos à estrutura celular e potencialmente destruir os tecidos (GRAVES, 2012). No entanto, as ERO são necessárias para o funcionamento celular adequado, incluindo a produção de energia pelas mitocôndrias (INOUE et al., 2005). O aumento do estresse oxidativo tem sido incriminado em condições fisiológicas, como envelhecimento e exercício, e em várias condições patológicas, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças inflamatórias e intoxicações (CABELLO-VERRUGIO et al., 2017; GRAVES, 2012; INOUE et al., 2005; PREISER, 2012; RAHAL et al., 2014).

A mitocôndria é a organela celular predominante na produção de ROS (INOUE et al., 2005). Gera trifosfato de adenosina (ATP) através de uma série de processos de fosforilação oxidativa. Durante este processo, ocorrem uma ou duas reduções de elétrons em vez de quatro reduções de elétrons de oxigênio, o que subsequentemente leva à formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou oxigênio (O₂) e converter para outro ROS (INOUE et al., 2005). A principal forma de ERNS inclui óxido nítrico (ON) e peroxinitrito (GRAVES, 2012; RAHAL et al., 2014). Quando há

excesso de NO, esta reação leva à formação do radical dióxido de nitrogênio. Maior concentração de ON leva à formação de Trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) e isso geralmente resulta em nitrosação (GRAVES, 2012)

Os radicais livres de oxigênio, incluindo o radical alquil peróxil, o radical hidroxila (OH^-) e o radical ânion superóxido (O_2^-), são potentes iniciadores na peroxidação lipídica, cujo papel está bem estabelecido na patogênese de doenças. Uma vez que a peroxidação lipídica é iniciada, uma propagação de reações em cadeia ocorrerá até que produtos de terminação sejam produzidos (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013). Assim, os produtos finais da peroxidação lipídica, por exemplo, F2-isoprostanos, 4-hidroxi-2-nonenol (4-HNE) e malondialdeído (MDA), são acumulados em sistemas biológicos (RAHAL et al., 2014). As bases de DNA são muito suscetíveis à oxidação de ROS, e o principal produto de oxidação detectável de bases de DNA é a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; RAHAL et al., 2014). A oxidação das bases do DNA pode causar mutações e deleções no DNA nuclear e mitocondrial. O DNA mitocondrial é relativamente propenso a danos oxidativos devido à sua proximidade com ROS e sua capacidade de reparo deficiente em comparação com o DNA nuclear (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

Essas modificações oxidativas causam alterações funcionais nas proteínas estruturais e enzimáticas, o que pode levar a um impacto fisiológico substancial. Além disso, as modulações redox dos fatores de transcrição também aumentam ou diminuem suas atividades específicas de ligação ao DNA (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; PREISER, 2012; RAHAL et al., 2014), assim, alteram a expressão gênica, e tornam-se responsáveis por desencadear diferentes resposta no organismo como a potencialização de processos inflamatórios (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; SOUGIANNIS et al., 2021).

2.4. 5-FU e mucosite

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um quimioterápico da classe dos antimetabólicos que atua inibindo processos de biossíntese essenciais (CRISWELL et al., 2003; SONIS, 2004). Ele penetra na célula por transporte facilitado, usando o mesmo mecanismo de transporte que o uracil (SONIS, 2004). No meio intracelular é convertido em metabólitos ativos que interrompem a síntese de ácido ribonucleico (RNA) e a ação da enzima timidilato sintetase essencial na produção e reparação de ácido desoxirribonucleico (DNA) (CHANG et al., 2012).

Devido à ação inespecífica, o 5-FU pode atingir células saudáveis com alto índice mitótico, principalmente do TGI (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013). Como consequência, observa-se a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), promoção do estresse oxidativo, ativação de fatores de transcrição e aumento da produção de citocinas inflamatórias, que amplificam os danos causados pelo quimioterápico (SONIS, 2004). Estes eventos culminam em inflamação e diversos efeitos colaterais, como a mucosite (SONIS, 2004).

A mucosite intestinal é efeito colateral adverso à toxicidade da quimioterapia e radioterapia em pacientes oncológicos. O quadro clínico caracteriza-se pela ulceração, inflamação e perda das células que compõe a barreira epitelial do trato digestivo (SONIS, 2004). O dano na mucosa intestinal acomete cerca de 40% a 80% dos pacientes em quimioterapia com de 5-FU e está associado a sintomas como dor, ulceração, inchaço, náuseas, vômitos, diarreia e constipação (KEEFE et al., 2007; SONIS, 2004; TOUCHEFEU et al., 2014). Essa disfunção patológica ocasiona anorexia e perda de peso, conseqüentemente, piora do estado nutricional e qualidade de vida desses pacientes. Além disso, contribui com aumento da predisposição às infecções, tempo de internação e custos do tratamento (MANZI; SILVEIRA; DOS REIS, 2016; OBEROI et al., 2014a). Nestes casos, é necessário ajustes de dose ou interrupção do tratamento, comprometendo a eficácia do fármaco e resultando em maior taxa de mortalidade em pacientes com câncer (TRINDADE et al., 2018).

O desenvolvimento da mucosite é processo dinâmico; contudo, (SONIS, 2004) descreveu a fisiopatologia da mucosite em 5 estágios. Em 2021, Sougiannis e colaboradores reforçaram a descrição explorando os mecanismos associados ao desenvolvimento da inflamação (SOUGIANNIS et al., 2021) (Figura 2):

(I) Iniciação: a lesão tecidual ocorre imediatamente após a administração do quimioterápico ou radioterápico (0 a 2 dias). Os agentes citotóxicos promovem danos ao DNA e estimulam a produção de EROs. A ativação de cascata de eventos na camada submucosa resulta em lesão celular que atinge as células do epitélio basal e contribui para a ativação no NFkB e regulação positiva de mensageiros (GENEROSO et al., 2015).

(II) Resposta primária ao dano: a ativação do NFkB estimula a expressão de diversos genes potencialmente tóxicos para a mucosa. O processo induz a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1 β e IL-6

capazes de aumentar o dano tecidual, reduzir a oxigenação e induzir a apoptose das células epiteliais basais (FERREIRA et al., 2012). Bowen e colaboradores (2019) verificaram que a inibição do NF- κ B suprime a inflamação e melhora o dano à mucosa, o que sugere que ele seja o mediador chave envolvido na mucosite induzida por 5-FU (BOWEN et al., 2019).

(III) Amplificação do sinal: a ativação de receptores do tipo *toll* (TLR) por bactérias intestinais leva à regulação positiva de NF- κ B por meio de múltiplas vias de sinalização, agravando ainda mais a resposta inflamatória por meio da geração e amplificação de citocinas inflamatórias, causando danos teciduais. Cerca de 2 a 5 dias após o tratamento quimioterápico, ocorre aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, expressão aumentada de TNF α e proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP1) que levam ao recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local do dano. A regulação positiva do *feedback* do TNF α para aumentar a sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e c-Jun NH 2 -terminal quinase (JNK) levando à degradação da fibronectina e ativação de macrófagos, além de favorecer o aumento de caspase 3, caracterizando então a mucosite (SOUGIANNIS et al., 2021).

(IV) Ulceração: as ulcerações, ocorrem como evento final de lesão tecidual e morte de células-tronco. Este evento leva ao aumento da liberação de ROS, o que exacerba o dano à camada submucosa e avança os efeitos debilitantes do dano induzido pela quimioterapia (SOUGIANNIS et al., 2021). Isso piora especialmente em pacientes que recebem múltiplas doses de quimioterapia. A colonização bacteriana nas úlceras mucosas induz ainda mais a inflamação, estimulando a infiltração e ativação de macrófagos pró-inflamatórios, levando a um ciclo vicioso de inflamação no TGI. Na fase ulcerativa a mucosite se torna clinicamente evidente. Esse processo resulta no aumento da permeabilidade intestinal, invasão da microbiota do lúmen para a lâmina própria e translocação das bactérias para circulação sistêmica (JUSTINO et al., 2014; PRISCIANDARO et al., 2011). Nessa fase, os sinais clínicos de dor, desconforto gastrointestinal são mais evidentes, além de apresentarem maior risco de bacteremia e sepse (LI et al., 2017).

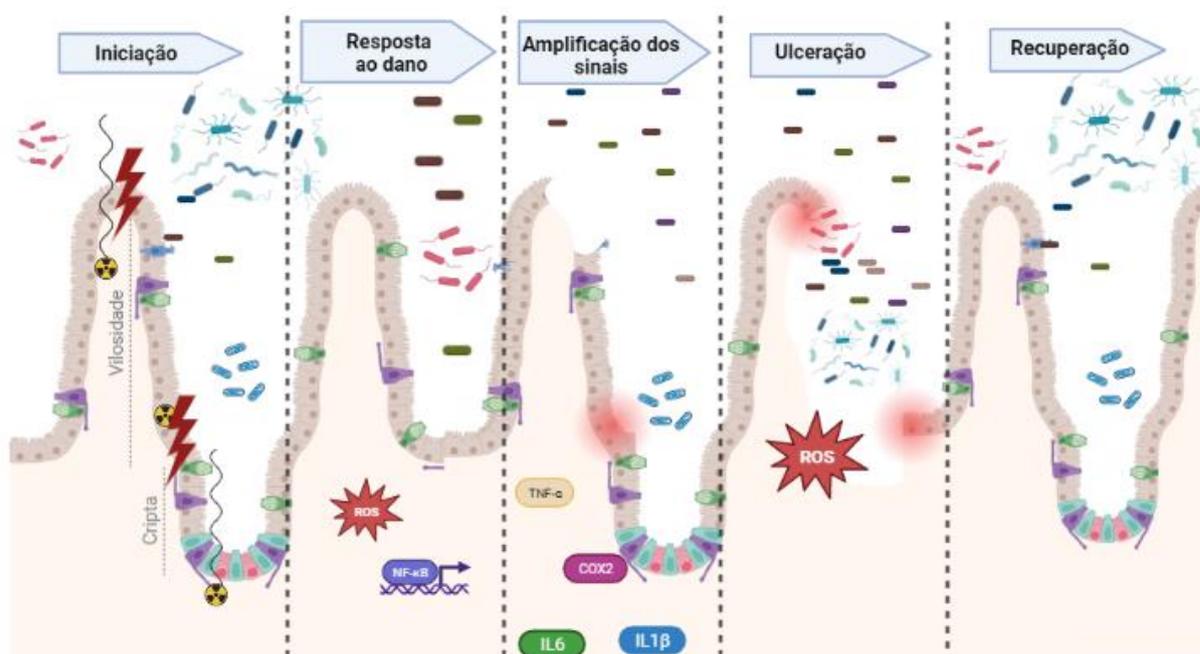
(V) **Recuperação:** a interrupção do tratamento quimioterápico e/ou radioterápico leva ao processo de cicatrização ou cura. O reparo tecidual é promovido por meio da proliferação e diferenciação do tecido a partir da liberação de sinais da matriz extracelular da submucosa (SOUGIANNIS et al., 2021). Embora normalmente esse tipo de resposta resulte em reparo tecidual, as drogas antineoplásicas também têm como alvo o sistema hematopoiético altamente proliferativo, causando anemia sistêmica e linfocitopenia (SHITARA et al., 2011). Esses eventos resultam em uma capacidade reduzida do sistema imunológico de responder adequadamente ao insulto tecidual (CARUSO et al., 2019; NILSEN et al., 2021). Portanto, um desequilíbrio das respostas das citocinas e dos mecanismos de cura prolonga os distúrbios fisiológicos resultantes da destruição do tecido intestinal; no entanto, são escassos os trabalhos que elucidam os mecanismos a longo prazo.

Figura 2. Desenvolvimento da mucosite

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio; NFkB= Fator de Necrose Kappa B; COX2= Cicloxigenase 2; IL6 = Interleucina 6; IL10= Interleucina 10.

Fonte: Adaptado de(SONIS, 2004; SOUGIANNIS et al., 2021). Criado no software BioRender.

Nos últimos anos, os avanços no entendimento da patogênese da mucosite, bem como a busca por novos agentes envolvidos, reforçaram a



complexibilidade da lesão (BOWEN et al., 2019). Além do mecanismo descrito, recentemente a microbiota intestinal foi incluída como parte do desenvolvimento e da gravidade da mucosite (BOWEN et al., 2019). A disbiose microbiana que ocorre na

mucosite levou os pesquisadores a postular que a composição do microbioma intestinal pode ser usada como marcador substituto para alterações que levam à diarreia (ALEXANDER et al., 2017; WANG et al., 2015). Além disso, parece haver ligações mecanísticas entre a microbiota intestinal alterada durante quimioterapia e a capacidade de metabolizar nutrientes e xenobióticos (MONTASSIER et al., 2015). As interações microbioma-mucosa com os receptores *toll-like* (TLRs, devido à sua interface direta entre ligantes microbianos e cascatas de sinalização através de células epiteliais, neurais e imunes, agem para regular a inflamação e ajuda na cicatrização do intestino (ALEXANDER et al., 2017).

Apesar das consequências clínicas, econômicas e dos avanços no entendimento da mucosite, ainda não há terapias e protocolos efetivos para a prevenção e/ou tratamento. Algumas alternativas, como crioterapia e aplicação de laser têm sido utilizadas para amenizar os sintomas, essencialmente na cavidade oral (DE MELO MANZI; SILVEIRA; REIS, 2016; OBEROI et al., 2014b) O uso de imunomoduladores tem sido investigado como forma de minimizar os efeitos colaterais do tratamento e melhorar qualidade de vida de pacientes, principalmente pelos benefícios já demonstrados em reduzir a PI, a translocação bacteriana, modular a microbiota e aumentar a produção de slga (ANDRADE et al., 2015).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a suplementação com simbiótico (TRINDADE et al., 2018), ácidos graxos ômega-3 (GENEROSO et al., 2015), L-arginina (LEOCÁDIO et al., 2015b), butirato (FERREIRA et al., 2012), ácido linoleico conjugado (BARROS et al., 2016), FOS (CARVALHO et al., 2021) probióticos (JUSTINO et al., 2014; PRISCIANDARO et al., 2011) e mais recente, associação de FOS com L-arginina (ANDRADE et al., 2023) apresentaram efeitos benéficos na mucosite intestinal e na modulação da microbiota intestinal. O uso de terapias combinadas, como a associação de imunomoduladores podem ser importantes adjuvantes na prevenção da mucosite intestinal por aumentar a abrangência do tratamento, principalmente pelas novas descobertas relacionadas à fisiopatologia da lesão e inflamação intestinal (BOWEN et al., 2019).

Neste contexto, a vitamina C por ser um potente antioxidante e modulador da resposta imunológica, associada ao aminoácido L-arginina, com propriedades benéficas já mostradas na mucosite intestinal, poderia ser uma alternativa de tratamento associado à quimioterapia.

2.5. Vitamina C

O ácido ascórbico, comumente conhecido como vitamina C (vitC), é micronutriente hidrossolúvel, essencial para seres humanos. As melhores fontes de vit C são frutas frescas (particularmente frutas cítricas), como laranja, acerola, limão, abacaxi, entre outras (COLLI, 2005). O consumo alimentar diário varia de acordo com a faixa etária; adultos saudáveis devem consumir entre (60 a 75mg/dia). No entanto, o maior desafio na utilização e consumo da vit C é manter a estabilidade, uma vez que é facilmente degradada em meio aquoso, calor, pH elevado, presença de oxigênio e íons metálicos. Esse processo geralmente é acompanhado por uma mudança de cor nas formulações ou alimentos, que ficam gradativamente mais amareladas/alaranjadas (COLLI, 2005). Várias estratégias têm sido desenvolvidas para limitar esses processos, entre elas: controle da presença de oxigênio durante a formulação e armazenamento, baixo pH e redução do teor de água através do uso de formulações anidras/não aquosas e manutenção em baixas temperaturas (CARITÁ et al., 2020) (Figura 3).

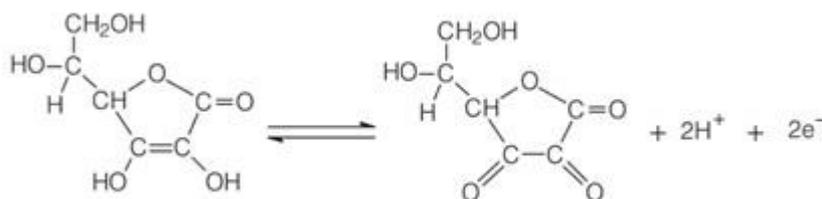


Figura 3. Estrutura química do ácido ascórbico e a oxidação em ácido dehidroascórbico. Fonte: Lykkesfeldt et al. 2014.

2.5.1. Absorção e metabolismo da vitamina C

A captação intestinal e a reabsorção renal são importantes na biodisponibilidade do ácido ascórbico, pois os humanos, ao contrário da maioria dos mamíferos, não podem sintetizar a vitamina de novo. Os níveis circulantes de vit C são rigidamente controlados na faixa micromolar, enquanto os níveis intracelulares são muito mais altos (MAY; HARRISON, 2013). O ácido ascórbico é distribuído por Transportadores de Membrana de Vit C (SVCT) em células nucleadas, enquanto o ácido dehidroascórbico (DHA), o produto da 2e-oxidação da vit C (Figura 3), é transportado por transportadores de glicose independentes de Na⁺ (GLUT) e é rapidamente reduzido intracelularmente. A oxidação da vit C pode aumentar substancialmente os níveis de DHA, permitindo o acúmulo de vit C em vários tipos de

células, e isso pode ser importante para sua função antioxidante (MAY; HARRISON, 2013).

Assim, grandes quantidades de ácido ascórbico podem ser disponibilizadas durante uma resposta inflamatória, por exemplo, para equilibrar a produção de ROS. No entanto, os polimorfismos genéticos nos genes humanos de transporte de vit C afetam os níveis plasmáticos de ácido ascórbico e, portanto, o risco de doenças e os indivíduos com baixa ingestão alimentar podem ser mais suscetíveis aos efeitos da variação genética (MICHELS; HAGEN; FREI, 2013).

2.5.2. O papel da vitamina C no sistema imunológico

Vários estudos demonstraram o papel da vit C na regulação do sistema imunológico humano. Além de ser antioxidante, ela desempenha papel imunomodulador fundamental como cofator para várias enzimas envolvidas na expressão biosintética e genética (CARR; MAGGINI, 2017; LEE et al., 2003). Além disso, esse micronutriente ajuda a manter a integridade da barreira epitelial, promovendo a atividade das células *natural Killer* (NK) e a diferenciação de células T CD4 + imaturas em células T (Th1) auxiliares (células T produtoras de IFN- γ). Além disso, demonstrou-se que a vit C afeta a produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão (CHAMBIAL et al., 2013). Outro papel importante é a capacidade da vit C em promover a migração de neutrófilos para o local da infecção. Ela também melhora a fagocitose, promove a renovação dos agentes oxidantes e a morte microbiana (CARR; MAGGINI, 2017). Curiosamente, a vit C parece também regular o perfil epigenético das células imunes, pela restauração da atividade de enzimas relacionadas as desmetilação do DNA nas células *Treg*, o que leva à reexpressão de Foxp3 e impulsiona a função adequada das células imunológicas (KI et al., 2003; LI; SONG; CHEN, 2022; YUE; RAO, 2020) .

Adicionalmente, o ácido ascórbico é essencial para a síntese de imunoglobulinas, para a produção de interferon e para a supressão da produção de interleucina-18, fator regulador de tumores malignos. Portanto, a suplementação de Vit C é recomendada durante a infecção e estresse (KI et al., 2003; LEE CHONG; AHEARN; CIMMINO, 2019; YUE; RAO, 2020). Outro ponto relevante é que a vit C estimula a formação de bile na vesícula e facilita a excreção de hormônios esteróides. Atua diretamente na biossíntese do colágeno, sendo cofator enzimático das lisil e prolil hidroxilases, enzimas essenciais para a estabilização e reticulação das fibras de

colágeno tipo I e III. Também desempenha papel importante na cascata de sinalização intracelular que leva à proliferação de fibroblastos (KI et al., 2003; LI; SONG; CHEN, 2022).

A vit C é mantida em níveis elevados na maioria das células imunológicas e pode afetar muitos aspectos da resposta imune (BÖTTGER et al., 2021; LEE CHONG; AHEARN; CIMMINO, 2019). Essa atividade requer concentrações em milimolar de VitC enfatizando assim. a necessidade de ingestão adequada para permitir a função imunológica especialmente em condições de inflamação e câncer, quando a vitamina C frequentemente se torna deficiente.

2.5.3. Vitamina C na quimioterapia

A Vit C tem sido estudada em várias condições como, durante a quimiorradiação convencional e no tratamento do câncer (AL-REFAI, 2017; CHAITANYA et al., 2018; MAGRÌ et al., 2020). Dois estudos pré-clínicos, mostraram que altas doses de Vitamina C atuaram em sinergismo com inibidores do *checkpoint* imunológico anti-PD-1 e anti-CTL-4(LUCHETEL et al., 2020; MAGRÌ et al., 2020). Indicando que sua atividade antitumoral não depende apenas de seus efeitos pró-oxidantes, mas também substancialmente de algumas de suas funções imunomoduladoras.

Estudo publicado em 2003, por Nagy e colaboradores (2003), mostrou efeito antiproliferativo e a ação indutora de apoptose do 5-fluorouracil (5-FU) em combinação com a vit C, *in vitro*, contra o linfoma quimiossensível de camundongo. A própria Vit C não teve efeito antiproliferativo nos fibroblastos, mas aumentou o efeito anticancerígeno do 5-FU dose-dependente. Em uma linha celular quimiorresistente, apenas a concentração elevada de vit C aumentou a citotoxicidade do 5-FU. A combinação de 5-FU e Vit C exerceu efeito apoptótico aumentado na linha celular de linfoma de camundongo, enquanto para a linha celular HEp-2 esse efeito foi menos marcante e foi alcançado apenas com uma alta concentração de Vit C. Esses achados sugerem que a administração de uma alta dose de Vit C em combinação com a quimioterapia 5-FU aumenta a quimioresponsividade das células cancerígenas e serve como um potencial sensibilizador, especialmente em linhagens celulares quimiorresistentes (NAGY et al., 2003).

Em outro estudo, Al-Refai e colaboradores (2017), mostraram que 12mg/kg/dia de ácido ascórbico diminuiu a gravidade da mucosite oral experimental induzida por ciclofosfamida em ratos, devido ao aumento significativo da espessura

do epitélio, diminuição significativa na pontuação de danos e aumento significativo na expressão imune de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) corroborando para o efeito potencializador da Vit C na quimioterapia (AL-REFAI, 2017).

São raros os estudos clínicos com uso de Vit C durante o tratamento quimioterápico. Chaitanya e colaboradores (2018) em ensaio clínico randomizado, utilizando altas doses, 4 g por dia, de Vit C, mostraram alívio da gravidade da mucosite oral em pacientes com câncer, durante a radioterapia e quimiorradioterapia, além de não apresentar nenhum outro efeito colateral em decorrência da suplementação (CHAITANYA et al., 2018)

2.6. L arginina

A L-arginina é aminoácido semi-essencial e importante agente imunomodulador em diversas situações (Figura 4). Suas fontes mais comuns são frutos do mar, algas, carnes, nozes e concentrado proteico de arroz e soja (POPOLO et al., 2014; VISEK, 1986).

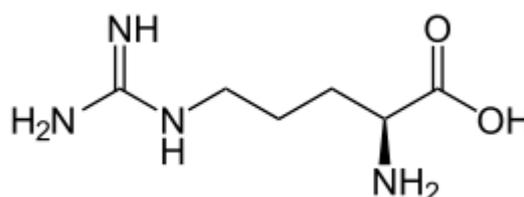


Figura 4. Estrutura química do aminoácido L-arginina.

Durante o período de crescimento e proliferação celular e em estados catabólicos, a demanda por L-arginina é maior e, a síntese endógena é insuficiente para suprir a necessidade do organismo. Além disso, é importante precursor para a síntese de proteínas, uréia, óxido nítrico, poliaminas, prolina, creatina e no intestino atua na manutenção e regeneração da mucosa intestinal (BERTRAND et al., 2013; FARGHALY; THABIT, 2014; POPOLO et al., 2014; WU et al., 2009). Arginina pode ainda, estimular a secreção de hormônios como insulina, glucagon, hormônio do crescimento e prolactina. Além disso, está envolvida na imunorregulação (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

2.6.1. Absorção e metabolismo da L-Arginina

A homeostase da L-arginina depende do suprimento dietético, da síntese endógena, do catabolismo e da eficiência do transporte da L-arginina através das membranas celulares (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). A influência decisiva no desempenho da síntese endógena desse aminoácido é a disponibilidade de citocinas produzidas pelos enterócitos. O intestino é a principal fonte de citrulina para a síntese de L-arginina que ocorre nos túbulos renais proximais, que é conhecido como eixo intestino-renal (BEAUMIER et al., 1996; BROSNAN; BROSNAN, 2004).

Com isso, a síntese de cerca de 60% da L -arginina ocorre nos rins, onde o aminoácido citrulina, produto do catabolismo proteico endógeno, é extraído do plasma sanguíneo. Com o envolvimento de L-arginina succinato sintetase (ASS) e arginina succinato liase (ASL), a citrulina é convertida em L -arginina. Essas reações são os componentes do ciclo da ornitina. A baixa eficiência do ciclo da ornitina deve-se à baixa taxa de velocidade máxima de resposta (V_{max}) catalisada por ASS1 e ASL e à disponibilidade limitada de citrulina (POPOLO et al., 2014; SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

A disponibilidade da L-arginina para funções metabólicas é determinada pela ação de seus transportadores localizados no plasma e nas membranas mitocondriais (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). Administrado por via oral o aminoácido L -arginina é rápido e quase totalmente absorvido pelo sistema de transporte de aminoácidos catiônicos (CAT) intestinal (MORRIS, 2007; SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). Entretanto, a dupla membrana lipídica da célula não é permeável à molécula de L-arginina e, portanto, seu transporte celular requer o envolvimento de um sistema transportador localizado nas membranas celulares (GAD, 2010). O sistema y^+ é um transportador de alta afinidade, independente de sódio e que inclui a família de transportadores de aminoácidos catiônico (CAT)(NICHOLSON et al., 2001; SINGH et al., 2012) A CAT-1 ocorre constitutivamente em todas as células, exceto nos hepatócitos. Já, a CAT-2A ocorre nos hepatócitos, a CAT-2B é um transportador induzido por citocinas e a CAT-3 está envolvida no desenvolvimento embrionário (NICHOLSON et al., 2001). A deficiência de CAT limita o transporte de L-arginina do plasma para as células (MORRIS, 2007). Citocinas, interferon e fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) estimulam a atividade de L-transportadores de arginina e aumentam a atividade do óxido nítrico sintase (NOS) (CENDAN et al., 1995, 1996).

A degradação da L-arginina é catalisada pelas quatro enzimas presentes em muitas isoformas: arginase (ARG), óxido nítrico sintase (NOS), arginina descarboxilase (ADC) e arginina glicina amidinotransferase (AGAT) (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). A reação de decomposição da L-arginina em citrulina e NO é catalisada a óxido nítrico sintase (NOS). A NOS ocorre em três isoformas: eNOS (endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (induzível), derivada de macrófagos. Estima-se que cerca de 1,5% da L -arginina entre na rota de síntese do NO (BENSON; HARDY; MORRIS, 2011).

Nos mamíferos, existem dois ARG isomórficos que diferem na distribuição tecidual e localização subcelular. ARG I é uma proteína citoplasmática expressa principalmente no fígado, que catalisa a última etapa do ciclo urinário. ARG II é uma proteína mitocondrial encontrada em muitos tecidos.

A ornitina, produto direto do metabolismo da I -arginina, é substrato para a síntese de poliaminas em uma reação catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC, ornitina transcarbamilase) (MUNDER, 2009). As poliaminas são compostos biogênicos formados em todas as células pela descarboxilação de alguns aminoácidos, incluindo I-arginina. As poliaminas (incluindo putrescina, espermidina, espermina) encontradas no citoplasma de células saudáveis são responsáveis pelo seu desenvolvimento e funcionamento adequados. As poliaminas interagem com DNA, RNA, proteínas, fosfolipídios e outros poliânions, estimulando a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas nas células, afetando o crescimento, proliferação e diferenciação celular (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). As poliaminas protegem os ácidos nucleicos dos efeitos nocivos dos fatores ambientais. A atividade das poliaminas nos processos de replicação, transcrição e tradução depende da concentração (SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

Os valores de K_m para I -arginina de ARG I e II (~ 10 mmol/l) são muito maiores do que os de iNOS (~ 5 μ mol/L), enquanto $V_{m\acute{a}x}$ de ARG I e II foram $10^3 - 10^4$ vezes maiores do que o do iNOS. Assim, os valores de $V_{m\acute{a}x} / K_m$ de ARG são próximos ao valor de iNOS, o que faz com que essas enzimas compitam por I -arginina nas células. Portanto, a utilização de I -arginina por ambas as enzimas, *in vitro*, é comparável e o consumo *in vivo* é variável e depende da polarização imunológica, ou seja, a relação Th1/Th2. Logo, dependendo do perfil imunológico do corpo, as citocinas Th1 terão mais facilidade em aumentar a atividade de NOS ou as citocinas

Th2 terão mais facilidade em aumentarem a atividade de ARG (CHATTERJEE et al., 2006; POPOVIC; ZEH; OCHOA, 2007).

Dessa forma, as concentrações plasmáticas fisiológicas de L-arginina são cerca de 50-100 μM e são muitas vezes menores do que a concentração intracelular, que é de cerca de 1 mM (BODE-BÖGER; SCALERA; IGNARRO, 2007). Essa diferença nas concentrações de L-arginina (entre o plasma e a célula) leva ao chamado 'paradoxo da arginina' e, está associado as taxas de síntese de NO. Uma hipótese, é a dimetilarginina assimétrica (ADMA) ser a causa desse fenômeno, que ao bloquear a eNOS reduz a síntese de NO (CARDOUNEL et al., 2007; LEONE et al., 1992; SHIN; THAPA; FUNG, 2017). Porém, a alta concentração de L-arginina plasmática desloca ADMA de eNOS (impedindo o bloqueio), resultando em aumento da produção de NO e diminuição no meio intracelular (BÖGER, 2004).

2.6.2. O papel da L-arginina no sistema imunológico

A produção de óxido nítrico (NO) a partir da arginina foi identificada em células endoteliais (IGNARRO et al., 1987) e logo depois em macrófagos (HIBBS et al., 1988). Eventualmente, foi demonstrado que estímulos inflamatórios induzem a expressão de uma isoforma específica da NO sintase (iNOS) em células mieloides e outros tipos celulares. Existem vários papéis para iNOS em diferentes processos de doença (RATH et al., 2014; WITTE; BARBUL, 2002). Os estímulos que induzem iNOS incluem citocinas auxiliares (Th1) IL-1, TNF- α e IFN- γ e endotoxinas (CHATTERJEE et al., 2006; HOLÁŇ et al., 2006). A regulação da disponibilidade de arginina é um mecanismo potencial que pode levar ao controle da produção de NO (EFRON; BARBUL, 1998; MORRIS, 2007). A arginase 1 é induzida em células mieloides por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13 (BARKSDALE et al., 2004; MUNDER, 2009) e também por IL-6, IL-10, TGF- β (MUNDER, 2009), prostaglandinas (PGE) (BANSAL et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005) e catecolaminas (BANSAL et al., 2005; BARKSDALE et al., 2004; MORRIS, 2007; MUNDER, 2009). Assim, a ativação de iNOS ou arginase (ou ambos) reflete o tipo de resposta inflamatória em um processo de doença específico (CHATTERJEE et al., 2006; HOLÁŇ et al., 2006). Por exemplo, a sepse está associada a uma predominância de iNOS, mas o trauma exhibe uma indução preferencial de arginase (BANSAL et al., 2005; CHIARLA; GIOVANNINI; SIEGEL, 2006).

Células mieloides que expressam arginase esgotam eficientemente a arginina do ambiente circundante (BRONTE et al., 2003; TSUEI et al., 2001). Por meio deste mecanismo, as células mieloides suprimem as funções dependentes de arginina e são, portanto, apropriadamente chamadas de células supressoras mieloides (MSC) (OCHOA et al., 2001; SERAFINI; BORRELLO; BRONTE, 2006). As MSC foram descritas em traumas (em camundongos e humanos), certas infecções e, principalmente, em câncer (MORRIS, 2007; MUNDER, 2009). Em humanos, a expressão da arginase é observada principalmente nos granulócitos, que por sua vez podem exercer um efeito supressor, sugerindo uma diferença significativa entre as espécies (MUNDER, 2009). No entanto, os modelos de camundongos continuam a fornecer conhecimentos importantes quanto ao efeito regulador das células que expressam arginase (POPOVIC; ZEH; OCHOA, 2007).

As estratégias dietéticas destinadas a suprir a deficiência de arginina exibem resultados mistos. Mais de 40 ensaios usando dietas de reforço imunológico com arginina foram realizados em uma ampla variedade de populações de pacientes (GRIMBLE, 2005). Esses estudos demonstram um benefício consistente na redução de infecções em pacientes submetidos a cirurgias de alto risco, como ressecção de cólon ou pâncreas. Pacientes com trauma também parecem se beneficiar dessas dietas, mas elas devem ser iniciadas logo (idealmente dentro de 24 horas) após a lesão. O uso de dietas de reforço imunológico com arginina em pacientes críticos (não cirúrgicos) falhou em demonstrar qualquer benefício significativo. Mais preocupante é o fato de que, em alguns desses estudos, resultados mistos foram observados em pacientes sépticos gravemente enfermos, com alguns estudos descrevendo aumento da mortalidade, enquanto outros relatam exatamente o oposto. Esses resultados incertos tornam o uso de arginina altamente controverso na sepse (GRIMBLE, 2005; OCHOA et al., 2001; POPOVIC; ZEH; OCHOA, 2007).

2.6.3. O papel da arginina na quimioterapia

No epitélio intestinal, a arginina já demonstrou efeitos anti-inflamatórios que recuperam o epitélio inflamado (BERTRAND et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa demonstrou, em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU, que a suplementação com arginina foi capaz de reduzir escore histológico, infiltrado inflamatório, peroxidação lipídica, permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e modula a microbiota intestinal (ANDRADE et al., 2023; LEOCÁDIO et al., 2015).

Além disso, DE ANDRADE BERNAL FAGIANI e colaboradores (2019), demonstraram que a suplementação com 100 mg/d de L-arginina minimizou a imunossupressão, a depleção do baço e o tempo de protrombina e contribuiu para a degradação do DNA gerado pelo 5-FU em ratos Wistar. Além de que a suplementação com 50 mg/dia de L-arginina diminuiu a perda de peso gerada pelo 5-FU. Entretanto, suplementos com 50 ou 100 mg de L-arginina não interferiram no infiltrado inflamatório jejunal gerado pelo 5-FU (DE ANDRADE BERNAL FAGIANI et al., 2019).

Associado a isso, BALTMANT et al., 2018, demonstraram em seu estudo utilizando suplementação de arginina associada à quimioterapia com 5-FU em células de câncer in vitro, o efeito do quimioterápico foi potencializado na presença de arginina por aumento de NO e apoptose das células (BALMANT et al., 2018). Porém, esse efeito potencializador, com aumento de NO, gera uma resposta mais inflamatória (CHATTERJEE et al., 2006) o que poderia desfavorecer os resultados positivos na mucosite.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação com vitamina C isolada e associada com L-arginina na mucosite intestinal experimental.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar se a suplementação com vitamina C isolada e associada com arginina, interfere:

- No consumo alimentar e na variação ponderal dos animais;
- Na permeabilidade intestinal;
- Nas alterações morfológicas do epitélio intestinal, nas junções firmes e no comprimento do intestino.
- Na resposta imunológica do intestino, pela dosagem do infiltrado inflamatório, sIgA e citocinas;
- Nos danos lipídicos e resposta antioxidante enzimática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

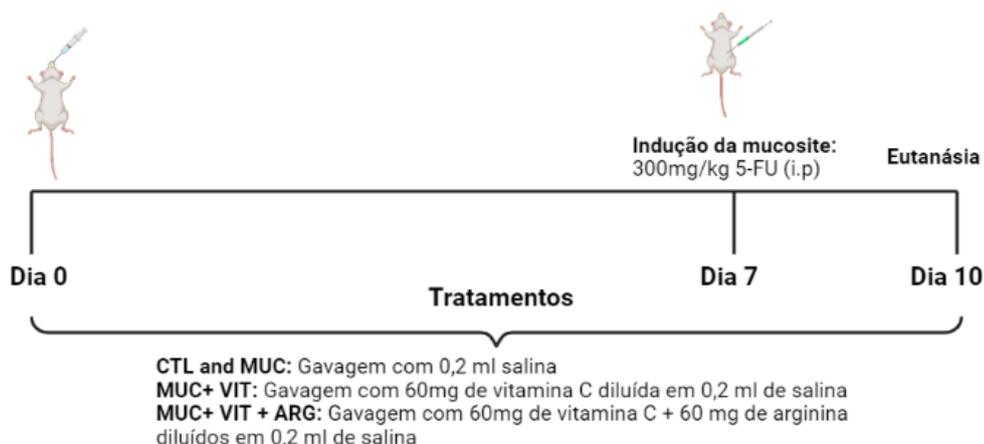
Foram utilizados camundongos machos BALB/c, de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 15 e 23 gramas, fornecidos pelo Biotério Central (BC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG em gaiolas plásticas, com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro de 12 horas) e ventilação, com acesso à água e comida *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o protocolo nº 68/2021 (ANEXO I) e está em conformidade com o guia recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório. Todas as normas determinadas pelo guia *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments- ARRIVE* de experimentação animal (ARRIVE Guidelines, 2022) foram respeitadas.

4.2. Preparo de L- Arginina e Vitamina C

Inicialmente, foi testada a viabilidade em utilizar o produto comercial já disponível no mercado Targifor+C (SANOFI AVENTIS®) que possui na composição a associação de vitamina C e arginina. Entretanto, a diluição para alcançar a dose calculada não apresentou homogeneidade e estabilidade, o que inviabilizou o uso (ANEXO II). Em decorrência disso, foram utilizados o aminoácido L-arginina isolado (A5006), fabricante Sigma Aldrich® e a vitamina C (L-ácido ascórbico) isolada (A0537), fabricante TCI America®. Para a definição das dosagens, foi considerada a dose de arginina (60 mg/dia) utilizada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Para a definição da dosagem de vitamina C, utilizou-se proporção de 1:1 apresentada no produto Targifor+C, perfazendo a dose de 60mg de vitamina C por dia (ANDRADE et al., 2023). A associação dos nutrientes (60 mg de vitamina C e 60 mg de arginina), assim como a vitamina C isolada foi pesada diariamente em balança semi-analítica, em proporção necessária para 10 animais por grupo e diluída em 2mL de salina.

4.3. Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (CTL), Mucosite (MUC), Mucosite + Vitamina C (MUC+VIT), Mucosite + associação de arginina e vitamina C (MUC+ARG+VIT). Os camundongos dos grupos CTL e MUC



receberam 0,2 mL de salina (NaCl 99%) por gavagem durante todo o período experimental. Enquanto que os animais do grupo MUC+VIT receberam, por gavagem, 0,2mL de solução contendo 60mg de vitamina C e os animais do grupo MUC+ARG+VIT receberam, por gavagem, 0,2 mL de solução contendo 60mg de vitamina C e 60 mg de arginina.

O tratamento teve duração de 10 dias, com indução da mucosite no 7º dia. Setenta e duas horas após a indução (10º dia), os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e realizada a coleta de amostras para as análises (Figura 5).

Os grupos CTL+ARG e MUC+ARG já foram explorados em outro trabalho do nosso grupo (ANDRADE et al., 2023) e por isso não foram utilizados no delineamento experimental. Já, o grupo CTL+VIT, foi utilizado apenas para as análises de peso, consumo, histologias e permeabilidade intestinal, para comprovação dos efeitos da vitamina C em condições homeostáticas (ANEXO III).

4.4. Mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil

Para indução da mucosite, os animais dos grupos MUC, MUC+VIT e MUC+ARG+VIT, receberam no 7º dia de tratamento, injeção única intraperitoneal (IP) com 300mg/kg de 5-FU (Fauldfluor®, Libbs, São Paulo, Brasil), conforme descrito por (VIANA et al., 2010). Já os animais do grupo CTL, receberam injeção IP com o mesmo volume de salina (NaCl 99%).

Figura 5. Delineamento experimental.

CTL = controle; MUC= mucosite; MUC+VIT= Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + arginina + Vitamina C; IP = intraperitoneal. Dia 0 = primeiro dia de gavagem; Dia 10= dia da eutanásia.

4.5. Consumo alimentar e alteração ponderal

Durante todo experimento, os animais receberam ração comercial da marca QUIMTIA® - Ração para ratos e camundongos, CR1 Autoclavável. O consumo alimentar foi avaliado por meio da diferença entre peso da ração ofertada e a sobra. Os animais e a ração foram pesados diariamente em balança semi-analítica, sempre no mesmo horário.

4.6. Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade no sangue, após 4 horas de administração oral de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc -DTPA).

O reagente liofilizado contendo 10 mg de DTPA e 0,5 mg do agente redutor cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi utilizado para a marcação foi utilizado do DTPA. O reagente foi reconstituído em 1 mL de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), obtidos do gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares/São Paulo). A preparação foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos (VIANA et al., 2010). Após esse período, os animais receberam por gavagem 0,1mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA contendo 18,5MBq (megabecquerel) de atividade. A correção de decaimento da radioatividade do ^{99m}Tc foi medida por meio de alíquotas de 0,1 mL de ^{99m}Tc -DTPA com a mesma marcação administrada aos camundongos e tiveram a radioatividade mesurada concomitante ao tempo da contagem radioativa do sangue dos animais (VIANA et al., 2010)

Após 4 horas da gavagem, os animais foram anestesiados IP com solução de xilazina (15 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80mg/kg de peso vivo). O sangue foi coletado por punção axilar da veia cava superior e a radioatividade medida em contador de radiação gama (*Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3*) (GENEROSO et al., 2011)Os dados foram comparados com o padrão da dose e expressos em dose %, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ dose no sangue} = \frac{\text{cpm do sangue}}{\text{cpm da dose administrada}} \times 100$$

onde cpm = contagem por minuto (ANDRADE et al., 2016).

4.7. Análises histopatológicas

Após a eutanásia, o segmento intestinal correspondente ao íleo distal de cada animal foi mensurado com o auxílio de uma régua e isolado, estendido com a camada serosa em contato com o papel de filtro e aberto longitudinalmente pela borda anti-mesentérica e o conteúdo luminal removido suavemente. Em seguida, o tecido foi lavado com PBS (tampão fosfato salina) para remoção completa de fluidos. Subsequentemente, o tecido foi lavado uma vez com formol tamponado 10%, enrolado, e novamente fixado em formol tamponado 10% em período mínimo de 24 horas. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica. As imagens fotográficas foram realizadas em microscópio *Olympus BX51* acoplado à câmera digital por meio do programa *SPOT Advanced*. (TRINDADE et al., 2021)

4.7.1. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Cortes de 4 µm do íleo de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de *Harris* por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo, em seguida, corados por Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Por fim, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com 15 *Entellan (Merck)* e lamínulas de vidro. As lâminas microscópicas foram revisadas de forma cega por 2 patologistas treinados, Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas (Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG) e aluna de doutorado Fernanda Rezende do mesmo departamento, lesões da mucosa e muscular foram avaliadas de acordo com método proposto por (SOARES e colaboradores, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros avaliados para determinação dos escores histológicos na porção do íleo.

Escores	Achados microscópios
0	Achados histológicos normais.

1	<p>Mucosa: vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema.</p> <p>Muscular: normal.</p>
2	<p>Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema.</p> <p>Muscular: Normal.</p>
3	<p>Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema.</p> <p>Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrófilos.</p>

Fonte: SOARES e colaboradores, 2008

4.7.2. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas do íleo, foram obtidas fotografias em aumento de 20X para maior abrangência do órgão. Posteriormente foi realizada a análise da altura das vilosidades e profundidade das criptas.

4.7.2.1. Altura das vilosidades e profundidade das criptas

Para as análises morfométricas do íleo, foram obtidas 3 fotografias em aumento de 20X para maior abrangência do órgão e 10 medições por imagem. Posteriormente foi realizada a análise da altura das vilosidades e profundidade das criptas. O comprimento das vilosidades e das criptas foi mensurado da sua base ao seu ápice e os dados expressos em micrômetros utilizando programa *ImageJ* (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível on line no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Em seguida, os dados de vilosidades e criptas foram combinados para obtenção da razão vilosidade/cripta.

4.8. Avaliação de parâmetros imunológicos

4.8.1. Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Sumariamente, fragmentos do íleo dos

animais foram removidos e congelados a -80°C . Inicialmente, 20 mg de tecido foram homogeneizados em Buffer 1 gelado (proporção: 1,9mL/100mg de tecido) e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C , durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida foram adicionadas solução de NaCl 0,2%, e solução de NaCl 1,6% com glicose 5% (proporção: 1,5mL/100mg de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C , por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e ao precipitado foi adicionado Buffer 2, em temperatura ambiente (proporção: 1,9mL/100mg de tecido). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C , durante 10 minutos, e o sobrenadante foi reservado para o ensaio enzimático. Alíquota de 25 μL de amostra foi adicionada à placa de 96 poços. Foram adicionados às amostras 25 μL do substrato 3'3', 5'5' - tetrametilbenzidina (*SigmaAldrich*®), previamente diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C , por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 100 μL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço, e foi realizada nova incubação (37°C , por 50 cinco minutos). Foram adicionados 100 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 4M para interromper a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria (*Spectromax M3, Molecular Devices Inc., USA*) em comprimento de onda de 450nm. Os dados foram expressos em atividade de mPO/g de proteína do tecido.

4.8.2. Medida da atividade de peroxidase eosinófilica (EPO)

A atividade da enzima EPO, como quantidade relativa de eosinófilos no íleo, foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito por STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985. Foram pesados 20 mg de íleo e homogeneizados em PBS, em seguida, centrifugados a 10.000 rpm, a 4°C , durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao precipitado foi adicionada solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5%. Mais uma vez, as amostras foram homogeneizadas (*Ultraturrax IKA T10 basic*) e centrifugado a 10.000 rpm (*Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil*), a 4°C , por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi novamente suspenso com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HETAB) (*Sigma-Aldrich*®) 0,5% diluído em PBS. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas em água à temperatura ambiente,

alternadamente, o processo se repetiu por 3 vezes. Após essa etapa, foi feita nova centrifugação (10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, 75µL das amostras foram adicionados à placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 75µL do cromógeno o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) (*SigmaAldrich*®) diluídos em tampão Tris-HCl (*Sigma-Aldrich*®) a 0,075 mM, em pH 8,0, acrescidos de H₂O₂ a 6,6 mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria (*Spectromax M3, Molecular Devices Inc., USA*) em comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram expressos em atividade de EPO/g de proteína do tecido.

4.8.3. Dosagem de slgA

A determinação do nível de slgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA. Após a eutanásia dos animais, o fluido intestinal foi retirado, pesado, lavado e ressuspenso em PBS, pH 7,2, suplementado com inibidores de protease (1 µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 x rpm, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para análises posteriores. Para a determinação da slgA foi utilizado para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA (M-8769, *Sigma*) de camundongos desenvolvidos em cabra. Para a detecção da slgA foi utilizado anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, *Sigma*). A concentração de slgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, *Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA*). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (*Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA*) e a concentração de slgA dada em µg/g de fluido intestinal.

4.8.4. Dosagem de citocinas e proteínas de junções

Para dosagem das citocinas (TNFα, IL6, IL10, IL6, e IL1β), , do fator de transcrição NFκB, da quimiocina COX2 e das proteínas de junções Ocludina e Zônula Occludens 1 (ZO-1), foi utilizado o método de análise da expressão gênica por Real Time PCR descrito por (LEOCÁDIO et al., 2015). O RNA total foi extraído das amostras de íleo com aproximadamente 50mg de tecido, adicionando 500µL do

reagente Trizol® (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), seguida de 200µL de clorofórmio. Os tubos foram então agitados vigorosamente por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados a 13.000rpm, 4°C (15 minutos). A fase superior foi transferida para outro tubo contendo 250µL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Os tubos foram então incubados por 90 minutos a -80°C, para precipitação do RNA. As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado lavado com 500µL de etanol 75%. Após centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi seco em temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Depois de seco, o pellet foi ressuspenso em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Espectrofotômetro foi utilizado para determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA (por meio da razão 260/280) (*Spectrophotometer ND-1000*).

Para a síntese do cDNA, utilizou-se 1 µg do RNA total diluído em 5µL de água livre de RNase e DNase. Adicionou-se 0,5µL de Oligo(dT) primer (50 µM) e 1,25µL de água. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados em termociclador a 72°C por 5 minutos (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems*). Em seguida, 3,25µL do mix contendo 0,5µL de M-MLV RT (200 U), 2µL de tampão M-MLV 5x, 0,5µL de dNTP Mix (10 mM), 0,1µL de RNAsin (40.000 U/mL) e 0,25µL de água foram adicionados. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42°C por três horas e, em seguida, 72°C por 15 minutos.

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de Real Time PCR, utilizando primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL foram adicionados à 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para a técnica. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de iTaq *Universal SYBR® Green Supermix* (BIO-RAD #1725121 e CELLCO MB-PCK100M). A análise foi feita em máquina específica (*ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System*) e analisados o programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle (2- $\Delta\Delta$ CT). Primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados na análise de expressão gênica por Real Time PCR.

ene	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
ZO1	CCAGCTTATGAAAGGGT TGTC	TCCTCTCTTGCCAACTT TTCTC
cludina	ATGTCCGGCCGATGCTC TC	TTTGGCTGCTCTTGGGT CTGTAT
APDH	ACGGCCGCATCTTCTTG TGCA	CGCCCAAATCCGTCCA CACCGA
NF α	GAGATAGCAAATCGGCT G	CGTCGTAGCAAACCAC CAAG
L10	GGTTGCCAAGCCTTATC GGA	ACCTGCTCCACTGCCTT GCT
L-6	CACGATTTCCCAGAGAA CATGTG	ACAACCACGGCCTTCC CTACTT
OX 2	GAAGTCTTTGGTCTGGT GCCT	GCTCCTGCTTGAGTATG TCG
FkB	GTGGAGGCATGTTCGGT AGTG	TCTTGGCACAATCTTTA GGGC

4.9. Análise de estresse oxidativo no óleo

A análise foi feita conforme método descrito por (LEONEL e colaboradores, 2013). Para avaliação do estresse oxidativo, foram retirados aproximadamente 50 mg do óleo e homogeneizados com 1mL de PBS 1x gelado e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado para as análises de superóxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentração de hidroperóxidos.

4.9.1.1. Atividade de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da SOD é baseada na sua habilidade em reagir com o ânion superóxido (O_2^-) e reduzi-lo a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água.

As amostras de óleo foram homogeneizadas em PBS 1x, 6 μ L brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolio e 15 μ L do pirogallol. No branco, o pirogallol foi substituído por PBS 1x, e no padrão a amostra foi substituída por PBS 1x. Incubou-se as amostras por 5 minutos a 37°C e para parar a reação adicionou-se 150 μ L de DMSO. A

absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570nm (*SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA*) (LEONEL e colaboradores, 2013; LOWRY e colaboradores, 1951) A reação pode ser determinada espectrofotometricamente por absorbância a 570 nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão.

4.9.1.2. Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas. Dessa forma, são geralmente mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O principal produto é o malonaldeído (MDA). Com a formação do MDA, pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é possível determinar o grau de peroxidação lipídica, uma vez que o TBARS reage com o MDA, formando uma molécula capaz de ser detectada espectrofotometricamente (LEONEL et al., 2013).

A análise da medida dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico contemplou a adição de 500µL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N) aos sobrenadantes dos fragmentos de íleo (250µL). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos, colocadas em água corrente até esfriarem e em seguida adicionados 750µL de álcool butílico. Para finalizar as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e adicionados à placa de 96 poços 200µL do sobrenadante, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm (LOWRY e colaboradores, 1951).

4.9.1.3. Avaliação da concentração de hidroperóxidos

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol laranja consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). Utiliza-se o indicador xilenol laranja, uma vez que este se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, detectado espectrofotometricamente (LEONEL e

colaboradores, 2013). Para as dosagens de hidroperóxidos foram acrescentados 180µL do reagente FOX-2 aos sobrenadantes de íleo (20µL), diretamente na microplaca, em duplicata. Para o branco foi utilizado água deionizada no lugar do sobrenadante. Em seguida as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com 15µL de solução de trifenilfostina (TPP) em metanol (TPP a 10mM). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, foram acrescentados às amostras 180µL do reagente FOX-2 e mantidas novamente à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (LEOCÁDIO e colaboradores, 2015b; LEONEL e colaboradores, 2013).

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos, $4,3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$, e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azularroxado produzido pelo xilenol orange, ao se ligar aos íons férricos, $1,5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$. A quantificação dos hidroperóxidos da amostra foi alcançada pela subtração das dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína de cada fragmento (LOWRY et al., 1951).

4.10. Análises estatísticas

4.10.1. Cálculo amostral

Foi realizado cálculo amostral considerando um poder de teste de 90%, nível de significância de 0,05, desvio máximo de 0,3 (30%) e uma diferença esperada entre grupos de 50%, encontrou-se que o tamanho da amostra seria de 9 animais por grupo.

4.10.2. Testes estatísticos

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 8.02 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os resultados foram avaliados pelo teste de normalidade *Shapiro Wilk*, dados normais, foram apresentados em média e erro padrão da média e

comparados pelo teste paramétrico de Análise da Variância – ANOVA (*one-way*) com pós-teste de *Tukey*. Já os dados não normais, foram apresentados em mediana e intervalo interquartil e comparados com o teste não-paramétrico de *Kruskal Wallis* com pós-teste de *Dunn*. A significância estatística foi dada por $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Variação ponderal e consumo alimentar

Após 72 horas da administração do 5-FU, os animais do grupo MUC tiveram redução significativa do peso quando comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 6 A). O tratamento com vitamina C isolada e associada com arginina não foram capazes de minimizar a perda de peso dos animais. Adicionalmente, não foi observada alteração do consumo dos animais do grupo MUC comparado com os grupos MUC+VIT e MUC+ARG+VIT ($p > 0,05$) (Figura 6 B). Como esperado, o grupo CTL não apresentou perda de peso e diminuição do consumo alimentar (Figura 6 A e B).

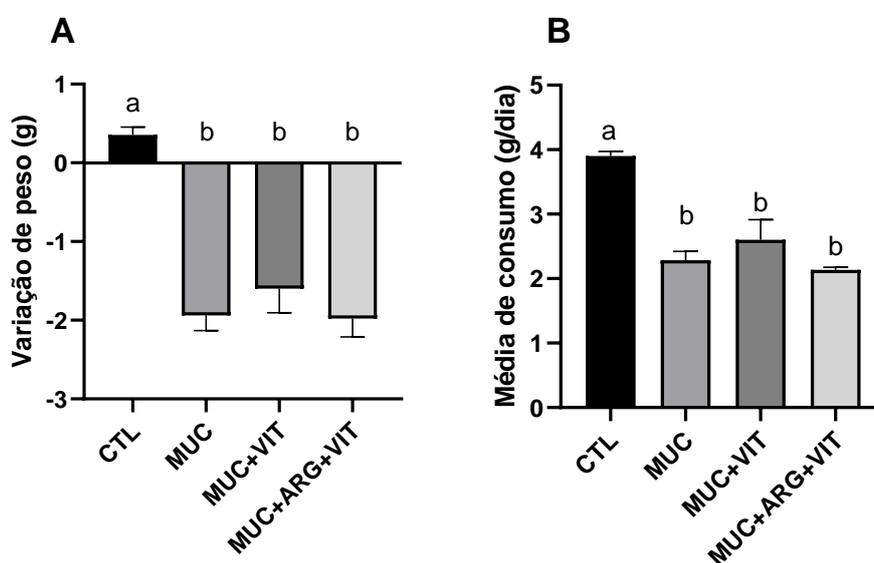


Figura 6. Variação ponderal (A) e consumo alimentar (B) 72 horas após a administração de 5-FU.

Dados expressos em média \pm SEM ($n=10$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.2. Permeabilidade Intestinal

O grupo MUC apresentou maior PI quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 7). Os grupos suplementados tanto com vitamina C isolada, quanto associada com arginina foram capazes de manter a permeabilidade intestinal em níveis fisiológicos, uma vez que apresentaram valores de PI semelhante ao CTL ($p > 0,05$).

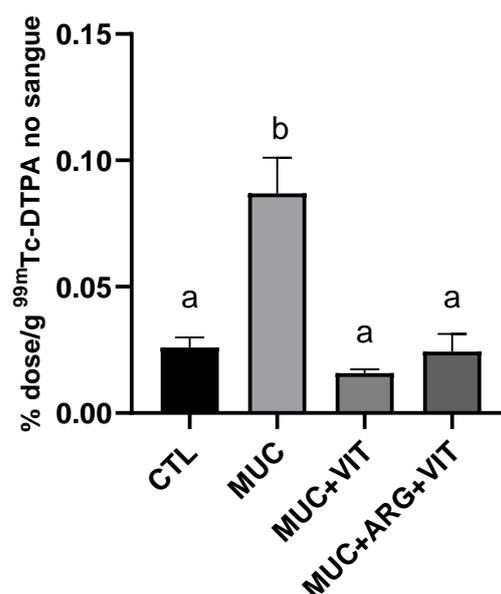


Figura 7. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite. Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.3. Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas *tight junctions* – ZO-1 e Ocludina

A administração do quimioterápico não alterou a expressão da junção ZO-1 em nenhum dos grupos analisados ($p > 0,05$) (Figura 8 A). Já, a expressão de ocludina diminuiu em todos os grupos com mucosite quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). As suplementações tanto com a vitamina C isolada quanto associada com arginina não foi capaz de reverter a diminuição observada ($p > 0,05$) (Figura 8 B).

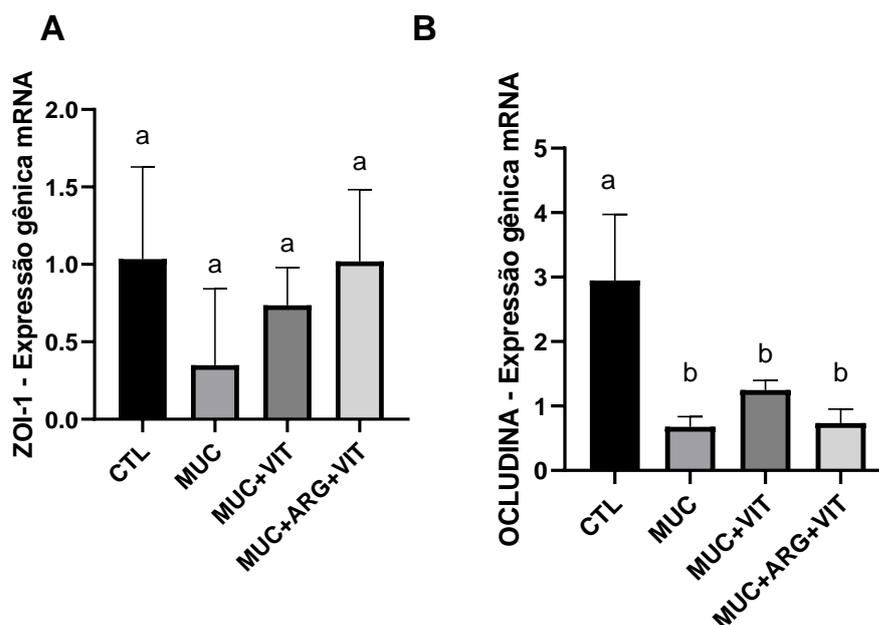


Figura 8. Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas *tight junctions* – ZO-1 e Occludina - 72 horas após a indução da mucosite.

ZOI-1 = Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. OCLUDINA = Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* ou *Kruskal wallis* e *Pós-teste de Tukey* ou *Dunn*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.4. Análises histológicas

A figura 9 mostra as imagens histológicas do íleo dos diferentes grupos. Foram observados encurtamento das vilosidades, intensa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, células achatadas e vacuoladas e perda da arquitetura tecidual no grupo MUC (Figura 9 B). Os animais dos grupos CTL e MUC+VIT apresentaram aspectos histológicos normais na mucosa intestinal (Figura 9 A e C). No entanto, os camundongos com mucosite suplementados com a associação de arginina e vitamina C apresentaram apenas melhora parcial na integridade da mucosa devido à menor encurtamento das vilosidades e diminuição do infiltrado inflamatório em comparação aos animais do grupo MUC (Figura 9 D).

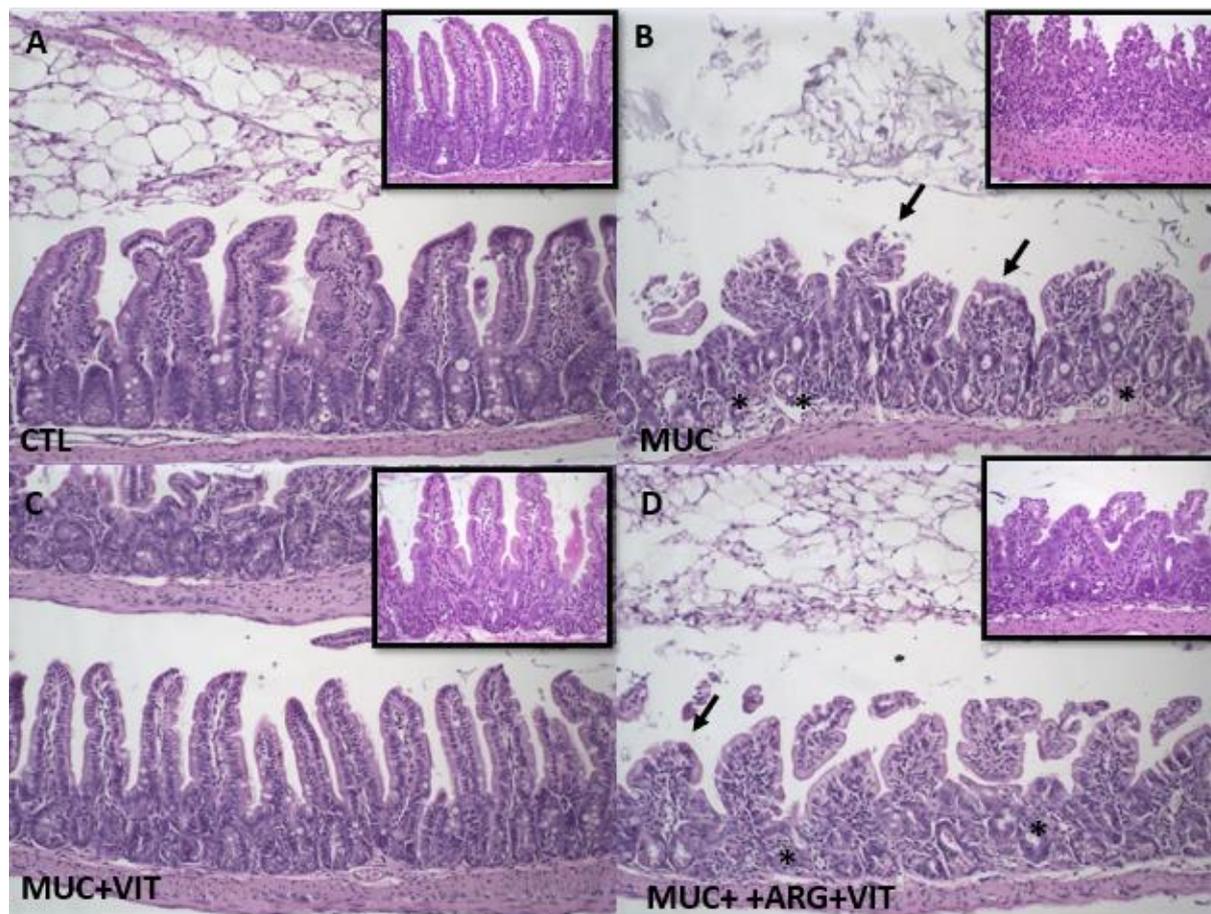


Figura 9. Análise histológica do íleo aumento de 20X e 40X.

Aspectos normais para os grupos CTL (A) e MUC+VIT(C). Vilosidades encurtadas (setas), infiltração de células inflamatórias (asteriscos) estão presentes no grupo MUC (B) e também no grupo MUC+ARG+VIT (D). Preservação parcial das vilosidades é observada no grupo MUC+ARG+VIT (D). Coloração HE, aumento 20x. CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

O escore histológico foi realizado de acordo com o sistema de escores (SOARES et al., 2008)(Tabela 1). Na figura 10 observa-se que o grupo CTL apresentou escore histológico 0, indicando achados morfológicos normais como esperado. Já, o grupo MUC apresentou escore mais elevado comparado ao CTL, o que corresponde a vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema ($p < 0,05$). A suplementação com vitamina C reduziu o escore histológico dos animais, mantendo valores próximos ao CTL ($p > 0,05$). O grupo suplementado com a associação de vitamina C e arginina manteve o escore intermediário entre o grupo CTL e MUC ($p > 0,05$).

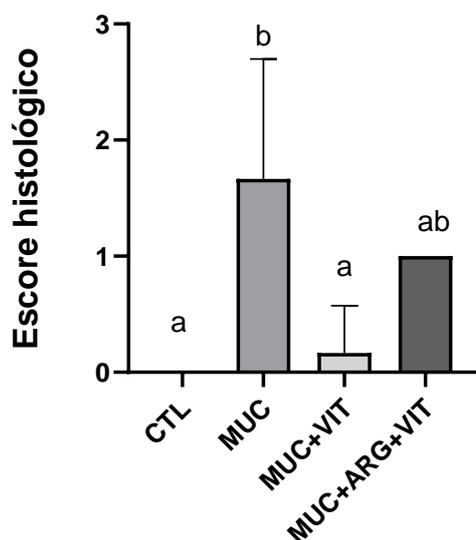
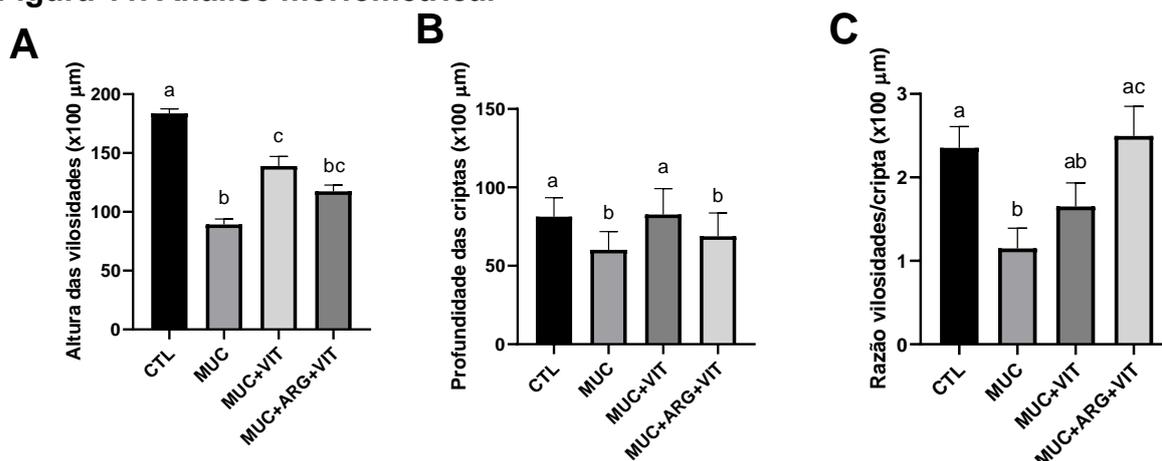


Figura 10. Escore histológico.

CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C. Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*).

Na análise morfométrica do grupo MUC em relação ao grupo CTL observou-se redução significativa em todos os parâmetros analisados (Figura 11 A, B e C) ($p < 0,05$). O grupo MUC+VIT apresentou manutenção das vilosidades e criptas em relação aos grupos MUC e MUC+ARG+VIT ($p < 0,05$) (Figura 11 A, B). Ambos os tratamentos foram capazes de preservar parcial (MUC+VIT) e total (MUC+ARG+VIT) a razão vilosidades/criptas em comparação ao grupo MUC ($p < 0,05$) (Figura 11 C).

Figura 11. Análise morfométrica.



Altura das vilosidades (A), Profundidade das criptas (B), dados expressos em média \pm SEM e Razão Vilosidades/ Criptas (C), dados expressos em mediana IC 95% (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*; *Kruskal Wallis* e *pós-teste de Dunn*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

Ao avaliar o comprimento do intestino delgado, observou-se que 72 após horas após da administração do quimioterápico, o intestino delgado dos animais dos grupos MUC, MUC+VIT e MUC+ARG+VIT reduziram o comprimento em comparação ao CTL ($p < 0,05$) (Figura 12).

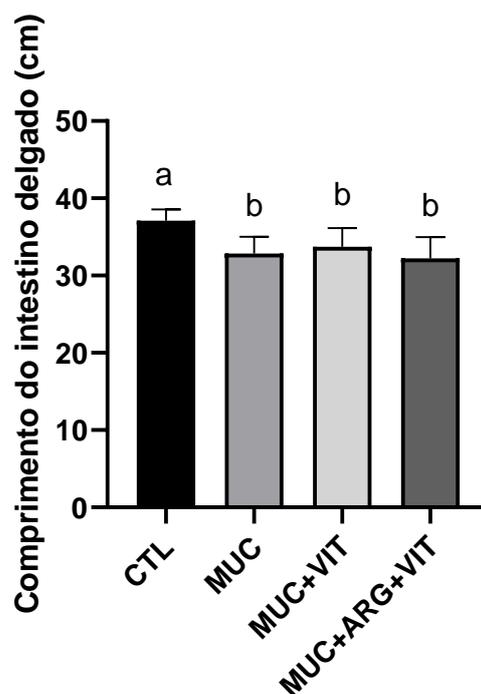


Figura 12. Comprimento do intestino delgado.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.5. Avaliação do infiltrado inflamatório

A Figura 13 A mostra o aumento da atividade de MPO no grupo MUC comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os animais do grupo MUC+VIT mostraram valores intermediários para MPO. A associação de vitamina C e arginina não preveniu o aumento da atividade da enzima MPO ($p < 0,05$) (figura 13 A). Adicionalmente, foram observadas aumento da atividade da enzima EPO nos grupos MUC e MUC+ARG+VIT em relação ao CTL ($p < 0,05$) (Figura 13 B). Contudo, apenas a suplementação com vitamina C teve efeito parcial na redução na atividade de MPO e EPO, com possível diminuição da infiltração dose neutrófilos e eosinófilos nos animais com mucosite ($p < 0,05$) (Figura 13 A e B).

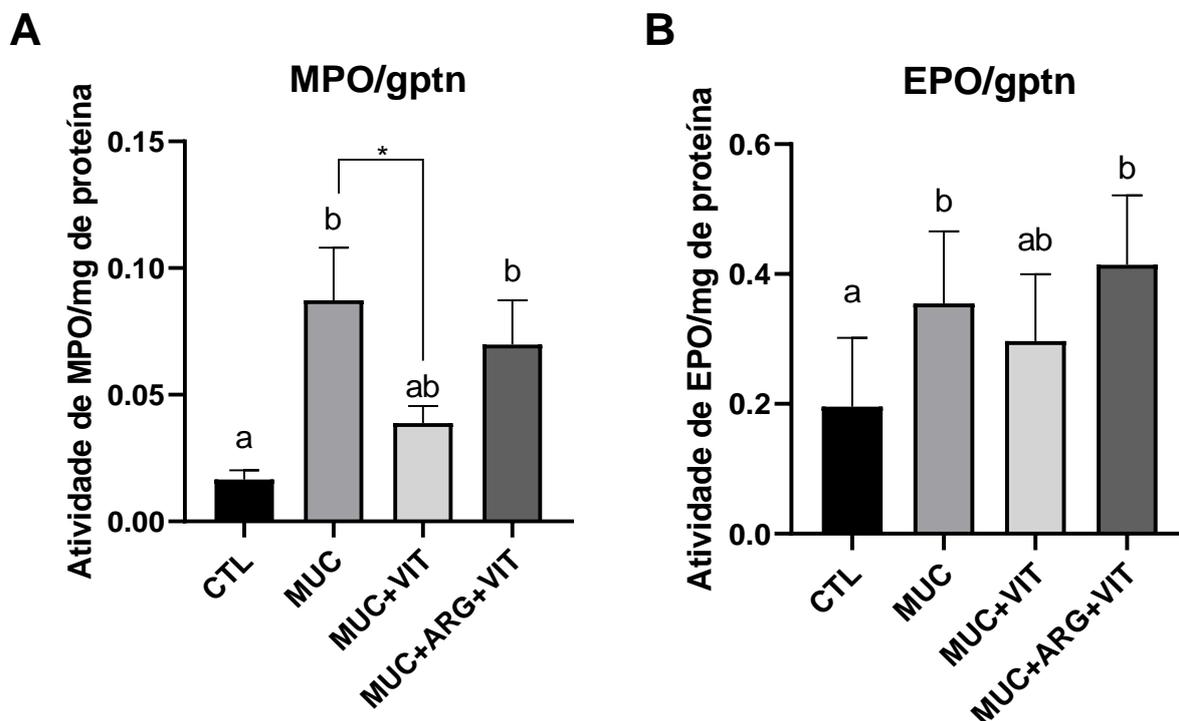


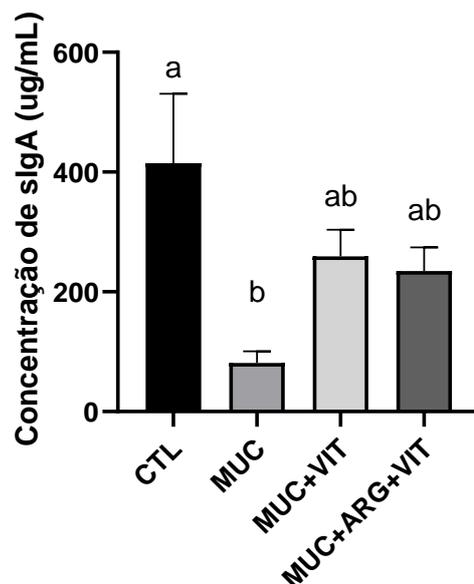
Figura 13. Infiltrado inflamatório no íleo.

(A) Infiltrado de neutrófilos (MPO) e (B) Infiltrado de esonófilos (EPO). Dados expressos em média \pm SEM de atividade das enzimas por absorvância (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey*) * ($p < 0,05$) - Test-t independente. CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.6. Avaliação de sIgA intestinal

A mucosite intestinal reduziu significativamente a concentração de sIgA nos animais do grupo MUC, comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$) (Figura 14). No entanto, observou-se que a suplementação com ambos os tratamentos preveniu parcialmente a redução na concentração de sIgA em relação ao MUC ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14. Concentração de sIgA intestinal.



Dados expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *pós-teste de Tukey*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.7. Expressão gênica de citocinas e quimiocinas por Real Time PCR

A figura 15 demonstra os resultados da expressão gênica das citocinas e quimiocinas intestinais 72 horas após a administração do agente quimioterápico (5-FU). A expressão gênica de NF κ B, TNF α e COX2 foi significativamente maior no grupo MUC em relação ao CTL ($p < 0,05$) (Figura 15 A, B e C). O grupo MUC+VIT apresentou expressão gênica semelhante ao CTL ($p > 0,05$) (Figura 15 A, B e C). Entretanto, o grupo MUC+ARG+VIT apresentou expressão de TNF α e COX2 semelhante ao grupo MUC ($p > 0,05$) (Figura 15 B e C). Adicionalmente, a expressão das citocinas IL1 β , IL10 e IL6 não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 15 D, E e F)

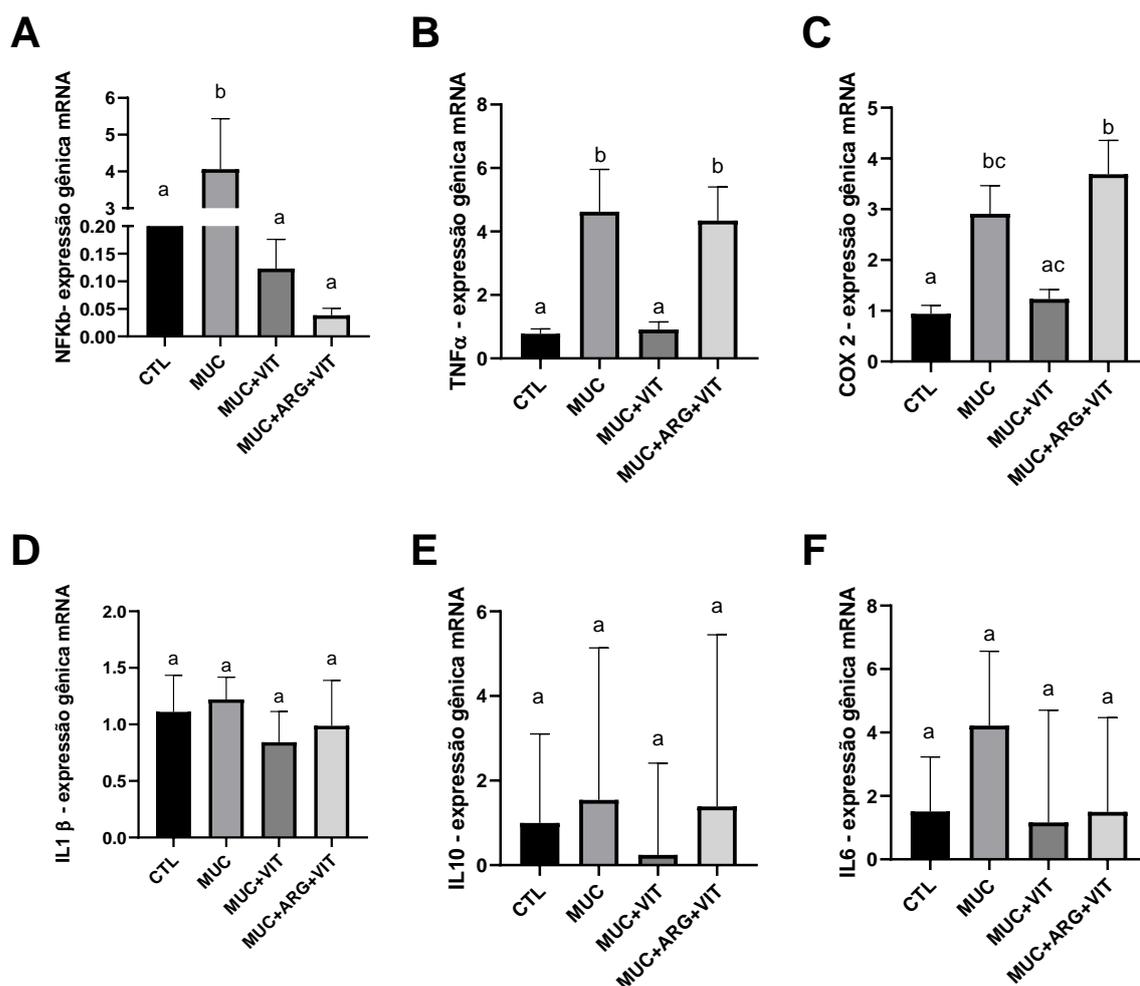


Figura 15. Expressão gênica mRNA de NFkB, TNF α , COX 2, IL1 β , IL-10 e IL-6.

(A) Concentração de NFkB, (B) TNF α , (C) COX2, (D) IL1 β , (E) IL10 e (F) IL6. Dados expressos em média \pm SEM (A, B, C e D) em mediana e IC95% (E e F) (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ($p < 0,05$; *one-way ANOVA* e *Pós-teste de Tukey ou Kruskal Wallis* e *pós-teste de Dunn*). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT = Mucosite + associação de arginina e vitamina C.

5.8. Estresse oxidativo

A atividade da enzima SOD e a peroxidação lipídica (técnica de TBARS) estavam alteradas 72 horas após da administração do quimioterápico no grupo MUC, comparado com o CTL ($p < 0,05$) (Figura 16 A e B). Entretanto, quando comparado os tratamentos com o grupo MUC, a atividade da enzima SOD não foi alterada (Figura 16 A). Já, a peroxidação lipídica dos grupos MUC+VIT e MUC+ARG+VIT manteve-se em níveis basais semelhante ao CTL ($p > 0,05$) (Figura 16 B). Quanto a formação de

hidroperóxidos, não foram observadas nenhuma diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 16 C).

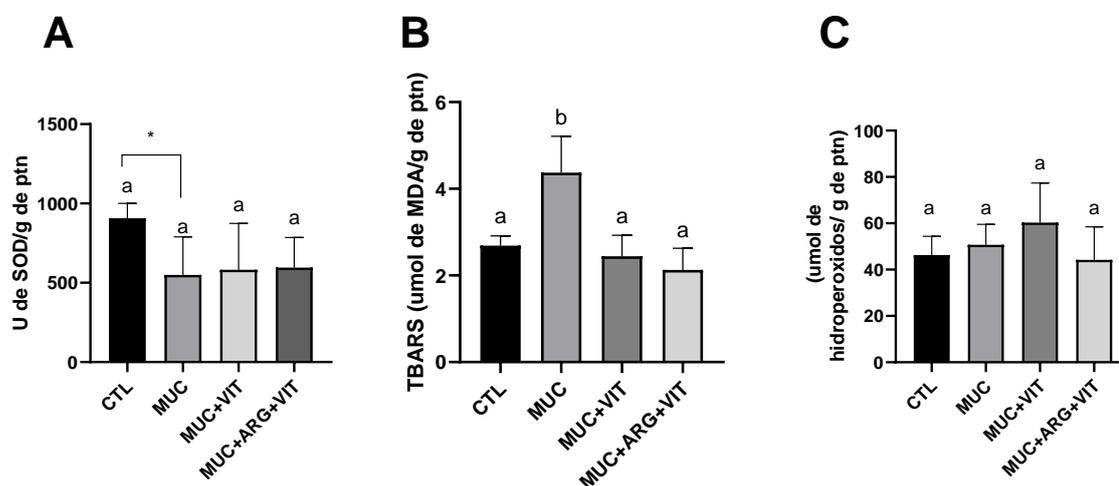


Figura 16. Atividade das enzimas SOD, TBARS e hidroperóxido no íleo 72h após de administração de 5-fu em camundongos.

(A) Atividade de superóxido dismutase (SOD) (B) Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C) Concentração de hidroperóxidos. Dados expressos em média \pm SEM (A, B, C e D) em mediana e IC95% (E e F) ($n=8$). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ($p<0,05$; one-way ANOVA e Pós-teste de Tukey ou Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC+VIT = Mucosite + vitamina C; MUC+ARG+VIT= Mucosite + arginina + vitamina C.

6 DISCUSSÃO

A utilização de terapias antineoplásicas, especialmente as terapias neoadjuvantes com quimio e radioterapia, têm contribuído para o tratamento e sobrevivência dos pacientes oncológicos (CRONIN et al., 2018). No entanto, induzem apoptose celular, aumento da resposta inflamatória e, conseqüentemente, mucosite oral e intestinal. Essas alterações, por sua vez, culminam na ativação do sistema imunológico, lesões ulcerativas com aumento da PI e do estresse oxidativo, favorecendo ao aumento de infiltrado inflamatório e infecções oportunistas (SOUGIANNIS et al., 2021). Nesse contexto, justifica-se a busca por terapias alternativas que possam minimizar estes efeitos, dentre elas, o uso de imunomoduladores.

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa (BARROS et al., 2016; GENEROSO et al., 2011; TRINDADE et al., 2018, 2021) têm demonstrado benefícios da utilização isolada de imunomoduladores na mucosite intestinal. Mais recente, trabalho

conduzido por ANDRADE e colaboradores, (2023) mostrou que a suplementação de L-arginina associada aos frutooligossacarídeos, antes e após a indução da mucosite, foi capaz de conferir benefícios a barreira intestinal, minimizando os danos causados pela quimioterapia e modulando a microbiota intestinal (ANDRADE et al., 2023). Esses resultados abrem perspectivas para a avaliação da suplementação de outros imunonutrientes associados, afim de potencializar os efeitos benéficos observados com o uso desses nutrientes isolados.

Sabe-se que um dos principais sintomas da mucosite intestinal que pode comprometer o tratamento é a anorexia e, conseqüentemente a redução do peso, levando a piora do estado nutricional e da qualidade de vida dos pacientes, comprometendo o tratamento (ALA et al., 2016). Corroborando, nossos resultados mostraram que 72 horas após a indução da mucosite, os animais apresentaram significativa perda de peso e redução do consumo alimentar comparado ao grupo CTL. Essas alterações podem ser justificadas pelo processo inflamatório agudo e presença de lesões teciduais no TGI característicos na mucosite (CINAUSERO et al., 2017; GIBSON et al., 2013; KEEFE et al., 2007). Essas lesões alteram a barreira intestinal levando a diminuição das vilosidades, das criptas e da capacidade de absorção dos nutrientes(SOUGIANNIS et al., 2021).

É importante ressaltar que o epitélio intestinal é um dos tecidos mais proliferativos, tornando alvo para drogas como o 5-FU, que interrompe a síntese de DNA levando a morte celular (SONIS, 2004; SOUGIANNIS et al., 2019). Neste estudo, ao avaliar a permeabilidade intestinal dos animais no 10º dia de tratamento, observou-se que o grupo MUC apresentou aumento significativo da PI em relação ao grupo controle. Entretanto, foi observado que os tratamentos com vitamina C isolada e associada a arginina preveniram o aumento da PI quando comparado ao grupo MUC.

A análise da PI foi baseada na utilização do DTPA radiomarcado com ^{99m}Tc. Em condições fisiológicas normais, a macromolécula ^{99m}Tc-DTPA passa do lúmen intestinal, em quantidades mínimas, para a corrente sanguínea. Todavia, na ocorrência de lesões ou rupturas do epitélio intestinal e/ou afrouxamento das junções, com conseqüente aumento da PI, o fármaco radiomarcado permeia pelo espaçamento das *tight junctions* e pode ser identificado no sangue, em quantidades maiores, por meio da determinação da radiação gama emitida pelo isótopo radioativo tecnécio-99m (GENEROSO et al., 2011). ANDRADE e colaboradores (2023) observaram que a utilização tanto de FOS ou arginina isolados, bem como o uso associado também foi

capaz de prevenir o aumento da PI no mesmo modelo experimental. LEOCÁDIO e colaboradores 2015 também observaram efeitos positivos do uso de L-arginina na PI, bem como nos parâmetros histopatológicos. Para o melhor do nosso conhecimento não existem relatos na literatura de trabalhos que avaliaram a suplementação de vitamina C em relação à PI. Entretanto, em estudo experimental utilizando modelo de mucosite oral induzida por ciclofosfamida em ratos, foi observado que 12mg/kg/dia de ácido ascórbico diminuiu a gravidade da mucosite devido ao aumento significativo da espessura do epitélio, diminuição significativa na pontuação de danos e aumento significativo na expressão imune de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (AL-REFAI, 2017), o que corrobora para o efeito protetor da vitamina C em mucosa injuriada por quimioterápico, o que de certa forma poderia justificar a redução da PI observada neste trabalho.

Os resultados da PI corroboram com os achados histológicos do trabalho. O grupo MUC apresentou destruição da arquitetura intestinal, aumento de infiltrado inflamatório e encurtamento das vilosidades e criptas, além de diminuição no comprimento do intestino. Em contrapartida, o grupo suplementado com vitamina C de forma isolada apresentou resultados melhores em comparação a associação de imunomoduladores. Diferente dos nossos achados, ANDRADE e colaboradores (2023) observaram sinergismo entre o uso de FOS e ARG para melhora destes parâmetros.

Em concordância com a análise de PI, a morfometria do íleo demonstrou que os tratamentos melhoram total e parcialmente a arquitetura intestinal e a razão vilosidade/cripta em comparação ao MUC. Curiosamente, o grupo MUC+VIT, nas análises histológicas, apresentou efeitos benéficos superiores do que a associação de imunonutrientes, uma vez que o grupo MUC+ARG+VIT melhorou apenas a razão vilosidade/cripta e apresentou pior escore histológico em relação ao MUC+VIT. Semelhantemente ao encontrado no presente estudo, BEUTHEU e colaboradores, (2014) ao associar arginina com glutamina, no tratamento de mucosite intestinal induzida por metotrexato, não observaram resultados positivos para as análises histológicas. O grupo associado não preveniu os danos causados à arquitetura intestinal, além de não ter prevenido o aumento da PI.

Um possível mecanismo de ação para melhores resultados encontrados no grupo MUC+VIT, seria a atuação da vitamina C nos processos de cicatrização e produção de colágeno (CARR; MAGGINI, 2017). Estudos em animais usando o

camundongo nocaute Gulo, dependente de vitamina C, indicaram que a deficiência dessa vitamina não afetou a formação de colágeno na pele de camundongos não desafiados (MOHAMMED et al., 2016; PARSONS et al., 2006). No entanto, após o ferimento incisional de espessura total, houve diminuição significativa da formação de colágeno em camundongos com deficiência de vitamina C (MOHAMMED et al., 2016; PARSONS et al., 2006). Assim, a vitamina C parece ser particularmente essencial durante a cicatrização de feridas, diminuindo também a expressão de mediadores pró-inflamatórios e aumentando a expressão de vários mediadores de cicatrização (MOHAMMED et al., 2016; PARSONS et al., 2006). Esses eventos favorecem a recuperação do epitélio intestinal levando a melhores resultados histológicos. Entretanto, sabe-se que os mecanismos de ação da arginina também compreendem a síntese de colágeno por meio da produção de poliaminas, resultando em aumento de prolina (LEOCÁDIO et al., 2015b). Entretanto, conforme proposto por BEUTHEU e colaboradores, (2014) a associação de L-arginina a outros nutrientes, pode interferir na resposta a ser desencadeada, uma vez que a resposta gerada por este aminoácido é dependente da dose e das condições fisiopatológicas. Além disso, como o mecanismo de desenvolvimento da mucosite aumenta iNOS, pressupõe-se que a via do óxido nítrico esteja mais expressa e ativada do que outras vias, o que pode contribuir para os efeitos menos favoráveis observados na associação de arginina com outras moléculas (BEUTHEU et al., 2014; CALVANI et al., 2023).

Paralelamente a isso, afim de explorar mais os mecanismos de ação dos tratamentos, avaliamos a produção de IgA do tipo secretória. Observamos que a mucosite levou à diminuição de sIgA em comparação ao CTL. No presente trabalho, ambos os tratamentos avaliados foram capazes de estimular o aumento de sIgA. A invasão de microrganismos patogênicos no lúmen intestinal, principalmente, na fase ulcerativa da mucosite (BOWEN et al., 2019; SONIS, 2004; SOUGIANNIS et al., 2021) estimula o reconhecimento por meio dos peptídeos antimicrobianos e células apresentadoras de antígenos. Esse processo culmina na produção de sIgA, dependente de linfócitos B que por sua vez é liberada no intestino com o propósito de neutralização do patógeno invasor. Adicionalmente, ocorre ativação da proteína de resposta primária de diferenciação mieloide (MYD88) e do NF- κ B, essenciais na resposta imunológica da mucosite (BOWEN et al., 2019). Dessa forma, a manutenção das concentrações de sIgA favorece a reconstrução de uma das barreiras de defesa do intestino e contribui para a diminuição da PI.

Outro importante componente da barreira intestinal são as junções firmes (FASANO, 2020). Entretanto, no presente trabalho, não foi observado alterações na expressão de ZO-1 e ocludina nos tratamentos avaliados. Um possível mecanismo postulado, seria a manutenção da arquitetura intestinal estar associada ao aumento da slgA, agindo de forma compensatória com a PI. Uma vez que a slgA coopera com uma variedade de mecanismos de proteção (SUTHERLAND; FAGARASAN, 2012) impedindo a absorção de uma vasta quantidade de antígenos e prevenindo uma sobrecarga ao sistema imunológico, o que pode contribuir com a seletividade na barreira intestinal evitando o comprometimento da PI (MARTENS; NEUMANN; DESAI, 2018; SUTHERLAND; FAGARASAN, 2012).

Durante a fase de amplificação dos sinais na mucosite, observa-se intenso infiltrado inflamatório e ativação de cascatas inflamatórias que intensificam a resposta ao dano inicial (SOUGIANNIS et al., 2021). Ao avaliar a atividade das enzimas MPO e EPO, observamos aumento da atividade de ambas as enzimas no grupo MUC e MUC+ARG+VIT. É sabido que o aumento de infiltrado inflamatório está associado ao recrutamento de células imunológicas, incluindo neutrófilos e eosinófilos, para o local da lesão a fim de recuperar a área lesada (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985). Neutrófilos são as primeiras células efetoras recrutadas para o local da inflamação, onde internalizam, matam e digerem bactérias e fungos. Os neutrófilos também liberam grânulos em resposta a inflamação, dentre estes a mieloperoxidase (MPO) que tem sua atividade aumentada nas primeiras horas após administração de 5-FU (CRUVINEL et al., 2010; VINOLO et al., 2011). No presente estudo, observou-se maior infiltrado de neutrófilos no íleo dos animais do grupo MUC comparado ao controle, como demonstrado por MIRANDA et al., 2019 em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Da mesma forma dos neutrófilos, os eosinófilos desempenham papel fundamental na inflamação, induzindo a produção e liberação de grânulos, em sua maioria proteínas e a peroxidase de eosinófilos (EPO), que tem grande potencial citotóxico em parasitas (CRUVINEL et al., 2010). A EPO é bastante empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos e seu aumento foi relatado em modelo de mucosite intestinal após administração de 5-FU por (DE BARROS et al., 2018; LEOCÁDIO et al., 2015).

Os resultados obtidos mostraram que apenas o tratamento com vitamina C foi capaz de prevenir o aumento da atividade dessas enzimas. Durante a fase de ulceração da mucosite, têm-se aumento do processo inflamatório, morte celular e principalmente, aumento de infecções oportunistas, processos inflamatórios e infecciosos favorecem o aumento de infiltrado inflamatório (BOWEN et al., 2019; SONIS, 2004; SOUGIANNIS et al., 2021). A vitamina C apresenta efeito bactericida no intestino e capacidade anti-inflamatória, o que impede o aparecimento de infecções e ainda diminui o recrutamento de células inflamatórias (CARR; MAGGINI, 2017). Em oposição a isso, uma das vias de ação da arginina é por aumento de óxido nítrico, aumento de vascularização sanguínea, contribuindo para o aumento do processo inflamatório (BEUTHEU et al., 2014; CHATTERJEE et al., 2006). Esse evento, já foi descrito como dose dependente, quando, pode ser benéfico para o organismo, bem como pode ser deletério (ANDRADE et al., 2015; LEOCÁDIO et al., 2015) isso poderia justificar a falta de sinergismo entre a vitamina C e arginina.

A secreção de citocinas intestinais também é essencial para a homeostase do hospedeiro. No entanto, lesões do epitélio, bem como alterações na barreira intestinal podem induzir o desequilíbrio da resposta imunológica (SOUGIANNIS et al., 2021). No presente estudo, a expressão gênica de NFκB, TNF e COX2 foi significativamente maior no grupo MUC em relação ao CTL, após 72 horas de indução da mucosite. No entanto, ao avaliar a expressão das citocinas IL1β, IL10 e IL6 não foram observadas diferenças entre os grupos. Além disso, observou-se aumento na peroxidação lipídica (TBARS) no grupo MUC e redução de SOD, enzima associada à processos antioxidantes.

Na fase 3 da mucosite (SONIS, 2004), a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação do NF-κB resulta em uma regulação positiva de aproximadamente 200 mensageiros, principalmente TNFα, IL6 e IL1β, bem como COX2. Além disso, a ativação de receptores do tipo *toll* por bactérias gram negativas intestinais leva à regulação positiva de NF-κB por meio de múltiplas vias de sinalização, agravando ainda mais a resposta inflamatória por meio da geração e amplificação de citocinas inflamatórias (SOUGIANNIS et al., 2021). Logo, a eficácia dos tratamentos se daria por melhora destas vias inflamatórias. Os animais tratados com vitamina C reduziram a expressão de TNFα, NFκB e de COX2, já o grupo que recebeu a associação dos tratamentos, apenas a expressão de NFκB foi reduzida. MOHAMMED e colaboradores (2016), demonstrou que a vitamina C

atenua tanto a geração de ROS quanto a ativação de NF κ B em células dendríticas *in vitro*. Assim, a vitamina C poderia modular a função imunológica através da modulação de vias de sinalização celular sensíveis a alterações no potencial redox ou protegendo diretamente importantes componentes estruturais celulares. Por exemplo, a exposição de neutrófilos a oxidantes pode inibir a motilidade das células, o que se acredita ser devido à oxidação dos lipídios da membrana (CARR; MAGGINI, 2017).

Durante condições inflamatórias a enzima óxido nítrico sintase exibe um importante papel imunorregulador, envolvendo vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (ENKHBAATAR et al., 2009; GOCAN; SCOTT; TYML, 2000; TAN et al., 2016). Como parte da via pró-inflamatória, sugere-se que a produção de NO induzida por NOS1 atue como um radical livre e seja propensa a ser convertida em espécies de nitrogênio mais reativas (ENKHBAATAR et al., 2009). Esse processo, leva ainda a uma alteração nas ligações de dimetilarginina assimétrico (ADMA), favorecendo o desenvolvimento inflamatório por ativação de TNF α (ENKHBAATAR et al., 2009). Em contrapartida, o uso de vitamina C em condições inflamatórias pode prevenir aumento de TNF α na molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (BECK et al., 2004; QU et al., 2005). Esses achados, confirmam os dados encontrados, uma vez que os nutrientes do estudo não conseguem apresentar sinergismo, por antagonismo de ações e parecem apresentar o mesmo mecanismo de ação de forma isolada (BEUTHEU et al., 2014; CALVANI et al., 2023).

Um estudo que avaliou os efeitos de outros aminoácidos (cistina e teanina - CT) nos danos causados por 5-FU, observou que os dois aminoácidos que compõem a glutathiona, promoveu a síntese de GSH e normalizou o balanço redox. Como resultado, a administração de CT suprimiu a mucosite e aliviou os sintomas de diarreia (YONEDA; NISHIKAWA; KURIHARA, 2021). ANDRADE e colaboradores (2023) também encontraram sinergismo entre a associação de FOS e ARG ao analisar o estresse oxidativo, observaram que as enzimas SOD foi aumentada e TBARS reduzida.

Já, no uso de vitamina C isolada, não observamos diferenças entre os grupos para SOD e hidroperóxidos. Um estudo clínico, com objetivo de verificar os efeitos da vitamina C por meio de suplemento alimentar em dieta rica em ácido ascórbico no estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, não observou nenhuma mudança nos valores plasmáticos de TBARS, hidroperóxido lipídico e creatina quinase após as diferentes formas de consumo de vitamina C, corroborando para os

achados atuais. Porém a técnica de análise do estresse oxidativo é muito variável e as divergências entre os estudos sobre estresse são, provavelmente, devidas às diferenças metodológicas, tempo de realização e tempo de armazenamento (GARLIPP-PICCHI et al., 2013).

Nosso trabalho apresenta evidências do efeito benéfico em modelo animal de mucosite do uso de altas doses de vitamina C, apesar da falta de sinergismo entre a associação dos imunomoduladores estudados. No entanto, muito se questiona sobre o uso de altas doses de ácido ascórbico e o desenvolvimento de problemas renais, dessa forma, apesar de não encontrar evidências na literatura quanto a essa complicação, é necessário novos estudos para comprovar a segurança do uso de doses elevadas de vitamina C.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com vitamina C demonstrou ser benéfica na barreira intestinal, reduzindo a PI e prevenindo as lesões causadas pelo uso do quimioterápico, além de apresentar potencial efeito anti-inflamatório reduzindo vias inflamatórias e a peroxidação lipídica na mucosite intestinal. Entretanto, o uso da associação entre vitamina C e L-arginina, não apresentou benefícios adicionais sobre a mucosite.

8 PERSPECTIVAS

- Explorar novos mecanismos para elucidar a relação da associação de vitamina C com arginina;
- Testar novas combinações de imunomoduladores;
- Avaliar os efeitos destes imunomoduladores na presença de câncer colorretal e 5-FU;
- Avaliar os efeitos da vitamina C isolada e associada a arginina na produção de AGCC;
- Comprovar a segurança do uso de altas doses de vitamina C;
- Avaliar danos à proteína e resposta antioxidante não enzimática;
- Trasladar os efeitos para estudos clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALA, S. et al. Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1153666>, v. 68, n. 3, p. 456–463, 2 abr. 2016.
- ALEXANDER, J. L. et al. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2017 **14:6**, v. 14, n. 6, p. 356–365, 8 mar. 2017.
- ALLAIRE, J. M. et al. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in immunology**, v. 39, n. 9, p. 677–696, 1 set. 2018.
- AL-REFAI, A. S. Chemoprotective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide induced oral toxicity. **Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)**, v. 21, n. 1, p. 1540–1551, 12 abr. 2017.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 1 dez. 2015.
- ANDRADE, M. E. R. et al. Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 1131–1139, 1 nov. 2016.
- ANDRADE, M. E. R. et al. Association of Fructo-oligosaccharides and Arginine Improves Severity of Mucositis and Modulate the Intestinal Microbiota. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023.
- ANDREWS, C.; MCLEAN, M. H.; DURUM, S. K. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1270, 5 jun. 2018.
- ARRIVE Guidelines**. Disponível em: <<https://arriveguidelines.org/>>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- BALMANT, B. D. et al. Effects of L-Arginine Supplementation on Leukogram, Inflammatory Bowel Infiltrates and Immunoglobulins with 5-FU Use in Rats. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1424346>, v. 70, n. 2, p. 249–256, 17 fev. 2018.
- BANSAL, V. et al. Interactions Between Fatty Acids and Arginine Metabolism: Implications for the Design of Immune-Enhancing Diets. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 29, n. SUPPL. 1, p. S75–S80, 2005.
- BARKSDALE, A. R. et al. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. **Surgery**, v. 135, n. 5, p. 527–535, 1 maio 2004.
- BARROS, P. A. V. DE et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1225100>, v. 69, n. 1, p. 168–175, 2 jan. 2016.

BEAUMIER, L. et al. Arginine: new and exciting developments for an “old” amino acid. **Biomedical and Environmental Sciences : BES**, v. 9, n. 2–3, p. 296–315, 1 set. 1996.

BECK, P. L. et al. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 1 49-1, 2004.

BERTRAND, J. et al. Regulation of intestinal protein metabolism by amino acids. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 443–450, 29 set. 2013.

BEUTHEU, S. et al. Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 694–701, 1 ago. 2014.

BLANDER, J. M. et al. Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. **Nature Immunology 2017 18:8**, v. 18, n. 8, p. 851–860, 19 jul. 2017.

BODE-BÖGER, S. M.; SCALERA, F.; IGNARRO, L. J. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 295–306, 1 jun. 2007.

BÖGER, R. H. Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the “L-Arginine Paradox” and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2842S-2847S, 1 out. 2004.

BÖTTGER, F. et al. High-dose intravenous vitamin C, a promising multi-targeting agent in the treatment of cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2021 40:1**, v. 40, n. 1, p. 1–44, 30 out. 2021.

BOWEN, J. et al. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. **Supportive Care in Cancer 2019 27:10**, v. 27, n. 10, p. 4023–4033, 8 jul. 2019.

BRONTE, V. et al. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 301–305, 1 jun. 2003.

BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Renal Arginine Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2791S-2795S, 1 out. 2004.

CABELLO-VERRUGIO, C. et al. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

CALVANI, R. et al. Effects of L-Arginine Plus Vitamin C Supplementation on L-Arginine Metabolism in Adults with Long COVID: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 5078**, v. 24, n. 6, p. 5078, 7 mar. 2023.

CARDOUNEL, A. J. et al. Evidence for the Pathophysiological Role of Endogenous Methylarginines in Regulation of Endothelial NO Production and Vascular Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 879–887, 12 jan. 2007.

CARITÁ, A. C. et al. Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 24, p. 102117, 1 fev. 2020.

CARR, A. C.; MAGGINI, S. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients** 2017, Vol. 9, Page 1211, v. 9, n. 11, p. 1211, 3 nov. 2017.

CARUSO, R. et al. A specific gene-microbe interaction drives the development of Crohn's disease-like colitis in mice. **Science Immunology**, v. 4, n. 34, 19 abr. 2019.

CARVALHO, P. L. A. et al. Prophylactic and therapeutic supplementation using fructo-oligosaccharide improves the intestinal homeostasis after mucositis induced by 5-fluorouracil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111012–111012, 1 jan. 2021.

CHAITANYA, N. C. S. K. et al. Oral Mucositis Severity Assessment by Supplementation of High Dose Ascorbic Acid During Chemo and/or Radiotherapy of Oro-Pharyngeal Cancers – A Pilot Project. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 52, n. 3, p. 532–539, 1 jul. 2018.

CHAMBIAL, S. et al. Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 314–328, 1 out. 2013.

CHANG, C.-T. et al. 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31808, mar. 2012.

CHATTERJEE, S. et al. Arginine metabolic pathways determine its therapeutic benefit in experimental heatstroke: Role of Th1/Th2 cytokine balance. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 408–416, dez. 2006.

CHIARLA, C.; GIOVANNINI, I.; SIEGEL, J. H. Plasma arginine correlations in trauma and sepsis. **Amino Acids**, v. 30, n. 1, p. 81–86, 31 fev. 2006.

CINAUSERO, M. et al. **New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury**. **Frontiers in Pharmacology** Frontiers Media S.A., , 8 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28642709/>>. Acesso em: 21 jun. 2021

COLLI, C. Biodisponibilidade de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 120–120, mar. 2005.

CREMON, C. et al. Pre- and probiotic overview. **Current opinion in pharmacology**, v. 43, p. 87–92, 1 dez. 2018.

CRISWELL, T. et al. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5813–5827, set. 2003.

CRONIN, K. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**, v. 124, n. 13, p. 2785–2800, 1 jul. 2018.

CRUVINEL, W. DE M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

CRYAN, J. F. et al. The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019.

DE ANDRADE BERNAL FAGIANI, M. et al. L-arginine minimizes immunosuppression and prothrombin time and enhances the genotoxicity of 5-fluorouracil in rats. **Nutrition**, v. 66, p. 94–100, 1 out. 2019.

DE BARROS, P. A. V. et al. **Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018.

DE MELO MANZI, N.; SILVEIRA, R. C. DE C. P.; REIS, P. E. D. DOS. Prophylaxis for mucositis induced by ambulatory chemotherapy: systematic review. **Journal of Advanced Nursing**, v. 72, n. 4, p. 735–746, 1 abr. 2016.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 6, p. 378, 5 maio 2016.

EFRON, D. T.; BARBUL, A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 1, n. 6, p. 531–538, 1 nov. 1998.

ENKHBAATAR, P. et al. Role of neuronal nitric oxide synthase in ovine sepsis model. **Shock**, v. 32, n. 3, p. 253–257, set. 2009.

FARGHALY, H. S.; THABIT, R. H. L-arginine and aminoguanidine reduce colonic damage of acetic acid-induced colitis in rats: Potential modulation of nuclear factor- κ B/p65. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 10, p. 769–779, 1 out. 2014.

FASANO, A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. **F1000Research 2020 9:69**, v. 9, p. 69, 31 jan. 2020.

FERREIRA, T. M. et al. Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 669–678, 1 jul. 2012.

FORCHIELLI, M. L.; WALKER, W. A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S41–S48, abr. 2005.

FORSGÅRD, R. A. et al. Intestinal permeability to iohexol as an in vivo marker of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in Sprague–Dawley rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 863–874, 1 out. 2016.

FRANZÈ, E. et al. Interleukin-34 Induces Cc-chemokine Ligand 20 in Gut Epithelial Cells. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 1, p. 87–94, 1 jan. 2016.

GAD, M. Z. Anti-aging effects of l-arginine. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 3, p. 169–177, 1 jul. 2010.

GALLO, R. L.; HOOPER, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. **Nature Reviews Immunology** 2012 **12:7**, v. 12, n. 7, p. 503–516, 25 jun. 2012.

GARLIPP-PICCHI, M. et al. Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de elite. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, p. 394–398, nov. 2013.

GENEROSO, S. D. V. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 12 jun. 2015.

GENEROSO, S. V. et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 261–269, 10 jun. 2011.

GIBSON, R. J. et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 1, p. 313–326, jan. 2013.

GLEESON, M. H.; CULLEN, J.; DOWLING, R. H. Intestinal Structure and Function after Small Bowel by-Pass in the Rat. **Clinical Science**, v. 43, n. 6, p. 731–742, 1 dez. 1972.

Global Cancer Observatory. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

GOCAN, N. C.; SCOTT, J. A.; TYML, K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 5 47-5, 2000.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery** 2013 **12:12**, v. 12, n. 12, p. 931–947, 29 nov. 2013.

GRAVES, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 45, n. 26, p. 263001, 13 jun. 2012.

GRIMBLE, R. F. Immunonutrition. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 216–222, mar. 2005.

HIBBS, J. B. et al. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, n. 1, p. 87–94, 30 nov. 1988.

HOLÁÑ, V. et al. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. **Transplantation**, v. 81, n. 12, p. 1708–1715, jun. 2006.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1 dez. 1987.

INCA. **Câncer: estadiamento.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estadiamento>>.

INOUE, M. et al. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495–2505, 23 mar. 2005.

JUSTINO, P. F. C. et al. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 9, p. 1611–1621, 14 maio 2014.

KEEFE, D. M. et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, v. 109, n. 5, p. 820–831, 1 mar. 2007.

KI, W. L. et al. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 6, p. 1074–1078, 1 dez. 2003.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 13 out. 2010.

LEE CHONG, T.; AHEARN, E. L.; CIMMINO, L. **Reprogramming the Epigenome With Vitamin C.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., , 16 jul. 2019.

LEE, K. W. et al. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal 1-3. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 1074–1082, 2003.

LEOCÁDIO, P. C. L. et al. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004730>, v. 67, n. 3, p. 486–493, 3 abr. 2015.

LEONE, A. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **The Lancet**, v. 339, n. 8793, p. 572–575, 7 mar. 1992.

LEONEL, A. J. et al. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 8, p. 1396–1407, abr. 2013.

LI, H.-L. et al. Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. October, p. 1–14, 2017.

LI, W.; SONG, J.; CHEN, Z. The association between dietary vitamin C intake and periodontitis: result from the NHANES (2009–2014). **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2022.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUCHEL, R. A. et al. High-dose ascorbic acid synergizes with anti-PD1 in a lymphoma mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 3, p. 1666–1677, 21 jan. 2020.

MAGRÌ, A. et al. High-dose vitamin C enhances cancer immunotherapy. **Sci. Transl. Med**, v. 12, p. 8707, 2020.

MANZI, N. DE M.; SILVEIRA, R. C. DE C. P.; DOS REIS, P. E. D. Prophylaxis for mucositis induced by ambulatory chemotherapy: systematic review. **Journal of advanced nursing**, v. 72, n. 4, p. 735–46, abr. 2016.

MARTENS, E. C.; NEUMANN, M.; DESAI, M. S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. **Nature Reviews Microbiology** 2018 16:8, v. 16, n. 8, p. 457–470, 14 jun. 2018.

MAY, J. M.; HARRISON, F. E. Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. <https://home.liebertpub.com/ars>, v. 19, n. 17, p. 2068–2083, 16 dez. 2013.

MICHELS, A. J.; HAGEN, T. M.; FREI, B. Human Genetic Variation Influences Vitamin C Homeostasis by Altering Vitamin C Transport and Antioxidant Enzyme Function. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161246>, v. 33, p. 45–70, 17 jul. 2013.

MIRANDA, J. A. L. DE et al. Protective Effect of cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis. 2019.

MOHAMMED, B. M. et al. Vitamin C promotes wound healing through novel pleiotropic mechanisms. **International Wound Journal**, v. 13, n. 4, p. 572–584, 1 ago. 2016.

MONTASSIER, E. et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, n. 5, p. 515–528, 1 set. 2015.

MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 793–802, 1 jul. 2021.

MORRIS, S. M. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge,,. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1602S-1609S, 1 jun. 2007.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 638–651, 1 out. 2009.

MUNKER, S. et al. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 23 abr. 2018.

NAGY, B. et al. Chemosensitizing effect of vitamin C in combination with 5-fluorouracil in vitro. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 17, n. 3, p. 289–292, 1 maio 2003.

NICHOLSON, B. et al. Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15881–15885, 11 maio 2001.

NILSEN, M. et al. Fecal Microbiota Nutrient Utilization Potential Suggests Mucins as Drivers for Initial Gut Colonization of Mother-Child-Shared Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 1–12, 1 mar. 2021.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, n. 2, p. 403–409, 1 ago. 1994.

OBEROI, S. et al. Effect of Prophylactic Low Level Laser Therapy on Oral Mucositis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107418, set. 2014a.

OBEROI, S. et al. Effect of Prophylactic Low Level Laser Therapy on Oral Mucositis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107418, 8 set. 2014b.

OCHOA, J. B. M. et al. Arginase I Expression and Activity in Human Mononuclear Cell... : *Annals of Surgery*. **Annals of Surgery**, v. 233, n. 3, p. 393–399, mar. 2001.

PARSONS, K. K. et al. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 6, p. 1131–1139, 2006.

PEREIRA, V. B. M. et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 323–332, 1 fev. 2016.

POPOLO, A. et al. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. **Amino Acids**, v. 46, n. 10, p. 2271–2286, 27 ago. 2014.

POPOVIC, P. J.; ZEH, H. J.; OCHOA, J. B. Arginine and Immunity,.. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1681S-1686S, 1 jun. 2007.

PREISER, J. C. Oxidative Stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 147–154, 1 mar. 2012.

PRISCIANDARO, L. D. et al. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.11.7.14896>, v. 11, n. 7, p. 671–677, 1 abr. 2011.

QU, X. W. et al. Tetrahydrobiopterin prevents platelet-activating factor-induced intestinal hypoperfusion and necrosis: Role of neuronal nitric oxide synthase. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 5, p. 1050–1056, maio 2005.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 532, 27 out. 2014.

REGAN, T. et al. Identification of TLR10 as a Key Mediator of the Inflammatory Response to *Listeria monocytogenes* in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 12, p. 6084–6092, 15 dez. 2013.

RODRIGUEZ, P. C. et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 7, p. 931–939, 3 out. 2005.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. et al. Polyamines in mammalian pathophysiology. **Cellular and Molecular Life Sciences** 2019 **76:20**, v. 76, n. 20, p. 3987–4008, 21 jun. 2019.

SERAFINI, P.; BORRELLO, I.; BRONTE, V. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 1, p. 53–65, 1 fev. 2006.

SHIN, S.; THAPA, S. K.; FUNG, H. L. Cellular interactions between L-arginine and asymmetric dimethylarginine: Transport and metabolism. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178710, 1 maio 2017.

SHITARA, K. et al. Meta-analysis of neutropenia or leukopenia as a prognostic factor in patients with malignant disease undergoing chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 301–307, 20 ago. 2011.

SIEGEL MPH, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 1 jan. 2023.

SINGH, K. et al. L-arginine uptake by cationic amino acid transporter 2 is essential for colonic epithelial cell restitution. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 9, p. 1061–1073, 1 maio 2012.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91–98, 7 dez. 2008.

SOARES, P. M. G. et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46–9, jan. 2013.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004.

SOUGIANNIS, A. T. et al. Impact of 5 fluorouracil chemotherapy on gut inflammation, functional parameters, and gut microbiota. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 44–55, 1 ago. 2019.

SOUGIANNIS, A. T. et al. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 320, n. 5, p. G712–G719, 2021.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, n. 2, p. 209–215, 7 nov. 1985.

SUTHERLAND, D. B.; FAGARASAN, S. IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 261–268, 1 jun. 2012.

SZEFEL, J.; DANIELAK, A.; KRUSZEWSKI, W. J. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. **Advances in Medical Sciences**, v. 64, n. 1, p. 104–110, 1 mar. 2019.

TAN, D. X. et al. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 16 dez. 2016.

TOUCHEFEU, Y. et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis – current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 5, p. 409–421, 1 set. 2014.

TRINDADE, L. M. et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0082>, v. 9, n. 3, p. 477–486, 10 abr. 2018.

TRINDADE, L. M. et al. Paraprobiotic Lacticaseibacillus rhamnosus Protects Intestinal Damage in an Experimental Murine Model of Mucositis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 2, p. 338–350, 15 set. 2021.

TSUEI, B. J. M. et al. Surgery Induces Human Mononuclear Cell Arginase I Expression: Journal of Trauma and Acute Care Surgery. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 51, n. 3, p. 497–502, set. 2001.

UICC. **TNM Classification of Malignant Tumours**. Disponível em: <<https://www.uicc.org/what-we-do/sharing-knowledge/tnm>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

VIANA, M. L. et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 218–223, 1 fev. 2010.

VINOLO, M. A. R. et al. **Regulation of inflammation by short chain fatty acids**. **Nutrients** MDPI AG, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22254083/>>. Acesso em: 21 jun. 2021

WISEK, W. J. Arginine Needs, Physiological State and Usual Diets. A Reevaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 116, n. 1, p. 36–46, 1 jan. 1986.

WANG, A. et al. Gut Microbial Dysbiosis May Predict Diarrhea and Fatigue in Patients Undergoing Pelvic Cancer Radiotherapy: A Pilot Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126312, 1 maio 2015.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **American Journal of Surgery**, v. 183, n. 4, p. 406–412, 1 abr. 2002.

WU, G. et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 153, maio 2009.

YONEDA, J.; NISHIKAWA, S.; KURIHARA, S. Oral administration of cystine and theanine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and diarrhea by suppressing both glutathione level decrease and ROS production in the small intestine of mucositis mouse model. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2021.

YUE, X.; RAO, A. TET family dioxygenases and the TET activator vitamin C in immune responses and cancer. **Blood**, v. 136, n. 12, p. 1394–1401, 17 set. 2020.

ANEXOS

ANEXO I – CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise dos efeitos do uso de simbióticos em camundongos com câncer colorretal submetidos a tratamento quimioterápico", protocolo do CEUA: 68/2021 sob a responsabilidade de Simone de Vasconcelos Generoso que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 24/05/2021.

Vigência da Autorização	24/05/2021 a 23/05/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / balb/c
Nº de animais	18
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / balb/c
Nº de animais	18
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / balb/c
Nº de animais	18
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / balb/c
Nº de animais	18
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / balb/c
Nº de animais	18

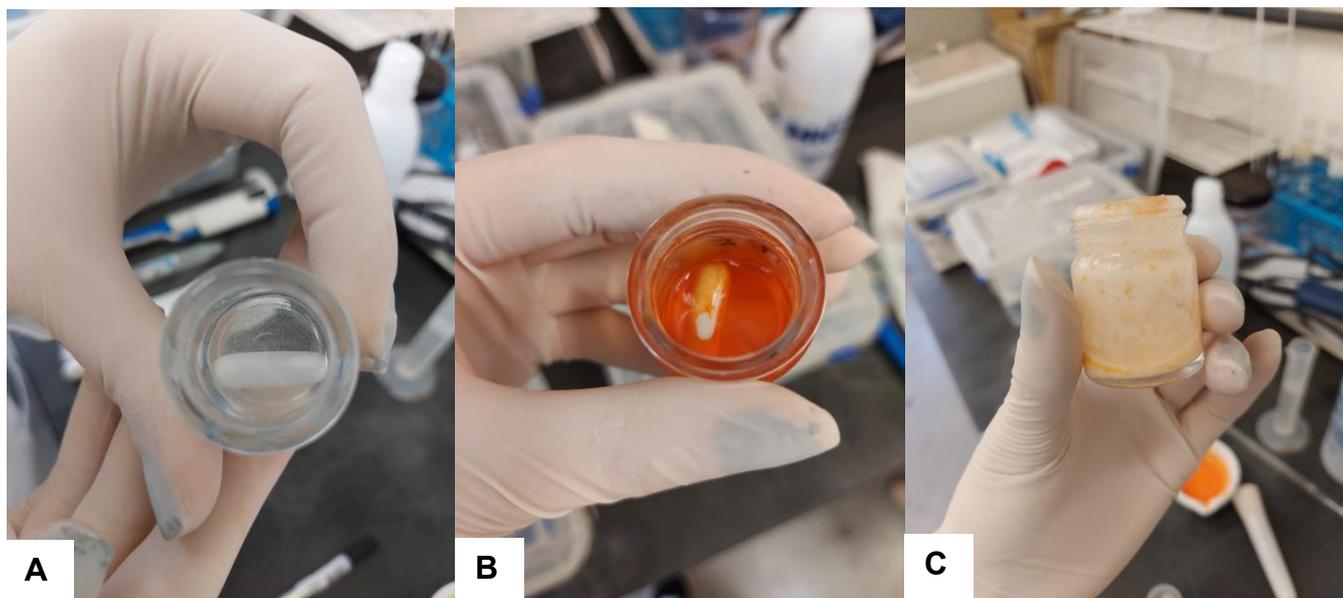
ANEXO II – DILUIÇÃO DOS SUPLEMENTOS ARGININA E VITAMINA C

Figura 1. Teste de diluição dos compostos vitamina C e arginina associada a vitamina C. 1= arginina; 2= vitamina C marca A; 3 vitamina C + arginina.

ANEXO III – DADOS SUPLEMENTARES (CTL+VIT)

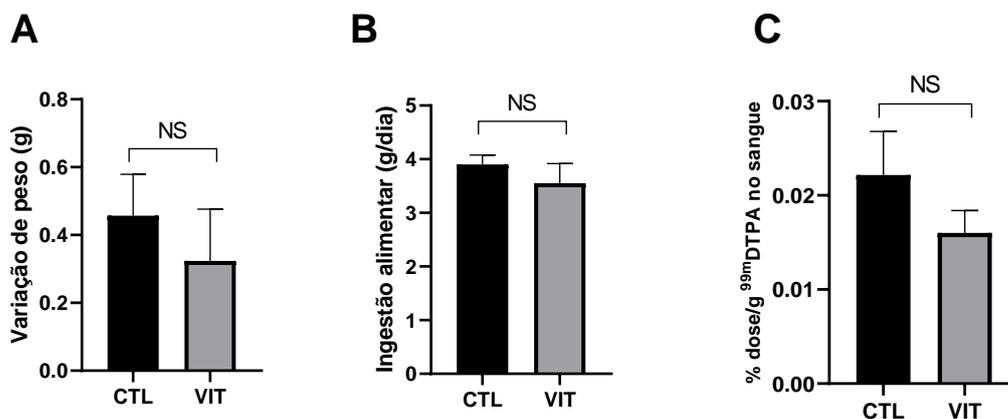


Figura 2. Variação de peso (A), consumo alimentar (B) e permeabilidade intestinal (C) de animais controles (CTL e VIT). Dados expressos em média \pm SEM (n=6). NS= não significativo ($p > 0,05$; *Test T* de amostras independentes). CTL= Controle; VIT = Vitamina C.

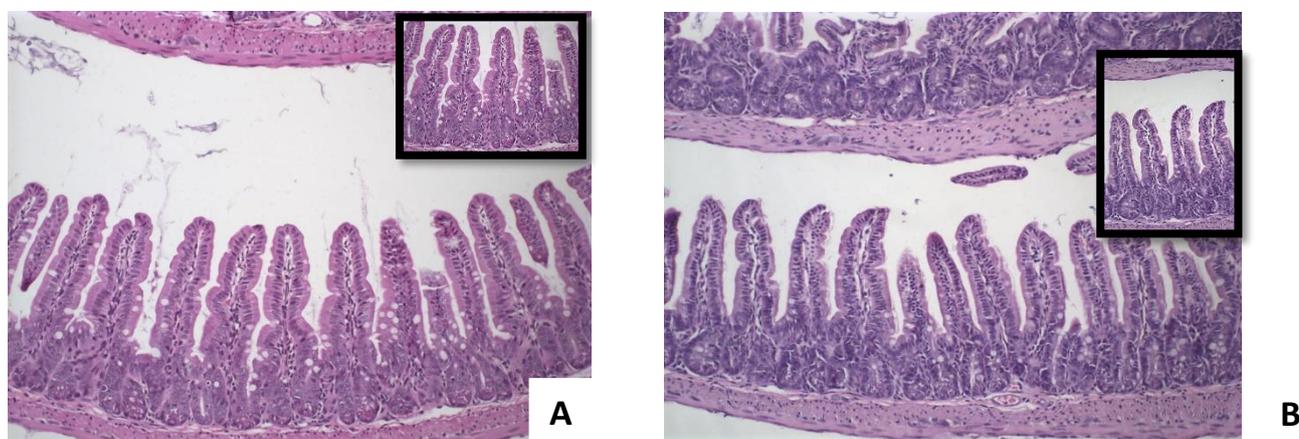


Figura 3. Análises histológicas do íleo de animais controles. A= Controle; B = Vitamina C. Aumento de 20X e 40X.