

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

PAOLA CAROLINE LACERDA LEOCÁDIO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM
L-ARGININA NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte, MG

2013

PAOLA CAROLINE LACERDA LEOCÁDIO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM
L-ARGININA NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM
CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Profa Dra. Maria Isabel Toulson
Davisson Correia

Belo Horizonte, MG

2013

L576e Leocádio, Paola Caroline Lacerda.
Efeito do pré-tratamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos / Paola Caroline Leocádio. – 2013.
110 f. : il.

Orientadora: Maria Isabel Toulson Davisson Correia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Arginina – Teses. 2. Mucosa gástrica – Teses. 3. Intestinos – Doenças – Teses. 4. Absorção intestinal – Teses. 5. Câncer – Quimioterapia – Teses. 6. Medicamentos – Efeitos colaterais – Teses. 7. Intestinos – Permeabilidade – Teses. 8. Mucosite intestinal – Teses. I. Correia, Maria Isabel Toulson Davisson. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 616.34



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

PAOLA CAROLINE LACERDA LEOCÁDIO

**“EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ARGININA NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS”**

APROVADA EM 24 DE ABRIL DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. CLÁUDIA COLAMARCO FERREIRA

Dra. FABIÓLA LACERDA PIRES SOARES

Profa. Dra. MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON CORREIA
Orientadora e Presidente da Comissão

Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO ARAÚJO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar todos os dias, me ensinar com amor e me permitir vencer mais essa etapa. Sem o Senhor nada poderia ter feito, toda a honra seja dada ao Teu nome;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Isabel Toulson Davisson Correia, por me receber como aluna e me ensinar tanto sobre tantas coisas. Você é um exemplo de orientadora, professora e pessoa para mim;

À Prof^a Dr^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite, por me acolher em seu laboratório, pelo apoio e por me dar a oportunidade de aprender tantas coisas. Tenho certeza de que minha admiração pela área experimental só aumentou;

À Prof^a Dr^a Denise Carmona Cara Machado pela contribuição nas análises deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso por disponibilizar materiais e equipamentos do seu laboratório e à Prof^a Dr^a Simone de Vasconcelos Generoso pelo auxílio precioso neste trabalho;

Aos meus pais, Maurílio Militão Leocádio e Cleuza Lacerda Cardoso Militão, pelo amor, paciência, por sonharem junto comigo e me incentivarem sempre. Todo agradecimento a vocês ainda será pouco;

Aos meus irmãos Diego Henrique Lacerda Leocádio e Larissa Giovanna Lacerda Leocádio, pela paciência, conversas e momentos de descontração (que quase sempre envolviam o Chokito) que tornaram mais fácil a realização deste trabalho;

À minha amiga Máisa Mota Antunes, por construir este trabalho junto comigo.

Às minhas amigas e colaboradoras Prof^a Dr^a Lílian Gonçalves Teixeira e Alda Jusceline Leonel, por abraçarem este trabalho, pela ativa participação e ensino na bancada e pelos conselhos tão importantes;

À aluna de iniciação científica Ana Carolina Silva Almada, pela ajuda no trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN), especialmente à Lana Claudinez dos Santos, à Lorraine Gonçalves Lopes e ao Edenil Costa Aguiar, pela amizade e auxílio;

A todos os membros do LABiN pelas críticas construtivas;

À minha amiga Penélope Lacrísio dos Reis Menta. Um dia sonhamos, hoje realizamos;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

E a todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Meu muito obrigada!

*“A ciência conhece um único comando:
contribuir com a ciência.”*

Bertold Brecht

*“Cada célula, todo fio de cabelo
Falando assim parece exagero
Mas se depender de mim, eu vou até o fim.”*

Humberto Gessinger

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Câncer e tratamento	20
2.2 Quimioterapia	20
2.3 5-Fluorouracil: aspectos gerais, utilização e efeitos colaterais	21
2.4 Mucosite intestinal	23
2.4.1 Fase de iniciação: espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico e estresse oxidativo	24
2.4.2 Fase de resposta a danos primários: fatores de transcrição e citocinas	26
2.4.3 Fase de amplificação de sinal	27
2.4.4 Fase de ulceração: infiltrado celular e permeabilidade intestinal ...	27
2.4.5 Fase de cicatrização	30
2.4.6 Avaliação, prevenção e tratamento	31
2.4.7 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU	33
2.5 L- arginina	33
2.5.1 Aspectos gerais	33
2.5.2 Absorção	34
2.5.3 Catabolismo	35
2.5.3.1 Óxido nítrico sintases	35
2.5.3.2 Arginases	36
2.5.3.3 Arginina:glicina amidinotransferase e arginina descarboxilase	37
2.5.3.4 Poliaminas	37
2.5.4 Síntese	38
2.5.5 L-arginina e mucosa intestinal	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivos gerais	41
3.2 Objetivos específicos	41

4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Animais	42
4.2	Delineamento experimental	42
4.3	Ração comercial e água suplementada	43
4.4	Modelo experimental de mucosite intestinal	44
4.5	Eutanásia dos animais	44
4.6	Parâmetros avaliados	44
4.6.1	Consumo alimentar e consumo hídrico	44
4.6.2	Evolução de peso	45
4.6.3	Comprimento intestinal	45
4.6.4	Análise histológica e escore histopatológico	45
4.6.5	Estresse oxidativo	46
4.6.6	Avaliação do infiltrado celular	48
4.6.7	Estudo da permeabilidade intestinal	51
4.7	Análises estatísticas	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos	53
5.2	Evolução de peso	54
5.3	Comprimento intestinal	55
5.4	Análise histológica e escore histopatológico	56
5.5	Estresse oxidativo	60
5.5.1	Peroxidação lipídica	60
5.5.2	Concentração de hidroperóxidos	61
5.6	Avaliação do infiltrado celular	62
5.6.1	Atividade de MPO	62
5.6.2	Atividade de NAG	64
5.6.3	Atividade de EPO	66
5.7	Estudo da permeabilidade intestinal	68
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	77
8	PERSPECTIVAS	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	APÊNDICE A – DADOS COMPLEMENTARES	97

LISTA DE TABELAS

1	Composição centesimal: ração comercial	44
2	Consumo alimentar	53
3	Consumo hídrico e de aminoácidos	54
A1	Consumo alimentar e hídrico	97

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura molecular do 5-Fluorouracil	21
2	Fases da mucosite intestinal	24
3	Estrutura molecular da arginina	33
4	Metabolismo da L-arginina	39
5	Varição de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia)	55
6	Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	55
7	Aspecto morfológico do duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	57
8	Aspecto morfológico do jejuno proximal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	57
9	Escore histopatológico total do duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	58
10	Escore histopatológico total do jejuno proximal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	58
11	Escore histopatológico total do jejuno distal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	59
12	Escore histopatológico total do íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	59
13	Análise da peroxidação lipídica por TBARS no intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	60
14	Dosagem da concentração de hidroperóxidos no intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	61
15	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	62
16	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	63
17	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	63
18	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU ..	64

19	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	65
20	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	65
21	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	66
22	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	67
23	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	67
24	Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m} Tc-DTPA no sangue de animais após tratamento com PBS ou 5-FU	68
A1	Variação de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia)	98
A2	Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com PBS	98
A3	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com PBS	99
A4	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com PBS	99
A5	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com PBS	100
A6	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS	100
A7	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS	101
A8	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS	101
A9	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS	102
A10	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS	102
A11	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS	103
A12	Variação de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia)	103
A13	Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com 5-FU	104
A14	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de	104

	macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU	
A15	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU	105
A16	Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com 5-FU	105
A17	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU	106
A18	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU	106
A19	Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no íleo três dias após tratamento com 5-FU	107
A20	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU	107
A21	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU	108
A22	Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	108
A23	Aspecto morfológico do jejuno distal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU.....	109
A24	Aspecto morfológico do íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ADC	Arginina descarboxilase
AGAT	Arginina:glicina aminotransferase
ALA	Alanina
ANSR	<i>Abbott Nutrition Skills & Resource</i>
ARG	Arginina
ASL	Argininosuccinato liase
ASS	Argininosuccinato sintetase
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Transportadores de aminoácidos catiônicos
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CPM	Contagem por minuto
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CXCL9	Ligante de Quimiocina 9 (motivo C-X-C)
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSS	Sulfato de sódio dextrano
DTPA	Ácido dietilenoaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPO	Peroxidase de eosinófilos
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDUMP	5-fluoro-2'-desoxiuridina
FOX	Oxidação do ferro em xilenol laranja
FUTP	Trifosfato de 5-fluoruridina

GAMT	Guanidinoacetato N-metiltransferase
HETAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
HOI	Maior ingestão observada
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
IPEN/CNEM	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ Comissão Nacional de Energia Nuclear
ISOO	<i>International Society for Oral Oncology</i>
JAM	Molécula de adesão juncional
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MASCC	<i>Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer</i>
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
NAG	n-acetilglicosaminidase
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
NOS	Óxido nítrico sintase
ODC	Ornitina descarboxilase
OPD	o-fenilenediamina diidrocloreto
OSL	Nível de segurança observado
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Trifenilfostina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZO	Zônula ocludente

RESUMO

O diagnóstico do câncer, assim como o tratamento, alteram aspectos da saúde e qualidade de vida do indivíduo. A quimioterapia é uma das terapias empregadas e tem como base a utilização de drogas que retardam ou inibem o crescimento de células tumorais. O 5-Fluorouracil (5-FU), um dos fármacos anti-neoplásicos muito utilizado, pode causar efeitos colaterais graves, como a mucosite. Essa é caracterizada por inflamação que atinge o trato gastrointestinal levando a alterações da permeabilidade intestinal, assim como causando dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia, além de levar a piora do estado nutricional. Assim estratégias que possam positivamente impactar nesta realidade devem ser estimuladas. O aminoácido L-arginina impacta positivamente na resposta imunológica e na melhora da função intestinal. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a ação do pré-tratamento com L-arginina a 2% (diluída na água) na mucosite induzida por 5-FU (dose única de 200mg/kg de peso) em camundongos *Swiss* machos. Avaliou-se o efeito do aminoácido na variação de peso, ingestão alimentar e hídrica, morfologia e escore histopatológico do intestino delgado, estresse oxidativo, infiltrado celular e permeabilidade intestinal. Observou-se melhora no comprimento intestinal, recuperação parcial da arquitetura da mucosa, redução intermediária do escore histopatológico e do infiltrado de neutrófilos, além de melhora da permeabilidade intestinal nos animais suplementados com L-arginina. A suplementação não evitou a perda de peso dos animais após a administração de 5-FU. Conclui-se que a L-arginina é capaz de melhorar parcialmente a mucosite intestinal, promovendo recuperação da mucosa, redução da inflamação e melhora da permeabilidade intestinal.

Palavras-chave: Quimioterapia. 5-Fluorouracil. Mucosite intestinal. L-arginina. Permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

Cancer and its treatment affect patients' health status as well as their quality of life. Chemotherapy, one of the therapies employed, is based on the use of drugs which retard or inhibit tumor growth. 5-Fluorouracil (5-FU) is one of the antineoplastic drugs commonly used in the treatment of cancer. However, it may cause serious side effects such as mucositis. This is characterized by inflammation that affects the gastrointestinal, increasing permeability as well as causing abdominal pain, nausea, vomiting and diarrhea, which worsen the nutritional status. Therefore, it is important to assess potential novel treatment options that may positively impact the outcome of such complication. Beneficial effects of L-arginine in immune response and bowel function have been reported. The aim of this study was to evaluate the effect of a 2% L-arginine water supplementation pretreatment on mucositis induced by 5-FU (single dose of 200mg/kg body weight) in Swiss male mice. We evaluated the effect of L-arginine on weight, food and water intake, morphology and inflammatory score of the small intestine, oxidative stress, cell infiltrate and intestinal permeability. Intestinal length improvement was observed, as well as partial recovery of the mucosal architecture, intermediate reduction of inflammatory score and neutrophil infiltration, in addition to improvement of intestinal permeability. Arginine supplementation did not prevent weight loss after the administration of 5-FU. In conclusion, L-arginine is able to partially improve intestinal mucositis, promoting mucosal recovery, reduction of inflammation and improvement of intestinal permeability.

Key words: Chemotherapy. 5-Fluorouracil. Intestinal mucositis. L-arginine. Intestinal permeability.

1 INTRODUÇÃO

O câncer ou neoplasia maligna é doença caracterizada por desenvolvimento de células com perda da estrutura fisiológica. Isso resulta em proliferação celular descontrolada, perda de função, poder de invasão e capacidade de disseminação para outras partes do corpo (RANG *et al.*, 2003 *apud* LIMA, 2004; VERDE, 2007). O diagnóstico de câncer altera diversos aspectos na vida de um indivíduo. Além de desconforto e dor que comprometem a capacidade de realizar tarefas rotineiras, há também perda de auto-estima e modificações de ordem social (PAIVA, 2006).

A terapia anti-neoplásica com quimioterápicos é uma das formas de tratamento, utilizada tanto no tratamento de tumores não curáveis por operação ou radioterapia, como também de forma isolada para alguns tipos de neoplasia (MENDES, 2009). Dentre as drogas utilizadas, encontra-se o 5-Fluorouracil (5-FU). O fármaco, desenvolvido na década de 50 do século passado, tem a função de inibir moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células (MENDES, 2009). No entanto, o tratamento pode ter efeitos colaterais, muitas vezes responsáveis por recusas da terapia, dentre os quais a mucosite, que afeta a maioria dos pacientes que fazem uso do fármaco (LIMA, 2004; VERDE, 2007; WU, Z. *et al.*, 2011).

A mucosite, inflamação que atinge o trato gastrointestinal (TGI), representa um dos principais efeitos indesejáveis do tratamento do câncer, relacionada com quimioterapia e radioterapia (ANTUNIASSI, 2005; RUSSO *et al.*, 2008). Os sintomas incluem náuseas, dor abdominal, vômitos e diarreia, que podem surgir de imediato ou até vários dias após o tratamento e, afetam a ingestão alimentar assim como a qualidade de vida dos pacientes, além de piorarem o estado nutricional pelo comprometimento da absorção de nutrientes (McCARTHY *et al.*, 1998; KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004; SANTOS, 2009; WU, Z. *et al.*, 2011). Esse efeito adverso representa ainda aumento dos custos hospitalares, que podem atingir três vezes mais os valores habituais (LALLA *et al.*, 2006; TOOLEY; HOWARTH; BUTLER, 2009). Sendo assim, torna-se importante o estudo de formas que possam minimizar o impacto da mucosite em pacientes com câncer.

Devido aos comprovados efeitos da L-arginina na resposta imunológica, assim como na melhora da função e permeabilidade intestinal (ERSIN *et al.*, 2000; WANG; QIAO; LI, 2009; QUIRINO *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2010; KOPPELMANN *et al.*, 2012; QUIRINO *et al.*, 2012), estudou-se a contribuição do aminoácido na abordagem da mucosite intestinal induzida por 5-FU, visando futuros benefícios em pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer e tratamento

O câncer vem se convertendo nas últimas décadas em problema de saúde pública mundial. Pode-se atribuir o aumento do número de casos à urbanização, ao incremento na expectativa de vida e, também, ao melhor diagnóstico (ROSENFELD *et al.*, 2001 *apud* VERDE, 2007; LOPES *et al.*, 2002). A busca por formas de tratamento anti-neoplásico mais efetivas e menos agressivas tem aumentado. Os tratamentos disponíveis atualmente incluem operação, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e, mais recentemente, imunoterapia, com resultados promissores (VERDE, 2007).

Os fármacos anti-neoplásicos constituem o tratamento de numerosas neoplasias malignas de forma isolada ou em conjunto com a radioterapia e/ou o tratamento cirúrgico (LIMA, 2004).

2.2 Quimioterapia

A quimioterapia, tratamento anti-neoplásico sistêmico, é classificada de três maneiras principais: neoadjuvante, terapêutica e adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante caracteriza-se pelo uso de quimioterapia como tratamento inicial de pacientes que serão submetidos a tratamento cirúrgico e/ou radioterápico. A terapêutica ocorre quando a abordagem única é a submissão do paciente à quimioterapia. Já a adjuvante é utilizada após o tumor primário ter sido controlado por terapia cirúrgica ou radioterapia (CHU; DeVITA, 2001 *apud* VERDE, 2007; ANELLI, 2002; GIMENEZ, 2003).

O tratamento objetiva a erradicação de células tumorais viáveis, com mínima lesão aos tecidos do hospedeiro. As drogas anti-neoplásicas induzem a morte ou comprometem as células tumorais susceptíveis, bloqueando vias metabólicas ou bioquímicas sensíveis às drogas (LIMA, 2004). Percebe-se que cada quimioterápico tem perfil de toxicidade distinto e os efeitos colaterais têm relação direta com a droga

utilizada e o estado clínico do indivíduo (LIMA, 2004; VERDE, 2007). Neste sentido, o 5-Fluorouracil é um dos quimioterápicos que causa importantes efeitos colaterais (McCARTHY *et al.*, 1998; LEITÃO *et al.*, 2007). Mielotoxicidade, cistite, toxicidade pulmonar, cardiotoxicidade e mucosite são os efeitos adversos mais encontrados após o uso deste agente (LIMA, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; VERDE, 2007).

2.3 5-Fluorouracil: aspectos gerais, utilização e efeitos colaterais

O 5-Fluorouracil é um dos mais efetivos anti-neoplásicos usados para o tratamento do câncer (ANTUNIASSI, 2005), exercendo múltiplos efeitos sobre o crescimento celular anormal. É amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de tumores, como os de cólon, mama, cabeça e pescoço (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O fármaco é administrado por via intravenosa, na forma de *bolus* (administração rápida, em tempo menor ou igual a um minuto) ou como infusão contínua prolongada (tempo superior a 60 minutos, ininterruptamente) durante determinado período. A meia-vida é curta, de dez a vinte minutos, tornando a infusão contínua vantajosa (LIMA, 2004).

O 5-Fluorouracil é uma pirimidina fluorada, preparada a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor, mais estável, na posição cinco da molécula de uracil (Figura 1). O sítio de substituição no anel pirimidina foi selecionado para inibir a conversão do nucleotídeo uracil em timidina (PINEDO; PETERS, 1988).

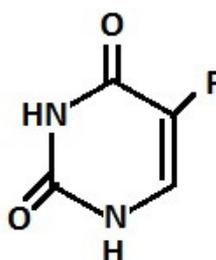


Figura 1 – Estrutura molecular do 5-Fluorouracil.

O 5-FU é classificado como antimetabólito, classe que inclui drogas anti-neoplásicas com maior espectro de ação na prática oncológica (CHU; DeVITA, 2001 *apud* VERDE, 2007; ANELLI, 2002; GIMENEZ, 2003). Os antimetabólitos assemelham-se estruturalmente com o ácido fólico cujas bases são purina e pirimidina, envolvidas na síntese de DNA, RNA e determinadas enzimas. Diferem-se, no entanto, no arranjo molecular do metabólito correspondente, em grau suficiente para atuarem como substratos falsos em reações bioquímicas. Ademais, o 5-FU inibe etapas de síntese ou, incorpora-se em moléculas interferindo na função ou replicação celular (LIMA, 2004).

A droga, após conversão intracelular em monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FDUMP), atua como potente antimetabólito que se liga à timidilato sintetase, inibindo-a (McCARTHY *et al.*, 1998). Há ainda inibição do ácido timidílico e comprometimento da síntese de DNA e, conseqüentemente, do crescimento celular. O metabolismo do 5-FU produz ainda um intermediário crítico, o trifosfato de 5-fluoruridina (FUTP), que se incorpora ao RNA e interfere na função celular. As células com alto índice mitótico são as mais afetadas, e por isso, as da medula óssea e do trato gastrointestinal são muito susceptíveis (PINEDO; PETERS, 1988; JENSEN *et al.*, 2003; ANTUNIASSI, 2005).

Os efeitos colaterais provenientes do uso do 5-FU acometem principalmente tecidos de proliferação rápida, causando mucosite, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia. Essas complicações variam de acordo com a dose, o esquema posológico adotado, a via de administração e o estado geral do paciente. Mielossupressão também pode ocorrer, sendo mais comum na administração em *bolus*. No entanto, enquanto o manejo das diversas toxicidades relacionadas ao uso tem evoluído, a incidência de mucosite tem aumentado (GREM, 2000; LIMA, 2004; VERDE, 2007).

Aproximadamente 40% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam mucosite, podendo chegar a 100% com o uso de altas doses. Isso contribui para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia proposta e refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (SONIS, 2004; ANTUNIASSI, 2005; BOWEN *et al.*, 2006; LEITÃO *et al.*, 2007;

STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010). Devido a esses fatores, torna-se importante entender a mucosite intestinal.

2.4 Mucosite intestinal

A mucosa do trato gastrointestinal, devido à alta taxa proliferativa, é particularmente susceptível a complicações. Por conseguinte, os indivíduos submetidos a quimioterapia, cujos tumores podem ou não ser originários do trato alimentar são considerados grupo de risco para tal evento (LIMA, 2004).

O quadro clínico da mucosite é caracterizado por eritema generalizado e/ou lesões ulcerativas na mucosa bucal e do trato gastrointestinal (KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004). A mucosite é associada ainda a febre, aumento do risco de infecção, interrupção do tratamento, aumento dos custos hospitalares e mortalidade (LIMA, 2004; ANTUNIASSI, 2005). Sabe-se que as alterações que ocorrem na mucosa, em geral, resultam em decréscimo da ingestão oral, acarretando deficiências nutricionais (McCARTHY *et al.*, 1998; SANTOS, 2009), além de negativamente afetarem a qualidade de vida (ANTUNIASSI, 2005; LALLA *et al.*, 2006).

A mucosite acomete principalmente o intestino delgado (KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004). Logan *et al.* (2009) observaram alterações mínimas no cólon após administração dos quimioterápicos metotrexato (MTX) ou 5-FU. Ferreira *et al.* (2012) não encontraram alterações no cólon com o uso de 5-FU.

O exato mecanismo biológico da mucosite ainda não está totalmente esclarecido (ANTUNIASSI, 2005; GIBSON; KEEFE, 2006). Acredita-se que a gênese da mucosite induzida pela quimioterapia esteja relacionada ao efeito apoptótico das drogas sobre as células intestinais (WU, Z. *et al.*, 2011). A ação da microbiota intestinal também tem sido investigada no desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos (VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2003). Sonis (2004) descreve o desenvolvimento da mucosite em cinco fases, que ocorrem dinamicamente: iniciação, resposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (Figura 2).

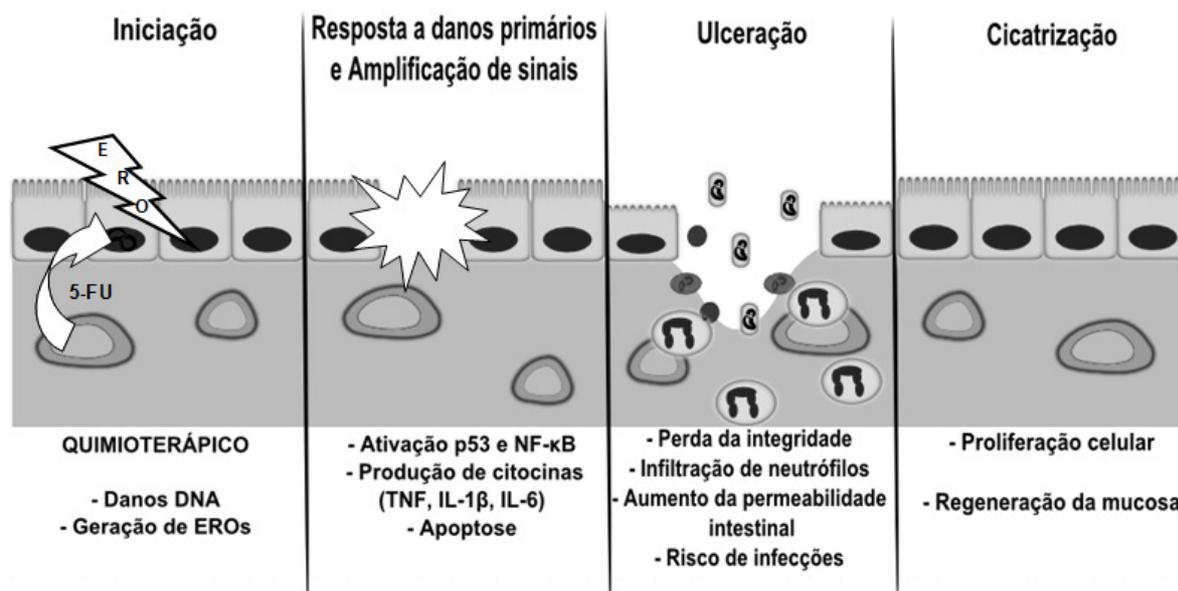


Figura 2 – Fases da mucosite intestinal, baseada em SONIS (2004).

2.4.1 Fase de iniciação: espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico e estresse oxidativo

A primeira fase, denominada iniciação, ocorre logo após a administração do fármaco (Figura 2). O quimioterápico promove alterações no DNA que resultam em dano tecidual. Simultaneamente há geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004).

As EROs incluem radicais e não-radicais derivados do oxigênio. Alguns exemplos são o superóxido, peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e hidroperóxidos de lipídeos (SUZUKI; FORMAN; SEVANI, 1997). Alguns autores incluem o óxido nítrico (NO) no grupo, sendo citado como ERO (BETTERIDGE, 2000; NORDBERD e ARNÉR, 2001) ou mais especificamente como espécie reativa de nitrogênio (ERN) (HENSLEY *et al.*, 2000). O óxido nítrico será tratado com maiores detalhes adiante.

As EROs desempenham importante participação em diversas doenças, como diabetes, câncer, úlcera gástrica e colite. Em pequenas concentrações observam-se efeitos modulatórios na proliferação, adesão, apoptose celular e quimiotaxia, por meio da regulação de fatores de transcrição (SUZUKI; FORMAN; SEVANI, 1997; MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004).

As células possuem sistema de defesa antioxidante, que pode atuar na detoxificação do agente antes da lesão ou na reparação da lesão ocorrida, com objetivo de protegerem-se do efeito da formação excessiva de EROs (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). No entanto, quando há distúrbio no balanço entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, há o estresse oxidativo, que promove lesão tecidual, causando perda de função celular, apoptose ou necrose (BETTERIDGE, 2000; NORDBERD e ARNÉR, 2001).

Em geral, o estresse oxidativo pode ser avaliado pela mensuração dos produtos das reações de dano oxidativo, como por exemplo as reações de peroxidação lipídica, oxidação do DNA e oxidação proteica. Um dos principais alvos das EROs são os lipídeos das membranas celulares, sendo a peroxidação lipídica a forma de avaliação de estresse oxidativo mais estudada, podendo ser mensurada pela concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das quais o malondialdeído (MDA) – um dos produtos da peroxidação lipídica – é a principal. Pode-se utilizar ainda a quantificação de hidroperóxidos de lipídeos (BETTERIDGE, 2000; SUN *et al.*, 2000; MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004; LEONEL, 2012; FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

A geração de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo são os eventos primários do desenvolvimento da mucosite, afetando diretamente células e tecidos (SONIS *et al.*, 2004; MAEDA *et al.*, 2010). A mucosa tem aparência normal na fase de iniciação, no entanto começam a ocorrer diversas alterações na submucosa (SONIS, 2004).

Células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e monócitos possuem a capacidade de produzir EROs (SONIS *et al.*, 2004). No entanto, acredita-se que a geração de EROs na fase de iniciação aconteça diretamente pela ação dos quimioterápicos, e que o estresse oxidativo seja evidenciado em fases posteriores. Miyazono; Gao; Horie (2004) e Maeda *et al.* (2010) verificaram que o aumento da produção de EROs ocorre principalmente 24 horas após a indução da mucosite, enquanto o aumento da peroxidação lipídica e do infiltrado de neutrófilos no tecido ocorre somente 48 horas após a administração do quimioterápico.

Relata-se ainda a participação do estresse oxidativo na ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (MAEDA *et al.*, 2010) e na regulação da permeabilidade intestinal (RAO *et al.*, 2002; SHETH *et al.*, 2003), assuntos que serão tratados adiante.

2.4.2 Fase de resposta a danos primários: fatores de transcrição e citocinas

Na segunda fase, denominada resposta a danos primários, ocorrem diversos eventos simultaneamente (Figura 2). Os danos causados ao DNA pelo quimioterápico, EROs e espécies reativas de nitrogênio promovem ativação de fatores de transcrição como p53 – relacionado à regulação do ciclo celular e apoptose – e NF- κ B – envolvido na regulação da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (SONIS *et al.*, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; MAEDA *et al.*, 2010).

Pritchard *et al.* (1998) observaram em camundongos tratados com 5-FU a ativação de p53 com consequente perda da integridade das criptas intestinais. Os autores acreditam que a atuação do fator de transcrição na mucosite resulta principalmente em inibição da proliferação celular e não somente em apoptose. Gibson *et al.* (2005) observaram aumento da apoptose logo após a indução da mucosite por MTX em ratos (provavelmente durante a fase de iniciação), não associada ao aumento da expressão de p53. Os autores acreditam que a apoptose mediada por p53 ocorra posteriormente, uma vez que observou-se aumento da expressão do fator de transcrição 24 horas após a indução.

Chang *et al.* (2012) sugerem que NF- κ B é a principal molécula envolvida na mucosite induzida por 5-FU, após a observação de que a inibição da atividade de NF- κ B promove supressão da inflamação e melhora do dano à mucosa. A ativação de NF- κ B age na regulação da expressão de diversos genes, a maioria dos quais potencialmente exercem efeito na toxicidade da mucosa, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 β e IL-6. Níveis aumentados dessas citocinas resultam em dano tecidual e apoptose (SUZUKI; FORMAN; SEVANI, 1997; SONIS *et al.*, 2004; SULTANI *et al.*, 2012). Além disso, a ativação de NF- κ B e de citocinas inflamatórias estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), com consequente produção de NO (AKTAN, 2004; LEITÃO *et al.*, 2011).

2.4.3 Fase de amplificação de sinal

Na terceira fase, de amplificação de sinal (Figura 2), a presença das citocinas pró-inflamatórias, além de causar danos ao tecido, age indiretamente na amplificação do sinal, ativando vias que aumentam a produção de citocinas e o estresse oxidativo, agravando o dano tecidual e a apoptose. O epitélio começa a perder a integridade, o que é agravado na próxima fase (SONIS *et al.*, 2004).

2.4.4 Fase de ulceração: infiltrado celular e permeabilidade intestinal

Na quarta fase, de ulceração, há perda da integridade da mucosa (Figura 2). As alterações morfológicas são percebidas nesta fase (SONIS *et al.*, 2004). Keefe *et al.* (2000) observaram redução na área das vilosidades em humanos, quando utilizaram diversos quimioterápicos. Ferreira *et al.* (2012) observaram alteração na arquitetura da mucosa, com redução do comprimento do intestino delgado, redução das vilosidades e presença de ulcerações, na mucosite induzida por 5-FU. Utilizando o mesmo fármaco, Soares *et al.* (2013) observaram encurtamento das vilosidades e aumento da profundidade das criptas.

A presença de infiltrado polimorfonuclear também é característica dessa fase (SONIS *et al.*, 2004). A ativação de NF- κ B e os produtos das reações das EROs promovem aumento de moléculas de adesão, levando à atração de neutrófilos circulantes, estimulando a produção de oxidantes por essas células (VAN YE *et al.*, 1993).

Os neutrófilos são as primeiras células ativadas na defesa do organismo contra infecções, migrando por quimiotaxia até o local da infecção, reconhecendo, fagocitando e destruindo antígenos pela liberação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas e, de EROs (SAVILL *et al.*, 1989; SMITH, 1994; MARTINS, 2010). A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), encontrada especialmente em neutrófilos, pode ser utilizada para avaliar a infiltração de neutrófilos, sendo amplamente utilizada em estudos de mucosite intestinal (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990; O'BRIEN, 2000; MELO, 2007; SOARES *et al.*, 2008; LEITÃO *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2012). Ferreira *et al.* (2012) e Soares *et al.* (2013) relataram a associação da mucosite intestinal induzida por 5-FU à infiltração de neutrófilos e aumento de citocinas pró-inflamatórias.

Macrófagos são células que atuam na defesa do organismo, promovendo fagocitose de partículas estranhas ou antígenos, liberando citocinas e ativando outras células imunológicas, além de favorecer a homeostase do tecido retirando células, como neutrófilos, em apoptose (GEISSMANN *et al.*, 2010). A infiltração de macrófagos nos tecidos pode ser avaliada indiretamente pela atividade da enzima *n*-acetilglicosaminidase (NAG), que está presente no lisossomo de macrófagos ativados e pode ser facilmente quantificada (BAILEY, 1988).

Os eosinófilos são leucócitos formados e maturados na medula óssea e liberados na circulação. São recrutados em resposta a estímulo inflamatório, migrando da circulação para o tecido alvo da infecção, onde podem liberar citocinas inflamatórias e quimiocinas. Essas células também atuam como apresentadoras de antígenos, ativando mastócitos e células T (ROTHENBERG; HOGAN, 2006). A peroxidase de eosinófilos (EPO) é bastante empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos. A enzima é liberada quando o eosinófilo é estimulado, agindo na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis por morte celular via apoptose ou necrose (STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985; ZABUCCHI *et al.*, 1990; ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Ainda na fase de ulceração observa-se favorecimento da colonização bacteriana devido à presença de ulcerações. Produtos da parede celular dos microrganismos podem ativar células inflamatórias no tecido, levando à produção de maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Esta é a fase de maior preocupação no processo de mucosite, devido ao aumento do risco de bacteremia e sepse após enfraquecimento da barreira intestinal (SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2007; LINDSAY *et al.*, 2010).

A permeabilidade intestinal relaciona-se à função de barreira exercida pelo epitélio, referindo-se à facilidade com a qual o epitélio permite a passagem de moléculas por difusão simples, independente do gradiente de concentração ou de pressão e, sem o auxílio de um sistema carreador. O termo relaciona-se ainda à passagem de substâncias com peso molecular acima de 150 daltons (Da) (TRAVIS e MENZIES, 1992).

As junções firmes e as junções aderentes formam barreira seletiva à difusão de macromoléculas por meio do epitélio. Enquanto as junções firmes formam barreira física à difusão pelo espaço paracelular, as junções aderentes podem regular

indiretamente a estrutura e função das junções firmes. Na manutenção da barreira intestinal estão envolvidos diversos componentes, como as proteínas de membrana e do citoesqueleto, que formam e regulam essas junções entre as células (RAO *et al.*, 2002; MUSCH; WALSH-REITZ; CHANG, 2006).

Nas junções firmes encontram-se proteínas transmembrana e citoplasmáticas. Entre as proteínas transmembrana pode-se citar a ocludina, as claudinas e a molécula de adesão junctional (JAM). As principais proteínas citoplasmáticas são as proteínas da zônula ocludente (ZO)-1, ZO-2 e ZO-3, que se ligam ao domínio intracelular da ocludina. A interação entre ocludina e ZO-1 desempenha papel crucial na manutenção da estrutura das junções firmes e da função de barreira (RAO *et al.*, 2002).

As principais proteínas das junções aderentes são a E-caderina (transmembrana) e as cateninas (citoplasmáticas). A ligação da β -catenina a E-caderina é de extrema importância na manutenção da estrutura das junções aderentes (RAO *et al.*, 2002).

Segundo Chin e Parkos (2007) a alteração dos componentes das junções firmes e aderentes durante a infiltração de neutrófilos parece ser o principal mecanismo para aumento da permeabilidade intestinal. As junções firmes são mantidas durante a migração dos neutrófilos até o tecido, porém a partir da intensa infiltração celular ocorre dano à integridade do epitélio (MAEDA *et al.*, 2010). Edens *et al.* (2002) observaram em modelo *in vitro* que os neutrófilos iniciam importantes eventos de sinalização nas células epiteliais, resultando em alteração da permeabilidade paracelular e fosforilação de proteínas das junções firmes.

A produção de EROs pelas células inflamatórias pode ser uma das vias de alteração da permeabilidade intestinal. Rao *et al.* (2002) e Sheth *et al.* (2003), estudando o efeito do estresse oxidativo nas proteínas das junções firmes e aderentes observaram aumento da permeabilidade intestinal pela dissociação dos complexos ocludina-ZO-1 e E-caderina- β -catenina, promovida pela fosforilação da tirosina nessas proteínas. Os autores relacionaram os resultados à ativação de tirosinoquinase e phosphatidylinositol 3-quinase pelas EROs.

Wu, L. *et al.* (2011) verificaram que o aumento na expressão de iNOS, com consequente aumento na produção de óxido nítrico promove ruptura das junções firmes e fosforilação da miosina em enterócitos. As citocinas pró-inflamatórias também

têm sido relacionadas ao aumento da permeabilidade intestinal (SHEN, 2012; SUZUKI, 2013).

A avaliação da permeabilidade intestinal pode ser realizada por diversos métodos, geralmente avaliando-se a excreção urinária de moléculas de teste. Existem três principais grupos de testes, de acordo com o substrato utilizado: açúcares, polímeros de polietilenoglicol (PEG) e isótopos. Dentre os isótopos pode-se citar o ^{51}Cr ligado ao ácido etilendiaminotetracético (EDTA) – $^{51}\text{Cr-EDTA}$ – e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ligado ao fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) – $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ (TRAVIS e MENZIES, 1992; BJARNASON; MACPHERSON; HOLLANDER, 1995; CAMILLERI *et al.*, 2012).

O $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ tem peso molecular de 492 Da, o que em condições normais não atravessa a barreira intestinal (COUSINS *et al.*, 1997). Além da detecção da radioatividade via excreção urinária, tem sido utilizada em diversos trabalhos a detecção no plasma para avaliação da permeabilidade intestinal (JØRGENSEN *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2010, GENEROSO *et al.*, 2011, BATISTA *et al.*, 2012), inclusive na mucosite intestinal induzida por 5-FU (FERREIRA *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm relacionado a mucosite ao aumento da permeabilidade intestinal. Em camundongos recebendo 5-FU, Monteiro (2006) e Ferreira *et al.* (2012) observaram aumento da permeabilidade intestinal, assim como Maeda *et al.* e Hamada *et al.* (2010) em mucosite induzida por MTX em ratos e, Choi *et al.* (2007) avaliando a permeabilidade intestinal em pacientes recebendo 5-FU e leucovorina.

2.4.5 Fase de cicatrização

Na maioria dos casos a resolução da mucosite ocorre espontaneamente, com o fim do tratamento. Na última fase, denominada cicatrização, há proliferação celular, regeneração da mucosa e restabelecimento da microbiota (Figura 2). No entanto o risco de novo episódio de mucosite é maior, uma vez que a mucosa foi alterada profundamente (SONIS *et al.*, 2004).

2.4.6 Avaliação, prevenção e tratamento

Há limitado número de instrumentos para avaliação da mucosite intestinal. As escalas utilizadas geralmente são baseadas em características indiretas da mucosite, como a diarreia, que pode ser causada por outras condições e intervenções, dificultando a interpretação (PETERSON *et al.*, 2011).

Segundo Keefe (2007) a escala *National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)* – NCI/CTCAE, utilizada na avaliação da mucosite oral, provavelmente seja a mais adequada para avaliação da mucosite intestinal. A escala vai de assintomática (1) a morte (5), de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas. A última versão (4.03) foi publicada em 2010 (NCI, 2010).

Os avanços no estudo da mucosite nos últimos anos possibilitaram, além de melhor compreensão dos mecanismos moleculares, possíveis formas de prevenção e tratamento (PETERSON *et al.*, 2011). Fatores de crescimento, citocinas e antagonistas, além de probióticos e diversos nutrientes são alguns dos alvos de estudo na área (VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006; KEEFE, 2007; SULTANI *et al.*, 2012).

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF ou palifermina) tem apresentado efeitos benéficos na mucosite oral (REDDING, 2005; VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006; KEEFE *et al.*, 2007; PETERSON *et al.*, 2011). Na mucosite intestinal por MTX, GIBSON *et al.* (2002a) não encontraram efeito na proteção ou melhora da mucosa. No entanto, Gibson; Bowen; Keefe (2005) avaliando o uso do fator de crescimento na mucosite intestinal induzida por irinotecano observaram prevenção da apoptose, redução da diarreia e da mortalidade.

Gibson *et al.* (2002b) observaram o efeito de IL-11 na atenuação da mucosite intestinal induzida por MTX, com manutenção da arquitetura da mucosa e indução da proliferação celular. Han *et al.* (2011) verificaram redução da apoptose nas criptas intestinais, da perda de peso e diarreia, além de promoção da proliferação e regeneração da mucosa com a utilização da citocina CXCL9 em camundongos que receberam 5-FU. Também na mucosite induzida por 5-FU em camundongos, Wu, Z. *et al.* (2011) utilizando antagonista do receptor de IL-1, que reduz os efeitos da IL-1 β , observaram proteção contra apoptose e, favorecimento da recuperação da mucosa.

Utilizando *Streptococcus thermophilus* TH-4 como probiótico em ratos tratados com 5-FU, Whitford *et al.* (2009) não observaram melhora da mucosite. Já PRISCIANDARO *et al.* (2012) avaliando o efeito dos sobrenadantes de *Escherichia coli* Nissle 1917 e *Lactobacillus rhamnosus* GG em células intestinais *in vitro* que receberam 5-FU concluíram que o pré-tratamento com probióticos preveniu ou inibiu a apoptose e a perda da função da barreira intestinal.

Daniele *et al.* (2001) avaliaram o efeito de suplemento oral de glutamina em pacientes em tratamento com 5-FU e ácido folínico, observando melhora na absorção e permeabilidade intestinal. Cheah *et al.* (2009) testaram o extrato de semente de uva (rico em flavonóides) em animais tratados com 5-FU e observaram redução do dano intestinal, com melhora dos parâmetros histológicos e redução da atividade de MPO. Ferreira *et al.* (2012), em trabalho realizado no mesmo laboratório do presente estudo verificaram, com o uso de butirato (ácido graxo de cadeia curta) melhora dos parâmetros histológicos, redução da atividade de MPO, da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da permeabilidade intestinal em camundongos tratados com 5-FU.

Dentre os compostos citados anteriormente, somente a palifermina é recomendada nos casos de mucosite oral pelo *Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society for Oral Oncology (ISOO)*. Apesar das diversas formas de prevenção e tratamento estudadas, novos estudos são necessários (KEEFE *et al.*, 2007; PETERSON *et al.*, 2011) e o efeito benéfico de outras substâncias na mucosite intestinal pode ser encontrado.

A L-arginina pode ser uma dessas substâncias, já tendo inclusive sido estudada na mucosite intestinal por MTX. Koppelman *et al.* (2012) observaram melhora dos parâmetros histológicos, redução da apoptose e favorecimento da recuperação da mucosa intestinal com a utilização do aminoácido por via oral. Sendo assim, a L-arginina torna-se importante objeto de estudo na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

2.4.7 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

O modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU é encontrado na literatura com a utilização de diferentes espécies, doses e períodos de administração do fármaco (PRITCHARD *et al.* 1998; VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2003; SOARES, 2008; STRINGER *et al.*, 2009). Em nosso laboratório utiliza-se o modelo adotado por Ferreira *et al.* (2012), com achados bioquímicos e histológicos que confirmam a indução da mucosite. O modelo contempla dose única de 200mg/kg de peso por via intraperitoneal em camundongos *Swiss*, com eutanásia no terceiro dia após a indução.

2.5 L- arginina

2.5.1 Aspectos gerais

A arginina, aminoácido não-essencial de aspecto cristalino e branco, praticamente sem odor, de alto ponto de fusão, solúvel em água e sensível à luz (NOVAES; PANTALEÃO, 2005) é proveniente da dieta e de fontes endógenas. No entanto, durante estados catabólicos é considerado aminoácido condicionalmente essencial (NOVAES; PANTALEÃO, 2005; QUIRINO, 2006; PICANÇO *et al.*, 2011).

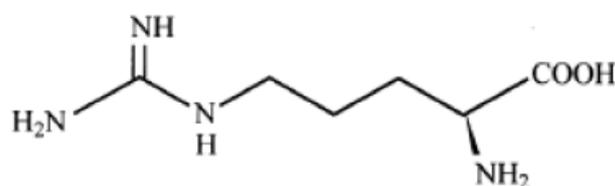


Figura 3 – Estrutura molecular da arginina

O aminoácido é um dos mais metabolicamente versáteis, participando da síntese de óxido nítrico, ureia, ornitina, citrulina, creatina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas (MORRIS, 2004). Possui múltipla e potente atividade secretagoga sobre

várias glândulas endócrinas, sendo secretagogo do hormônio do crescimento, da prolactina e da insulina. Estimula ainda a liberação de glucagon, polipeptídeo pancreático e catecolaminas, além de atuar estimulando o metabolismo do nitrogênio. Atribui-se à arginina também efeitos benéficos sobre a cicatrização de feridas operatórias, úlceras por pressão e queimaduras, sobre a melhora da função cardiovascular, na redução da pressão arterial, no mecanismo das defesas anti-tumor e no metabolismo e crescimento tumoral (TAPIERO *et al.*, 2002; NOVAES; PANTALEÃO, 2005; GRIMBLE, 2007).

A arginina tem sido bastante utilizada devido à participação na síntese da ureia, NO e creatina, o que a torna útil no tratamento de insuficiências do ciclo da ureia (hiperamonemia e a insuficiência hepática), deficiência na produção de NO e erros inatos da síntese de creatina que envolvem defeitos nas enzimas arginina:glicina amidinotransferase e guanidinoacetato metiltransferase (GRIMBLE, 2007).

As doses utilizadas em estudos de suplementação são bastante variadas, tanto em humanos quanto em animais. Poucos estudos abordam os possíveis efeitos adversos da utilização do aminoácido, porém nos trabalhos existentes não existem muitos relatos de efeitos adversos, denotando nível de segurança substancial na suplementação. A dose letal (DL₅₀), que indica a quantidade capaz de provocar a morte de 50% da população exposta (toxicidade aguda), é de 16g/kg para ratos, enquanto o nível de efeito adverso não observado (NOAEL) é de 3,6 g/kg também para ratos. Em humanos, o nível de segurança observado (OSL) ou maior ingestão observada (HOI) é de 20g/dia, embora já tenha sido utilizada a dose de 42g/dia sem efeitos adversos (GRASEMANN *et al.* 2005; GRIMBLE, 2007; SHAO e HATHCOCK, 2008).

2.5.2 Absorção

A absorção do aminoácido acontece principalmente no jejuno e íleo, envolvendo os sistemas de transporte B^{0,+} (dependente de Na⁺) e b^{0,+} (independente de Na⁺), além dos sistemas y⁺ L e y⁺. O sistema y⁺ L na falta de Na⁺ atua na troca de aminoácidos catiônicos, incluindo a arginina, enquanto na presença de Na⁺ atua na troca de aminoácidos catiônicos intracelulares. No entanto o transporte de arginina é realizado predominantemente pelo sistema y⁺, independente de Na⁺, do qual fazem parte os

transportadores de aminoácidos catiônicos (CATs) (CYNOBER; LE BOUCHER; VASSON, 1995; HALLEMEESCH *et al.*, 2002; PAN *et al.*, 2004)

Após a absorção o aminoácido pode ser metabolizado pelo enterócito ou transportado pela membrana basal até a circulação, na forma de metabólitos ou arginina livre (PAN *et al.*, 2004). A biodisponibilidade de doses orais varia entre 21% e 68%, dependendo do método experimental (GRIMBLE, 2007). Níveis plasmáticos máximos são percebidos em aproximadamente duas horas após administração oral (ILEYLAND *et al.*, 2001). Alterações no transporte da arginina pela borda em escova refletem diretamente no estado do metabolismo do aminoácido tanto no enterócito quanto no restante do organismo (PAN *et al.*, 2004).

2.5.3 Catabolismo

O catabolismo da L-arginina pode ser realizado por quatro tipos de enzimas nos mamíferos: óxido nítrico sintases, arginases, arginina:glicina amidinotransferase e arginina descarboxilase (MORRIS, 2004).

2.5.3.1 Óxido nítrico sintases

As óxido nítrico sintases (NOS) metabolizam a L-arginina com a produção de óxido nítrico e citrulina (Figura 4). Existem pelo menos três tipos de NOS, agrupadas em duas categorias. Na categoria constitutiva, dependente de cálcio (Ca^{++}), fazem parte as formas neuronal (nNOS ou tipo I) e endotelial (eNOS ou tipo III). A óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou tipo II), independente de Ca^{++} , contempla a outra categoria (FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; BECK *et al.*, 2004; FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

A nNOS é expressa predominantemente em neurônios, sendo também encontrada em neutrófilos e miócitos, dentre outras células. Atua na regulação da transmissão sináptica, pressão arterial, peristaltismo e vasodilatação. A eNOS é expressa principalmente em células endoteliais, sendo também encontrada em cardiomiócitos, plaquetas e no epitélio dos túbulos renais. O óxido nítrico produzido pela enzima atua como vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária, além de reduzir a expressão de moléculas de adesão, prevenindo adesão leucocitária e

migração pela parede vascular. Embora sejam constitutivas, as duas formas podem ser moduladas por temperatura, isquemia e inflamação (BOUCHER; MOALI; TENU, 1999; BECK *et al.*, 2004).

A iNOS não é encontrada expressa usualmente em células, no entanto estímulos imunológicos como citocinas induzem a transcrição da enzima, que já foi detectada em células como macrófagos, hepatócitos, neutrófilos e células endoteliais. A presença de iNOS no intestino é esperada, uma vez que a mucosa intestinal é constantemente exposta a antígenos. O fator de transcrição NF- κ B regula a expressão da enzima. O óxido nítrico produzido pela iNOS tem função no controle de microrganismos, mas a produção exacerbada por macrófagos e neutrófilos pode contribuir para o dano tecidual (KUBES e McCAFFERTY, 2000; MARTÍN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001; AKTAN, 2004).

O óxido nítrico é importante molécula, envolvida na regulação de diversos mecanismos, fisiológicos ou não, tendo funções contrastantes no organismo (AKTAN, 2004). Apesar do papel do óxido nítrico na promoção do dano intestinal relatado em estudos como o de Leitão *et al.* (2011), outros estudos apontam a molécula como responsável pelos efeitos na melhora da mucosa (THOMAS *et al.*, 2001; ÖZTÜRK *et al.*, 2002).

2.5.3.2 Arginases

Existem duas isoformas de arginase em mamíferos, codificadas por diferentes genes, tendo distintas propriedades moleculares, distribuição e regulação da expressão. A arginase do tipo I, citosólica, é expressa principalmente no fígado como componente do ciclo da ureia, tendo ação na detoxificação da amônia e síntese de ureia e ornitina (Figura 4). Já a do tipo II, mitocondrial, é expressa em níveis menores nos rins, cérebro, intestino delgado, células endoteliais e macrófagos, envolvida na síntese de ornitina, prolina e glutamato (TAPIERO *et al.*, 2002; FLYNN *et al.*, 2002; MORRIS, 2004).

Devido a utilização da L-arginina por NOS e arginase, a atividade de uma das enzimas pode ter efeito regulatório sobre a outra. Dependendo da concentração local de arginase possivelmente pode ocorrer competição com NOS pelo substrato, com

redução da disponibilidade de arginina para a síntese de NO. Porém, deve-se considerar que a atividade da arginase nem sempre pode ser elevada o suficiente para limitar a síntese de NO (HALLEMEESCH *et al.*, 2002; MORRIS, 2007).

2.5.3.3 Arginina:glicina amidinotransferase e arginina descarboxilase

A enzima arginina:glicina amidinotransferase (AGAT) catalisa a reação inicial da síntese de creatina, com a combinação de arginina e glicina formando guanidinoacetato e ornitina (Figura 4). Na segunda reação, catalizada pela guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT), guanidinoacetato é metilado formando S-adenosilhomocisteína e creatina (Figura 4). A creatina é então liberada pelo fígado e alcança os tecidos utilizando transportador específico (MORRIS, 2004; BROSNAN e BROSNAN, 2004; COMAN; YAPLITO-LEE; BONEH, 2008).

O catabolismo da L-arginina ainda compreende a síntese de agmatina com a liberação gás carbônico (CO₂), reação catalisada pela enzima mitocondrial arginina descarboxilase (ADC) (Figura 4). A agmatina é então descarboxilada pela agmatinase (enzima mitocondrial) com a formação de poliaminas, sendo considerada essa uma via menor de produção de poliaminas (FLYNN *et al.*, 2002; MORRIS, 2004). A agmatina ainda regula a produção de NO aumentando a atividade de nNOS e eNOS e, reduzindo a atividade de iNOS (NIEVES JR. e LANGKAMP-HENKEN, 2002).

2.5.3.4 Poliaminas

A ornitina proveniente do catabolismo da arginina pode, além de participar do ciclo da ureia e da síntese de citrulina (Figura 4) e prolina, servir como substrato para a enzima ornitina descarboxilase (ODC) na reação inicial da produção de poliaminas (MORRIS, 2007). O termo poliaminas é utilizado para classificar compostos derivados da ornitina, conhecidos como putrescina, espermidina e espermina. A agmatina, derivada da L-arginina, também serve de substrato para a síntese de poliaminas. Pertencem ao grupo das aminas biogênicas, envolvidas em diversas funções fisiológicas, principalmente imunológicas. Exercem importante função no crescimento e

proliferação celular, na adesão celular e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005).

A ação das poliaminas no crescimento e desenvolvimento intestinal e na recuperação da mucosa está bem relatada na literatura (LÖSER *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2002; MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005). Gao *et al.* (2002) observaram redução de espermidina e espermina na mucosite intestinal induzida por MTX, com retorno aos níveis normais após tratamento, sugerindo participação das poliaminas na recuperação da mucosa. Rhoads *et al.* (2004) verificaram que o tratamento com L-arginina em células intestinais *in vitro* promoveu aumento da migração de enterócitos (destinados ao reparo de lesões) dependente da produção de NO e poliaminas.

A participação das poliaminas na regulação da permeabilidade intestinal também é relatada. Guo *et al.* (2003) e Liu *et al.* (2009) observaram que as moléculas são requeridas para a expressão das proteínas das junções aderentes, como a E-caderina. As poliaminas podem regular também a expressão de ocludina, proteína da junção firme, como verificado por Guo *et al.* (2005).

A regulação da produção de poliaminas se dá pela concentração de ornitina, mas principalmente pela concentração de arginina (depleção promove inibição do influxo de putrescina). Outras moléculas envolvidas são o óxido nítrico, que pode inibir a atividade de ODC, e a agmatina, que pode modular as concentrações intracelulares de poliaminas reduzindo a atividade de ODC (NIEVES JR. e LANGKAMP-HENKEN, 2002; MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005). As enzimas envolvidas nas vias de síntese de ornitina também exercem regulação, principalmente a arginase, devido a maior atividade da enzima em relação à de arginina descarboxilase, exercendo impacto muito maior na produção de poliaminas (FLYNN *et al.*, 2002; MORRIS, 2004).

2.5.4 Síntese

Grande parte da síntese de arginina ocorre nos rins, a partir da citrulina produzida no intestino pelo metabolismo de outros aminoácidos (prolina, glutamina, glutamato) (Figura 4). Nos túbulos renais a citrulina é convertida a arginina pela ação das enzimas argininosuccinato sintetase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL)

(CYNOBER; LE BOUCHER; VASSON, 1995; WU e MORRIS, 1998; BROSANAN e BROSANAN, 2004, NOVAES e PANTALEÃO, 2005; WU *et al.*, 2009).

A citrulina também pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos (FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; QUIRINO, 2006; VIANA, 2010). A arginina também é sintetizada no fígado pelo ciclo da ureia, porém devido a alta atividade da arginase há rápida hidrólise do aminoácido (FLYNN *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2009).

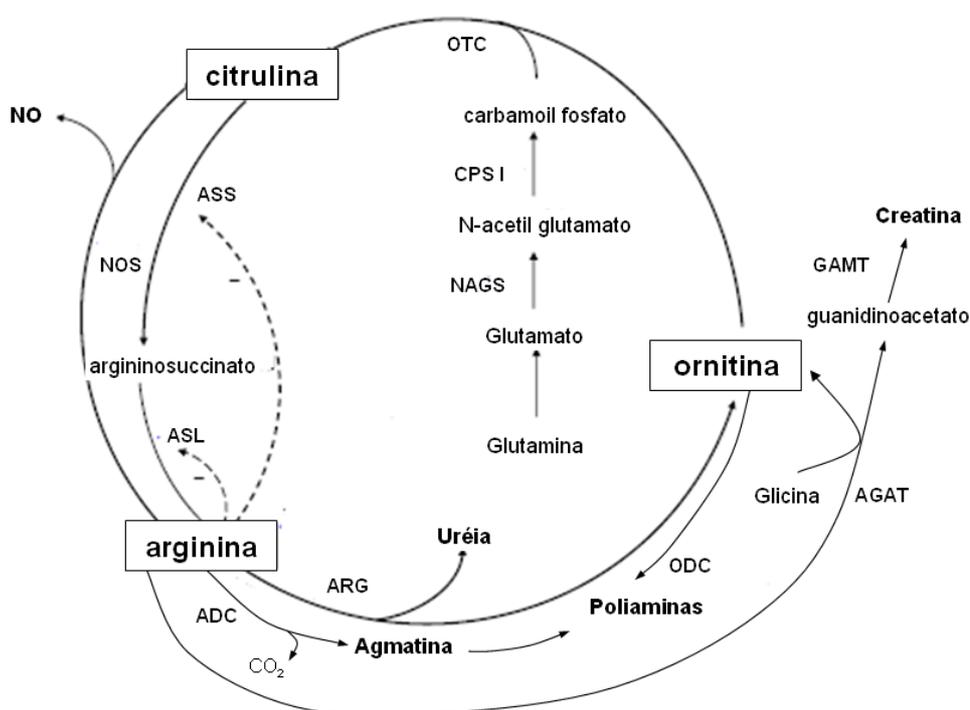


Figura 4 – Metabolismo da L-arginina. Modificado de COMAN; YAPLITO-LEE; BONEH (2008). As enzimas que utilizam a L-arginina como substrato são a arginase (ARG), óxido nítrico sintase (NOS), arginina:glicina aminotransferase (AGAT) e arginina descarboxilase (ADC). As outras enzimas citadas são N-acetil glutamato sintetase (NAGS), carbamoil fosfato sintetase (CPS), ornitina transcarbamilase (OTC), argininosuccinato sintase (ASS), argininosuccinato liase (ASL) e guanidinoacetato metiltransferase (GAMT). Óxido nítrico (NO).

2.5.5 L-arginina e mucosa intestinal

A ação das moléculas de NO e poliaminas, assim como as vias metabólicas que envolvem a L-arginina nas alterações da mucosa intestinal, fazem com que seja importante o estudo do aminoácido, no intestino. Nesse sentido, diversos trabalhos relacionam a utilização do aminoácido à manutenção e recuperação da mucosa intestinal. Öztürk *et al.* (2002) observaram, em modelo de Síndrome do intestino curto tratado com L-arginina, melhora da mucosa com aumento das vilosidades. Thomas *et al.* (2001) verificaram que a administração de L-arginina promoveu proteção do dano intestinal induzido por laparotomia e manipulação intestinal. Em modelo de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) a arginina foi relacionada à melhora dos parâmetros avaliados, com redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento da migração de células epiteliais (COBURN *et al.*, 2012).

A ação do aminoácido na permeabilidade intestinal também é relatada na literatura. Schleiffer e Raul (1996) estudando o pré-tratamento com esse aminoácido na lesão causada por isquemia/reperfusão, em ratos, observaram melhora da barreira intestinal. Viana *et al.* (2010), avaliando a arginina na translocação bacteriana, verificaram que a mesma pode evitar a ruptura do epitélio intestinal e reduzir a permeabilidade do intestino. Quirino *et al.* (2007, 2012) associaram a arginina à melhora da permeabilidade intestinal e redução da translocação bacteriana em modelo de obstrução intestinal.

Especificamente em modelo de mucosite intestinal, observou-se que o aminoácido acelera a regeneração da mucosa intestinal em mucosite induzida por radiação em ratos (GURBUZ; KUNZELMAN; RATZER, 1998). Segundo Ersin *et al.* (2000) a arginina parece exercer efeitos benéficos sobre o intestino por meio do aumento da secreção de imunoglobulinas, do estímulo à deposição de colágeno e, logo, melhor cicatrização. Além disso, interfere na manutenção da morfologia intestinal e na modulação da resposta imunológica. Nesse estudo, verificou-se melhora no aspecto da mucosa intestinal após mucosite induzida por radiação, em animais que utilizaram dieta suplementada com arginina. Ainda, cita-se novamente o estudo de Koppelman *et al.* (2012), que demonstrou a ação da L-arginina na melhora da mucosite induzida por MTX.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar, em camundongos, os efeitos do pré-condicionamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil.

3.2 Objetivos específicos

- Observar os efeitos da L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-FU a partir da avaliação de:
 - consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos;
 - peso;
 - comprimento intestinal;
 - análise histológica e escore histopatológico da mucosa intestinal;
 - estresse oxidativo no intestino delgado por meio da medida da peroxidação lipídica via substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da concentração de hidroperóxidos;
 - infiltrado celular intestinal por meio da medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), n-acetilglicosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO);
 - permeabilidade intestinal por meio da utilização do fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com ^{99m}Tc .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos machos da linhagem *Swiss*, com idade inicial entre quatro e oito semanas, peso inicial entre 20g e 30g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados. O experimento foi realizado no biotério Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, que dispõe de controle de temperatura (entre 20°C e 22°C), sendo os animais expostos a ciclos de luminosidade (claro-escuro de 12 horas).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo de pesquisa n° 231/2011.

4.2 Delineamento experimental

Os camundongos foram mantidos em gaiolas coletivas (três ou quatro por gaiola) durante todo o experimento. Os animais foram distribuídos em quatro grupos iniciais, a saber:

- **Grupo Controle:** 12 animais que receberam ração comercial, água filtrada e suplementada com 2% de L-alanina (controle isoproteico) durante todo o experimento e que foram submetidos a eutanásia no 10º dia;
- **Grupo ARG:** 14 animais que receberam ração comercial, água filtrada e suplementada com 2% de L-arginina durante todo o experimento e que foram submetidos a eutanásia no 10º dia;
- **Grupo 5-FU:** 12 animais que receberam ração comercial, água filtrada e suplementada com 2% de L-alanina (controle isoproteico) durante todo o experimento e que foram submetidos à indução de mucosite intestinal no 7º dia, seguida por eutanásia no 10º dia;

- **Grupo ARG 5-FU:** 14 animais que receberam ração comercial, água filtrada e suplementada com 2% de L-arginina (durante todo o experimento) e que foram submetidos à indução de mucosite intestinal no 7º dia, seguida por eutanásia no 10º dia.

A L-alanina é amplamente utilizada como controle isoproteico (KOHLI *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2009; WIJNANDS *et al.*, 2012), inclusive no estudo da mucosite intestinal (BOUKHETTALA *et al.*, 2010), o que justifica a inclusão do aminoácido no presente trabalho com este objetivo. No entanto, visando minimizar dúvidas a respeito de possível influência do aminoácido sobre os resultados, foram adicionados os seguintes grupos:

- **Grupo Controle sem ALA:** 6 animais que receberam ração comercial, água filtrada sem suplementação (durante todo o experimento) e que foram submetidos a eutanásia no 10º dia;
- **Grupo 5-FU sem ALA:** 7 animais que receberam ração comercial, água filtrada sem suplementação (durante todo o experimento) e que foram submetidos à indução de mucosite intestinal no 7º dia seguida por eutanásia no 10º dia.

Optou-se pela realização de análises de menor número de parâmetros para os dois grupos acima, o que será abordado adiante. Os dados dos grupos Controle sem ALA e 5-FU sem ALA serão utilizados para comparação com os grupos Controle e 5-FU, respectivamente.

4.3 Ração comercial e água suplementada

Os animais receberam ração comercial (Tabela 1) durante todo o experimento. A água foi suplementada com 2% de L-alanina ou L-arginina, de acordo com o grupo experimental (KOPPELMANN *et al.*, 2012). Aspectos referentes ao controle da ingestão alimentar e hídrica serão abordados adiante.

Tabela 1 - Composição centesimal: ração comercial

Macronutriente	Percentual
Carboidratos	27,6%
Proteínas	23,0%
Lipídios	4,3%

Fonte: Informações do fabricante

4.4 Modelo experimental de mucosite intestinal

A mucosite intestinal foi induzida no 7^o dia experimental, com dose única intraperitoneal, 200mg/kg (peso do animal) de 5-FU (Faldfluor®, Libbs). Os animais dos grupos sem indução de mucosite receberam o mesmo volume de solução PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), também por via intraperitoneal.

4.5 Eutanásia dos animais

Ao término do experimento (10^o dia), os animais foram anestesiados com solução de ketamina (60mg/kg) e xilazina (8mg/kg). Após anestesia, foi realizada exsanguinação pelo plexo axilar seguida por deslocamento cervical. Foi realizada incisão abdominal longitudinal para remoção do intestino delgado.

4.6 Parâmetros avaliados

4.6.1 Consumo alimentar e consumo hídrico

O consumo alimentar e hídrico foi avaliado no 7^o e 10^o dias, por meio da diferença entre peso da dieta/água ofertada e peso da dieta/água referente à sobra (para ração e bebedouros) e no fundo das gaiolas (para balanço alimentar). O peso de sobra de ração, bebedouros e fundo de gaiolas foi aferido em balança semi-analítica.

O valor de ingestão por animal foi estimado por média aritmética, devido ao uso de gaiolas coletivas.

4.6.2 Evolução de peso

Os animais foram pesados em balança semi-analítica nos seguintes momentos experimentais:

- No início do experimento – 1º dia experimental;
- Antes da administração do quimioterápico – 7º dia experimental;
- Após administração do quimioterápico – 10º dia experimental.

Foi avaliada a variação de peso, em gramas, (ganho ou perda de peso antes e após a indução da mucosite).

4.6.3 Comprimento intestinal

O comprimento do intestino delgado compreendeu a porção distal à incisão sobre o piloro até a válvula íleo-cecal. O órgão foi lavado e perfundido com PBS. O intestino delgado foi medido com régua milimetrada após lavagem e secagem com papel filtro para remoção do excesso de umidade.

4.6.4 Análise histológica e escore histopatológico

O intestino delgado foi dividido em porções anatômicas, conforme proposto por Ferraris e Vinnakota (1995), com o duodeno correspondendo a 20%, o jejuno a 60% e o íleo a 20% do comprimento total. Após retirada dos fragmentos para as análises de estresse oxidativo e infiltrado celular, que serão tratadas adiante, o jejuno foi dividido em jejuno proximal e distal. As porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) foram identificadas na região proximal e perfundidas com solução de paraformaldeído 4%, para fixação do tecido.

Posteriormente as porções foram fixadas em solução de formol 10% por sete dias. Em seguida, os tecidos foram transferidos para recipientes com álcool 70%, no qual permaneceram até o momento da inclusão em parafina. Foram então realizadas secções histológicas de 5 µm em micrótomo *Spencer*. Os cortes foram colocados em lâminas, posteriormente coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas por patologista que desconhecia os tratamentos aos quais os animais foram submetidos. Foram utilizadas imagens digitalizadas, obtidas com objetiva de 10x a partir de microscópio de luz (*Olympus*) adaptado com câmera digital (*Moticon*). O escore histopatológico foi determinado considerando-se a medida da altura das vilosidades, a intensidade do infiltrado mononuclear e polimorfonuclear na lâmina própria, as mudanças na arquitetura da mucosa, e a presença de ulceração. Para cada parâmetro foi utilizada a classificação de acordo com a seguinte escala: ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). O escore histopatológico contemplou o número total correspondente à soma de valores para cada parâmetro avaliado, em cada porção intestinal analisada (Adaptado de SOARES *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012). A medida da altura das vilosidades foi realizada a partir de analisador de imagem computadorizado (*Image J*).

A análise não foi realizada nos grupos Controle sem ALA e 5-FU sem ALA.

4.6.5 Estresse oxidativo

Foi retirado 1cm de cada porção do intestino delgado para avaliação da peroxidação lipídica por TBARS e 1cm para avaliação da concentração de hidroperóxidos. Os fragmentos foram 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.

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

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 duodeno, jejuno e íleo (250µL cada). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e, então, colocadas em água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750µL de álcool butílico, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados à placa de 96 poços 200µL do sobrenadante, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no intestino delgado (LOWRY *et al.*, 1951).

- Avaliação da concentração de hidroperóxidos

Este ensaio foi feito com uma parte da solução FOX (preparado pela dissolução do xilenol laranja e do sulfato ferroso amoniacal em 250mM de H₂SO₄ para concentração final de 1 e 2,5mM, respectivamente) diluída em nove partes da solução de metanol contendo 4,4mM de BHT (hidroxitolueno butilado), obtendo-se, assim, o reagente FOX-2. Para as dosagens, aos sobrenadantes de duodeno, jejuno e íleo (20µL cada) foram acrescentados 180µL do reagente FOX-2, diretamente na microplaca, em duplicata. O branco foi alcançado pela utilização de 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.

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com trifenilfostina (TPP). Aos sobrenadantes de duodeno, jejuno e íleo (15µL cada) foram adicionados 5µL da solução de TPP em metanol (TPP a 10mM), diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando-se água deionizada. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, foram acrescentados 180µL do reagente FOX-2. As amostras foram mantidas novamente à temperatura ambiente por mais 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos, $4,3 \times 10^{-4}M^{-1}$, e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado produzido pelo xilenol *orange*, ao se ligar aos íons férricos, $1,5 \times 10^{-4}M^{-1}$. 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).

- Dosagem de Proteína

A dosagem da concentração de proteína nos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo foi feita de acordo com Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Para isso, em 250µL de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250µL da solução A (uma parte de sulfato de cobre, uma parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio) e 25µL de reagente de Folin-Ciocalteau diluído (1:2). Em seguida as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras (200µL) foram então adicionadas à placa de 96 poços e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 660nm. Os resultados foram expressos em mg/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão, feita com albumina.

A análise não foi realizada nos grupos Controle sem ALA e 5-FU sem ALA.

4.6.6 Avaliação do infiltrado celular

A avaliação do infiltrado celular intestinal foi realizada a partir da medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), n-acetilglicosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO), respectivamente presentes em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Foi retirado 1cm de cada porção (duodeno, jejuno e íleo) para a análise de MPO/NAG e 1 cm para a análise de EPO. As porções foram armazenadas em freezer -80°C, até o momento da análise.

A técnica para medida da atividade das enzimas MPO, NAG e EPO considera o peso da porção do órgão em estudo. Sendo assim, as amostras foram descongeladas

e pesadas em balança analítica para se adequar o volume dos reagentes de acordo com o peso da amostra.

Conforme descrito a seguir, a medida da atividade de cada enzima foi realizada por procedimentos distintos.

- Preparo de amostras para medida da atividade das enzimas NAG e MPO

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas 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 remanescente foi adicionado Buffer 2, em temperatura ambiente (proporção: 1,9mL/100mg de tecido). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e o volume igualmente dividido em tubos Eppendorf® para o ensaio de MPO e para o ensaio de NAG. A partir desse momento, as amostras receberam tratamentos distintos.

O ensaio de MPO contemplou amostras 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.

As amostras destinadas ao ensaio de NAG foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foi adicionada solução salina 0,9%/triton x-100 (Sigma-Aldrich®). Novamente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio enzimático.

- Ensaio enzimático: enzima MPO

Alíquota de 25µL de amostra foi adicionada à placa de 96 poços. Foram adicionados às amostras 25µL do substrato 3'3', 5'5' - tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®), previamente diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C, por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 100µL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço, e foi realizada nova incubação (37°C, por

cinco minutos). Foram adicionados 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4M para interromper a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm.

- Ensaio enzimático: enzima NAG

O ensaio enzimático contemplou 100µL de amostra que foram adicionados à placa de 96 poços. Em seguida, 100µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma-Aldrich®), previamente diluídos em tampão citrato/fostato, foram adicionados às amostras. Após incubação das mesmas (37°C por 10 minutos), foram adicionados 100µL (0,2 M, pH 10,6) de tampão glicina em cada poço para interromper a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400nm.

- Preparo de amostras e ensaio enzimático para medida da atividade da enzima EPO

A atividade da enzima peroxidase de eosinófilos foi avaliada por meio de amostras homogeneizadas em PBS, e em seguida, centrifugadas 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%. Novamente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado remanescente foi novamente suspenso com *hexadecyltrimethylamonium bromide* (HETAB) 0,5% diluído em PBS.

Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três 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 tal, 75µL das amostras foram adicionados à placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 75µL do cromógeno o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) (Sigma-Aldrich®) 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

50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorvância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm.

Os resultados de MPO, NAG e EPO foram expressos em unidades arbitrárias.

4.6.7 Estudo da permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal ocorreu no décimo dia experimental. Para isso, os animais receberam por gavagem 0,1mL de solução com o fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com 3,7 MBq ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc) sob a forma de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄), o qual foi obtido pelo gerador de ⁹⁹molibdênio/^{99m}tecnécio (IPEN/CNEM, São Paulo, Brasil). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados e submetidos à exsanguinação pelo plexo axilar. Foi reservada alíquota de 500 μ L de sangue, posteriormente submetida à determinação da radiação por meio de cintilador de poço automático (ANSR, Abbott®, EUA).

O padrão de dose, que correspondeu a 0,1mL da solução com fármaco ^{99m}Tc DTPA, foi também submetido à determinação da radiação. Os resultados foram comparados com o padrão de dose e, calculados em percentual de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose} = [(CPM \text{ do sangue} * 100) / CPM \text{ do padrão de dose}]$$

CPM = contagem por minuto

A análise não foi realizada nos grupos Controle sem ALA e 5-FU sem ALA.

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e quanto à presença de *outliers* pelo teste de *Grubbs* e pelo teste

de Box-plot. Dados que assumiram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA *One-way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*.

Para comparação entre os grupos Controle e 5-FU que recebem ou não L-alanina utilizou-se o teste t de *Student* não pareado (dados paramétricos) ou o teste de *Mann Whitney* (dados não-paramétricos).

Os resultados foram expressos como média e erro padrão ou em mediana e intervalo interquartil. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5,0®. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os grupos Controle e 5-FU suplementados ou não com L-alanina foram iguais considerando-se os parâmetros analisados (APÊNDICE A). Sendo assim, somente os dados dos grupos suplementados com L-alanina (Controle e 5-FU) foram utilizados para comparação com os demais grupos experimentais (ARG e ARG 5-FU).

5.1 Consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos

O consumo alimentar (Tabela 2), hídrico e de aminoácidos (Tabela 3) foi reduzido nos grupos que receberam 5-FU (5-FU e ARG 5-FU), quando comparados o período sem indução de mucosite (1º ao 7º dia) e após a indução (8º ao 10º dia). Avaliando cada período, o consumo até o 7º dia foi igual entre todos os grupos. No entanto, após a indução observou-se redução do consumo alimentar e hídrico no grupo ARG 5-FU.

Tabela 2 – Consumo alimentar

Grupo	g/kg de peso/dia	
	1º ao 7º dia	8º ao 10º dia
Controle	161,30 (142,20 – 183,90) A,a	131,60 (126,30 – 145,10) A,a
ARG	157,60 (140,80 – 180,40) A,a	130,40 (124,00 – 154,70) A,a
5-FU	164,40 (159,20 – 179,20) A,a	100,10 (93,58 – 111,70) B,ab
ARG 5-FU	157,10 (142,70 – 173,70) A,a	88,25 (79,15 – 100,20) B,b

Consumo alimentar até a indução da mucosite (1º ao 7º dia) e após a indução (8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) em uma mesma linha (maiúsculas) e em uma mesma coluna (minúsculas). Letras iguais em uma mesma linha (maiúsculas) ou coluna (minúsculas) representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 4$ para todos os grupos.

Tabela 3 – Consumo hídrico e de aminoácidos

Grupo	Consumo hídrico ¹		Consumo aminoácidos ²	
	(mL/kg peso/dia)		(g/kg peso/dia)	
	1º ao 7º dia	8º ao 10º dia	1º ao 7º dia	8º ao 10º dia
Controle	356,90 (318,70 – 409,7) A,a	358,60 (290,50 – 460,10) A,a	7,14 (6,37 – 8,19) A,a	7,17 (5,81 – 9,20) A,a
ARG	342,10 (309,90 – 367,70) A,a	322,50 (249,00 – 364,50) A,ab	7,22 (6,26 – 7,48) A,a	6,45 (4,98 – 7,29) A,ab
5-FU	365,40 (356,80 – 428,00) A,a	217,70 (185,80 – 254,10) B,ab	7,06 (6,83 – 8,54) A,a	4,35 (3,72 – 5,08) B,ab
ARG 5-FU	330,50 (306,20 – 338,90) A,a	161,30 (133,20 – 225,40) B,b	6,61 (6,12 – 6,78) A,a	3,23 (2,66 – 4,51) B,b

Consumo hídrico (1) e de aminoácidos (2) até a indução da mucosite (1º ao 7º dia) e após a indução (8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. representam diferença estatística ($p < 0,05$) em uma mesma linha (maiúsculas) e em uma mesma coluna (minúsculas). Letras iguais em uma mesma linha (maiúsculas) ou coluna (minúsculas) representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 4$ para todos os grupos.

5.2 Evolução de peso

Não houve diferença na variação de peso até a indução da mucosite, com ganho de peso em todos os grupos (Figura 5A). Após a indução observou-se perda de peso nos grupos 5-FU e ARG 5-FU. Houve diferença nesse período em relação aos grupos que receberam PBS (Figura 5B).

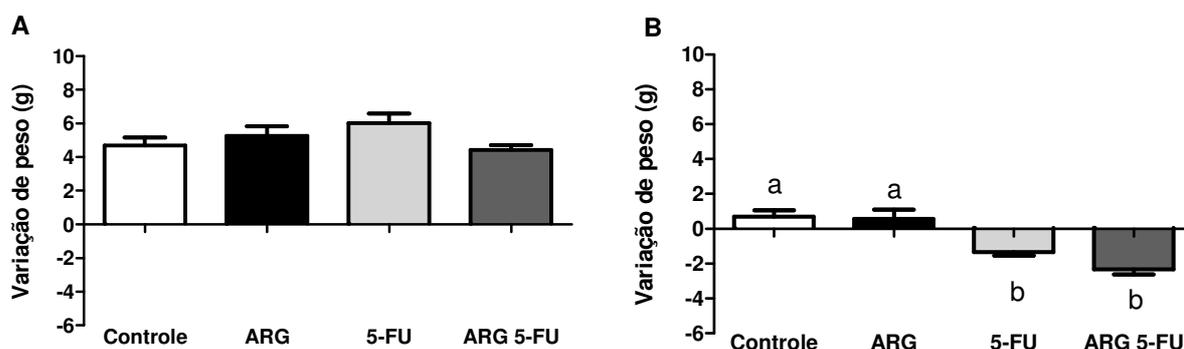


Figura 5 (A e B) – Variação de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 12, 14, 12, 14$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente.

5.3 Comprimento intestinal

Observou-se redução do comprimento do intestino delgado no grupo 5-FU, enquanto o grupo que recebeu L-arginina (ARG 5-FU) manteve o comprimento semelhante aos grupos Controle e ARG (Figura 6).

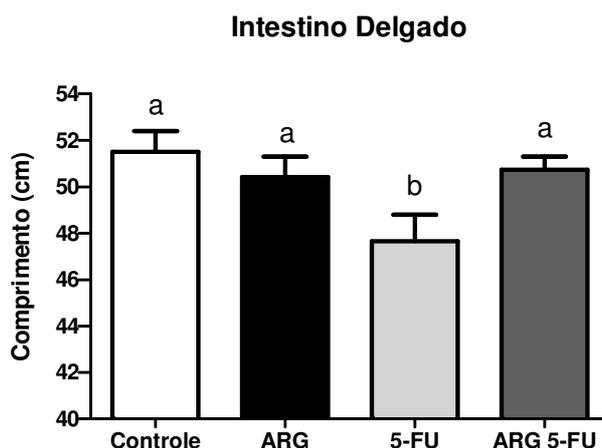


Figura 6 - Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 11, 13, 12, 13$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

5.4 Análise histológica e escore histopatológico

O intestino delgado do grupo Controle, em todas as porções estudadas, apresentou estrutura morfológica dentro dos parâmetros de normalidade, com preservação das vilosidades e epitélio íntegro. O tratamento com L-arginina (grupo ARG) não alterou os padrões de normalidade, com manutenção da mucosa semelhante ao grupo Controle. As Figuras 7A e 7B ilustram a mucosa do duodeno dos dois grupos. As Figuras 8A e 8B representam a mucosa do jejuno proximal. As Figuras A23 e A24 (APÊNDICE A) ilustram a mucosa do jejuno distal e íleo.

Observou-se na mucosa dos animais do grupo 5-FU intenso processo inflamatório com ulceração e redução do tamanho das vilosidades, alterando a arquitetura da mucosa em todos os segmentos estudados (Figura 7C e 8C). No grupo ARG 5-FU o tratamento com L-arginina reduziu, de forma leve a moderada, a lesão no duodeno e jejuno proximal, mas não nos outros segmentos (Figura 7D e 8D).

Em todas as porções analisadas observou-se escore histopatológico elevado no grupo 5-FU, sendo o escore em mediana e intervalo interquartil 12,00 (11,00 – 12,00) no duodeno, 10,00 (10,00 – 12,00) no jejuno proximal, 11,50 (9,75 – 12,00) no jejuno distal e 11,50 (11,00 – 12,00) no íleo.

No grupo ARG 5-FU o escore foi numericamente menor, sendo 8,00 (6,00 – 9,00) no duodeno, 8,00 (7,00 – 8,00) no jejuno proximal, 10,50 (10,00 – 11,75) no jejuno distal e 10,50 (10,00 – 11,00) no íleo. No entanto, não houve diferença estatística entre o escore do grupo ARG 5-FU e 5-FU. Contudo, verificou-se no duodeno (Figura 9) e jejuno proximal (Figura 10) dos animais do grupo ARG 5-FU escore intermediário entre os grupos Controle e ARG (menor escore) e o grupo 5-FU (maior escore). As Figuras 9 a 12 representam o escore histopatológico total de cada segmento.

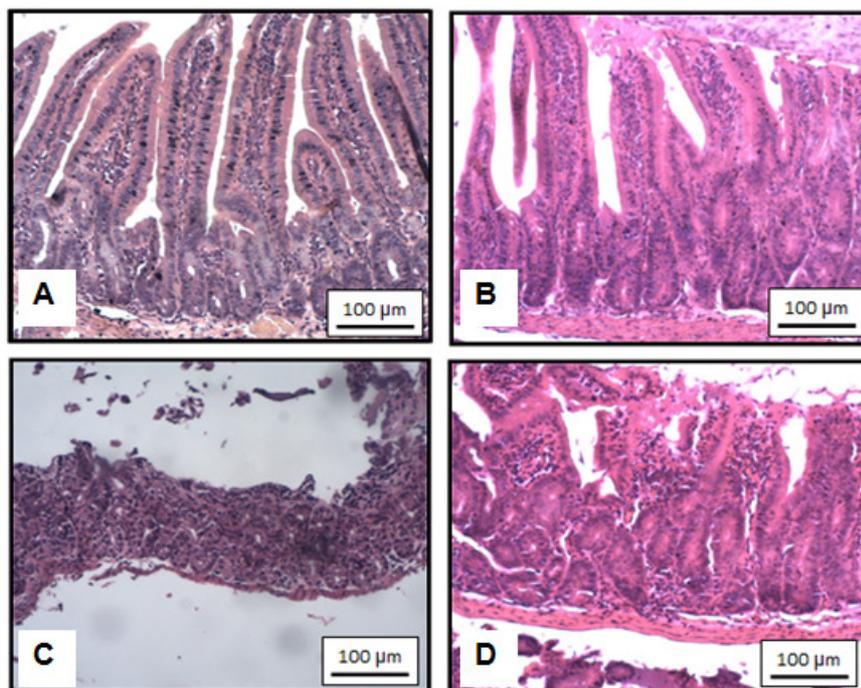


Figura 7 - Aspecto morfológico do duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). Grupo Controle (A), ARG (B), 5-FU (C), ARG 5-FU (D). Aumento de 10x.

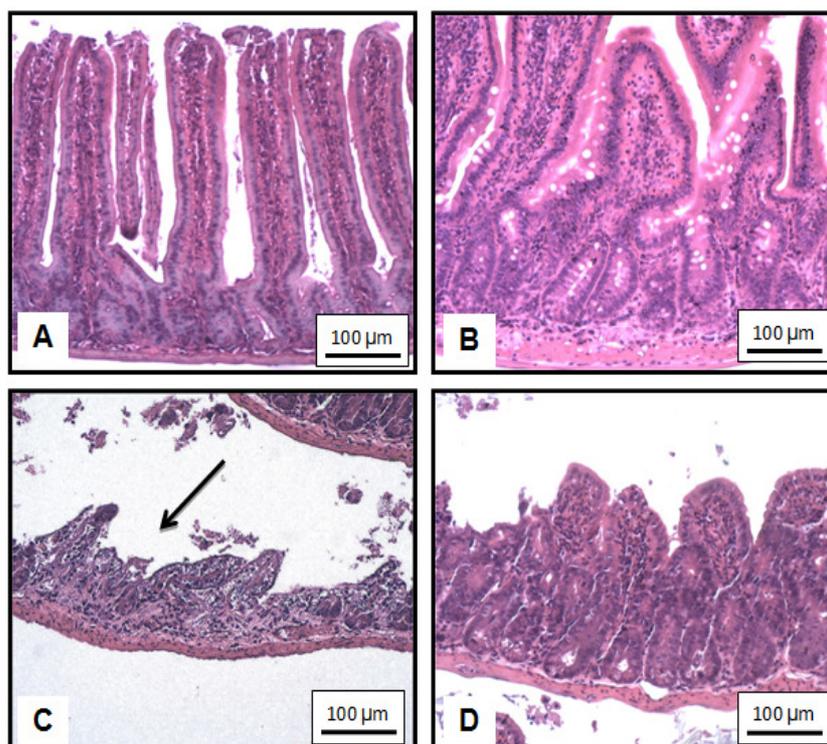


Figura 8 - Aspecto morfológico do jejuno proximal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). Grupo Controle (A), ARG (B), 5-FU (C), ARG 5-FU (D). A seta em C aponta para área com intensa perda do epitélio e das vilosidades, com presença de células inflamatórias. Aumento de 10x.

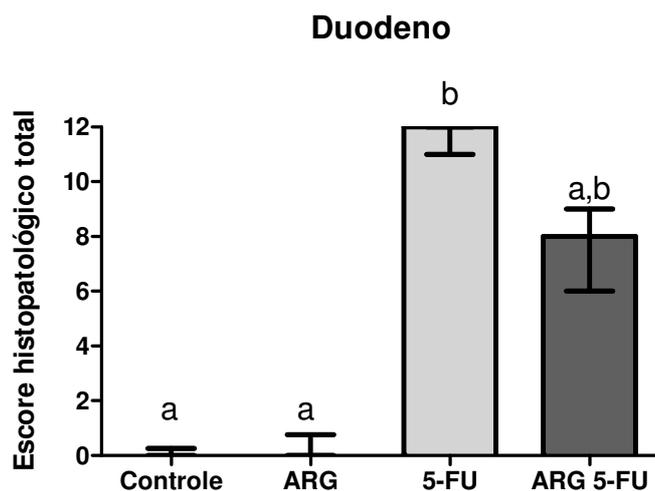


Figura 9 – Escore histopatológico total do duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6,8,6,8$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

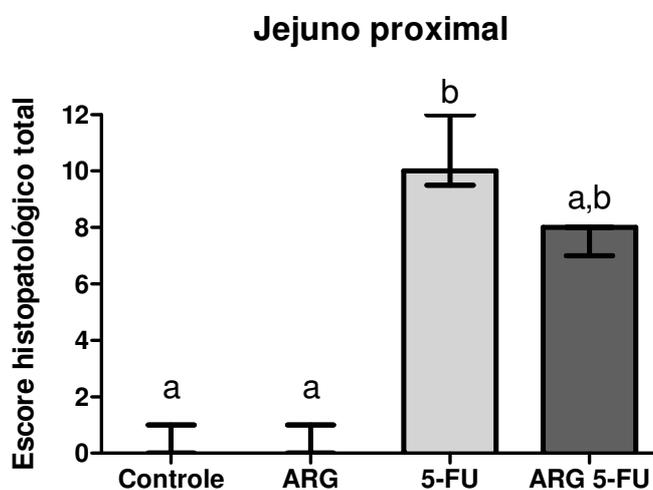


Figura 10 – Escore histopatológico total do jejuno proximal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6,8,6,8$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

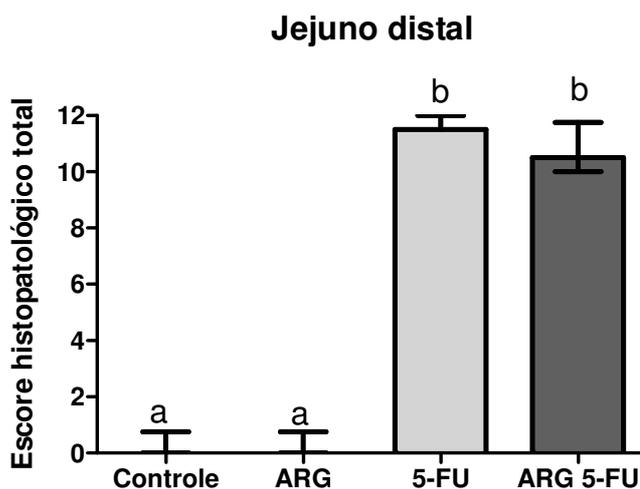


Figura 11 – Escore histopatológico total do jejuno distal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6,8,6,8$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

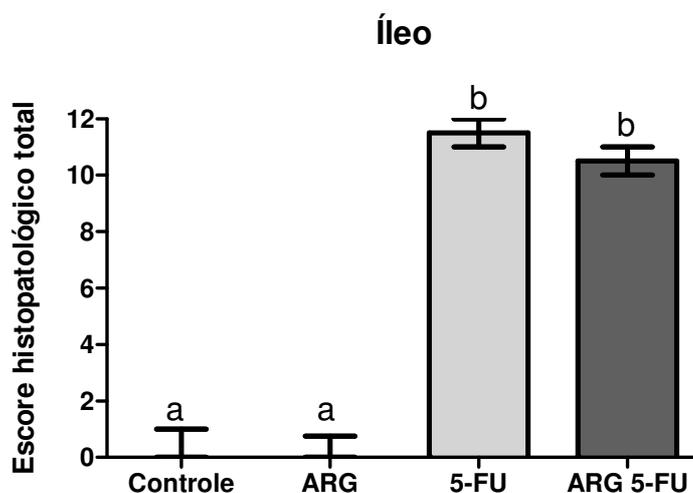


Figura 12 – Escore histopatológico total do íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6,8,6,8$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

Após verificar as alterações morfológicas no intestino delgado, investigaram-se as alterações teciduais por meio das análises de estresse oxidativo e infiltrado celular.

5.5 Estresse oxidativo

5.5.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica no intestino delgado foi igual entre os grupos em todas as porções do intestino delgado, por isso optou-se pela exibição dos gráficos contemplando o intestino delgado como um todo (Figura 13).

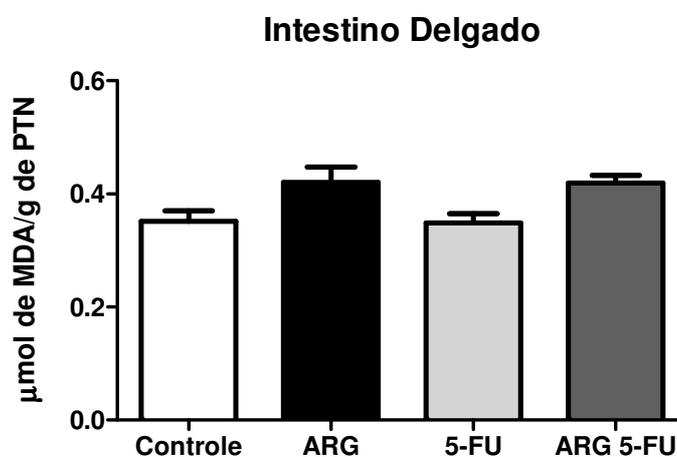


Figura 13 - Análise da peroxidação lipídica por TBARS no intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 12, 14, 12, 14$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

5.5.2 Concentração de hidroperóxidos

Assim como da peroxidação lipídica, não houve diferença entre os grupos, ao se avaliar duodeno, jejuno e íleo. Os dados do intestino delgado em geral são apresentados (Figura 14).

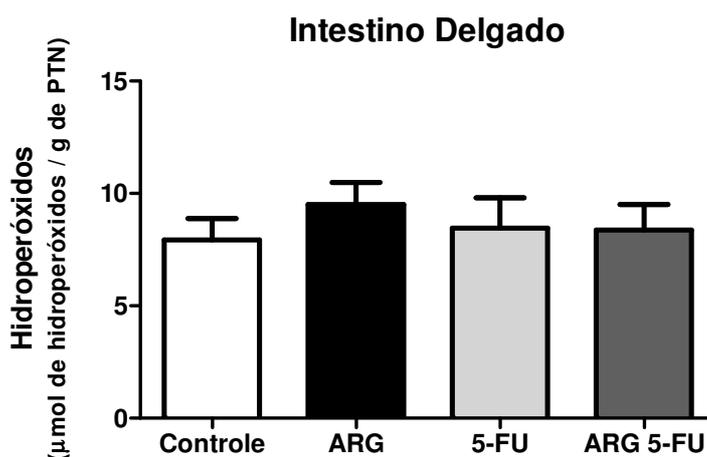


Figura 14 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos no intestino delgado três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 12, 12, 9, 12$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

5.6 Avaliação do infiltrado celular

5.6.1 Atividade de MPO

A atividade de MPO foi igual tanto no duodeno (Figura 15) como no íleo (Figura 17), observando-se alteração somente no jejuno, com aumento da atividade da enzima no grupo 5-FU. O grupo que recebeu L-arginina (ARG 5-FU), no entanto, apresentou atividade de MPO intermediária entre os controles (Controle e ARG) e 5-FU (Figura 16).

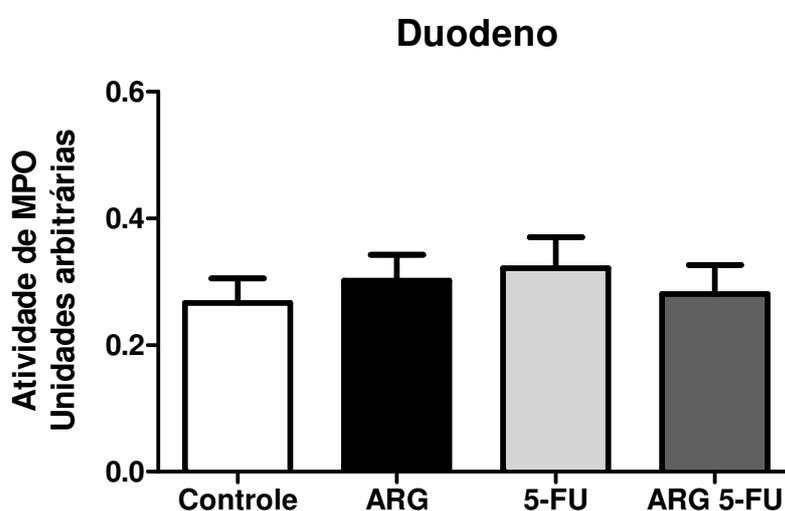


Figura 15 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 10,8,10,7$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

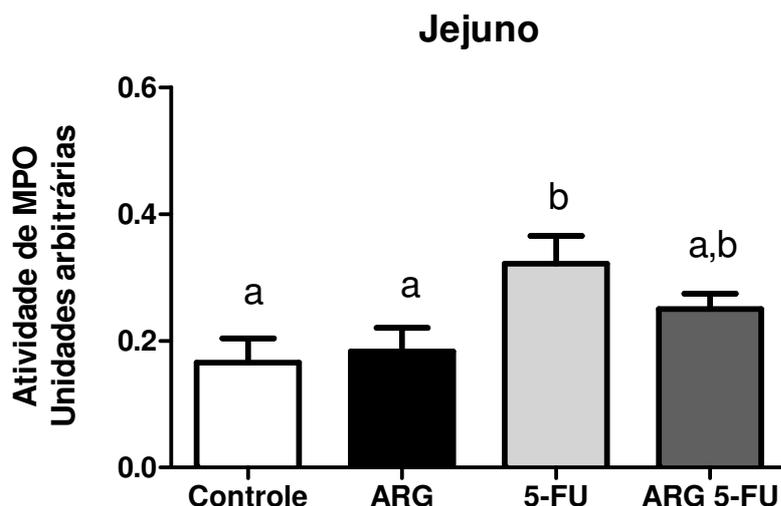


Figura 16 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 9, 12, 10, 9$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

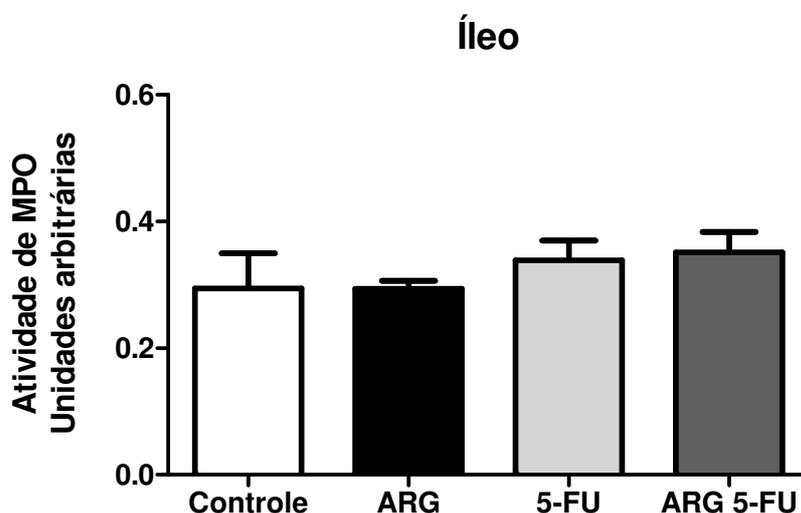


Figura 17 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6, 11, 12, 9$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

5.6.2 Atividade de NAG

A atividade de NAG foi igual entre os grupos em duodeno (Figura 18) e íleo (Figura 20). No entanto, verificou-se menor atividade de NAG no jejuno (Figura 19) dos animais que receberam 5-FU (5-FU e ARG 5-FU).

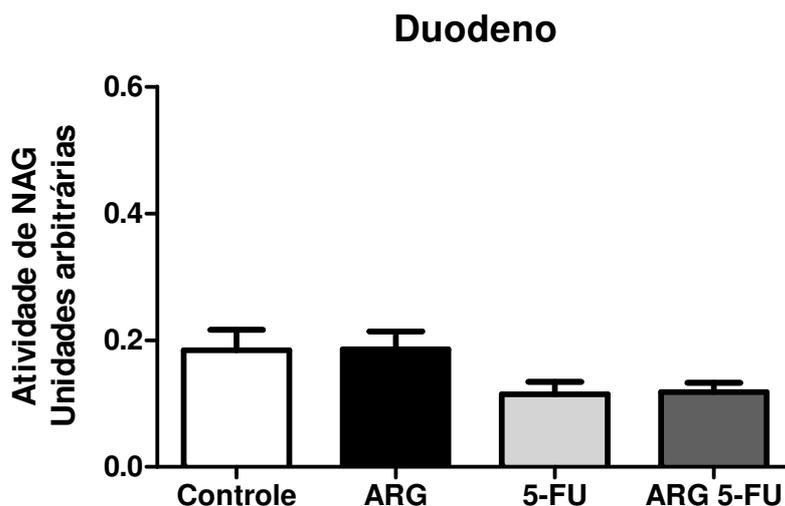


Figura 18 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 12, 14, 12, 14$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente.

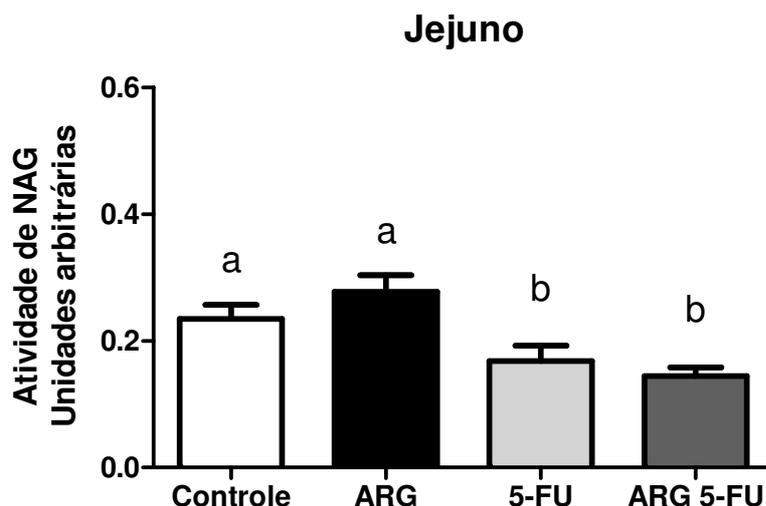


Figura 19 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 11, 14, 12, 14$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

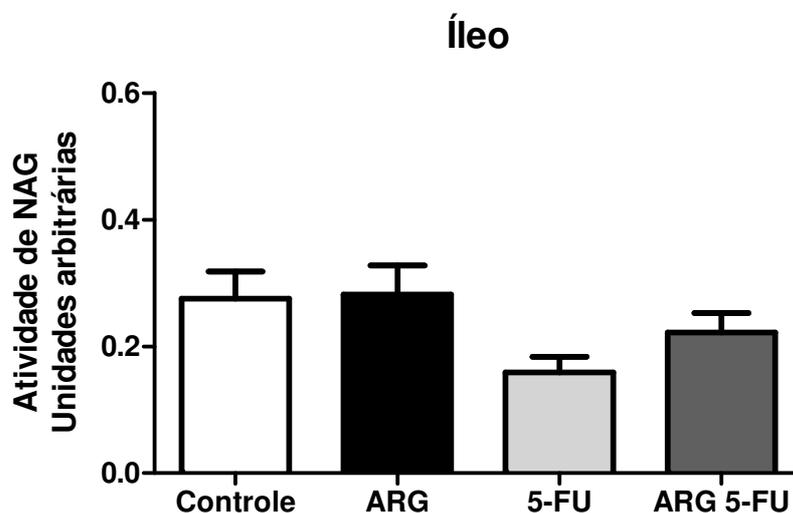


Figura 20 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 12, 14, 12, 14$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente.

5.6.3 Atividade de EPO

A atividade de EPO foi menor no duodeno dos animais do grupo 5-FU. Ainda na mesma porção, observou-se menor atividade de EPO no grupo ARG 5-FU em relação ao grupo ARG, mas não em relação aos demais grupos (Figura 21).

No jejuno, verificou-se menor atividade de EPO nos grupos que receberam 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) em relação ao grupo ARG, mas não em relação ao grupo Controle (Figura 22). No íleo não houve diferença entre os grupos (Figura 23).

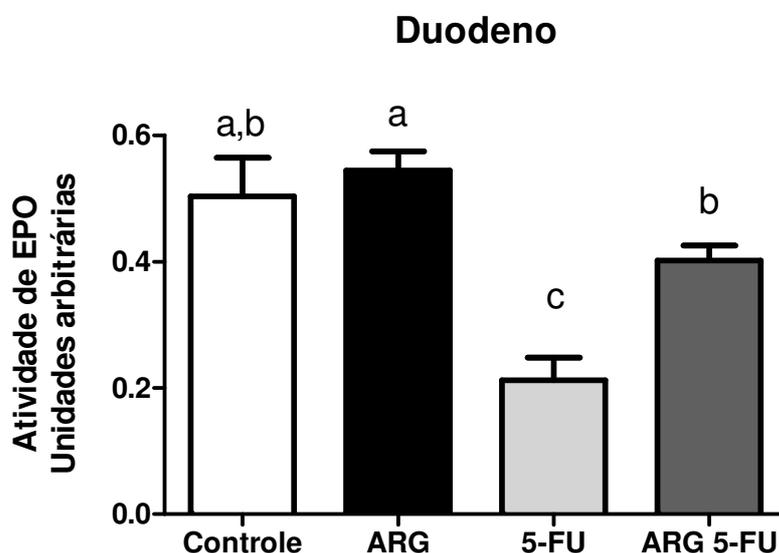


Figura 21 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 7, 8, 8, 9$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

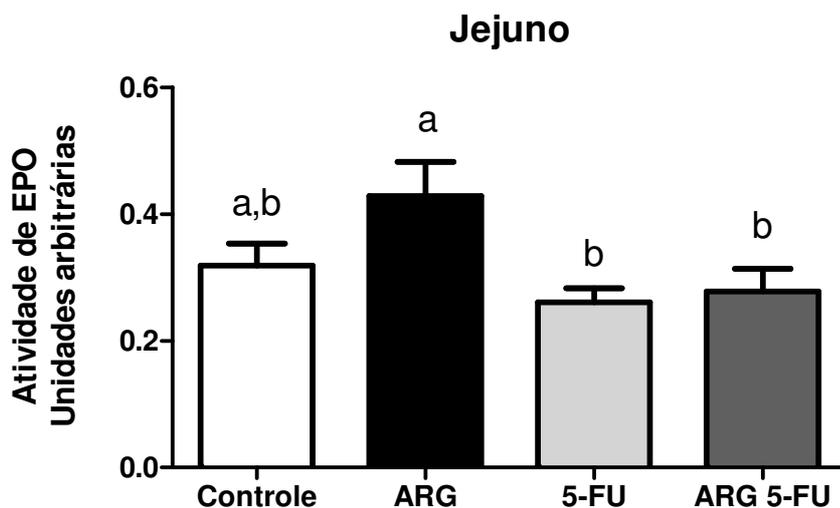


Figura 22 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 8, 10, 7, 9$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

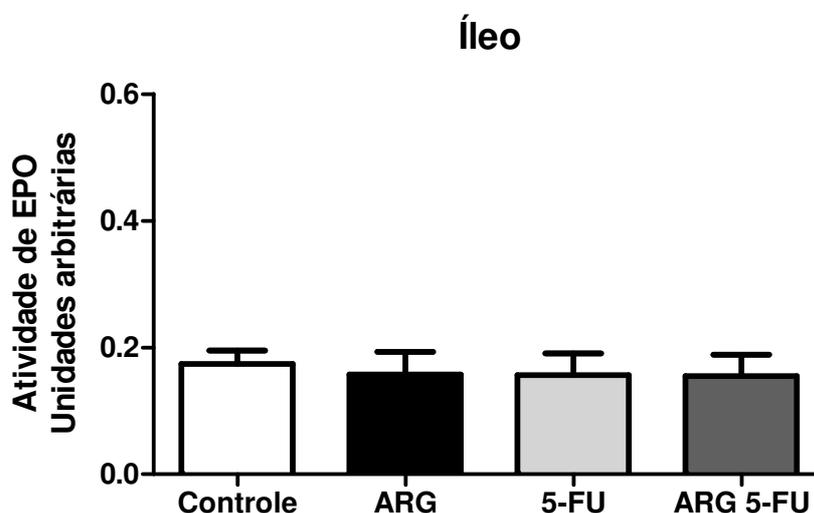


Figura 23 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 7, 11, 9, 10$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

5.7 Estudo da permeabilidade intestinal

Verificou-se maior permeabilidade intestinal no grupo 5-FU em relação a todos os grupos. O grupo que recebeu L-arginina (ARG 5-FU) apresentou maior permeabilidade em relação aos grupos Controle e ARG, no entanto a permeabilidade foi menor em relação ao grupo 5-FU (Figura 24).

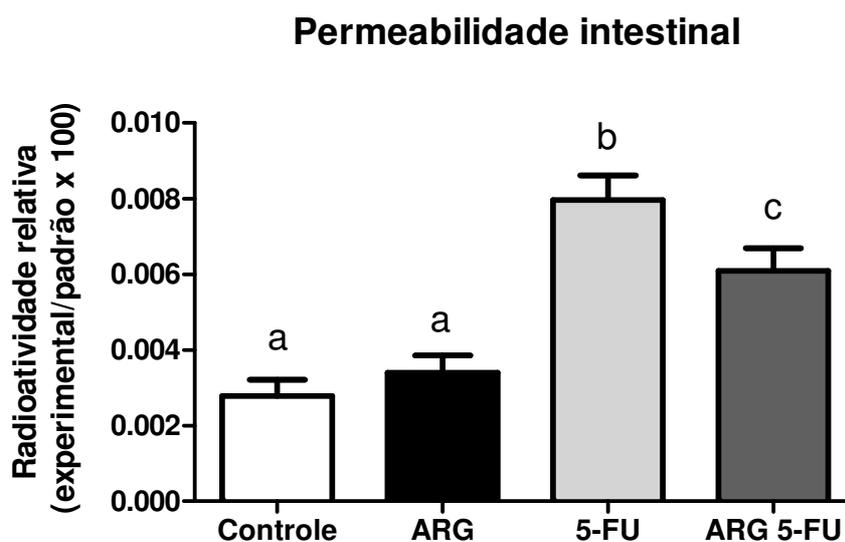


Figura 24 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ no sangue de animais após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6,8,6,7$ para os grupos Controle, ARG, 5-FU e ARG 5-FU, respectivamente. *Outliers* retirados.

6 DISCUSSÃO

A mucosite intestinal acomete entre 40% e 100% dos pacientes em tratamento com 5-FU. Isso contribui para interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia proposta, refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (SONIS, 2004; ANTUNIASSI, 2005; BOWEN *et al.*, 2006; LEITÃO *et al.*, 2007; STRINGER *et al.*, 2009; VLIET *et al.*, 2010).

Nossos dados mostram que a toxicidade proveniente da administração de 5-FU foi observada nos camundongos com a dose de 200mg/kg de peso por via intraperitoneal, como anteriormente relatado por Ferreira *et al.* (2012). Os efeitos da administração de 5-FU em modelos animais são citados na literatura, como a redução do consumo alimentar (MONTEIRO, 2006; FERREIRA *et al.*, 2012) e a perda de peso (MONTEIRO, 2006; SOARES *et al.*, 2008; LINDSAY *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012).

Outros parâmetros que comprovam a indução da mucosite intestinal no presente trabalho são a redução do comprimento intestinal, o elevado escore histopatológico da mucosa e o aumento do infiltrado de neutrófilos, características também observadas por Ferreira *et al.* (2012). A administração de 5-FU também promoveu intenso processo inflamatório com ulceração e redução do tamanho das vilosidades, alterando a arquitetura da mucosa em todos os segmentos estudados, resultados condizentes com os estudos de Soares *et al.* (2008) e Han *et al.* (2011) que utilizaram doses de 150mg/kg de peso e 200mg/kg de peso, respectivamente.

Soares *et al.* (2008) e Han *et al.* (2011) também observaram que as alterações na mucosa são percebidas com maior intensidade a partir do 3º dia após o tratamento com o fármaco, e que a partir do 5º dia há recuperação da mucosa. A eutanásia no terceiro dia após a indução da mucosite parece ser, portanto, ideal para a avaliação dos efeitos do 5-FU na mucosa. Seguindo as fases do desenvolvimento da mucosite propostas por Sonis (2004), nota-se que, no nosso estudo, a eutanásia ocorreu na fase de ulceração.

A L-alanina mostrou-se adequada como controle isoproteico, baseando-se na comparação entre os grupos que receberam o aminoácido e os que receberam água pura, na qual não foram observadas diferenças. A utilização de L-alanina permitiu a avaliação do efeito da L-arginina sem exercer impacto nos parâmetros analisados, uma vez que a alanina não participa das vias metabólicas de síntese de arginina (JOBGEN *et al.*, 2009).

Houve redução do consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos entre os animais tratados com 5-FU (5-FU e ARG 5-FU), quando comparados os períodos sem indução de mucosite (1^o ao 7^o dia) e após a indução (8^o ao 10^o dia). Quando avaliado somente o período após a indução da mucosite observa-se que o consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos do grupo 5-FU foi igual aos dos demais grupos. No entanto observa-se que o grupo ARG 5-FU teve menor consumo alimentar, hídrico e de aminoácidos entre o 8^o e 10^o dia em relação ao grupo Controle, e menor consumo alimentar (mas não hídrico e de aminoácidos), em relação ao grupo ARG. A partir desses resultados verifica-se que a administração do fármaco, como já relatado na literatura, promove redução da ingestão alimentar e hídrica.

Observou-se ainda perda de peso nos grupos 5-FU e ARG após a indução da mucosite. Pode-se relacionar a perda à redução do consumo alimentar. O uso de arginina não evitou a perda de peso no grupo ARG 5-FU. Os resultados de comprimento intestinal também ajudam a entender a perda de peso nos animais tratados com 5-FU. Verificou-se que os animais do grupo 5-FU tiveram menor comprimento intestinal, como relatado por Ferreira *et al.* (2012). Isso provavelmente contribuiu para a perda de peso devido ao prejuízo na absorção de nutrientes promovido pela redução da superfície de absorção e presença de ulcerações. No grupo ARG 5-FU observou-se comprimento intestinal igual ao dos grupos Controle e ARG. Sabe-se que as poliaminas, provenientes do metabolismo da L-arginina ou L-ornitina, possuem importante ação no crescimento e desenvolvimento intestinal e na reparação da mucosa (LÖSER *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 2002; MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005). No entanto, apesar da recuperação promovida pela L-arginina, não houve redução da perda de peso no grupo ARG 5-FU.

Os achados histológicos corroboram os dados do comprimento do intestino, revelando intenso processo inflamatório, ulcerações e redução de vilosidades no grupo 5-FU, o que está de acordo com a fase de ulceração proposta por Sonis (2004).

Monteiro (2006) e Ferreira *et al.* (2012) observaram alterações semelhantes com o uso de 5-FU. As alterações foram observadas em todas as porções do intestino delgado. A arginina melhorou de forma leve a moderada esses parâmetros no duodeno e jejuno proximal, porções mais afetadas na mucosite induzida por 5-FU no trabalho de Monteiro (2006). A ação benéfica da arginina é reforçada pelos resultados de escore histopatológico, que apontaram para efeito intermediário do aminoácido.

Considerando que as EROs e o estresse oxidativo estão envolvidos diretamente na iniciação da mucosite (SONIS *et al.*, 2004; MAEDA *et al.*, 2010), avaliamos também este parâmetro. Contudo, no presente estudo não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à peroxidação lipídica e concentração de hidroperóxidos. Sendo assim, não foi possível avaliar o efeito da L-arginina no estresse oxidativo. No entanto e contrariamente, Tripathi; Chandra; Misra (2010) observaram a ação do aminoácido na redução da peroxidação lipídica em pacientes com angina instável.

Por outro lado, em concordância com os nossos dados, Miyazono; Gao; Horie (2004) e Maeda *et al.* (2010) observaram retorno aos níveis normais de produção de EROs e peroxidação lipídica 72 horas após a indução da mucosite em animais tratados com MTX. Os autores relataram que o aumento do estresse oxidativo ocorreu no período entre 24 horas e 48 horas após a indução. Takuma *et al.* (2008) também observaram, em mucosite oral por 5-FU, aumento da peroxidação lipídica no primeiro dia após a indução, que voltou a níveis normais quando avaliada no quinto dia, fato que pode justificar a falta de diferenças vista em nosso estudo. Em um próximo estudo seria interessante avaliar o estresse oxidativo em diferentes períodos, visando observar se a L-arginina exerce algum efeito na redução do estresse oxidativo ou se a redução se dá somente pelo avanço natural da mucosite.

Além do estresse oxidativo, a presença de infiltrado inflamatório é característica da mucosite, promovida pelo aumento de moléculas de adesão resultantes da ativação de NF- κ B (VAN YE *et al.*, 1993; SONIS *et al.*, 2004). A infiltração de neutrófilos tem sido relatada em diversos trabalhos que avaliaram a mucosite, como os de Azevedo *et al.* (2012), Ferreira *et al.* (2012) e Soares *et al.* (2013).

No presente estudo o infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO) foi igual entre os grupos no duodeno e íleo, no entanto foi maior no grupo 5-FU no jejuno. Lindsay *et al.* (2010), avaliando atividade de mieloperoxidase em ratas com mucosite induzida por 5-FU, observaram aumento da atividade da enzima no jejuno, aumento não observado

no íleo, considerando o mesmo período após a indução da mucosite (72 horas). No entanto, os autores verificaram aumento da atividade da enzima no íleo 96 horas após a indução. A arginina também exerceu efeito nesse parâmetro e a atividade de MPO foi intermediária no grupo.

O infiltrado de macrófagos (atividade de NAG) em duodeno e íleo foi igual entre os grupos, corroborando os trabalhos de Santos (2011) e Ferreira *et al.* (2012), que não encontraram alteração na atividade de NAG no intestino delgado após administração de 5-FU. Já no jejuno os grupos que receberam 5-FU apresentaram menor atividade de NAG. Gazinnelli *et al.* (2010) sugerem que a atividade de NAG na mucosa intestinal afetada pela mucosite reflita mais a integridade do tecido do que o processo inflamatório local, uma vez que os macrófagos podem ser residentes na mucosa. Sendo assim, provavelmente a menor atividade de NAG observada nos grupos que receberam o fármaco reflita a redução do número de células residentes na mucosa lesada.

A atividade de EPO foi menor no duodeno dos animais do grupo 5-FU, e a L-arginina promoveu aumento nessa porção, com atividade de EPO intermediária entre os grupos sem mucosite e o grupo 5-FU. No jejuno a atividade de EPO dos grupos 5-FU e ARG 5-FU foi menor do que a do grupo ARG, enquanto no íleo não houve diferença entre os grupos. Os resultados foram inesperados, pois Ferreira *et al.* (2012) utilizando o mesmo modelo encontraram maior infiltrado de eosinófilos em todo o intestino delgado dos animais que receberam o fármaco.

A participação dos neutrófilos na mucosite intestinal é bem documentada, enquanto o comportamento de macrófagos e eosinófilos nesse modelo ainda é pouco conhecido. Sendo assim, o estudo mais detalhado dessas células na mucosite intestinal é necessário para melhor entendimento. Ainda, podem ocorrer diferenças entre as porções do intestino (duodeno, jejuno e íleo) no que se refere ao infiltrado celular, podendo estar relacionadas ao tempo após a indução da mucosite, como observado no já citado estudo de Lindsay *et al.* (2010). Essa variação pode explicar a ausência de diferenças em duodeno e íleo observadas em relação ao infiltrado de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Novos estudos são necessários para responder também essas questões.

É importante observar que a presença de indicadores de inflamação como o estresse oxidativo e o infiltrado celular não são exclusivos dos animais com mucosite,

como verificado nos resultados do presente estudo. No entanto, os níveis observados nos animais dos grupos Controle e ARG são considerados normais. A inflamação intestinal fisiológica ocorre para manter a homeostase do trato gastrointestinal (FIOCCHI, 2005).

A regulação da difusão passiva pela barreira é centrada na habilidade das junções firmes de selecionar os solutos benéficos para o organismo, evitando a passagem de antígenos, toxinas e patógenos (BLIKSLAGER *et al.*, 2007). As alterações na barreira intestinal podem aumentar o risco de bacteremia e sepse durante a mucosite intestinal (SONIS *et al.*, 2004). Sabe-se as células inflamatórias podem promover alteração das proteínas das junções firmes e aderentes, aumentando a permeabilidade intestinal (RAO *et al.*, 2002 e SHETH *et al.*, 2003; MAEDA *et al.*, 2010). Sendo assim, os achados histológicos e a elevada infiltração de neutrófilos podem explicar o aumento da permeabilidade intestinal nos animais tratados com 5-FU.

A L-arginina conseguiu reduzir a permeabilidade intestinal, embora a mesma ainda tenha sido maior do que a dos grupos Controle e ARG, o que não descarta o benefício do aminoácido na melhora da permeabilidade. Estes resultados estão em concordância com os resultados de escore histopatológico, onde nota-se melhora moderada na inflamação e arquitetura da mucosa nos animais do grupo ARG 5-FU, além de melhora no infiltrado inflamatório do intestino como um todo. Embora a avaliação da ação da arginina nas proteínas das junções firmes e aderentes não tenha sido realizada no presente estudo, nossos dados reforçam o papel protetor da arginina nas alterações da permeabilidade intestinal.

L-arginina é aminoácido com efeitos comprovados na mucosa intestinal, seja na mucosite, como observado no presente trabalho e no de Gurbuz; Kunzelman; Ratzer (1998) e Koppelman *et al.* (2012), ou em outras alterações intestinais (THOMAS *et al.*, 2001; ÖZTÜRK *et al.*, 2002; QUIRINO *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2010; COBURN *et al.*, 2012; QUIRINO *et al.*, 2012). O presente trabalho, além de reforçar a ação benéfica do aminoácido na redução da inflamação e melhora da arquitetura da mucosa, acrescenta a observação do papel do aminoácido na melhora da permeabilidade intestinal nesse modelo, o que pelo nosso conhecimento não havia ainda sido relatado.

A concentração de L-arginina na água adotada no estudo (2%) foi a mesma utilizada por Koppelman *et al.* (2012) para avaliar o efeito do aminoácido na mucosite intestinal induzida por MTX. No nosso trabalho a ingestão de L-arginina como

suplementação foi de 6,61g/kg de peso/dia antes da indução da mucosite, tendo sido reduzida para 3,23g/kg de peso/dia após a indução para o grupo ARG 5-FU. Embora a ingestão tenha sido reduzida após a indução de mucosite, a quantidade ingerida pelos animais ainda foi maior do que a ingestão pela qual foram observados efeitos benéficos no estudo de Koppelman *et al.* (2012) e semelhante à ingestão relatada por Quirino *et al.* (2007) – aproximadamente 1g/kg de peso/dia e 3g/kg de peso/dia, respectivamente – o que é reforçado pelos resultados positivos vistos no atual estudo.

Não foram observados efeitos adversos com a suplementação, como diarreia. Além disso, a avaliação histológica revelou que o tratamento com L-arginina (grupo ARG) não alterou os padrões de normalidade da mucosa. Em relação ao consumo de aminoácidos, a única diferença observada foi entre o grupo ARG 5-FU e o grupo Controle (consumindo alanina). No entanto, como as comparações essenciais para avaliar o efeito da L-arginina na mucosite foram realizadas entre os grupos 5-FU e ARG 5-FU, essa diferença não representou alteração nos resultados.

No presente estudo observou-se que a L-arginina foi capaz de promover melhora no comprimento intestinal, na morfologia, na inflamação e na permeabilidade da mucosa intestinal, estabelecendo níveis intermediários entre as características da mucosa normal e os efeitos do 5-FU. O mecanismo de ação da L-arginina na melhora intestinal ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que o óxido nítrico proveniente do metabolismo da arginina pela iNOS exerce importante participação na lesão tecidual. No entanto, diversos trabalhos relacionam o NO à proteção da mucosa (KUBES e McCAFFERTY, 2000). Thomas *et al.*, (2001) acreditam que a melhora na lesão da mucosa induzida por laporotomia em animais que receberam L-arginina seja mediada pela produção de NO, uma vez que a administração de inibidor de óxido nítrico sintases preveniu a proteção da mucosa.

Embora se saiba que o NO exerce efeitos anti-inflamatórios no epitélio intestinal, o mecanismo exato desses efeitos não está totalmente elucidado (LEFER e LEFER, 1999). Acredita-se que as diferenças entre a NOS constitutiva e a indutível expliquem em parte a proteção da mucosa pelo NO. A forma constitutiva atua na modulação da integridade tecidual do trato gastrointestinal (TANAKA *et al.*, 2001), enquanto a forma indutível está envolvida na lesão tecidual (LEITÃO *et al.*, 2011). Takeuchi *et al.* (2007) avaliando o efeito do NO e das NOS nas lesões intestinais promovidas pela

administração de indometacina, concluíram que a eNOS (constitutiva) exerce função na cicatrização das lesões intestinais, e que a forma predominante de NOS depende do estágio de cicatrização, sendo a iNOS na fase inicial e a eNOS na fase tardia. Os autores acreditam ainda que o NO contribui para a cicatrização das ulcerações intestinais estimulando a angiogênese, provavelmente por meio da modulação da expressão de fatores de crescimento. No entanto, a divisão entre a ação do NO produzido pelas formas constitutiva e indutível tem sido questionada por não explicar totalmente os dados relatados na literatura (MARTÍN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001).

Outro possível mecanismo de ação do NO é a inibição de NF- κ B pela ativação do promotor de I κ B- α , subunidade inibitória de NF- κ B, reduzindo a expressão de moléculas de adesão, consequentemente reduzindo o infiltrado inflamatório, o estresse oxidativo e a permeabilidade intestinal. A reação do NO com EROs como superóxido e peróxido de hidrogênio, inativando as moléculas, é outro mecanismo relatado na literatura (LEFER e LEFER, 1999; KUBES e McCAFFERTY, 2000). Contudo, o mecanismo que parece explicar melhor o papel da L-arginina na recuperação da mucosite intestinal seja a relação entre NO e poliaminas.

As poliaminas são sintetizadas a partir da ornitina ou da agmatina, produto do catabolismo da arginina, e a participação dessas moléculas na proliferação celular é bem documentada. O efeito das poliaminas nesse processo pode estar relacionado à interação das moléculas com p53, que exercem função essencial na regulação de diversos genes envolvidos no crescimento e morte celular (MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005).

As poliaminas estão envolvidas também na diferenciação de células imunológicas e na regulação da inflamação, além de regularem a expressão de proteínas das junções firmes e aderentes, afetando a permeabilidade intestinal (GUO *et al.*, 2003; MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005; GUO *et al.* 2005; LIU *et al.*, 2009). A ação na mucosite intestinal também já foi documentada (GAO *et al.*, 2002).

Acredita-se que existam modificações temporais na expressão de NOS e síntese de poliaminas no local da inflamação. O óxido nítrico é essencial na fase inicial da lesão da mucosa, agindo na erradicação dos possíveis patógenos. Nessa fase a produção de poliaminas não seria benéfica, pois afetaria a ação do NO. No entanto, a síntese contínua de NO promoveria supressão da síntese de poliaminas, inibindo a

proliferação celular na fase tardia. Sendo assim, acredita-se que haja interregulação entre as vias (SATRIANO, 2004).

No início, a ativação de NOS favorece o acúmulo de células inflamatórias e inibe a síntese de poliaminas. A ativação e subsequente morte dessas células pode ser responsável pelo aumento de arginase e conseqüentemente da síntese de ornitina, favorecendo a proliferação celular via síntese de poliaminas, que inibem a expressão de iNOS (SATRIANO, 2004; MOINARD; CYNOBER; BRANDT, 2005). Satriano (2004) sugere que a agmatina, produto do catabolismo da arginina e substrato na síntese de poliaminas seja a molécula regulatória da transição entre iNOS/NO e arginase/ODC/poliaminas.

Quirino *et al.* (2012) estudando a L-arginina em modelo de obstrução intestinal observaram melhora da permeabilidade intestinal e aumento da concentração de poliaminas com a utilização do aminoácido. No entanto, o papel da suplementação com L-arginina na relação entre NO e poliaminas ainda não está totalmente esclarecido. Talvez a participação da L-arginina no processo seja o fornecimento de substrato para as reações, ou talvez a concentração do aminoácido possa favorecer uma ou outra reação. É importante ressaltar que apesar dos possíveis mecanismos citados não foram avaliados parâmetros relativos ao óxido nítrico e poliaminas no presente estudo. A investigação desses parâmetros em um próximo trabalho ajudaria a elucidar a participação dos compostos na mucosite intestinal. Além disso, outros mecanismos podem ajudar a entender melhor o efeito do aminoácido na mucosa.

A partir dos resultados observados no presente estudo, verificou-se que o efeito do pré-condicionamento com L-arginina em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU não é de recuperação total, mas intermediária. Até o momento não foram encontrados dados sobre o efeito do aminoácido na mucosite intestinal em humanos. Mesmo assim, o estudo da L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-FU parece promissor, especialmente se a recuperação promovida pelo aminoácido for capaz de reduzir os efeitos adversos da mucosite, que geram o risco de abandono do tratamento quimioterápico, os altos custos hospitalares e a mortalidade aumentada, melhorando, assim, a qualidade de vida do paciente. Outra vez, a demanda por novos estudos é salientada.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que a mucosite intestinal foi induzida pela administração de 5-FU, levando à redução do consumo alimentar, perda de peso e intenso processo inflamatório, ulcerações e redução das vilosidades na mucosa intestinal, além de aumento da permeabilidade. O pré-tratamento com L-arginina promoveu, de forma intermediária, melhora do processo inflamatório, da arquitetura da mucosa e da permeabilidade intestinal, resultando em melhora moderada da mucosite intestinal. Contudo são necessários novos estudos com o aminoácido, visando futuros benefícios em pacientes.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o estresse oxidativo na mucosite intestinal em diferentes períodos (24hs, 36hs e 48hs após a indução da mucosite, por exemplo), visando observar se a L-arginina exerce algum efeito na redução do estresse oxidativo;
- Avaliar o infiltrado celular também em diferentes períodos nas porções do intestino delgado, com o objetivo de analisar mais detalhadamente a ação da L-arginina nesse parâmetro, além de conhecer melhor as alterações que ocorrem de acordo com o tempo após a indução da mucosite;
- Estudar o efeito da arginina nas proteínas das junções firmes e aderentes, envolvidas na permeabilidade intestinal;
- Avaliar a ação do aminoácido na produção de NO pelas NOS e na relação entre NO e poliaminas na mucosite intestinal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, v.75, p. 639-653, 2004.
- ANELLI, A. Tratamento sistêmico do câncer. In: KOWASLKI, L.P.; ANELLI, A.; SALVAJOLI, J.V.; LOPES, L.F. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2ª ed. São Paulo: Âmbito Editores Ltda, 2002. p.100-111.
- ANTUNIASSI, A. R. Ocorrência e grau de severidade da mucosite bucal em relação ao fluxo salivar de pacientes sob quimioterapia. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2005. 62p.
- AZEVEDO, O. G. R.; OLIVEIRA, R, A. C.; OLIVEIRA, B. C.; ZAJA-MILATOVIC, S.; ARAÚJO, C. V.; WONG, D. V. T.; COSTA, T. B.; LUCENA, H. B. M.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A.; WARREN, C. A.; LIMA, A. A. M.; VITEK, M. P.; GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis. *BMC Gastroenterology*, v.12, p. 35, 2012.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*, v.162, p. 327 – 334, 1988.
- BATISTA, M. A.; NICOLI, J, R.; MARTINS, F. dos S.; MACHADO, J. A. N.; ARANTES, R. M. E.; QUIRINO, I. E. P.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. Pretreatment with citrulline improves gut barrier after intestinal obstruction in mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v.36, p.69, 2012.
- BECK, P. L.; XAVIER, R.; WONG, J.; EZEDI, I.; MASHIMO, H.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; BHAN, A. K.; PODOLSKY, D. K. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 286, p. G137–G147, 2004.

- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, v. 49, 2 Suppl 1, p. 3-8, 2000.
- BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*, v.108, p. 1566-1581, 1995.
- BLIKSLAGER, A. T.; MOESER, A. J.; GOOKIN, J. L.; JONES, S. L.; ODLE, J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*, v.87, p.545-564, 2007.
- BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, v.55, p.1015–1028, 1999.
- BOUKHETTALA, N.; IBRAHIM, A.; AZIZ, M.; VUICHOUD, J.; SAUDAN, K.; BLUM, S.; DÉCHELOTTE, P.; BREUILLE, D.; COËFFIER, M. A diet containing whey protein, free glutamine, and transforming growth factor- β ameliorates nutritional outcome and intestinal mucositis during repeated chemotherapeutic challenges in rats. *J. Nutr.*, v.140, p. 799–805, 2010.
- BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M.K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*, v.14, p.713-731, 2006.
- BOZEMAN, P. M.; LEARN, D. B.; THOMAS, E. L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of Immunological Methods*, v.126, p.125-133, 1990.
- BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Renal arginine metabolism. *J. Nutr.*, v.134, p.2791S–2795S, 2004.
- CAMILLERI, M.; MADSEN, K.; SPILLER, R.; VAN MEERVELD, B. G.; VERNE, G. N. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*, v.24, p.503-512, 2012.
- CHANG, C.-T.; HO, T.-Y.; LIN, H.; LIANG, J.-A.; HUANG, H.-C.; LI, C.-C.; LO, H.-Y.; WU, S.-L.; HUANG, Y.-F.; HSIANG, C.-Y. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, v.7, n.3, p.e31808, 2012.

- CHEAH, K. Y.; HOWARTH, G. S.; YAZBECK, R.; WRIGHT, T. H.; WHITFORD, E. J.; PAYNE, C.; BUTLER, R. N.; BASTIAN, S. E. P. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biology & Therapy*, v.8, n.4, p.382-390, 2009.
- CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v.2, p.111–143, 2007.
- CHOI, K.; LEE, S. S.; OH, S. J.; LIM, S. Y.; LIM, S. Y.; JEON, W. K.; OH, T. Y.; KIM, J. W. The effect of oral glutamine on 5-Fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test. *Clin Nutr*, v.26, p.57–62, 2007.
- CHU, E.; DeVITA, V.T.J. Principles of cancer management: chemotherapy. In: DeVITA, V.T.J.; HELLMANS, S; ROSEMBER, S.A. Cancer: principles and practice of oncology. 6^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.289-306.
- COBURN, L. A.; GONG, X.; SINGH, K.; ASIM, M.; SCULL, B. P.; ALLAMAN, M. M.; WILLIAMS, C. S.; ROSEN, M. J.; WASHINGTON, M. K.; BARRY, D. P.; PLAZUELO, M. B.; CASERO JR., R. A.; CHATURVEDI, R.; ZHAO, Z.; WILSON, K. T. L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis. *PLoS ONE*, v.7, n.3, p.e33546, 2012.
- COMAN, D.; YAPLITO-LEE, J.; BONEH, A. New indications and controversies in arginine therapy. *Clinical Nutrition*, v.27, p.489-496, 2008.
- COUSINS, C.; GUNASEKERA, R. D.; MUBASHAR, M.; MOHAMMADTAGHI, S.; STRONG, R.; MYERS, M. J.; PETERS, A. M. Comparative kinetics of microvascular inulin and ^{99m}Tc-labelled diethylenetriaminepenta-acetic acid exchange. *Clinical Science*, v.93, p.471-477, 1997.
- CYNOBER, L.; LE BOUCHER, J.; VASSON, M.-P. Arginine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.*, v.6, p.402-403, 1995.
- DANIELE, B.; PERRONE, F.; GALLO, C.; PIGNATA, S.; De MARTINO, S.; De VIVO, R.; BARLETTA, E.; TAMBARO, R.; ABBIATI, R.; D'AGOSTINHO, L. Oral glutamine

in the prevention of fluorouracil induced intestinal toxicity: a double blind, placebo controlled, randomised trial. *Gut*, v.48, p.28–33, 2001.

EDENS, H. A.; LEVI, B. P.; JAYE, D. L.; WALSH, S.; REAVES, T. A.; TURNER, J. R.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *The Journal of Immunology*, v.169, p.476–486, 2002.

ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M.; TELEFONCU, A.; KOSE, T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine and arginine-enriched diets on radiation induced enteritis in rats. *J Surg Res*, v.89, p.121–125, 2000.

FERRARIS, R. P.; VINNAKOTA, R. R. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. *J. Nutr.*, v.125, n.8, p.2172-2182, 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R. G.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids*, v.47, p.669–678, 2012.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev Ass Med Bras.*, v.46, n.3, p.265-71, 2000.

FIOCCHI, C. What is “physiological” intestinal inflammation and how does it differ from “pathological” inflammation? *Inflamm Bowel Dis.*, v.14, n.S2, p. S77-S78, 2005.

FLYNN, N. E.; MEININGER, C. J.; HAYNES, T. E.; WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.427–438, 2002.

- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v.33, p.829–837, 2012.
- FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, v.29, p.15–21, 2013.
- GAO, F.; TOMITORIB, H.; IGARASHIB, K. HORIE, T. Correlation between methotrexate-induced intestinal damage and decrease in polyamine content. *Life Sciences*, v.72, p.669–676, 2002.
- GAZZINELLI, M. L. T.; FONSECA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BARCELOS, M. de F. P. Efeitos da ingestão de diferentes fontes lipídicas na mucosite em camundongos submetidos à quimioterapia com ara-c. *Rev Med Minas Gerais*, v.20, n.3, p.310–316, 2010.
- GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; SIEWEKE, M. H. MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v.327, p.656, 2010.
- GENEROSO, S. V.; VIANA, M. L.; SANTOS, R. G.; ARANTES, R. M. E.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R.; MACHADO, J. A. N.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *Eur J Nutr*, v.50, p.261–269, 2011.
- GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; KEEFE, D. M. K. Palifermin reduces diarrhea and increases survival following irinotecan treatment in tumor-bearing DA rats. *Int. J. Cancer*, v.116, p.464–470, 2005.
- GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*, v.14, p.890–900, 2006.
- GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; CLARKE, J. M.; REGESTER, G. O.; THOMPSON, F. M.; GOLAND, G. J. EDWARDS, B. G.; CUMMINS, A. G. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.50, p.53–58, 2002a.
- GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; THOMPSON, F. M.; CLARKE, J. M.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after

- methotrexate treatment of breast cancer in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, v.47, n.12, p.2751–2757, 2002b.
- GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; CUMMINS, A.; KEEFE, D. M. K. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. *Clin. Exp. Med.*, v.4, p.188-195, 2005.
- GIMENEZ, D.L. Quimioterapia. In: IKEMORI, E.H.A; OLIVEIRA, T; SERRALHEIRO, I.F.D.; SHIBUYA, E. COTRIM, T.H.; TRINTIN, L.A. *et al.* Nutrição em oncologia. 1ª ed. São Paulo: Lemar; 2003. p.179-88.
- GRASEMANN, H.; GRASEMANN, C.; KURTZ, F.; TIETZE-SCHILLINGS, G.; VESTER, U.; RATJEN, F. Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study. *Eur. Respir. J.*, v.25, p.62–68, 2005.
- GREM, J. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational New Drugs*, v.18, p.299–313, 2000.
- GRIMBLE, G. K. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *J. Nutr.*, v.137, p.1693S–1701S, 2007.
- GUO, X.; RAO, J. N.; LIU, L.; RIZVI, M.; TURNER, D. J.; WANG, J.-Y. Polyamines regulate β -catenin tyrosine phosphorylation via Ca^{2+} during intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v.283, p.C722-C734, 2002.
- GUO, X.; RAO, J. N.; LIU, L.; ZOU, T.-T.; KELEDJIAN, K. M.; BONEVA, D.; MARASA, B. S.; WANG, J.-Y. Polyamines are necessary for synthesis and stability of occluding protein in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.288, p.G1159-G1169, 2005.
- GUO, X.; RAO, J. N.; LIU, L.; ZOU, T.-T.; TURNER, D. J.; BASS, B. L.; WANG, J.-Y. Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v.285, p.C1174-C1187, 2003.
- GURBUZ, A. T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E. E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *Journal of Surgical Research*, v.74, p.149–154, 1998.

- HALLEMEECH, M. M.; LAMERS, W. H.; DEUTZ, N. E. P. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin. Nutr.*, v.21, p.273-279, 2002.
- HAMADA, K.; SHITARA, Y.; SEKINE, S.; HORIE, T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.66, p.1031-1038, 2010.
- HAN, X.; WU, Z.; DI, J.; PAN, Y.; ZHANG, H.; DU, Y.; CHENG, Z.; JIN, Z.; WANG, Z.; ZHENG, Q.; ZHANG, P.; WANG, Y. CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.65, p.547–554, 2011.
- HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*, v.28, n.10, p.1456–1462, 2000.
- ILEYLAND, D. K.; NOVAK, F.; DROVER, J. W.; JAIN, M.; SU, X., SUCHNER, U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*, v.286, n.8, p.944-53, 2001.
- JENSEN, S. B.; PEDERSEN, A. M.; REIBEL, J.; NAUNTOFTE, B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer*, v.11, n.4, p.199-200, 2003.
- JOBGEN, W.; MEININGER, C. J.; JOBGEN, S. C.; LI, P.; LEE, M.-J.; SMITH, S. B.; SPENCER, T. E.; FRIED, S. K.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J. Nutr.*, v.139, p.230–237, 2009.
- JØRGENSEN, V. L.; NIELSEN, S. L.; ESPERSEN, K.; PERNER, A. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, v.32, p.1790–1796, 2006.
- KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Current Opinion in Oncology*, v.19, p.323–327, 2007.
- KEEFE, D. M. K.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*, v.47, p.632–637, 2000.

- KEEFE, D. M. K.; GIBSON, R. J.; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. *Seminars in Oncology Nursing*, v.20, n.1, p.38-47, 2004.
- KEEFE, D. M. K.; SHUBERT, M. M.; ELTING, L. S.; SONIS, S. T.; EPSTEIN, J. B.; RABER-DURLACHER, J. E.; MIGLIORATI, C. A.; McGUIRE, D. B.; HUTCHINS, R. D.; PETERSON, D. E. Updated Clinical Practice Guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*, v.109, n.5, p.820-831, 2007.
- KOHLI, R.; MEININGER, C. J.; HAYNES, T. E.; YAN, W.; SELF, J. T.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.*, v.134, p.600–608, 2004.
- KOPPELMANN, T.; POLLAK, Y.; MOGILNER, J.; BEJAR, J.; CORAN, A. G.; SUKHOTNIK, I. Dietary L-arginine supplementation reduces Methotrexate-induced intestinal mucosal injury in rat. *BMC Gastroenterology*, v.12, p.41, 2012.
- KUBES, P.; McCAFFERTY, D.-M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med.*, v.109, p.150 –158, 2000.
- LALLA, R. V.; SHUBERT, M. M.; BENSADOUN, R. J.; KEEFE, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. *Support Care Cancer*, v.14, p.558–565, 2006.
- LEFER, A. M.; LEFER, D. J. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, v.276, p.G572-G575, 1999.
- LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; BRAGA-NETO, M. B.; BELLAGUARDA, E. A. L.; SILVA, J. V.; GOMES, A. S.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SIQUEIRA, F. J. W. S.; FREIRE, R. S.; VALE, M. L.; RIBEIRO, R. A. R. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterology*, v.11, p.90, 2011.
- LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-Fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.59, p.603–612, 2007.
- LEONEL, A. J. Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano. Tese de Doutorado. Belo

Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. 132p.

- LIMA, V. de. Evidências de participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-Fluorouracil e metotrexato em animais. Tese de doutorado. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.
- LINDSAY, R. J.; GEIER, M. S.; YAZBECK, R.; BUTLER, R.; HOWARTH, G. S. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. *British Journal of Nutrition*, v.104, p.513–519, 2010.
- LIU, L.; GUO, X.; RAO, J. N.; ZOU, T.-T.; XIAO, L.; YU, T.; TIMMONS, J. A.; TURNER, D. J.; WANG, J.-Y. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.296, p.C801-C810, 2009.
- LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol*, v.63, p.239–251, 2009.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, v.3, p.330–338, 2003.
- LOPES, A. *et al.* Oncologia cirúrgica. In: KOWASLKI, L.P.; ANELLI, A.; SALVAJOLI, J.V.; LOPES, L.F. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2^a ed. São Paulo: Âmbito Editores Ltda; 2002. p.81-91.
- LÖSER, C.; EISEL, A.; HARMS, D.; FÖLSCH, U. R. Dietary polyamines are essential luminal growth factor for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut*, v.44, p.12-16, 1999.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, p.265-275, 1951.

- MAEDA, T.; MIYAZONO, Y.; ITO, K.; HAMADA, K.; SEKINE, S.; HORIE, T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.65, p.1117–1123, 2010.
- MARTÍN, M. J.; JIMÉNEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Current Pharmaceutical Design*, v.7, p.881-908, 2001.
- MARTINS, A. B. Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas. Dissertação de mestrado. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2010. 79p.
- MATEO, R. D.; WU, G.; BAZER, F. W.; PARK, J. C.; SHINZATO, I.; KIM, S. W. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. *J. Nutr.*, v.137, p.652–656, 2007.
- McCARTHY, G.M.; AWDE, J.D.; GHANDI, H.; VINCENT, M.; KOCHA, W.I. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. *Oral Oncol*, v.34, n.6, p.484-90, 1998.
- MELO, M. L. P. de. Papel de citocinas, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 na mucosite intestinal induzida pelo agente antitumoral cloridrato de irinotecano (CPT-11) – efeito na pentoxifilina, talidomida e celecoxibe. Tese de Doutorado. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2007. 166p.
- MENDES, E. da S.R. Efeito da quimioterapia adjuvante sobre o peso e índice de massa corporal em mulheres com câncer de mama. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2009.
- MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*, v.39, p.1119-1127, 2004.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, v.24, p.184-197, 2005.
- MONTEIRO, M. C. S. A. Restabelecimento da barreira morfo-funcional intestinal através da suplementação com glutamina, alanil-glutamina e peptídeos em

- camundongos com mucosite induzida por 5-Fluorouracil. Dissertação de Mestrado. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2006. 107p.
- MORRIS, S. M. JR. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.*, v.137, p.1602S–1609S, 2007.
- MORRIS, S. M. JR. Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.*, v.134, p.2743S–2747S, 2004.
- MUSCH, M. W.; WALSH-REITZ, M. M.; CHANG, E. B. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, v.290, p.G222-G231, 2006.
- NCI. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v. 4.03, 2010. Disponível em : <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06_14_QuickReference_5x7.pdf>. Acesso em 25 fev 2013.
- NIEVES JR, C.; LANGKAMP-HENJEN, B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.471–482, 2002.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v.31, n.11, p.1287–1312, 2001.
- NOVAES, M. R. C. G.; PANTALEÃO, C. de M. Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. *Rev. Ciênc. Méd.*, Campinas, v.14, n.1, p.65-75, 2005.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*, v.129, p.113-139, 2000.
- ÖZTÜRK, H.; DOKUCU, A. I.; YAĞMUR, Y.; SARI, I. Effects of supplemental L-arginine on the intestinal adaptive response after massive small-bowel resection in rats. *Pediatr Surg Int.*, v.18, p.332–336, 2002.
- PAIVA, S. M. M. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006. 111p.

- PAN, M.; CHOUDRY, H. A.; EPLER, M. J.; MENG, Q. H.; KARINCH, A, LIN, C. M.; SOUBA, W. Arginine Transport in Catabolic Disease States. *J. Nutr.*, v.134, p.2826-2829, 2004.
- PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R.-J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*, v.22, Supplement 6, p.vi78–vi84, 2011.
- PICANÇO, E. de A.; LOPES-PAULO, F.; MARQUES, R. G.; DIESTEL, C. F.; CAETANO, C. E. R.; SOUZA, M. V. M. de; MOSCOSO, G. M.; PAZOS, H. M. F. L-arginine and glycine supplementation in the repair of the irradiated colonic wall of rats. *Int J Colorectal Dis*, v.26, p.561–568, 2011.
- PINEDO, H. M.; PETERS, G. F. J. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.*, v.6, p.1653-1664, 1998.
- PRISCIANDARO, L. D.; GEIER, M. S.; CHUA, A. E.; BUTLER, R. N.; CUMMINS, A. G.; SANDER, G. R.; HOWARTH, G. S. Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-Fluorouracil-induced epithelial cell damage. *Support Care Cancer*, v.20, p.3205-3210, 2012.
- PRITCHARD, D. M.; POTTEN, C. S.; HICKMAN, J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-Fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res.*, v.58, p.5453-5465, 1998.
- QUIRINO, I. E. P. Arginina no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 79p.
- QUIRINO, I. E. P.; CARDOSO, V. N.; SANTOS, R. das G. C. dos; EVANGELISTA, W. P.; ARANTES, R. M. E.; FIUZA, J. A.; GLÓRIA, M. B. A.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BATISTA, M. A.; CORREIA, M. I. T. D. The role of L-arginine and inducible nitric oxid synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*, v.XX, n.X, p.1-9, 2012.
- QUIRINO, I. E. P.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin. Nutr.*, v.26, p.335-340, 2007.

- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. Em: Farmacologia, 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2001. p. 557-575.
- RAO, R. K.; BASUROY, S.; RAO, V. U.; KARNAKY, K. J.; GUPTA, A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin- β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J.*, v.368, p.471-481, 2002.
- REDDING, S. W. Cancer therapy-related oral mucositis. *Journal of Dental Education*, v.69, n.8, p.919-929, 2005.
- RHOADS, J. M.; CHEN, W.; GOOKIN, J.; WU, G. Y.; FU, Q.; BLIKSLAGER, A. T.; RIPPE, R. A.; ARGENZIO, R. A.; CANCE, W. G.; WEAVER, E. M.; ROMER, L. H. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut*, v.53, p.514-522, 2004.
- ROSENFELD, R. S.; LEITE, C.; ROCHA, R. G. A. Terapia nutricional no paciente imunodeprimido e no câncer. Programa abbott de especialização em terapia intensiva. Rio de Janeiro: Vero Comunicação Total, v.10, p.03-12, 2001.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.*, v.24, p.147-174, 2006.
- RUSSO, G.; HADAD, R.; POSNER, M.; MACHTAY, M. Radiation treatment breaks and ulcerative mucositis in head and neck cancer. *The Oncologist.*, v.13, p.886-98, 2008.
- SANTOS, L. C. dos. Efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil no perfil do tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes do receptor de LDL (LDLr-/-). Dissertação de mestrado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. 131p.
- SANTOS, S. B. O efeito da vitamina E e do selênio na prevenção da mucosite em pacientes com tumores malignos nas vias aerodigestivas superiores submetidos a radioterapia, concomitantemente ou não com quimioterapia. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

- SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines. *Amino Acids*, v.26, p.321-329, 2004.
- SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.*, v.83, n.3, p.865–875, 1989.
- SCHLEIFFER, R.; RAUL, F. Prophylactic administration of L-arginine improves the intestinal barrier function after mesenteric ischaemia. *Gut*, v.39, p.194-198, 1996.
- SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.50, p.376–399, 2008.
- SHEN, L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1258, p.9–18, 2012.
- SHETH, P.; BASUROY, S.; LI, C.; NAREN, A. P.; RAO, R. K. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J. Biol. Chem*, v.278, n.49, p.49239 – 49245, 2003.
- SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology*, v.56, p.672-686, 1994.
- SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Gastrointestinal dysmotility in 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.63, p.91–98, 2008.
- SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F. C.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Inflammatory intestinal damage induced by 5-Fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*, v.61, p.46–49, 2013.
- SONIS, S. T. The Pathobiology of mucositis. *Nature Reviews*, v.4, p.277-284, 2004.
- SONIS, S. T.; ELTING, S. L.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, P. D.;

- RUBENSTEIN, E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. *Cancer*, v.100, Suppl 9, p.1995-2025, 2004.
- 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, p.209-215, 1985.
- STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, S. J. A.; HAMILTON, J.; KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Experimental Biology and Medicine*, v.234, p.430-441, 2009.
- SULTANI, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy Research and Practice*, v.2012, p.1-11, 2012.
- SUN, F.; HAYAMI, S.; OGIRI, Y.; HARUNA, S.; TANAKA, K.; YAMADA, Y.; TOKUMARU, S.; KOJO, S. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1500, p.181-185, 2000.
- SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.70, p.631–659, 2013.
- SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANI, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, v.22, n.1/2, p.269–285, 1997.
- TAKEUCHI, K.; HATAZAWA, R.; TANIGAMI, M.; TANAKA, A.; OHNO, R.; YOKOTA, A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sciences*, v.80, p.329-336, 2007.
- TAKUMA, D.; GUANGCHEN, S.; YOKOTA, J.; HAMADA, A.; ONOGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on 5-Fluorouracil-induced mucositis in hamsters. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.2, 250-254, 2008.
- TAN, B.; YIN, Y.; LIU, Z.; LI, X.; XU, H.; KONG, X.; HUANG, R.; TANG, W.; SHINZATO, I.; SMITH, S. B.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation increases muscle gain

- and reduces body fat mass in growing-finishing pigs. *Amino Acids*, v.37, p.169-175, 2009.
- TANAKA, A.; MIZOGUCHI, H.; KUNIKATA, T.; MIYAZAWA, T.; TAKEUCHI, K. Protection by constitutively formed nitric oxide of intestinal damage induced by indomethacin in rats. *J. Physiol.*, v.95, p.35-41, 2001.
- TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Arginine. *Biomed. Pharmacother.*, v.56, p.439-445, 2002.
- THOMAS, S.; RAMACHANDRAN, A.; PATRA, S.; VIDYASAGAR, S.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. *J. Surg. Res.*, v.99, p.25-32, 2001.
- TOOLEY, K. L.; HOWARTH, G. S.; BUTLER, R. N. Mucositis and non-invasive markers of small intestinal function. *Cancer Biology & Therapy*, v.8, n.9, p.753-758, 2009.
- TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clinical Science*, v.82, p.471-488, 1992.
- TRIPATHI, P.; CHANDRA, M.; MISRA, M. K. Protective role of L-arginine against free-radical mediated oxidative damage in patients with unstable angina. *Ind J Clin Biochem*, v.25, n.3, p.302-306, 2010.
- VAN YE, T. M.; ROZA, A. M.; PIEPER, G. M.; HENDERSON JR., J.; JOHNSON, C. P.; ADAMS, M. B. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *Journal of Surgical Research*, v.55, p.553-558, 1993.
- VERDE, S. M. M. L. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2007.
- VIANA, M. L. Arginina no processo de translocação bacteriana: permeabilidade intestinal, vias de ação e resposta imunológica na obstrução intestinal em camundongos. Tese de doutorado. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2010.
- VIANA, M. L.; SANTOS, R. G. C.; GENEROSO, S. V.; ARANTES, R. M. E.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. C. Pretreatment with arginine preserves intestinal

barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition*, v.26, p.218–223, 2010.

VLIET, M. J. van; HARMSSEN, H. J. M.; BONT, E. S. J. M. de; TISSING, W. J. E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLOS Pathogens*, v.6, n.5, p.e.1000879, 2010.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E.; DAHLÉN, G.; JONTELL, M. Oral and intestinal microflora in 5-Fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, v.18, n.5, p.278–284, 2003.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; BRENNAN, M. T.; SPIJKERVET, F. K. L.; LOGAN, R.; STRINGER, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; KEEFE, D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. *Support Care Cancer*, v.14, p. 519–527, 2006.

WANG, W. W.; QIAO, S. Y.; LI, D. F. Amino acids and gut function. *Amino Acids*, v.37, p.105–110, 2009.

WHITFORD, E. J.; CUMMINS, A. G.; BUTLER, R. N.; PRISCIANDARO, L. D.; FAUSER, J. K.; YAZBECK, R.; LAWRENCE, A.; CHEAH, K. Y.; WRIGHT, T. H.; LYMN, K. A.; HOWARTH, G. S. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biology & Therapy*, v.8, n.6, p.505-511, 2009.

WIJNANDS, K. A. P.; VINK, H.; BRIEDE, J. J.; van FAASSEN, E. E.; LAMERS, W. H.; BUURMAN, W. A.; POEZE, M. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS ONE* v.7, n.5, p. e37439, 2012.

WU, G.; BAZER, F. W.; DAVIS, T. A.; KIM, S. W.; LI, P.; RHOADS, J. M.; SATTERFIELD, M. C.; SMITH, S. B.; SPENCER, T. E.; YIN, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, v.37, p.153–168, 2009.

WU, G.; MORRIS, S. M. JR. Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, v.336, p.1-17, 1998.

WU, L.-L.; CHIU, H.-D.; PENG, W.-H.; LIN, B.-R.; LU, K.-S.; LU, Y.-Z.; YU, L. C.-

H. Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta. *Crit Care Med*, v.39, p.2087–2098, 2011.

WU, Z. Q.; HAN, X. D.; WANG, Y.; YUAN, K. L.; JIN, Z. M.; DI, J. Z.; YAN, J.; PAN, Y.; ZHANG, P.; HUANG, X. Y.; WANG, Z. G.; ZHENG, Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-Fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.68, p.87–96, 2011.

ZABUCCHI, G.; MENEGAZZI, R.; CRAMER, R.; NARDON, E. PATRIARCA, P. Mutual influence between eosinophil peroxidase (EPO) and neutrophils: neutrophils reversibly inhibit EPO enzymatic activity and EPO increases neutrophil adhesiveness. *Immunology*, v.69, p.580-587, 1990.

APÊNDICE A

DADOS COMPLEMENTARES

Análises comparativas entre os grupos Controle e Controle sem ALA e 5-FU e 5-FU sem ALA

Tabela A1 – Consumo alimentar e hídrico

Grupo	Consumo alimentar		Consumo hídrico	
	(g/kg peso/dia)		(mL/kg peso/dia)	
	1º ao 7º dia	8º ao 10º dia	1º ao 7º dia	8º ao 10º dia
Controle	161,30 (142,20 – 183,90)	131,60 (126,30 – 145,10)	356,90 (318,70 – 409,7)	358,60 (290,50 – 460,10)
Controle sem ALA	155,90 (153,90 – 157,80)	142,40 (127,60 – 157,20)	267,20 (253,20 – 281,10)	246,40 (219,40 – 273,40)
5-FU	164,40 (159,20 – 179,20)	100,10 (93,58 – 111,70)	365,40 (356,80 – 428,00)	217,70 (185,80 – 254,10)
5-FU sem ALA	176,00 (159,70 – 192,30)	105,30 (79,50 – 131,10)	313,70 (305,40 – 322,00)	171,80 (123,50 – 220,00)

Consumo alimentar e hídrico até a indução da mucosite (1º ao 7º dia) e após a indução (8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e Controle sem ALA) ou 5-FU (5-FU e 5-FU sem ALA) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. n = 4 para todos os grupos.

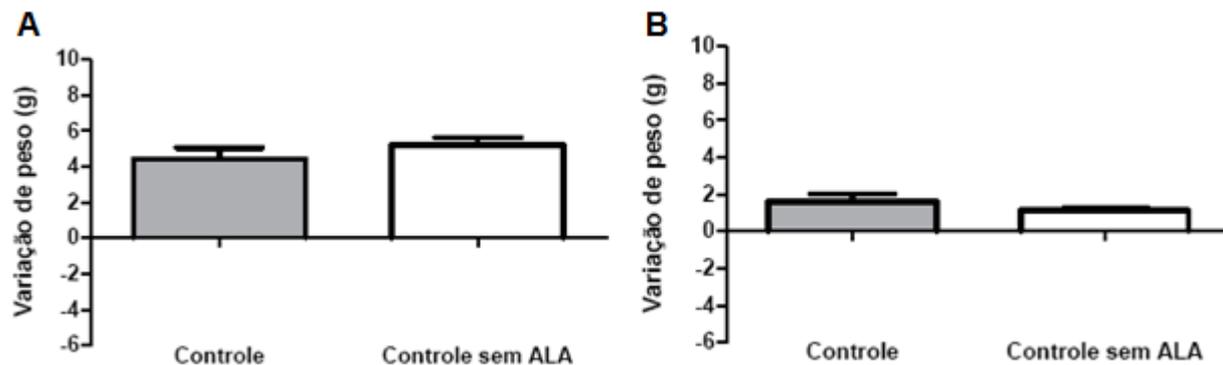


Figura A1 – Variação de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

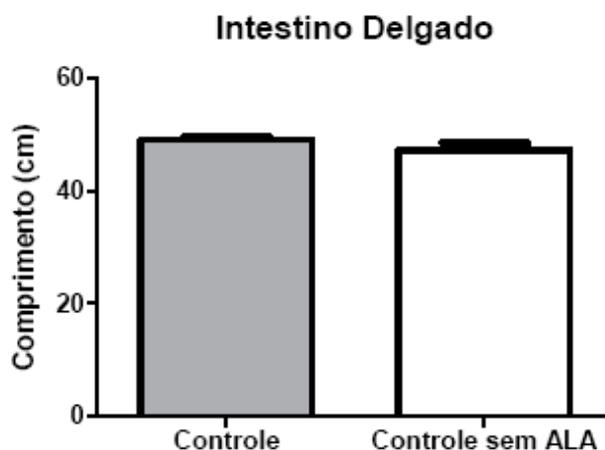


Figura A2 - Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 10$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

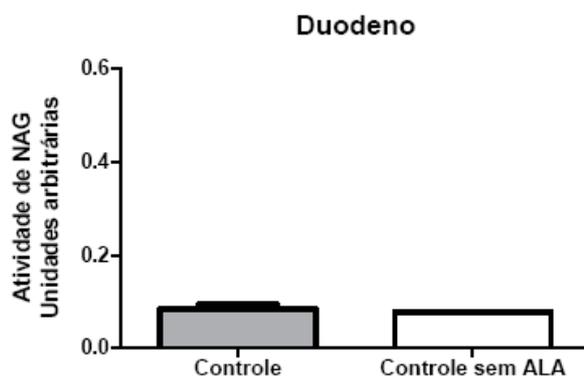


Figura A3 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

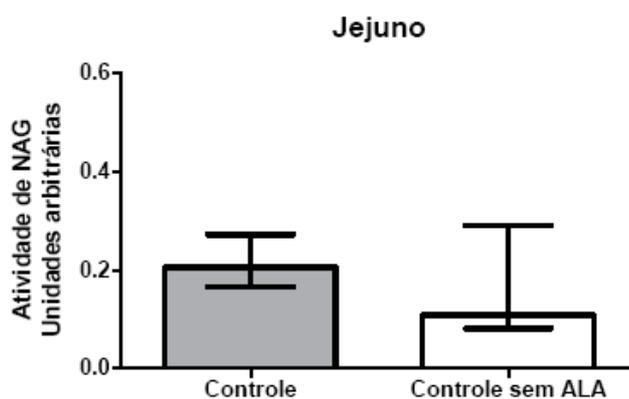


Figura A4 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste de *Mann Whitney*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 11$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

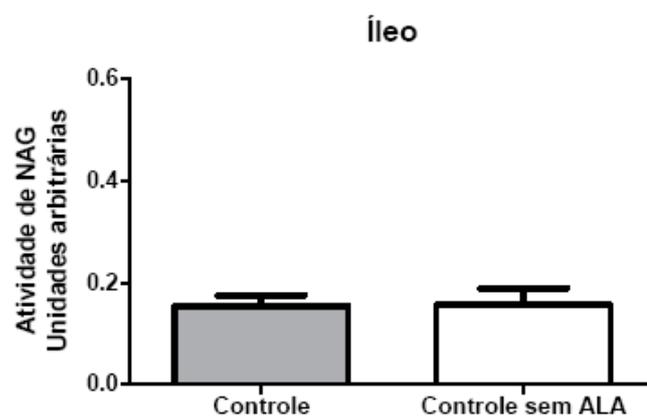


Figura A5 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

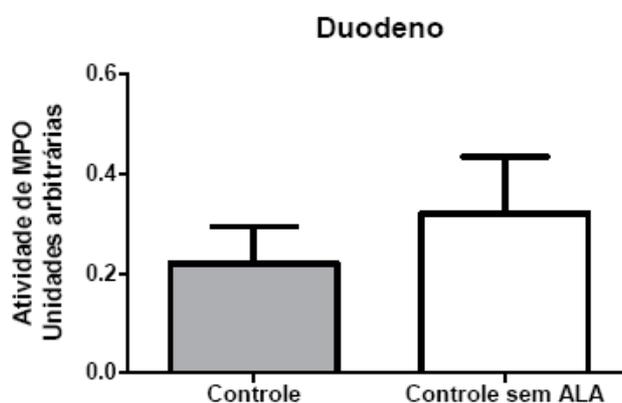


Figura A6 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 10$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

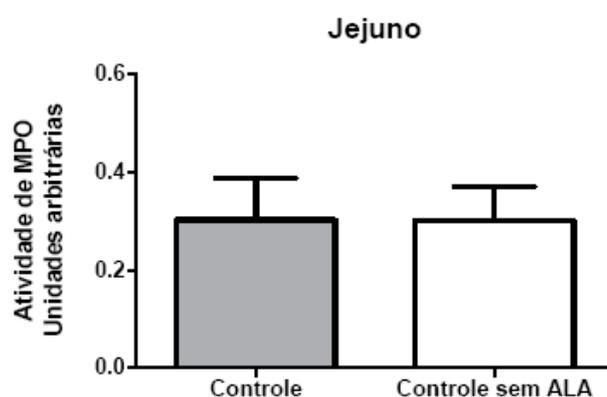


Figura A7 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 9$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

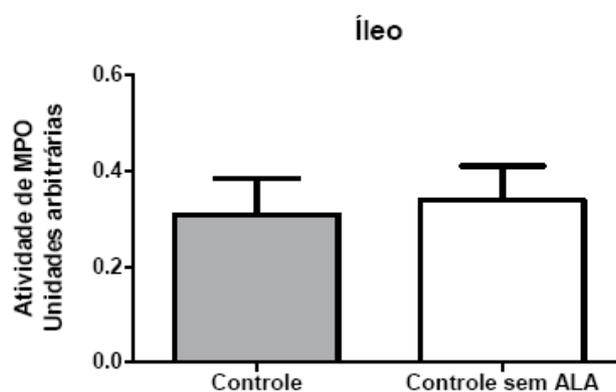


Figura A8 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 6$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

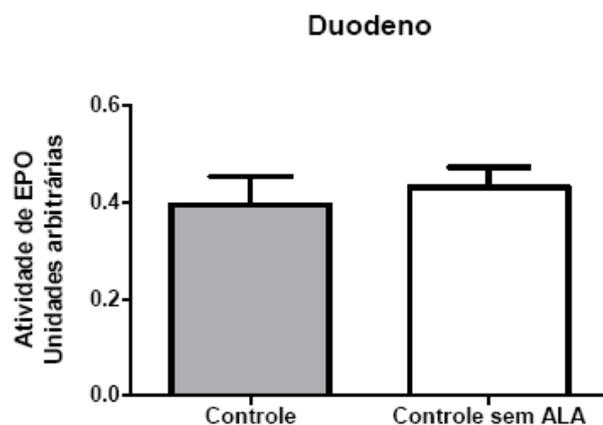


Figura A9 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 7$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

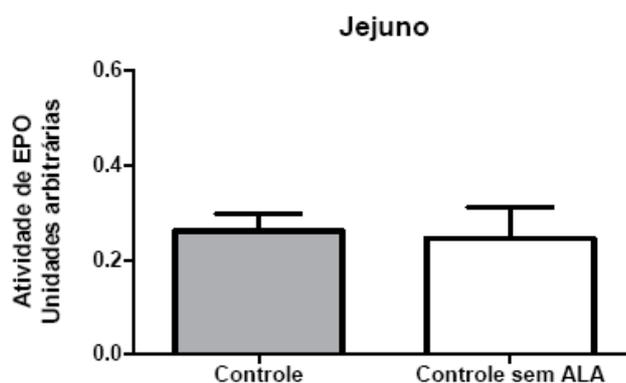


Figura A10 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 8$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

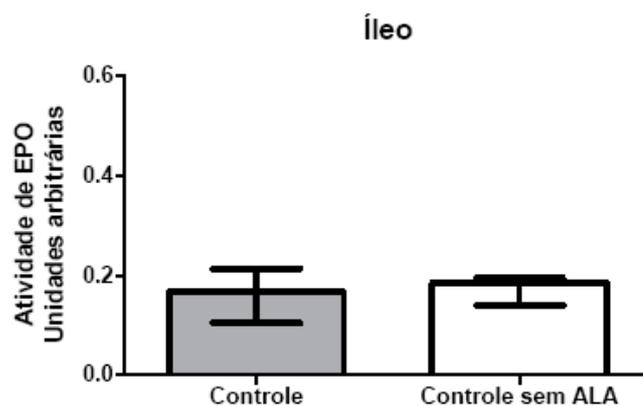


Figura A11 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com PBS. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste de *Mann Whitney*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 7$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

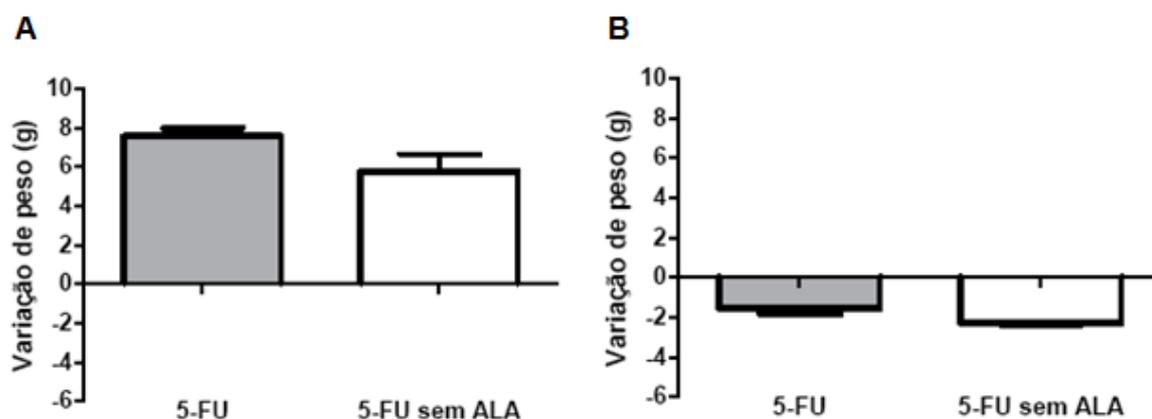


Figura A12 – Variação de peso até a indução da mucosite (A: 1º ao 7º dia) e após a indução (B: 8º ao 10º dia). Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

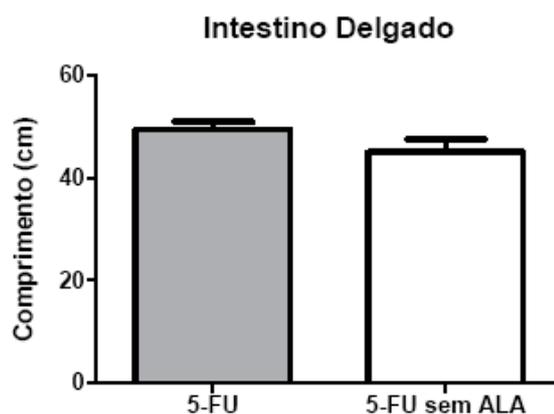


Figura A13 - Comprimento do intestino delgado três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

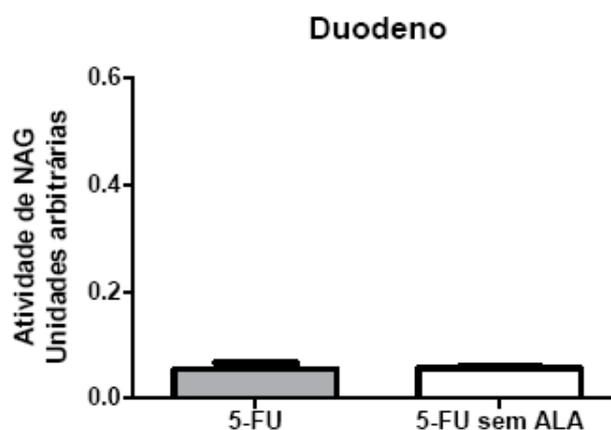


Figura A14 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

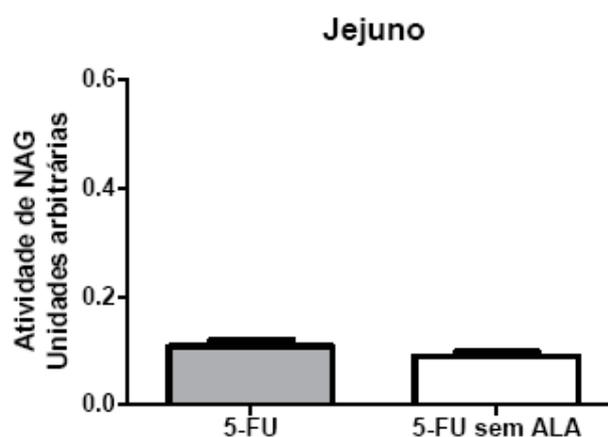


Figura A15 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

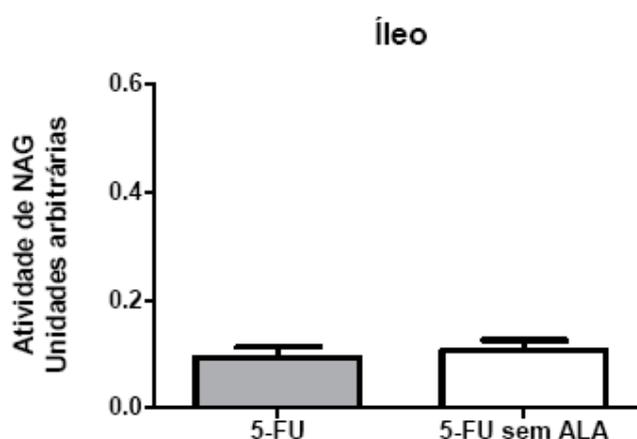


Figura A16 - Avaliação da atividade de NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

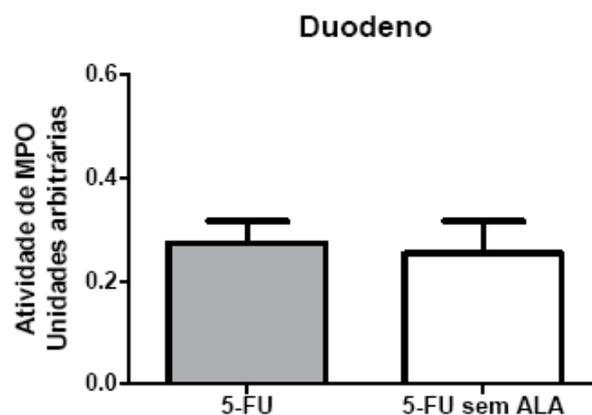


Figura A17 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 10$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

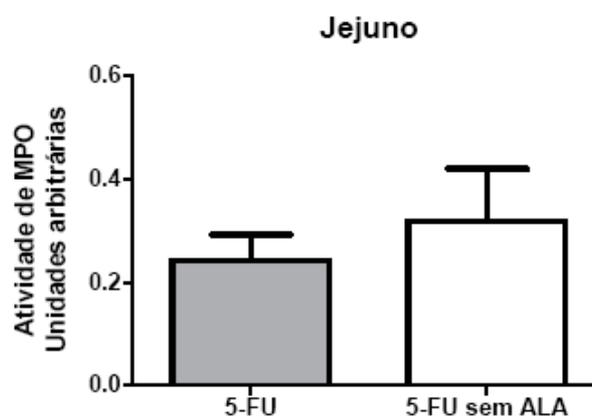


Figura A18 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 10$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

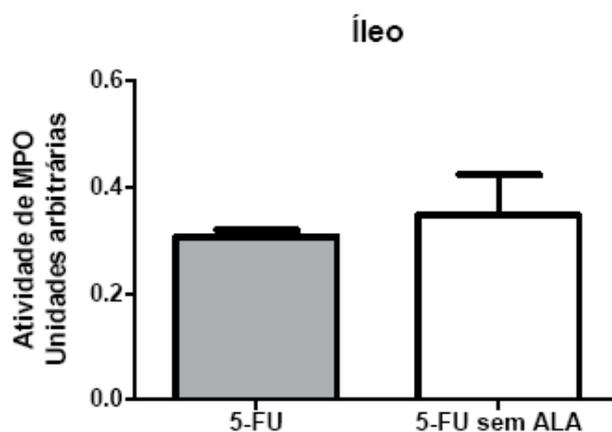


Figura A19 - Avaliação da atividade de MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) no íleo três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 12$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente.

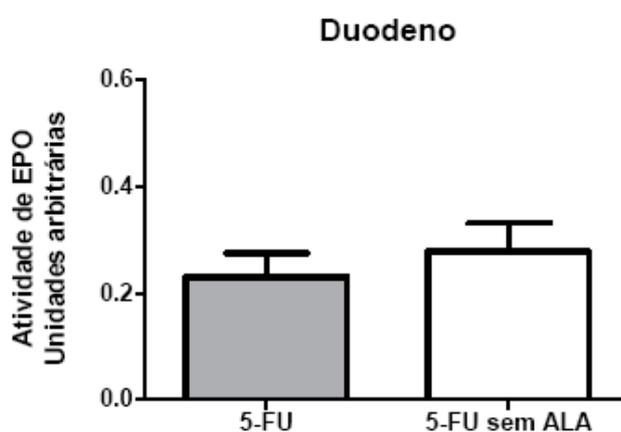


Figura A20 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no duodeno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). $n = 8$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

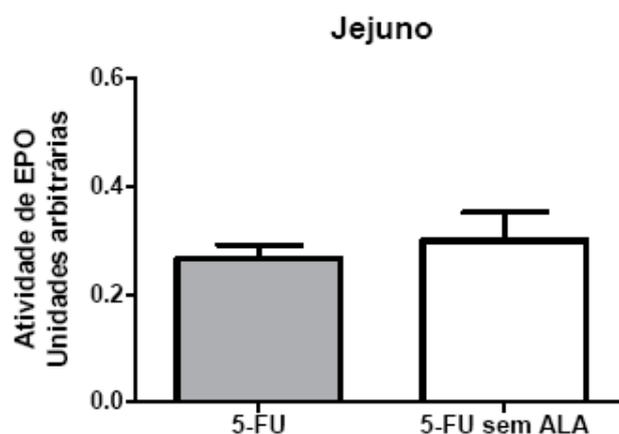


Figura A21 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no jejuno três dias após tratamento com 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água pura ou suplementada com 2% de L-alanina. Teste t de *Student* não pareado. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 7$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

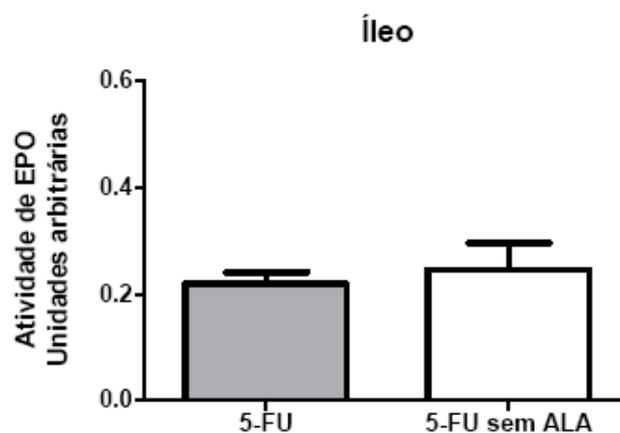


Figura A22 - Avaliação da atividade de EPO (medida indireta da infiltração de eosinófilos) no íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). $n = 9$ e 6 para os grupos Controle e Controle sem ALA, respectivamente. *Outliers* retirados.

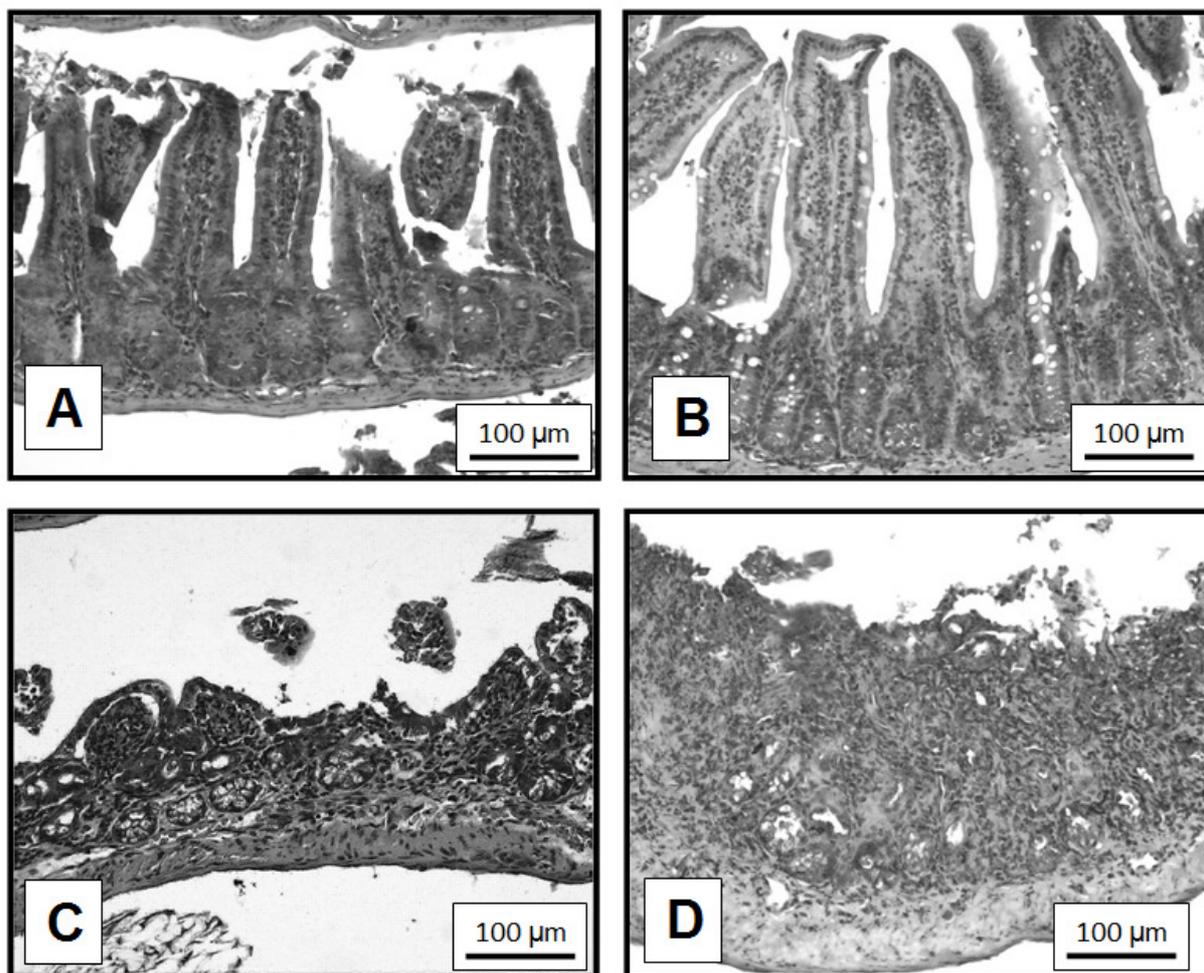
Aspecto morfológico da mucosa do jejuno distal e íleo

Figura A23 - Aspecto morfológico do jejuno distal três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). Grupo Controle (A), ARG (B), 5-FU (C), ARG 5-FU (D). Aumento de 10x.

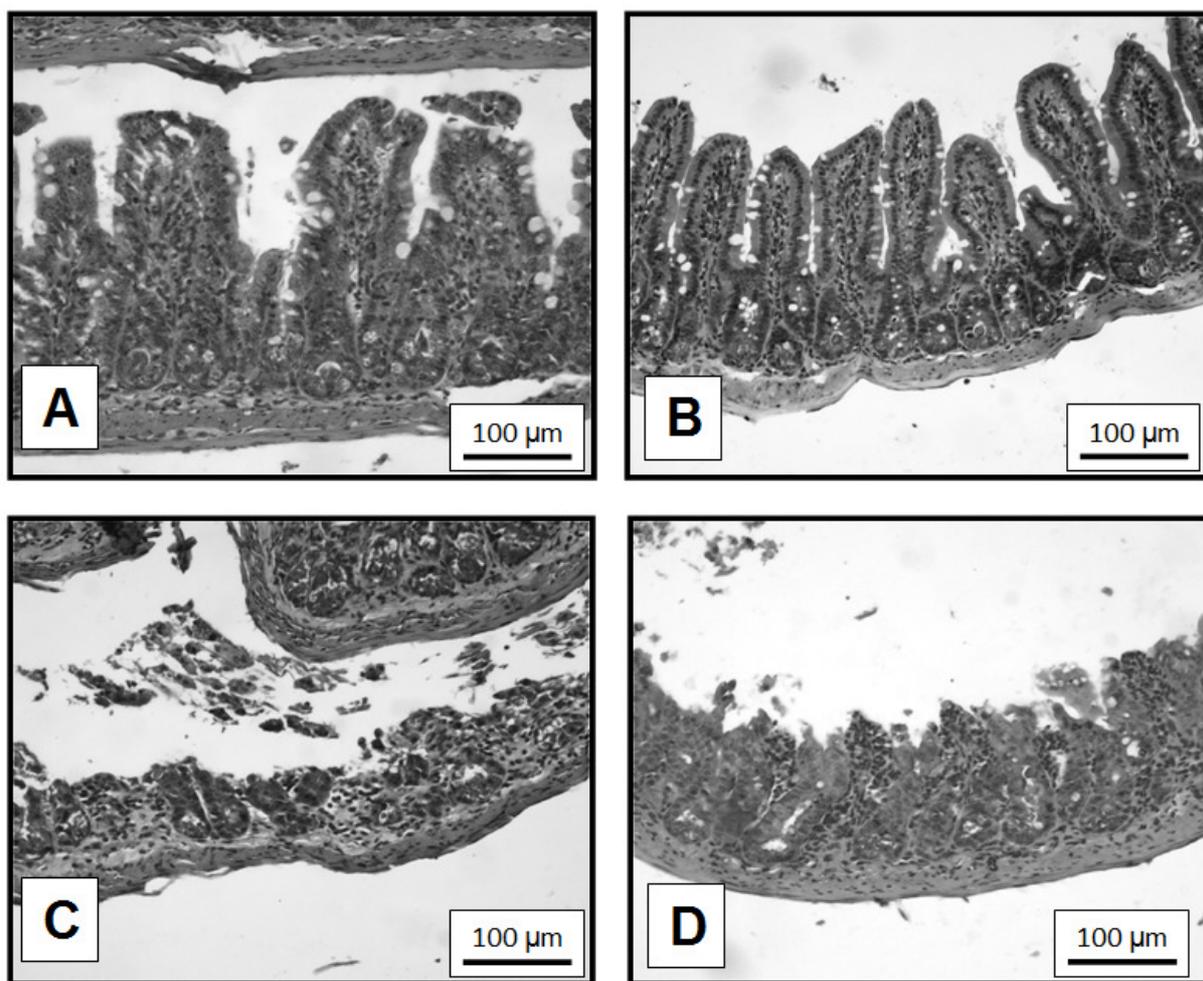


Figura A24 - Aspecto morfológico do íleo três dias após tratamento com PBS ou 5-FU. Animais tratados com 200mg/kg de peso de PBS (Controle e ARG) ou 5-FU (5-FU e ARG 5-FU) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial e bebendo água com 2% de L-alanina (Controle e 5-FU) ou L-arginina (ARG e ARG 5-FU). Grupo Controle (A), ARG (B), 5-FU (C), ARG 5-FU (D). Aumento de 10x.