



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

CELINA VIANA DE ARAÚJO

**EFEITOS DA ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA PELO 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS
DEFICIENTES DA APOLIPOPROTEÍNA-E**

**FORTALEZA
2013**

CELINA VIANA DE ARAÚJO

EFEITOS DA ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA PELO 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS
DEFICIENTES DA APOLIPOPROTEÍNA-E

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal do Ceará,
como exigência parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Médicas. Área
de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A688e

Araújo, Celina Viana de.

Efeitos da alanil-glutamina na mucosite intestinal induzida pelo 5-fluorouracil em camundongos deficientes da apolipoproteína-E/ Celina Viana de Araújo. – 2013.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Médica, Fortaleza, 2013.

Área de concentração: Medicina.

Orientação: Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. 5-Fluorouracil. 2. Mucosite. 3. Alanil-glutamina. 4. Inflamação. I. Título.

CDD 616.34

CELINA VIANA DE ARAÚJO

EFEITOS DA ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA PELO 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS
DEFICIENTES DA APOLIPOPROTEÍNA-E

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade Federal do Ceará,
como exigência parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Médicas. Área
de concentração: Medicina.

Aprovada em: 28/11/2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Luciana Relly Bertolini
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

Aos meus pais Casemiro B. Araújo e Verônica S. Viana,
pelos ensinamentos; e irmãos Casimiro e Célia, pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Reinaldo B. Oriá, pela orientação, dedicação e por sempre estar disposto a ajudar. Muito obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu amigo Tiê Bezerra, pela amizade e ajuda com os experimentos laboratoriais realizados neste trabalho, em especial o ELISA.

Ao meu amigo e doutorando Ítalo Figueiredo, pela ajuda em vários procedimentos e manipulação com os animais.

À Cristhyane Costa, por sua amizade, apoio e auxílio nos momentos necessários.

Aos meus amigos da iniciação científica Rakel Castro, Jardlon Albino, Amanda Aragão, Priscila Briseno e Anita Feitosa, pela amizade e ajuda. Todos contribuíram para a formação desse trabalho.

Aos novos alunos do nosso laboratório Vicente Souza e Luciana Rebouças, pela amizade e ajuda com algumas referências.

Às técnicas do nosso laboratório Rosângela Teixeira e Michelle Vieira, pela ajuda em vários experimentos. A primeira com Western Blot, e a segunda com a preparação dos reagentes e ajuda no sacrifício dos animais.

Ao meu amigo Luís Antônio, pelo apoio e ajuda na revisão deste trabalho.

Ao meu amigo Orleância Ripardo, pela confiança, amizade e companheirismo durante esses anos.

Aos meus amigos Davi Gonçalves, Josiane Santos e Camila Albuquerque, pela convivência, apoio e amizade.

Ao ex-técnico do laboratório Antônio Ricardo, pela amizade e ajuda nos experimentos desde a época da graduação até a minha entrada na pós-graduação. Muito obrigada por tudo.

Às técnicas do departamento de Morfologia da UFC Socorro França e Conceição da Silva, pela prontidão nas confecções das lâminas para histologia.

Ao Ivan Rodrigues, pelo auxílio técnico durante o processamento histológico de algumas amostras.

Aos professores Dr. Ronaldo Albuquerque e Dr. Roberto César, por gentilmente cederem o quimioterápico 5-fluorouracil para nossos experimentos.

À professora Dra. Luciana Bertolini e Cícera Lazzaroto, pela realização do PCR em tempo real.

Às professoras Dra. Antoniella Souza e Dra. Luciana Bertolini, por aceitarem o convite para compor a mesa examinadora.

À professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pelo apoio logístico do Núcleo de Microscopia e Processamento e Imagens (NEMPI) do Departamento de Morfologia da UFC.

Aos professores do Curso da Pós-Graduação da UFC, que muito contribuíram para a minha formação.

Ao meu amigo de trabalho Dr. José Maciel Andrade, pelo incentivo e apoio durante esse período. Muito obrigada pela compreensão durante os momentos de minha ausência.

Aos meus amigos e familiares, que sempre estiveram otimistas e confiantes na realização e conclusão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo suporte financeiro desse projeto.

“O futuro tem muitos nomes:
Para os fracos, é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes, é a oportunidade.”
(Victor Hugo)

RESUMO

A mucosite intestinal é uma reação inflamatória e/ou ulcerativa do revestimento gastrointestinal, podendo ocorrer pelo efeito citotóxico direto dos agentes de quimioterapia e radioterapia antineoplásicas. O 5-fluorouracil (5-FU) é um antineoplásico que está clinicamente indicado no tratamento de diversos tipos de câncer. A glutamina (Gln) é o aminoácido mais comumente encontrado no organismo, sendo benéfica na recuperação da mucosite oral e intestinal. A suplementação com derivados mais estáveis da Gln, tal como alanil-glutamina (Ala-Gln), representa um meio de fornecimento de Gln para o organismo. Um estudo recente do nosso grupo mostrou que animais deficientes da apolipoproteína E tinham agravamento da mucosite intestinal induzida pelo 5-FU. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da Ala-Gln no tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos C57BL6J *APOE* nocautes (*ApoE*^{-/-}) e selvagens. Utilizamos camundongos com pesos entre 20-25 g, de ambos os sexos, sendo desafiados com injeção intraperitoneal de 5-FU (450 mg/kg), dose única, e controles receberam PBS. Os animais foram tratados com doses de Ala-Gln (100 mM) ou PBS por gavagem (0,5 mL) três dias antes da administração do 5-FU e durante cinco dias consecutivos, sendo sacrificados com solução de eutanásia no sexto dia. Amostras de íleo foram armazenadas em freezer (-80 °C) para uso em protocolos de biologia molecular. Amostras também foram fixadas em formaldeído para processamento histológico. O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente e o efeito citotóxico mielosupressor do 5-FU avaliado pela técnica de leucometria. Também foram considerados parâmetros morfométricos de altura de vilos e profundidade das criptas, índice mitótico e apoptótico, bem como os seus escores para necrose. O Western blot foi usado para a detecção da expressão de vilina e TNF- α intestinais; ELISA para o estudo de citocinas e PCR em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação de IGF-1e Bcl-2 intestinais. Os animais selvagens e *APOE* nocautes, mesmo àqueles tratados com Ala-Gln, apresentaram perda de peso corporal quando desafiados com 5-FU, não havendo diferença entre os grupos. Porém, estes diferiram estatisticamente, apenas, quando comparados aos controles PBS ($p < 0,001$). Verificamos uma leucopenia significativa nos animais selvagens e nocautes desafiados pelo 5-FU em comparação ao grupo PBS ($p < 0,001$), não sendo este efeito revertido ou melhorado com a administração de Ala-Gln. Nas análises morfométricas do íleo, encontramos uma redução na altura de vilos ($p < 0,001$), um aumento da profundidade das criptas ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) e uma redução da razão vilo/cripta ($p < 0,0001$) nos animais selvagens e nocautes desafiados pelo 5-FU em comparativo aos respectivos controles PBS. O tratamento com Ala-Gln melhorou a razão vilo/cripta ($p < 0,0001$) e a profundidade das criptas ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$) nos animais selvagens e nocautes em relação aos respectivos animais desafiados pelo 5-FU. A altura de vilos foi melhorada ($p < 0,01$) apenas nos animais *APOE* nocautes tratados com Ala-Gln em relação aos respectivos animais desafiados pelo 5-FU. O desafio pelo 5-FU não aumentou o índice mitótico nas criptas dos animais selvagens e *APOE* nocautes em relação os controles PBS e os tratados com Ala-Gln. Houve um aumento de células em apoptose nos animais selvagens e nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em relação aos seus controles PBS. Houve um aumento significativo nos escores para criptas necróticas ($p < 0,028$) em animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU em relação aos respectivos controles não desafiados. Apenas os camundongos selvagens tratados com Ala-Gln tiveram uma redução significativa ($p < 0,04$) nos seus escores em comparação com os animais não tratados injetados com 5-FU. Não houve diferença estatística nos níveis da citocina IL-1 β detectadas por ELISA no íleo nos animais selvagens desafiados pelo 5-FU comparados aos controles PBS e Ala-Gln. Contudo, houve um aumento significativo nos níveis dessa citocina nos animais *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln. Não houve diferença na expressão de vilina e TNF- α no íleo nos grupos estudados. Transcritos de RNAm de IGF-1 e Bcl-2 no íleo foram encontrados diminuídos nos animais *APOE* nocautes em comparação aos animais selvagens. Nossos resultados sugerem que a deficiência de *APOE* tem um papel fundamental durante a mucosite intestinal induzida pelo 5-FU seguido pelo tratamento com Ala-Gln.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil. Mucosite. Alanil-glutamina. Inflamação.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is an inflammatory and/or ulcerative reaction of the gastrointestinal lining that could happen by the direct cytotoxic effect of chemotherapy agents or radiotherapy. 5-fluorouracil (5-FU) is anti-neoplastic drug which is clinically indicated for the treatment of various types of cancer. Glutamine (Gln) is the commonest amino acid found in the organism, being beneficial to the intestinal and oral mucositis healing. The supplementation of more stable Gln derivatives, such as alanyl-glutamine (Ala-Gln), provides better Gln availability to the body. In a recent study from our group, we have shown that apolipoprotein E-deficient mice had aggravated 5-FU-induced intestinal mucositis. In this study we aimed at investigating the Ala-Gln effects in the treatment of the 5FU-induced intestinal mucositis in C57BL6J *APOE* knockout (*ApoE*^{-/-}) and wild-type mice. We utilized mice weighing 20-25 g, both sexes, being challenged by the intraperitoneal injection of 5-FU (450 mg/kg), single dose and controls that received PBS. Mice were treated with either Ala-Gln (100 mM) or PBS by gavage (0.5 mL) three days prior to the 5-FU administration and during five consecutive days. Afterwards, mice were sacrificed with euthanasia solution in the 6th day. Ileal samples were stored in -80°C freezer for molecular biology protocols. Samples were also fixed in formaldehyde for histological processing. Mouse body weight was monitored daily and the 5-FU myelosuppressive and cytotoxic effect were evaluated by leukometry assessment. We also have assessed morphometrical parameters, including villus height, crypt depth, mitotic and apoptotic indexes, as well as, crypt necrosis scores. Western blot was used to detect intestinal villin and TNF- α expression; ELISA was used to evaluate ileal cytokines; and quantitative real time PCR (qPCR) was used to detect and quantify intestinal IGF-1 and Bcl-2 mRNA. Wild-type and *APOE* knockout mice, even after Ala-Gln treatment, showed significant body weight loss following 5-FU challenge. No differences between groups were found. However, they were statistically different only when compared with the PBS controls ($p < 0.001$). A significant leukopenia was found in the wild-type and *ApoE* knockout mice after challenged by 5-FU in comparison with the PBS group ($p < 0.001$), such effect was not improved or abrogated with Ala-Gln administration. Regarding ileal morphometric analyses, a great reduction in villus height ($p < 0.001$) and an increased in crypt depth ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), and the reduction of the villus/crypt ratio ($p < 0.0001$) were found in wild-type and *APOE* knockout mice challenged by 5-FU as opposed to their respective PBS controls. Ala-Gln treatment improved villus/crypt ratio ($p < 0.0001$) and crypt depth ($p < 0.001$) in the wild-type and *APOE* knockout mice compared with the untreated 5-FU challenged animals. The villus height was ameliorated ($p < 0.01$) only in the Ala-Gln-treated *APOE* knockout mice in regard to the respective 5-FU challenged animals. The 5-FU challenge did not increase the crypt mitotic index in the wild-type and *APOE* knock-out mice in comparison with the PBS controls and Ala-Gln-treated mice. An increase in apoptotic cells was found in the wild-type and *APOE* knockout mice challenged by 5-FU and treated with Ala-Gln ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) as compared with the PBS controls. There was a significant increase in the scores for necrotic crypts ($p < 0.028$) in the wild-type and *APOE* knockout mice challenged by 5-FU in comparison with the unchallenged controls. Only the Ala-Gln-treated wild-type mice had significant reduction ($p < 0.04$) in these scores in comparison with the untreated 5-FU injected animals. We could not find statistical differences in the ileal IL-1 β -cytokine levels detected by ELISA in the 5-FU-challenged wild-type animals as compared with the PBS controls and in the Ala-Gln treatment group. However, a significant increase in this cytokine levels was found for *APOE* knockout mice challenged by 5-FU and Alan-Gln treated. Villin and TNF- α ileal expression was not different between groups. Ileal Bcl-2 and IGF-1 mRNA transcripts were found diminished in the *APOE* knockout mice as compared with the wild-type controls. Altogether our findings suggest that *APOE* deficiency has a key role during 5-FU-induced intestinal mucositis and following Ala-Gln treatment.

Keywords: 5-Fluorouracil. Mucositis. Alanyl-glutamine. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

1	Estruturas químicas da uracila e 5-fluorouracil	18
2	Mecanismo de ação do 5-FU	20
3	Modelo da patobiologia da mucosite oral e intestinal	25
4	Estrutura química da glutamina	27
5	Metabolismo da glutamina	28
6	Modelo tridimensional da apolipoproteína E	32
7	Administração intraperitoneal de 5-FU em camundongo selvagem	39
8	Fluxograma do modelo experimental	39
9	Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilo e da profundidade da cripta	40
10	Leitora de ELISA utilizada na análise de citocinas	43
11	Aparato de eletroforese em funcionamento	45
12	Termociclador utilizado no qPCR	47
13	Efeito da administração da Ala-Gln sobre o peso corporal de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU	49
14	Efeito da administração da Ala-Gln sobre a leucometria de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	50
15	Histologia representativa do íleo de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	52
16	Avaliação morfométrica da altura dos vilos em íleo de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	53
17	Avaliação morfométrica da profundidade das criptas em íleo de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	54
18	Avaliação morfométrica da razão vilo/cripta em íleo de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	55
19	Histologia representativa das criptas do íleo de camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	57
20	Avaliação do índice mitótico das criptas em camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	58
21	Avaliação do índice apoptótico das criptas em camundongos <i>APOE</i> nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	59

22	Avaliação da expressão da citocina IL-1 β detectadas por ELISA no íleo de animais selvagens e <i>APOE</i> nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	61
23	Expressão de vilina no íleo de animais selvagens e <i>APOE</i> nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln detectada por Western Blot	62
24	Expressão de TNF- α no íleo de animais selvagens e <i>APOE</i> nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln detectada por Western Blot	63
25	Transcritos de RNAm para IGF-1 detectadas pelo qPCR no íleo de animais selvagens e <i>APOE</i> nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	64
26	Transcritos de RNAm para Bcl-2 detectadas pelo qPCR no íleo de animais selvagens e <i>APOE</i> nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
5-FU	5-fluorouracil
Ala-Gln	Alanil-glutamina
ApoE	Apolipoproteína da classe E
<i>APOE</i>	Gene da apolipoproteína E
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina 5-trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
DHFU	Diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPD	Diidropirimidina desidrogenase
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
<i>et al</i>	E outros
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FUTP	Fluorouridina trifosfato
g	Gramma
GA	Glutaminase
GI	Gastrointestinal
Gln	Glutamina
GS	Glutamina sintetase

GSH	Glutadiona
HPR	Horseradish Peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
H&E	Hematoxilina e eosina
i.p	Intraperitoneal
IGF-1	Fator de crescimento insuliniforme
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
IL	Interleucina
IBISAB	Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro
IgG	Imunoglobulina da classe G
kg	Quilograma
kDa	Quilodaltons
Ko	Nocaute
L	Litro
mm ³	Milímetro cúbico
min.	Minuto
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mL	Mililitro
n°	Número
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de significância
PAF	Fator de Ativação Plaquetário
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PM	Peso molecular
pH	Potencial hidrogeniônico
P.A	Para análise
q.s.p	Quantidade suficiente para
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real

RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
RNA _{sn}	Ácido ribonucleico <i>small</i> nuclear
RNA _t	RNA transportador
TNF	Fator de necrose tumoral
TS	Timidilato Sintase
UFC	Universidade Federal do Ceará
vs	<i>Versus</i> – em oposição a
V	Volt
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WT	<i>Wild-type</i> (tipo selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
dH ₂ O	Água destilada
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
%	Por cento
α	Alfa
β	Beta
<	Menor que
®	Marca registrada
&	Conjunção aditiva <i>e</i> (comercial)
#	Designação de um número
±	Mais ou menos
-/-	Nocauté – gene retirado ou desabilitado
v/v	Percentual volume-volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	18
1.2	Mucosite intestinal	22
1.3	Glutamina (Gln)	26
1.4	Apolipoproteína E	30
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos gerais	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Animais	36
4.2	Drogas, reagentes, soluções e anticorpos.....	36
4.3	Equipamentos e materiais	37
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, tratamento com alanil-glutamina (Ala-Gln), análise ponderal e leucometria	38
4.5	Análise morfométrica	39
4.6	Índice mitótico e apoptótico	41
4.7	Escores de criptas necróticas	41
4.8	Medida de citocinas	43
4.9	Western Blot	44
4.10	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)	45
4.10.1	Extração do RNA	45
4.10.2	Análise Espectrofométrica	46
4.10.3	Transcrição Reversa e Amplificação	46
4.11	Análise Estatística	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Avaliação ponderal	48
5.2	Avaliação do parâmetro leucometria	50
5.3	Avaliação morfométrica	51
5.4	Avaliação do índice mitótico e apoptótico nas criptas	56
5.5	Avaliação dos escores para criptas necróticas	60
5.6	Avaliação da expressão de IL-1β detectada por ELISA	60

5.7	Avaliação da expressão de vilina e TNF-α detectados por Western Blot	61
5.8	Avaliação dos transcritos de RNAm para IGF-1 e Bcl-2 detectados pelo qPCR	64
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO.....	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Em estudo recente, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) estimou que 7,6 milhões de mortes em todo o mundo foram devido a esta doença, com a ocorrência de aproximadamente 12,7 milhões de novos casos por ano. Uma parte significativa desses casos é observada nos países em desenvolvimento com uma estimativa de 63% das mortes nestes países (JEMAL *et al.*, 2011; FERLAY *et al.*, 2010). Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), a estimativa para 2030 é de 27 milhões de casos incidentes da doença, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas acometidas anualmente. O maior efeito desse aumento vai incidir em países pobres e emergentes.

Uma das grandes áreas de foco do tratamento do câncer é o alvo terapêutico a partir da pesquisa de sinais intracelulares gerados por hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, quimiocinas, citocinas e pequenas moléculas como a adenosina 5-trifosfato (ATP). O desenvolvimento mais revolucionário da biologia celular e molecular tem contribuído para a compreensão das vias moleculares nos processos oncogênicos. O câncer é um processo que se desenvolve com a participação de um evento principal: a perda da estabilidade genômica (WARDWELL; MASSION, 2005). Durante a vida ocorre o acúmulo de eventos carcinogênicos que predis põe o surgimento de processos pré-malignos até o surgimento do processo maligno (KAMANGAR *et al.*, 2006). A quimioterapia antineoplásica consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de combater as neoplasias malignas. A maioria dos quimioterápicos antineoplásicos atua de forma não específica afetando tanto as células normais como as neoplásicas, como as células da medula óssea, do epitélio intestinal e bucal (SONIS *et al.*, 2004).

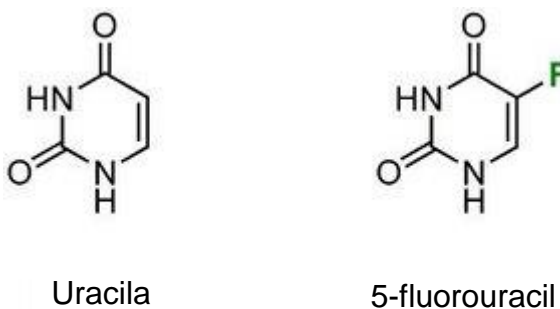
Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer podem ser divididos como: agentes alquilantes e compostos correlatos (mostarda nitrogenada, ciclofosfamida, bussulfano, ifosfamida) que atuam através da formação de ligações covalentes com o DNA, mais especificamente com as bases guaninas, impedindo dessa forma a sua replicação; derivados vegetais (alcaloides da vinca, taxanos, etoposida, camptotecinas), que afetam especificamente a função dos microtúbulos e, por conseguinte, a formação do fuso mitótico, levando a aneuploidia; antibióticos citotóxicos (antraciclinas, dactinomicina, bleomicinas) que são substâncias de origem microbiana que impedem a divisão das células

dos mamíferos; os antimitóticos (vincristina, vimblastina, docetaxel, paclitaxel) que interferem na formação do fuso mitótico; inibidores de topoisomerasas (irinotecano, etoposido), que impedem a atividade desta enzima, impedindo o relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a replicação e transcrição e, como consequência, geram quebras no DNA; e antimetabólitos (metotrexato, fludarebina, fluorouracil), que interferem na síntese dos precursores de DNA e RNA e, em alguns casos, por apresentarem estruturas semelhantes aos precursores endógenos dos ácidos nucleicos, podem ser metabolizadas através das rotas púricas e pirimídicas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008; RANG *et al.*, 2004).

1.1 5- Fluorouracil (5-FU)

O 5-fluorouracil (5-FU) é um antimetabólito que tem sido usado no tratamento do câncer desde 1957. É um composto orgânico aromático heterocíclico com estrutura similar às moléculas pirimidinas do DNA e RNA, podendo substituí-las e interferir com a biossíntese ou função dos ácidos nucleicos, causando alterações na duplicação celular. 5-FU é análogo estrutural da uracila, diferindo apenas pela substituição de um átomo de hidrogênio por um flúor no carbono 5 no anel pirimídico (figura 1) (ZHANG *et al.*, 2008). Exerce seus efeitos antitumorais através da inibição da timidilato sintase (TS) e incorporação de fluoronucleotídeos no RNA ou DNA. É um agente ativo na fase de síntese (fase S) e G1 do ciclo celular. Está clinicamente indicado no tratamento de diversos tipos de câncer, como, por exemplo, tumores do cólon, reto, trato gastrointestinal (GI), mama, ovário, cabeça e pescoço (GEM, 1997; HARRIS *et al.*, 2005; NOORDHUIS *et al.*, 2004).

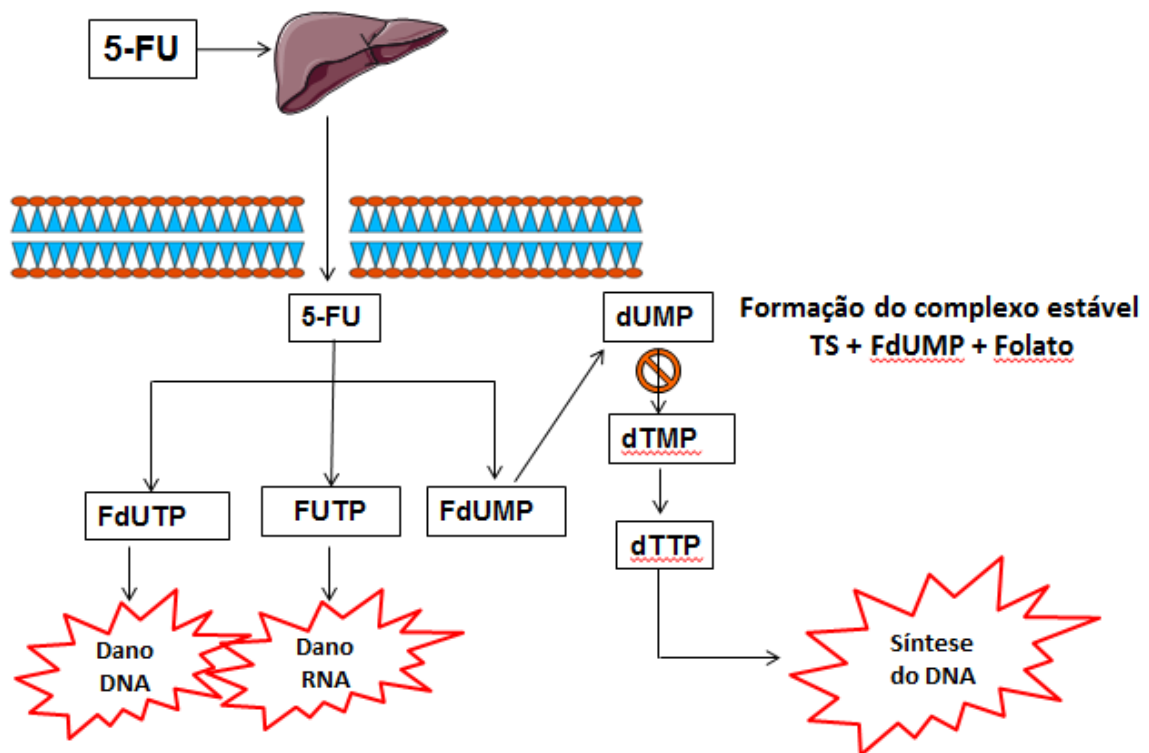
Figura 1 – Estruturas químicas da uracila e 5-fluorouracil.



Fonte: <http://www.afghanforums.com/showthread.php?26825-Randomness-Thread-It-It-Part-12/page18>. Acesso em: 20 jan. 2013. O 5-FU se caracteriza por apresentar semelhanças estruturais com os intermediários da síntese dos ácidos nucleicos (como a uracila), podendo substituí-los e causar alterações na duplicação celular.

5-FU é metabolizado intracelularmente, sendo convertido ao nucleotídeo fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), inibindo a atividade da enzima TS e, desse modo, interferindo com a síntese do DNA. TS transfere o grupo metil do 5,10 – metileno-tetraidrofolato (CH₂-THF) para a deoxiuridina monofosfato (dUMP), formando a deoxitimidina monofosfato (dTMP), a qual será convertida em deoxitimidina trifosfato (dTTP), um dos quatro deoxirribonucleotídeos essenciais para a síntese do DNA. FdUMP compete com dUMP ao se ligar ao TS e ao folato, formando um complexo ternário covalente. Esse complexo bloqueia o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo, inibindo a síntese de dTMP. Desse modo, há um desequilíbrio nas concentrações de outros deoxinucleotídeos (dATP, dGTP e dCTP), diminuição das concentrações de dTTP e aumento de deoxiuridina trifosfato (dUTP). Tanto dUTP e FdUTP podem ser incorporados ao DNA. Essa desproporção de deoxinucleotídeos e aumento de dUTP podem causar destruição do DNA (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; PINEDO; PETERS, 1988). O 5-FU também exerce seus efeitos antitumorais através de outros mecanismos: incorporação do falso nucleotídeo fluorouridina trifosfato (FUTP) no RNA, inibindo, dessa forma, sua função e síntese, e incorporação da fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA, levando à quebra de suas cadeias (GREM, 1997; NOORDHUIS *et al.*, 2004, figura 2).

Figura 2 – Mecanismo de ação do 5-FU.



Fonte: Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE).

A citotoxicidade do 5-FU é atribuída a três mecanismos: incorporação do fluorouridina trifosfato (FUTP) no RNA, incorporação do fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA e inibição da enzima Timidilato Sintase (TS). 5-FU pode ser convertido a fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) e se ligar a Timidilato Sintase (TS), inibindo a sua atividade e causando um desbalanço na síntese dos nucleotídeos.

A citotoxicidade do 5-FU pela incorporação no RNA inibe o processamento do pré-RNA_r em RNA_r, além de interromper a modificação pós-transcricional de RNA_t e a atividade de montagem do complexo RNAs_n/proteína, inibindo assim o *splicing* do pré-RNA_m. Incorporação do 5-FU em diferentes moléculas de RNA pode, por conseguinte, levar a perturbações de processamento de RNA_m e síntese de proteínas. Após a incorporação do 5-FU no DNA, ele pode ser excisado pelo uracil-DNA-glicosilato seguido pela clivagem endonucleofílica apirimidínico-apurínico, resultando nas quebras das fitas do DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MAURO *et al.*, 1993; SAMUELSSON, 1991).

A diidropirimidina desidrogenase (DPD) desempenha um importante papel na degradação e biodisponibilidade do 5-FU, sendo encontrada em abundância no fígado e rins, e em menor quantidade em monócitos do sangue periférico. DPD catalisa a primeira etapa na

via de degradação do 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU), sendo o passo inicial e limitante de velocidade do seu catabolismo em células normais e tumorais. A degradação do 5-FU mediada por DPD é responsável por mais de 80% de sua eliminação. O extensivo catabolismo do 5-FU pode limitar a formação de seus metabólitos ativos, enquanto que a sua degradação diminuída devido a uma deficiência de DPD resulta a um aumento de sua toxicidade, às vezes levando à morte (HEGGIE *et al.*, 1987; VAN KUILENBURG, 2004).

A principal via de administração do 5-FU é a endovenosa, embora a infusão arterial hepática e a instilação intraperitoneal tenham sido usadas em circunstâncias clínicas especiais. O 5-FU pode ser administrado por bolus, infusão rápida ao longo de minutos ou horas ou infusão prolongada, ao longo de horas a semanas (LAMONT; SCHILSKY, 1999). Os principais efeitos colaterais estão associados com o modo da administração. Quando o fármaco é dado por bolus durante cinco dias consecutivos, durante quatro a cinco semanas, os efeitos tóxicos são a neutropenia e estomatite. Em contraste, com doses de bolus semanais, a diarreia é mais frequente. A administração por infusão intravenosa contínua está associada por menor toxicidade GI e hematológica, mas a eritrodisestesia (síndrome mão-pé) é a mais comum (MEYERHARDT; MAYER, 2005).

5-FU tem sido usado na clínica em combinação com outros agentes moduladores que aumentam seu metabolismo ou efeitos citotóxicos e de outros agentes antineoplásicos, tais como cisplatina, metrotexato (GREM, 1997), oxaliplatina, leucovorina, irinotecano (GOLDBERG *et al.*, 2004; GUNNLAUGSSON *et al.*, 2009; NOORDHUIS *et al.*, 2004) entre outros, e radiação ionizante, com os quais ele pode produzir atividade sinérgica. As toxicidades clínicas comuns do 5-FU afetam rapidamente tecidos de divisão, tais como células hematopoiéticas da medula óssea e células da mucosa GI (GRADISHAR; VOKES, 1990). A rápida proliferação das células epiteliais intestinais torna o trato GI altamente vulnerável à quimioterapia. Complicações GI, incluindo náuseas, vômitos, diarreia e mucosite são os principais contribuintes para o atraso ou interrupção do tratamento. Mais de 90% das drogas quimioterápicas disponíveis causam essas complicações, e cerca de 30% destes fármacos podem causar severos efeitos GI. (XUE *et al.*, 2011).

A mucosite intestinal é um dos principais efeitos colaterais resultantes da quimioterapia, caracterizando-se pela inflamação e perda celular na barreira epitelial que reveste o trato GI. (VAN VLIET *et al.*, 2010).

1.2 Mucosite Intestinal

A mucosite se caracteriza como uma reação tóxica inflamatória, afetando o trato GI da boca ao ânus, que pode ocorrer por exposição à quimioterapia ou radioterapia antineoplásicas. Ela ocorre em 10-40% dos pacientes que recebem a quimioterapia na dosagem padrão e pode atingir até 100% dos pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia, manifestando-se clinicamente por sintomas orais, como dor e eritema; e sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, edema, dor abdominal e diarreia, constituindo o fator dose-limitante no tratamento do câncer (KEEF *et al.*, 2000, WU *et al.*, 2011). Muitos dos fatores que predis põem os pacientes à mucosite intestinal são similares àqueles para a mucosite oral. A incidência e a gravidade dos sinais e sintomas da mucosite dependem de vários fatores, como, por exemplo, toxicidade do quimioterápico, o volume de tecido irradiado, tipo, dose e frequência da administração da droga, além de fatores relacionados ao paciente, como idade, hábitos e condição clínica (KÖSTLER *et al.*, 2001; PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998) (resumo na tabela 1). Na mucosite grave, pacientes com neutropenia podem apresentar predisposição à septicemia (SONIS *et al.*, 2001). Inflamação grave, lesão, ulceração e sangramento podem ocorrer na boca, esôfago e intestino (DUNCAN; GRANT, 2003). Vários quimioterápicos contribuem para esse efeito, entre eles: metrotexato, irinotecano, ciclofosfamida, etoposide, melfalam e 5-FU.

Tabela 1 - Fatores que influenciam o desenvolvimento da mucosite.

Fatores relacionados ao paciente	Fatores relacionados à terapia
Tipo de malignidade	Quimioterápico usado
Pacientes < 20 anos	Dose e frequência da administração do fármaco
Estado nutricional	Terapia concomitante
Redução na quantidade de neutrófilos antes da quimioterapia	Terapia de radiação que envolve cabeça e pescoço

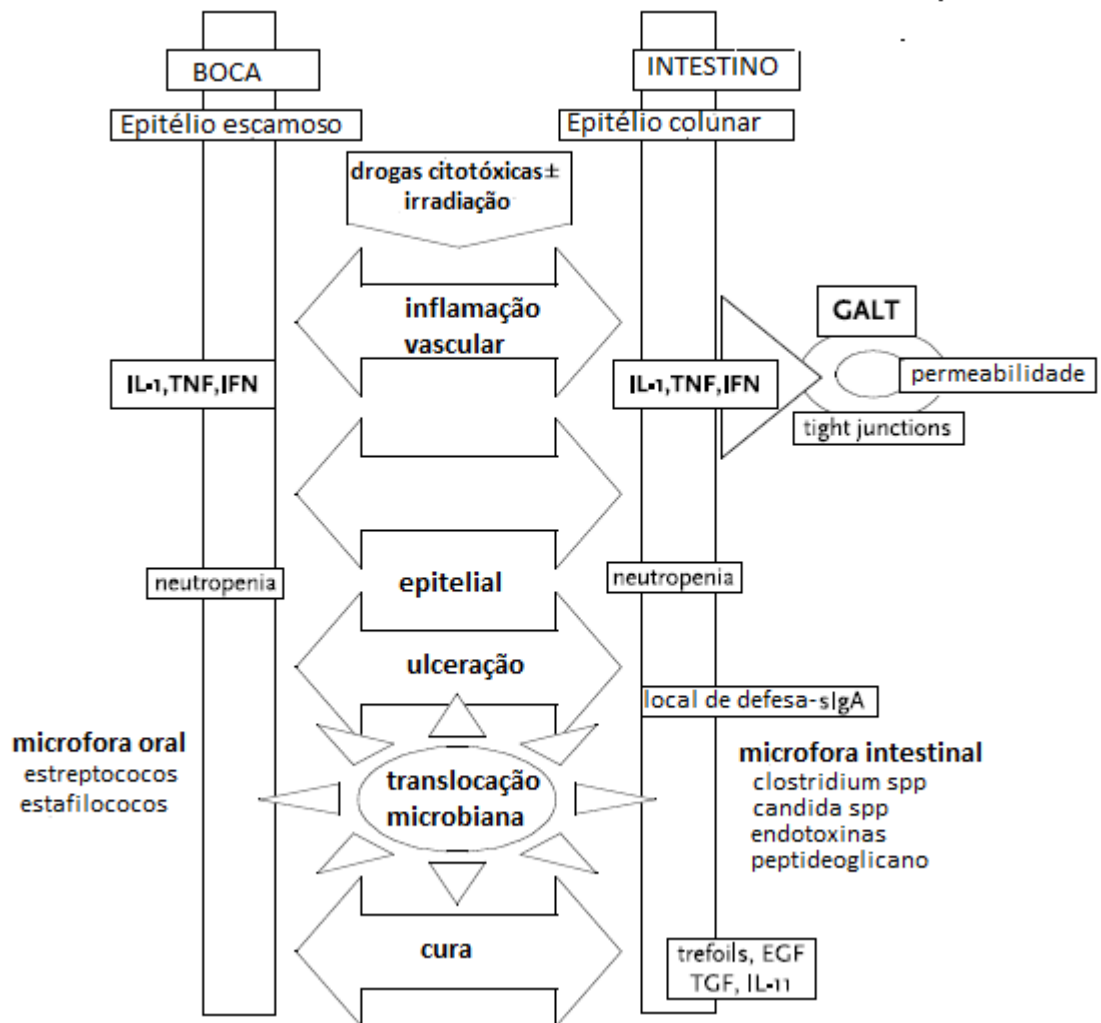
Fonte: PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998.

No intestino delgado, a mucosite induzida por quimioterapia antineoplásica resulta em atrofia dos vilos, diminuição da profundidade das criptas com hipoproliferação de suas células, devido, principalmente, a um aumento da apoptose (IJIRI; POTTEN, 1983; IKUNO *et al.*, 1995). Os pacientes podem apresentar vários sintomas, variando de leve náusea, vômitos e inchaço abdominal com cólicas dolorosas, e diarreia com dor abdominal intensa (necessitando da administração de narcótico). Na sua forma mais grave, a translocação bacteriana e a sepse são resultados da mucosite (KEEFE *et al.*, 1997). Os sintomas associados são desconfortáveis e dolorosos, prejudicando a ingestão de alimentos, comunicação, sono e estado mental (SONIS *et al.*, 2004). A incapacidade de engolir alimentos, ou mesmo líquidos, pode resultar em deficiências nutricionais, desidratação e, em muitos casos, anorexia, onde as formas mais drásticas para obtenção de alimentos devem ser utilizadas, como, por exemplo, através de sonda nasogástrica ou parenteral (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). A mucosa oral de pacientes com câncer é colonizada por uma variedade de microorganismos potencialmente patogênicos, especialmente cocos gram-positivos, bactérias oportunistas gram-negativas e fungos. Lesão na mucosa oral, leucopenia, alterações na composição e no fluxo salivar e mudança na microflora oral predispõe o paciente a infecções, especialmente durante períodos de mielossupressão (KÖSTLER *et al.*, 2001). Essa combinação de fatores leva ao aumento dos dias de hospitalização do paciente, à necessidade do uso de antibióticos, aumento dos riscos de bacteremia, o que leva a um aumento da morbidade e mortalidade, redução da qualidade de vida e aumento dos custos com tratamento (CHENG; CHANG; YUEN, 2004; SONIS, 1998; SONIS *et al.*, 2001).

Segundo Sonis *et al.* (2004), a patobiologia da mucosite é um processo complexo de alterações celulares e moleculares que pode ser dividido em cinco fases sequenciais: iniciação, superregulação, sinalização e amplificação, ulceração e cicatrização (resumo na figura 3). A fase de iniciação começa após a quimioterapia e/ou radioterapia, ocorrendo lesão direta no DNA das células basais do epitélio e o aparecimento de radicais livres e oxidativos, danificando as células, tecidos e vasos sanguíneos. Na superregulação, múltiplos eventos ocorrem simultaneamente. Espécies reativas de oxigênio causam destruição do DNA, levando à morte celular na camada epitelial. Ativação de fatores de transcrição, como, por exemplo, fator nuclear kappa B (NF- κ B), em resposta aos fatores oxidativos, quimioterapia ou radioterapia resultam em superregulação de vários genes, incluindo aqueles resultantes na produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas

(IL) 1 β e 6). A superregulação de outros genes causam a expressão de moléculas de adesão, ativação da via ciclooxigenase-2 e subsequente angiogênese. Na sinalização e amplificação, as citocinas pró-inflamatórias, além de exercerem um efeito prejudicial direto sobre as células-alvo da mucosa, também desempenham um papel indireto na amplificação da injúria da mucosa iniciada por quimioterapia e radioterapia. Os danos representados nessa fase estão localizados na submucosa e camada basal do epitélio, onde clinicamente a aparência da mucosa é normal. Durante a fase ulcerativa, ocorre colonização bacteriana (organismos gram-positivos, gram-negativos e anaeróbicos). Produtos da parede celular bacteriana podem ativar os macrófagos teciduais, levando a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), amplificação e aceleração dos danos teciduais. Essa fase pode levar a bacteremia e sepse em pacientes neutropênicos pela invasão dos microrganismos através dos vasos da submucosa. A cicatrização se inicia com um sinal da matriz extracelular, o que leva a proliferação, diferenciação e migração das células epiteliais e restauração da integridade da mucosa.

Figura 3 - Modelo da patobiologia da mucosite oral e intestinal.



Fonte: BLIJLEVENS; DONNELLY; DE PAUW, 2000.

Este modelo descreve as seguintes fases: 1) Fase inflamatória, sendo caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por drogas citotóxicas e irradiação; 2) Fase epitelial, em que as células param de se dividir e morrem, desenvolvendo a neutropenia; 3) Fase ulcerativa/bacteriológica, em que a flora microbiota residente e seus produtos translocam para a corrente sanguínea, prejudicando defesas locais e menores níveis de IgA secretórias, predispondo ao desenvolvimento de infecção local; 4) Fase de cura, envolvendo a ação de substâncias naturalmente presentes incluindo *trefoils*, TGF e EGF. O intestino possui o Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT), sendo sua microflora mais numerosa e variada.

A lesão da mucosa por quimioterápicos ou radioterapia resulta na liberação de mediadores inflamatórios e ativação de processos biológicos que podem resultar em vários efeitos sistêmicos, entre eles: dor, fadiga, caquexia, disfagia e aumento dos riscos de infecção (MURPHY, 2007). Devido a uma grande renovação celular (RADTKE; CLEVERS, 2005) e das proteínas na mucosa (COEFFIER *et al.*, 2003), o intestino é altamente sensível aos antineoplásicos. A mucosite intestinal é, portanto, associada com a ruptura da barreira intestinal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004), e encontra-se relacionada a um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose de células epiteliais do intestino. Duas disfunções têm sido claramente demonstradas na mucosite intestinal: uma diminuição da proliferação e uma maior apoptose em células das criptas intestinais na fase aguda induzida pelo efeito citotóxico e citostático do 5-FU. Mais tarde, a hiperplasia das criptas e aumento compensatório da proliferação celular são necessários para a recuperação da mucosa após a lesão.

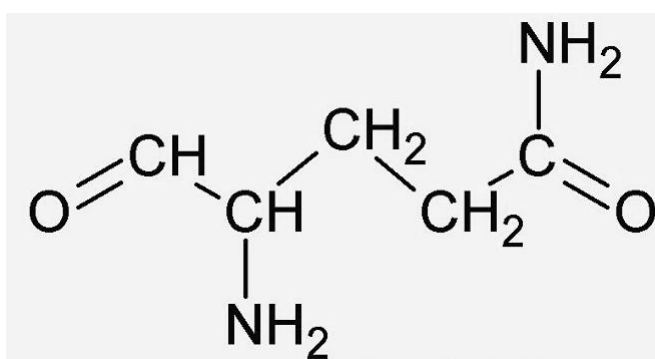
Vários fatores ou genes têm sido estudados na indução da mucosite intestinal induzida por 5-FU: o aumento da apoptose e diminuição da celularidade causa alterações histológicas no intestino (PRITCHARD *et al.*, 1998); formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) e da produção de citocinas próinflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-4 (SONIS *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013) levam à lesão da mucosa; além da produção do fator de ativação plaquetário (PAF) (SOARES *et al.*, 2011) e NF- κ B (CHANG *et al.*, 2012) que participam da patogênese da mucosite intestinal. Embora vários genes possam estar envolvidos da mucosite induzida pelo 5-FU, as moléculas-chave, em especial os fatores de transcrição que regulam os genes associados à patogênese da mucosite, ainda são incertos (CHANG *et al.*, 2012).

1.3 Glutamina (Gln)

O trato GI é um alvo atrativo para alvo terapêutico de nutrientes devido à sua exposição direta à dieta, participação do metabolismo de nutrientes, altas taxas de renovação celular e plasticidade em resposta a estímulos nutricionais. Nutrientes diversos, incluindo aminoácidos, ácidos graxos, oligossacarídeos, sais minerais, vitaminas e antioxidantes têm sido sugeridos para modular as toxicidades GI relacionados com tratamentos do câncer (XUE *et al.*, 2011).

A glutamina (Gln) ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido com peso molecular de 146,15 kDa, tendo composição elementar nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), hidrogênio (6,90%), oxigênio (32,84%) e nitrogênio (19,17%). É classificada como um aminoácido neutro em pH fisiológico e, nutricionalmente, como não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo a partir de outros aminoácidos. A Gln apresenta dois grupos amino: um grupo α -amino e um grupo amida terminal facilmente hidrolisável (figura 4). Essas características ressaltam as funções da Gln como um veículo de transporte de nitrogênio e carreadora de amônia (LACEY; WILMORE, 1990).

Figura 4 - Estrutura química da glutamina.



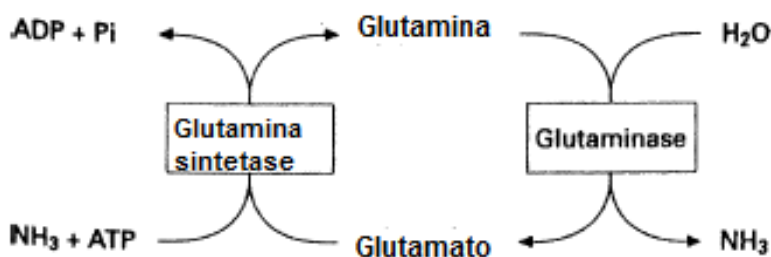
Fonte: <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/modules/mylinks/viewcat.php?cid=16&min=990&or derby=ratingD&show=10>. Acesso em: 5 dez. 2013.

A Gln é aminoácido livre circulante mais abundante no plasma e no tecido muscular, apresentando diversas funções únicas no organismo, o que reforça o seu importante papel em estados fisiológicos (ROGERO *et al.*, 2004). Em *pools* intracelulares, é o precursor do aminoácido, proteína e síntese de nucleotídeos, sendo necessário para a gênese da amônia pelo rim. Também tem um importante papel regulador, aumentando a síntese de proteínas e diminuindo sua degradação pelo músculo esquelético e estimula a síntese de glicogênio no fígado. É a fonte principal de energia para a rápida proliferação de células imunológicas e da mucosa, além de ser um intermediário importante de um grande número de vias metabólicas (CALDER, 1994; SMITH, 1990). É também um nutriente no metabolismo das proteínas do músculo em resposta a infecção, inflamação e trauma muscular (BERGSTROM *et al.*, 1974). Por ser um importante carreador de nitrogênio pelo corpo e combustível respiratório para enterócitos e de outras células que rapidamente proliferam, é considerado como aminoácido

condicionalmente essencial (LACEY; WILMORE, 1990). Sua concentração na circulação é mantida a um nível relativamente constante e é dependente de taxas relativas da sua captação e liberação pelos vários órgãos do corpo. O intestino delgado é o principal órgão de captação de Gln no estado pós-absortivo (WINDMUELLER, 1982). A Gln é um importante combustível metabólico para enterócito (SOUBA; SMITH; WIMORE, 1985), linfócitos e macrófagos (NEWSHOLME *et al.*, 1988) e dos precursores metabólicos, tais como as purinas e pirimidinas (SAVARESE *et al.*, 2003). A Gln é considerada um fator trófico para o epitélio intestinal. A depleção do *pool* de Gln conduz à atrofia dos vilos no intestino delgado, a qual parece estar associada a um comprometimento da barreira intestinal predispondo à translocação bacteriana (SCHEPPACH *et al.*, 1994).

As principais enzimas envolvidas no metabolismo da Gln são a glutaminase (GA) e glutamina sintetase (GS). Ambas estão expressas na maioria dos tecidos e presentes em diferentes células. GS é encontrada principalmente no citosol enquanto a GA (na sua forma ativa) é encontrada nas mitocôndrias. GA catalisa a hidrólise de Gln em glutamato e amônia (um processo essencial para a troca de nitrogênio total do corpo), representando o primeiro passo na sua utilização a partir da síntese do glutamato. GS sintetiza Gln a partir de glutamato utilizando a amônia como fonte de nitrogênio e com consumo de ATP (figura 5). Alguns tecidos são primariamente consumidores de Gln e contém alta atividade de GA (células da mucosa intestinal, linfócitos, células tubulares renais) e outros são produtores de Gln e contém alta atividade de GS (células musculares esqueléticas, células da glia, pulmões e possivelmente o tecido adiposo). O fígado pode agir como produtor ou consumidor de Gln, dependendo da necessidade de outro órgão, regulando a atividade de GS e GA (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996; SAVARESE *et al.*, 2003; WALSH *et al.*, 1998).

Figura 5 – Metabolismo da glutamina.



Fonte: SAVARESE *et al.*, 2003.

Legenda: ADP, adenosina 5-difosfato; ATP, adenosina 5-trifosfato; NH₃, amônia; Pi, fosfato.

A desaminação da Gln via GA produz glutamato, um precursor do aminoácido gama-aminobutírico. A transferência do nitrogênio amida da Gln via reação aminotransferase está envolvida na biossíntese das purinas e pirimidinas e na produção de hexosaminas. Gln via glutamato é convertido em α -cetoglutarato, um componente integral do ciclo do ácido cítrico. É um componente do antioxidante glutadiona (GSH) e dos poliglutamatos do ácido fólico. A ciclização do glutamato produz prolina, um aminoácido importante para a síntese do colágeno e tecido conjuntivo. A Gln também auxilia na manutenção dos níveis de glicose adequada no sangue, no balanço ácido-base no corpo e ajuda a regular a biossíntese de RNA e DNA (GAURAV *et al.*, 2012).

A Gln é o principal combustível oxidativo para o epitélio intestinal, sendo necessária para a manutenção da estrutura intestinal em estado normal ou de estresse, tendo efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal. A absorção e o metabolismo da Gln pelo intestino delgado acelera durante estados de estresse catabólico. Um dos subprodutos da Gln, a GSH, protege contra a lesão oxidante em tecidos. O intestino é o principal órgão de síntese da GSH. Sua síntese pode ser aumentada em até três vezes pelo fornecimento de Gln suplementar (CAO *et al.*, 1998). Em células tumorais, a toxicidade devido à radiação e quimioterapia é intensificada quando os estoques de GSH estão esgotados, sendo este efeito revertido com a suplementação de Gln (ROUSE *et al.*, 1995). A Gln está envolvida em muitos processos bioquímicos de síntese e metabolismo, sendo importante para a função de muitos órgãos, como músculo, intestino e sistema imune (GOETERS *et al.*, 2002).

A suplementação com Gln pode ser por via enteral ou parenteral. A Gln é metabolizada pela mucosa intestinal através da borda em escova dos enterócitos a partir do lúmen, ou através da membrana basolateral das células a partir do sangue arterial. A administração enteral parece proporcionar um efeito protetor maior no intestino (WINDMUELLER, 1982; PANIGRAHI *et al.*, 1997). A Gln não é adicionada rotineiramente à mistura de fórmulas parenterais comerciais porque possui baixa solubilidade em água (35 g/L de água, a 20°C) (FURST, 2001) e a uma possível neurotoxicidade decorrente dos produtos da decomposição desse aminoácido em ácido piroglutâmico e amônia (FURST; ALBERS; STEHLE, 1990). Uma alternativa para a utilização da Gln em fórmulas parenterais é a sua incorporação na forma de dipeptídeos, como L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln), que

permanece estável durante a esterilização com calor e é altamente solúvel em água (568 g/L) (FURST, 2001).

Um trabalho de Urbina *et al.* (2005) avaliou os efeitos de dietas parenterais complementares sobre o estado nutricional de ratos. Os animais que receberam nutrição parenteral suplementada com Ala-Gln (20 g/L) tiveram uma melhor resposta nos parâmetros nutricionais, peso corporal, proteínas plasmáticas e retenção de nitrogênio em relação ao grupo que recebeu nutrição parenteral padrão. Um estudo em comunidade urbana no Nordeste do Brasil demonstrou que crianças suplementadas com fórmula enteral contendo Ala-Gln apresentaram um aumento de peso por idade e por altura em relação às crianças que receberam placebo e também uma diminuição da taxa de excreção da lactulose, sugerindo uma melhora na função da barreira intestinal com Ala-Gln. (LIMA *et al.*, 2007).

Foram demonstrados os efeitos benéficos da Gln e de seu derivado mais estável Ala-Gln na mucosite induzida por 5-FU, aumentando a proliferação celular ao nível da cripta intestinal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). Outros estudos também demonstraram os efeitos benéficos da Gln e Ala-Gln em modelos de citotoxicidade epitelial (BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2006; LEITAO *et al.*, 2008).

1.4 Apolipoproteína E (ApoE)

O gene *APOE* humano, mapeado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica uma glicoproteína (ApoE) com 299 aminoácidos, a qual desempenha um papel fundamental para o catabolismo de componentes ricos em lipídeos no corpo humano. É encontrado em uma grande variedade de tecidos, principalmente fígado e cérebro. Vale ressaltar que o intestino é um dos poucos tecidos que não sintetizam ApoE, sendo dependente do fígado para a obtenção. A ApoE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma, que estão envolvidas na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diferentes tecidos (MAHLEY; HUANG; WEISGRABER, 2006). Há indícios também que a ApoE se liga à heparina, desempenhando importante função fisiológica de reconhecimento na superfície celular (MAHLEY; RALL, 2000). Deficiências dessa proteína causam inúmeras doenças envolvidas com o aumento no nível de colesterol e triglicérides na circulação, devido ao não reconhecimento dessas moléculas pelos receptores de membrana dos quilomícrons e pelas

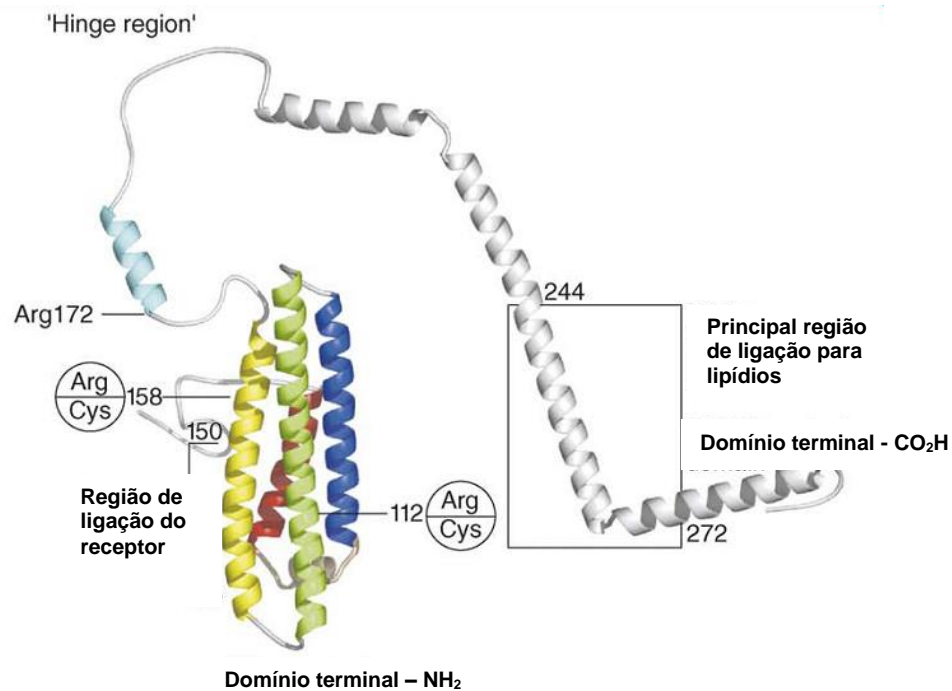
moléculas de VLDL, responsáveis por sua captação no fígado. O *locus* estrutural da apoE possui três alelos comuns, chamados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, que codificam as isoformas E2, E3 e E4. Esses três alelos codificam variantes da apolipoproteína que resultam em propriedades bioquímicas e físicas distintas para cada isoforma. As isoformas proteicas diferem entre si na composição dos aminoácidos nas posições 112 e/ou 158: $\epsilon 2$ possui o aminoácido cisteína nas duas posições da proteína (112 e 158), $\epsilon 3$ possui cisteína (112) e uma arginina (158) (sendo esta a isoforma mais comum), enquanto que o alelo $\epsilon 4$ possui arginina nestas duas posições (LYNCH *et al.*, 2003). A isoforma E4 está associada ao aumento da susceptibilidade de desenvolver a doença de Alzheimer de início tardio (BU, 2009) e de prognóstico reservado em distúrbios neuroinflamatórios, tais como a esclerose múltipla (LYNCH *et al.*, 2003). A ApoE também modula a susceptibilidade à doenças infecciosas e possivelmente a imunorregulação (MAHLEY; RALL, Jr., 2000). Foi documentado um papel protetor do alelo *APOE4* no desenvolvimento cognitivo de crianças acometidas por diarreia na infância, possivelmente por aumentar os níveis sanguíneos de LDL e através da regulação de receptores de LDL no fígado (ORIA *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* mostram que as isoformas E3 e E4 têm afinidades semelhantes a receptores de LDL, enquanto a isoforma E2 apresenta apenas 2% ou menos dessa capacidade de ligação. Isso pode estar associado à diferença dos resíduos de aminoácidos da isoforma E2, que diminui sua interação iônica com o LDL (MAHLEY; RALL, 2000). Estudos ainda revelam que a ApoE apresenta função no sistema imune, suprimindo a proliferação de células T (AVILA *et al.*, 1982), ativação de neutrófilo (TERKELTAUB, 1981) e na regulação dos macrófagos (VITEK; BROWN; COLTON, 2009). Há ainda a regulação da produção do óxido nítrico nas plaquetas e o papel de facilitar a apresentação de antígenos lipídicos da molécula CD1 às células natural killer T (NKT). Outra importante função da ApoE é a manutenção da integridade das barreiras hematocefálica e hemato-nervosa (ZHANG; WU. L.; WU. J, 2011).

A ApoE possui dois domínios distintos: um domínio hidrofóbico e um domínio hidrofílico para o receptor. O domínio NH₂-terminal contém a região de ligação da proteína com o receptor. Essa região foi identificada entre os resíduos 136 e 150 e é formada de aminoácidos básicos, especialmente de lisina e arginina, que são essenciais para a ligação ao receptor e à fração de heparina. O domínio NH₂-terminal possui menor afinidade pelas lipoproteínas plasmáticas em relação ao domínio COOH-terminal. Contudo, o domínio NH₂-

terminal é capaz de se unir às vesículas fosfolipídicas e de transformá-las em complexos discoides, que se ligam ao receptor LDL, com uma eficiência similar a toda proteína. Os dois domínios estão unidos por uma região sensível à digestão por uma protease (figura 6).

Figura 6 - Modelo tridimensional da apolipoproteína E.



Fonte: MAHLEY, 2009.

Um estudo de Oriá *et al.* (2006) investigou o papel da ApoE na maturação intestinal e adaptação após a desnutrição pós-natal em camundongos. Dados com camundongos *knock-out* têm sugerido efeitos sinérgicos de ApoE e IGF-1 na recuperação da barreira intestinal. Os camundongos com deficiência de ApoE se mostraram profundamente afetados quando submetidos à desnutrição pós-natal precoce e não conseguiram recuperar o peso após retorno à dieta quando comparado com os controles *wild-types*. Além disso, o aumento da expressão gênica da ApoE acompanha a diferenciação de linhagens celulares intestinais *in vitro* (REISHER *et al.*, 1993). A ApoE parece também ter um papel no estabelecimento da integridade das *tight junctions* em linhagens celulares de intestino (NIEMI *et al.*, 2002). Outras evidências mostram ruptura da barreira hematoencefálica de camundongos com deficiência de ApoE, especialmente após injúria (FULLERTON *et al.*, 2001; METHIA *et al.*,

2001). A barreira hematoencefálica é composta principalmente de *tight junctions* entre células endoteliais, algo semelhante à barreira intestinal ao longo dos enterócitos.

A apolipoproteína E também representa a principal proteína constituinte dos quilomícrons, sintetizados no intestino e com a função de transportar o colesterol e triglicerídeos da dieta. Os quilomícrons, quando sintetizados e liberados no intestino, não possuem ApoE, mas à medida que circulam e são processados, adquirem ApoE de outras classes de lipoproteínas. Isso resulta no desvio da distribuição da ApoE no plasma para os remanescentes. Os quilomícrons remanescentes são removidos do plasma por um processo mediado pela ApoE. Os seres humanos e camundongos transgênicos com deficiência de ApoE desenvolvem uma grave retenção dos quilomícrons remanescentes no plasma. Embora a função primária da ApoE seja facilitar o transporte lipídico para dentro das células através do receptor de LDL, é reconhecido que ApoE modula uma variedade de importantes funções biológicas. Animais deficientes de ApoE têm imunidade diminuída após o desafio bacteriano com *Listeria monocytogenes*. Eles também têm uma maior susceptibilidade à endotoxemia após administração de lipopolissacarídeo intravenoso (LPS) e inoculação com *Klebsiella pneumoniae*. Um relatório recente confirmou a observação de que os animais deficientes em ApoE tiveram uma resposta inflamatória sistêmica aumentada e mortalidade mais elevada após a injeção de LPS, e que a administração de ApoE exógena reduz a mortalidade por diminuir a cascata inflamatória (LYNCH *et al.*, 2003). A ApoE facilita a apresentação de antígenos de lipídios por células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas e células B, através de um processo que envolve a endocitose de um complexo ApoE-lipídio-antígeno através do receptor de LDL (LDLR) (TAKACH *et al.*, 2010). Um modelo experimental de encefalomielite autoimune em camundongos (EAE) modelo de esclerose múltipla humana, camundongos ApoE nocautes apresentaram pior deficiência e mais infiltrado inflamatório no SNC comparado com controles selvagens (KARUSSIS *et al.*, 2003). Azevedo *et al.* (2012) demonstraram um efeito anti-inflamatório do peptídeo mimético da ApoE (COG133) na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU, com redução dos níveis intestinais de IL-1 β , TNF- α e mieloperoxidase, efeito anti-apoptótico e proliferativo em monocamada de células IEC-6.

2 JUSTIFICATIVA

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga comumente utilizada no tratamento de neoplasias, sendo a mucosite intestinal um dos seus principais efeitos colaterais, podendo se apresentar de forma severa e atingir até cerca de 80% dos pacientes. Apesar de alguns estudos *in vitro*, poucos estudos avaliaram o papel do dipeptídeo da glutamina (alanil-glutamina) na mucosite intestinal por 5-FU *in vivo*. Recentemente, o nosso laboratório (LABICONTE – UFC) demonstrou o papel anti-inflamatório da apolipoproteína E (ApoE) em um modelo experimental de mucosite induzida pelo 5-FU. Contudo, um possível efeito sinérgico de ApoE e alanil-glutamina ainda não foi investigado.

Diante destas evidências e com base no cerne argumentativo do objeto deste estudo, buscou-se investigar os efeitos da alanil-glutamina na recuperação da mucosa intestinal após a indução da mucosite induzida por 5-FU em camundongos deficientes da *APOE*. Todas as considerações evidenciadas apontam para a relevância deste estudo que está delineado nos objetivos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar se a ApoE é necessária para o efeito protetor da alanil-glutamina (Ala-Gln) (100 mM) no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU (450 mg/Kg) em camundongos C57BL6 selvagens e *APOE* nocautes (ApoE^{-/-}).

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da Ala-Gln nas alterações do peso ponderal em camundongos selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU.
- Avaliar o efeito mielossupressor do 5-FU a partir da análise da leucometria em camundongos selvagens e *APOE* nocautes e o possível papel protetor da Ala-Gln.
- Investigar o efeito da Ala-Gln na barreira intestinal a partir da análise morfométrica do íleo em camundongos selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU.
- Analisar o efeito da Ala-Gln no *turnover* e citoarquitetura da cripta intestinal a partir da análise do índice mitótico, apoptótico e escores de necrose para criptas do íleo em camundongos selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU.
- Avaliar o efeito da Ala-Gln no processo inflamatório a partir da análise de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em camundongos selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU.
- Avaliar o efeito da Ala-Gln na transcrição do RNAm para IGF-1 e Bcl-2 no íleo de camundongos selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos selvagens (C57BL6) e *APOE* nocautes (ApoE^{-/-}) de ambos os sexos, com pesos entre 20-25 gramas, provenientes da colônia de animais transgênicos do Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (IBISAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram armazenados em caixas de polipropileno (19 x 30 cm), tampadas com grade de ferro, contendo suporte para bebedouro e divisória interna separando o bebedouro da ração. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura entre 20 e 28°C, com livre acesso a ração e água. Os camundongos foram mantidos em grupos de, no máximo, cinco animais por caixa. A ração ofertada para os animais foi a Fri-Ribe[®] (São Paulo - SP). Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, conforme o nº de protocolo 44/2013 (Anexo).

4.2 Drogas, reagentes, soluções e anticorpos

- 5- fluorouracil – 5-FU (250 mg/10 mL, Eurofarma): obtido através do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA);
- Alanil-glutamina: Solução estoque de 100 mM foi preparada em Solução Salina tamponada com fosfato (PBS), composta por NaCl 0,9%, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4;
- Anticorpo primário IgG de coelho anti-vilina (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA);
- Anticorpo primário IgG de coelho anti-IL-1 β (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA);
- Anticorpo primário IgG de carneiro anti-TNF- α (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA);
- Anticorpo secundário anti-IgG biotilado *Horseshoe Peroxidase* (HRP) de coelho (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA);
- Anticorpo Secundário anti-IgG biotilado *horseradish peroxidase* (HRP) de carneiro (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA);
- Formol 10% (Reagen);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Líquido de Turk;

- Ketamina (Kensol® Konig);
- Xilasina (Vetanarcol® Konig);
- Kit DuoSet (R&D Systems) – para dosagem das citocinas;
- Kit do ensaio BCA (Pierce, BioAgency);
- *Ladder* de proteínas (BIORAD).

4.3 Equipamentos e materiais

- Agitador e aquecedor orbital (Corning, Stirrer/Hot Plate);
- Balança Analítica (Eletronic Balance, Bioprecisa, FA -2104N);
- Centrífuga refrigerada para tubos Sigma 1-14k – Uniscience;
- Tubos *eppendorfs*;
- Espectrofotômetro (Eppendorf®, BioPhotometer, Hamburg, German);
- Freezer Thermo Scientific (-80 °C);
- Instrumentos cirúrgicos (pinças, tesouras, bisturis);
- Agulha de gavagem para camundongos (agulha de aço inox curvo com cânula contendo diâmetro de 1,0 mm com esfera de 1,7 mm, raio de 40 mm e com comprimento de 31 mm);
- Leitora de ELISA (Biotec Elx- 808);
- Medidor de pH (Corning, Pinnacle, 530 PHmeter);
- Microscópio Olympus acoplado a computador;
- Placas NUNC de 96 poços;
- Pipetas Eppendorf 1000, 200, e 20 µL;
- Pipeta multicanal – 12 poços (Discovery confort);
- Vidrarias: Béquers, tubos de ensaio, provetas;
- Banho-Maria (FANEM®, Water Bath model 1100);
- Triturador (ultra-Turrax homogenizer, Sigma, Saint Louis, MO);
- Plataforma de Agitação (MARCONI®);
- Capela de exaustão (Quimis®);
- Agitador Vortex (Quimis®);
- Câmara de Neubauer;

- Aparato de eletroforese (SDS-PAGE, *Mini Protean® tetra Cell*, BIORAD, Hercules, CA, USA);
- Aparato de transferência (*Mini Trans Blot® Cell*, BIORAD, Hercules, CA, USA);
- Fonte estabilizadora de eletroforese (BIORAD, Power Basic);
- Membrana de Nitrocelulose (BIORAD, cat. #162-0112);
- Termociclador (Applied Biosystems®).

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, tratamento com Alanil-glutamina (Ala-Gln), análise ponderal e leucometria

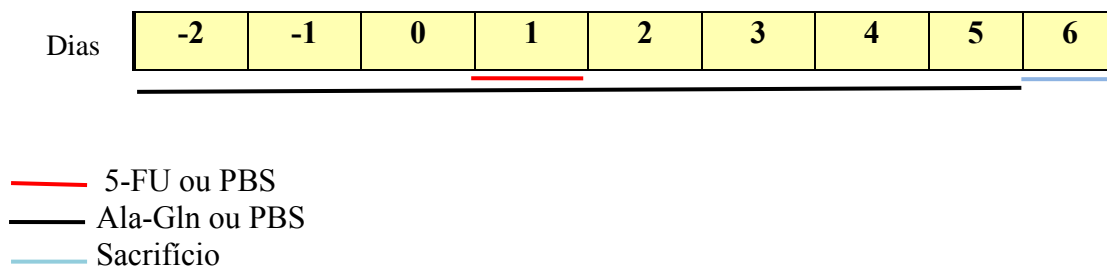
Para a indução da mucosite intestinal, administrou-se 5-FU (450 mg/kg, via intraperitoneal, dose única, figura 7) nos camundongos selvagens e *APOE* nocautes no primeiro dia de experimento e animais controles receberam PBS. Alguns animais receberam a solução de Ala-Gln (100 mM, 0,5 mL/animal) e controles receberam PBS oralmente por gavagem três dias antes da administração do 5-FU e durante cinco dias consecutivos. Os animais foram pesados diariamente, preferencialmente no mesmo horário, durante todo o experimento. O ganho de peso foi expresso pelo percentual do peso inicial (no dia -2). Esse modelo experimental foi baseado na descrição de Carneiro-Filho *et al.* (2004) (figura 8). No sexto dia, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina e xilazina e, em seguida, amostras de sangue foram colhidas pelo plexo orbital por capilaridade. 20 µL de sangue foram diluídas com 380 µL do líquido de Turk e, posteriormente, feita a contagem global de leucócitos na câmara de Neubauer. Os leucócitos foram contados nos quatro quadrantes externos da câmara com o auxílio de um microscópio óptico (100 x, Olympus CX3, Tóquio, Japão) e multiplicado pelo fator de correção. Os valores foram expressos como leucócitos/mm³. Também foram retiradas amostras do intestino (íleo) para análise histológica. Parte dessas amostras foi congelada em freezer (-80 °C) para análise da expressão gênica, dosagem de citocinas por ELISA e detecção de proteínas por imunoblotting.

Figura 7 – Administração intraperitoneal de 5-FU em camundongo selvagem.



Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – Fluxograma do modelo experimental.



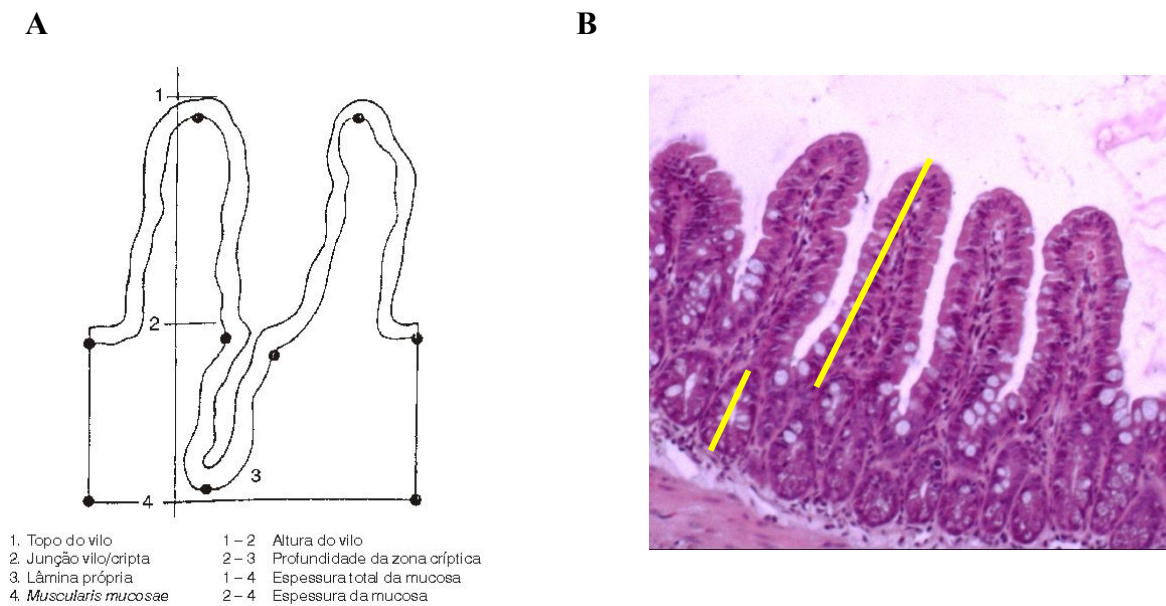
Foram formados os seguintes grupos experimentais: 1) camundongos selvagens (C57BL6) e *APOE* nocautes (ApoE^{-/-}) foram tratados com 5-FU (450 mg/Kg) ou PBS por via intraperitoneal, dose única; e 2) camundongos selvagens e ApoE^{-/-} foram tratados com Ala-Gln ou PBS por gavagem (0,5 mL) três dias antes da administração do 5-FU e durante cinco dias consecutivos, sendo sacrificados no sexto dia experimental, conforme descrição de Carneiro-Filho *et al.* (2004).

4.5 Análise morfométrica

Depois do sacrifício, amostras do intestino (íleo) foram retiradas e fixadas em formol a 10% (tamponado) durante 24 horas e posteriormente armazenadas em álcool 70%. Em seguida, foram desidratadas em álcool e fixadas em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para serem analisados.

Na análise morfométrica, foram analisados os parâmetros altura dos vilos e profundidade das criptas, que são marcadores de integridade do tecido intestinal. A altura do vilos foi medida a partir da linha da base até o seu topo. A profundidade da cripta foi medida a partir da linha da base até o fundo da cripta (figura 9). Foram observadas aproximadamente 10 vilos e criptas de cada grupo utilizando um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). A análise dessas medidas foram feitas através do programa *Image J 1.4*[®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), cuja calibração foi realizada através de uma micro-régua.

Figura 9 – Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilos e da profundidade da cripta (A e B) utilizando o programa *Image J 1.4*[®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).



Fonte: A - PIRES, A. L. G.; SILVEIRA, T. R.; SILVA, V. D. Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. *J Pediat.*, v. 79, p. 329-3, 2003. B – Fotomicrografia de íleo de camundongo *APOE* nocaute controle negativo (PBS).

4.6 Índice mitótico e apoptótico

Avaliou-se o índice mitótico e apoptótico nas criptas dos animais *APOE* nocautes e selvagens contando figuras mitóticas e apoptóticas por criptas em lâminas histológicas de íleo coradas em H&E. Foram observadas, no mínimo, 10 criptas longitudinais de cada animal (n=4) por grupo. As medições foram feitas utilizando um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) utilizando objetiva de imersão (1000 x) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Os valores absolutos foram calculados para produzir o índice mitótico e apoptótico por grupo, conforme descrição de Carneiro-Filho *et al.* (2004).

Foram consideradas figuras de apoptose quando (em imersão) eram identificados corpos eosinofílicos, com núcleo fragmentado em geral e encontradas próximo da luz da glândula intestinal. Foram consideradas figuras de mitose quando (em imersão) eram identificadas fases de mitose clássicas e eventualmente citocinese.

4.7 Escores de criptas necróticas

Os escores de criptas necróticas foram calculados de forma cega, por um experiente histopatologista, observando a mucosa em pequeno e maior aumento em lâminas coradas em H&E. Foram consideradas criptas necróticas as criptas cortadas longitudinalmente, com alteração da citoarquitetura normal e com fundo cego exibindo lesão necrótica e infiltrado celular inflamatório com ausência ou perda de células de Paneth e células caliciformes na base das criptas. O quadro 1 descreve os critérios utilizados para a avaliação dos escores. Esses critérios levam em consideração a citoarquitetura, aspecto em fundo da glândula intestinal e a presença de células residentes com grânulos citoplasmáticos conspícuos.

Quadro 1 – Critérios utilizados para determinação dos escores de criptas com lesão/alteração histopatológica.

Grau 0	>90% das criptas apresentando citoarquitetura e tamanhos normais, sem alargamento e hiperplasia, exibindo base de fundo cego regular bem delineado, com presença de células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 1	>70% das criptas exibindo hiperplasia e alargamento do tamanho, contudo com citoarquitetura normal, sem alterações necróticas, exibindo células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 2	Semelhante ao grau 1, contudo até 30% das criptas apresentando comprometimento da citoarquitetura normal, com lesão necrótica na sua base com infiltrado de células inflamatórias, com possível presença de células de Paneth, contudo sem células caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 3	Entre 50 e 70% das criptas exibindo alterações necróticas da base da cripta com infiltrado de células inflamatórias. O restante das criptas apresentando hiperplasia e alargamento, com ausência de células de Paneth e caliciformes com grânulos visíveis.
Grau 4	>70% das criptas com comprometimento da citoarquitetura normal, com lesão necrótica da base da cripta com invasão de infiltrado de células inflamatórias e ausência de células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes na base da cripta.

Fonte: LABICONTE.

4.8 Medida de citocinas

As amostras foram armazenadas em freezer (-80°C) até o dia da realização do ensaio. As concentrações de IL-1 β no tecido foram medidas usando ELISA do tipo sanduíche. Em resumo, as placas de 96 poços foram incubadas com 100 μ L da citocina acima, com uma diluição de 2 mg / mL em tampão de incubação e incubadas durante a noite, à 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (0,05% *Tween* 20 em PBS) e a ligação não específica foi bloqueada com soro fetal bovino a 1% durante 120 minutos a 37°C. Amostras e os padrões foram colocadas nas placas. Curvas padrão de recombinante murino de IL-1 β foi usada para calcular a concentração dessa citocina. A placa foi lavada e os biotínulos policlonal ou monoclonal anticitocina apropriado foi adicionado. Após 1 hora, a placa foi lavada, avidina peroxidase foi adicionada (1:5000) aos poços durante 15 minutos, sendo a placa novamente lavada. Em seguida, o substrato (0,4 mg de o-fenilenodiamina e 0,4 mL de H₂O₂ em 1 mL de tampão de substrato) foi adicionado aos poços e a reação foi parada com ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1 M). A densidade óptica foi medida em uma leitora de ELISA (Biotek- Elx 808, figura 10) a 490 nm. Os resultados foram expressos como picogramas de IL-1 β por mililitro do sobrenadante, comparando a densidade óptica das amostras com curvas padrão.

Figura 10 – Leitora de ELISA utilizada na análise de citocinas.

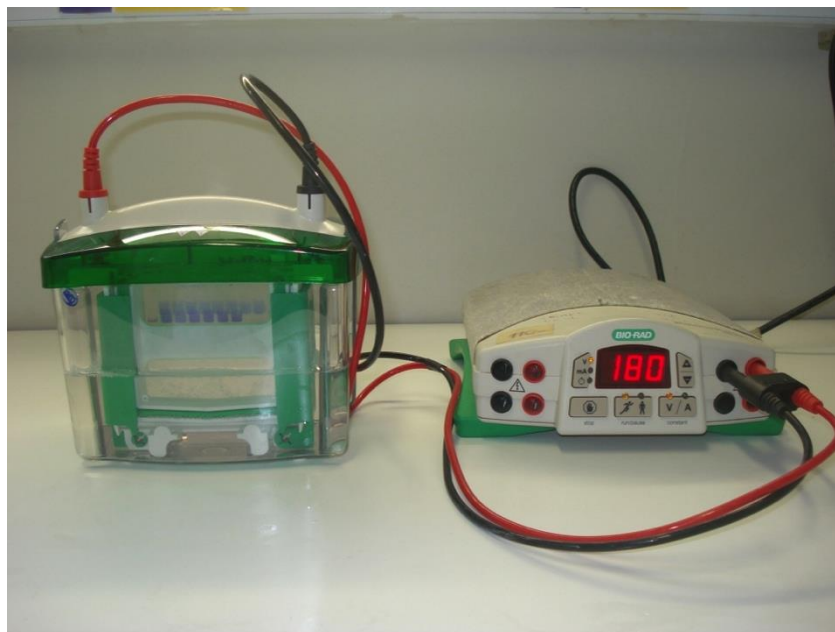


Fonte: LABCONTE.

4.9 Western Blot

Depois de sacrificar os animais, segmentos de íleo foram dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-80°C). Na preparação do homogenado, os tecidos foram descongelados e homogeneizados em solução composta por tampão de lise (1% Triton X-100, 5 mL; 0,2% Nonidet P40 substitute Fluka, 1 mL; EDTA 2mM, 200 µL; dH₂O q.s.p 50 mL; pH 7.5) e coquetel inibidor de protease, sendo então transferidos para tubos de ensaio e centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um tubo *Eppendorf* (1,5 mL) e o *pellet* descartado. O sobrenadante foi quantificado para proteína utilizando o kit do ensaio BCA e procedida leitura em espectrofotômetro (*Eppendorf*[®], *BioPhotometer*, Hamburg, German). Os dados foram obtidos (em absorbância) por meio de curva padrão, convertidos em concentração (µg/ml). Utilizou-se gel de poliacrilamida a 10 % para a eletroforese das amostras a 180 V (figura 11) (SDS-PAGE, *Mini Protean*[®] 3 Cell, BIO-RAD), adicionando-se 50 µg de proteína em cada poço do gel. A transferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita em um aparato de transferência (*Trans Blot*[®], BIO-RAD) a 100 V durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado em tampão de lavagem (0,8% NaCl; 0,242% Tris Base, Sigma #T-1503; *Tween* 20, 1 mL e 1 L de dH₂O) durante 1 hora. Logo após, foi realizada a incubação com anticorpos primários IgG de coelho anti-villina e anti-TNF α (1:500) durante 1 hora, sendo depois lavadas por três vezes com tampão de lavagem, para em seguida serem incubadas com anticorpo secundário IgG de burro anti-coelho biotilado (*Horse radish Peroxidase*, 1:1000) e lavado como descrito acima. Para a detecção, foi preparada uma solução a base de luminol (50µL, 90 mM), ácido cumárico (22 µL, 250 mM) e Tris Base (5 ml, 100 mM) e uma solução a base de peróxido de hidrogênio (3µL) e Tris Base (5 ml, 100 mM). As soluções foram misturadas e instantaneamente colocadas sobre a membrana, sendo agitada durante 1 minuto. Cada membrana foi exposta a um filme Kodak X-OMAT FS[®]. As bandas identificadas no filme de raio-X foram escaneadas (*Molecular Dynamics*), analisadas por densitometria utilizando o programa *Image J 1.4*[®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), e representadas pela razão vilina/actina e TNF- α /actina.

Figura 11 – Aparato de eletroforese em funcionamento.



Fonte: LABICONTE.

4.10 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

4.10.1 Extração do RNA

Os experimentos com qPCR foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento na Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Inicialmente, as bancadas foram limpas com RNaseZAP (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para a extração de RNA, adicionou-se 1 ml de Trizol (Invitrogen®) à 50 mg de tecido intestinal e, em seguida, macerou-se utilizando-se TissueRuptor (Qiagen®) e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio, seguido de agitação por 15 segundos e incubou-se a temperatura ambiente durante 3 minutos. Após, centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 500 µl de isopropanol gelado, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente. O RNA total foi ressuspensionado em 30 µl de H₂O ultrapura e incubado a 55°C por 15 minutos. O RNA total extraído foi armazenado em freezer (-80°C).

4.10.2 Análise Espectrofotométrica

Para quantificação do RNA extraído foi usada uma solução de água destilada como controle (branco), posteriormente foram adicionados 200µl de água livre de RNase em um Uvette® (Eppendorf, Alemanha) selecionando no espectrofotômetro (Evolution 300 Thermo Scientific®) a opção de ensaio para RNA, obtendo-se os valores de absorvância a 260 nm e 280 nm, bem como a relação 260/280 nm. Para a leitura foi utilizada uma diluição de (1:100) com uso de 2 µl de amostra e 198 µl de água livre de RNase (1:100).

4.10.3 Transcrição Reversa e Amplificação

Para a transcrição reversa, 2µg de RNA foram previamente tratado com DNase I (Invitrogen®), utilizando-se 2U de DNase I e 1µl de 10x DNase I *Buffer* e aqueceu-se a 37°C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 1µl de EDTA 25 mM e aqueceu-se a 65°C por 10 minutos. Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizou-se Super Script™ III CellsDirect cDNA Synthesis System (Invitrogen®). Ao RNA previamente tratado com DNase I adicionou-se 1µl de Oligo (dT) 40 µM e 1µl dNTP 10µM. Aqueceu-se a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriou-se em gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 6 µl de 5x RT *Buffer*, 1µl de DTT 0,1M, 1µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl) e água ultrapura para volume final de 30 µl. Aqueceu-se a 50°C por 50 minutos e posteriormente a 85°C por 5 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C. Para qPCR utilizou-se primers específicos para IGF-1, Bcl-2 e β-actina (controle endógeno). As sequências de bases nitrogenadas para os iniciadores senso e antisense estão demonstradas na tabela 2. As reações foram montadas separadamente para cada um dos genes analisados, utilizando-se 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 300 µM de cada primer, 1µl de cDNA e água ultrapura para volume final de 20 µl. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos com três etapas: desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 30 segundos, em equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems Thermocycler (Applied Biosystems®, figura 12), incluindo a curva de *melting*. Para a quantificação final, utilizou-se o método 2^{-ΔΔCT}.

Tabela 2 – Sequência de bases nitrogenadas utilizadas no experimento.

	IGF-1	Bcl-2	β-actina
Senso	TGGATGCTCTTGA GTTCGTG	CGGCTGGGATGGATTT TGT	CGTGAGAAGATGACCC AGATCA
Anti-senso	GTCTTGGGCATGT CAGTGTG	CTGTCCAGTATGAGAG GAA	GGG ACA GCA CAG CCT GGA T

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (UNIFOR)

Figura 12 – Termociclador utilizado no qPCR.

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (UNIFOR).

4.11 Análise Estatística

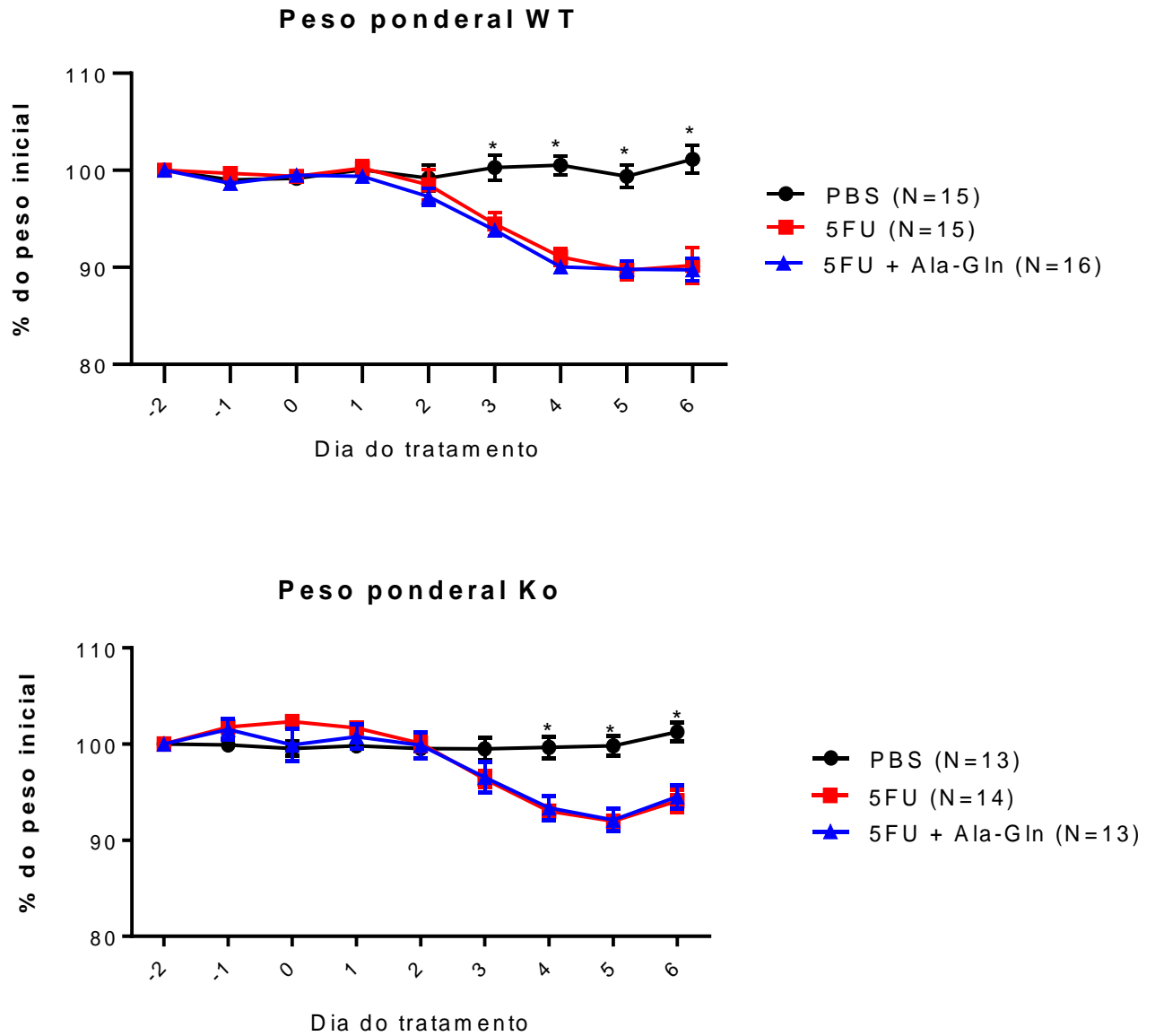
Os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). O teste de variância ANOVA seguido pela correção por Bonferroni foi utilizado para comparar múltiplos grupos. Utilizou-se ainda o teste de *T Student* não pareado para comparação entre dois grupos. Para a avaliação dos escores de criptas necróticas utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças significativas. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism 6 Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação ponderal

O desafio com o 5-FU (450 mg/kg, dose única, i.p.) causou redução significativa no peso dos animais, incluindo os animais tratados com Ala-Gln (100 mM). Não houve diferença estatística na perda de peso corporal entre esses grupos. Houve apenas diferença entre todos os grupos desafiados com 5-FU e Ala-Gln em comparação com os respectivos grupos PBS não desafiados após o 3º dia (selvagem) e 4º dia (ApoE^{-/-}) ($p < 0,001$) (figura 13). Todos sobreviveram ao desenho experimental.

Figura 13 – Efeito da administração da Ala-Gln sobre o peso corporal de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU.

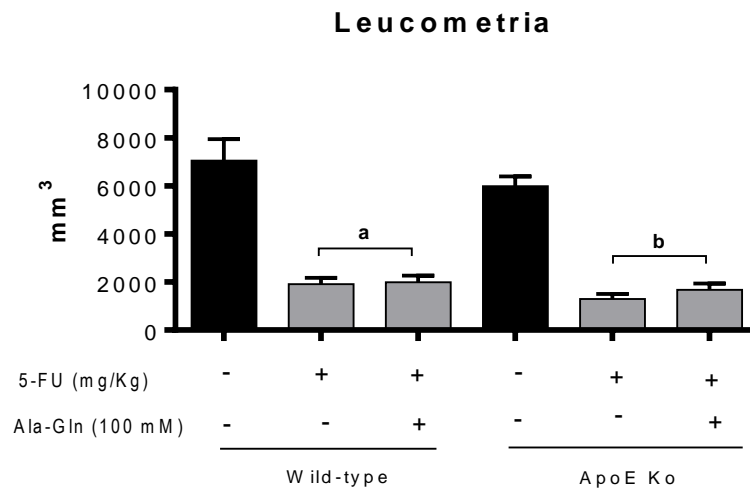


Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de animais por grupo igual ou superior a treze. * $p < 0,001$ vs todos os grupos.

5.2 Avaliação do parâmetro leucometria

Observou-se uma redução significativa do número de leucócitos/mm³ do sangue dos animais *APOE* nocautes e selvagens desafiados com 5-FU (450 mg/kg) ($p < 0,001$) em relação aos respectivos controles PBS, o que comprova o papel citotóxico do 5-FU sobre a produção de leucócitos na medula óssea. Esse efeito mielossupressor não foi melhorado ou revertido com a administração de Ala-Gln na dose de 100 mM ($p > 0,005$) (figura 14).

Figura 14 - Efeito da administração da Ala-Gln sobre a leucometria de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU.

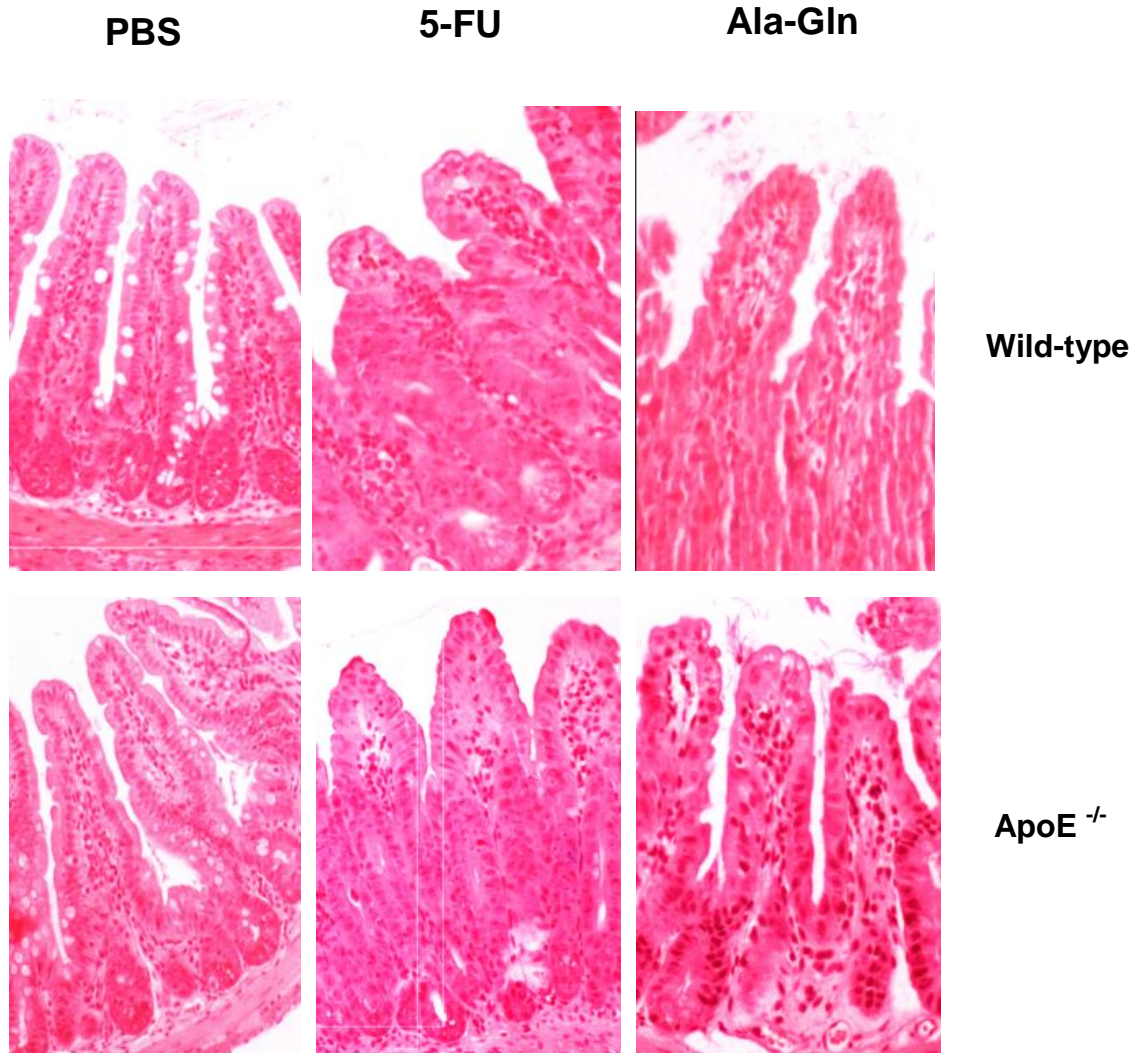


Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de animais por grupo igual a sete. **a**= $p < 0,001$ vs PBS WT. **b**= $p < 0,001$ vs PBS Ko.

5.3 Avaliação morfométrica

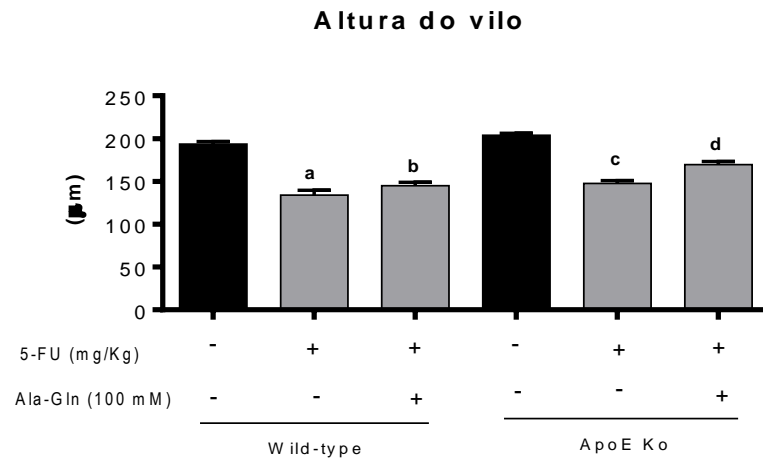
O desafio com 5-FU (450 mg/kg) promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) na altura dos vilos do íleo nos animais selvagens e *APOE* nocautes comparados aos seus respectivos controles PBS (figuras 15 e 16). O tratamento com Ala-Gln (100 mM) melhorou a altura dos vilos ($p < 0,01$) nos animais nocautes quando comparados aos desafiados pelo 5-FU (figura 16). No parâmetro profundidade de cripta, os animais selvagens ($p < 0,001$) e nocautes ($p < 0,01$) injetados com o 5-FU apresentaram um aumento da profundidade das criptas em relação aos animais PBS, achado que foi parcialmente revertido ou melhorado pela administração da Ala-Gln ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente) (figura 17). Na análise morfométrica razão vilo/cripta, observou-se que 5-FU induziu nos animais nocautes e selvagens uma redução significativa dessa razão ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles PBS, achado que foi parcialmente revertido ($p < 0,0001$) pela administração de Ala-Gln. (figura 18) quando comparados com 5-FU.

Figura 15 – Histologia representativa do íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.



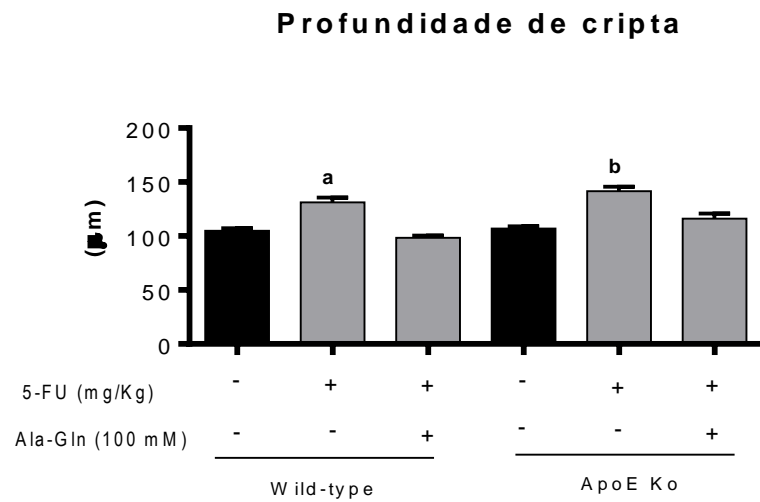
Camundongos *APOE* nocautes e selvagens foram tratados (dose única) com 5-FU (450 mg/Kg) e controles receberam PBS. Os animais receberam Ala-Gln (100 mM) ou PBS por gavagem (0,5 mL) três dias antes da administração do 5-FU e durante cinco dias consecutivos, sendo sacrificados no sexto dia experimental. Segmentos do íleo (1,0 cm) foram fixados em formaldeído (10%) e encaminhados para processamento histológico. Animais PBS apresentando vilos íntegros, de tamanho normal. Notou-se alterações de achatamento dos vilos nos animais nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU. Coloração H&E (100 x).

Figura 16 - Avaliação morfométrica da altura dos vilos em íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5- FU e tratados com Ala-Gln.



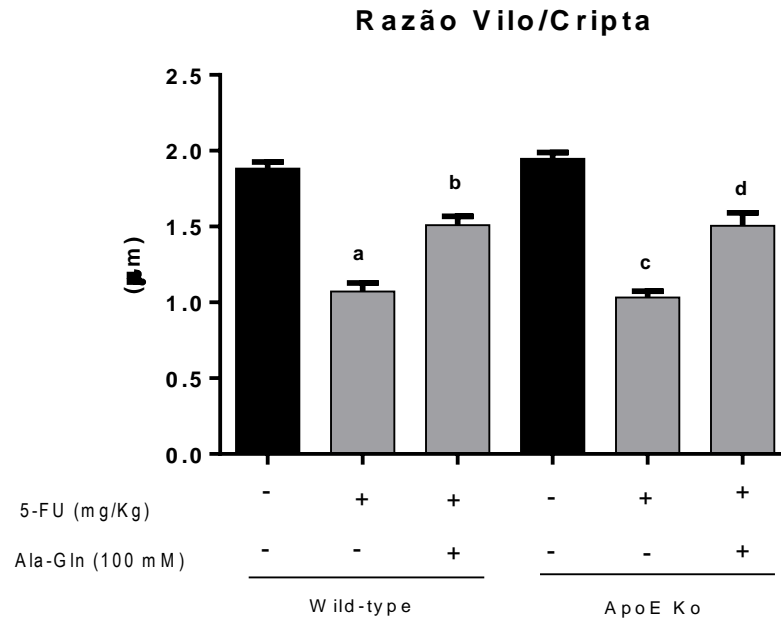
Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way NOVA com correção por Bonferroni. Número de vilos contadas por animal/ grupo igual ou superior a dez. **a, b**= $p < 0,001$ vs PBS WT. **c, d**= $p < 0,001$ vs PBS Ko. **d**= $p < 0,01$ vs 5-FU Ko.

Figura 17 - Avaliação morfométrica da profundidade das criptas em íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5- FU e tratados com Ala-Gln.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way NOVA com correção por Bonferroni. Número de criptas contadas por animal/ grupo igual ou superior a dez. **a**= $p < 0,0001$ vs PBS e 5-FU + Ala-Gln WT. **b**= $p < 0,01$ vs PBS Ko e $p < 0,0001$ vs 5-FU+Ala-Gln Ko.

Figura 18 - Avaliação morfométrica da razão vilos/cripta em íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.

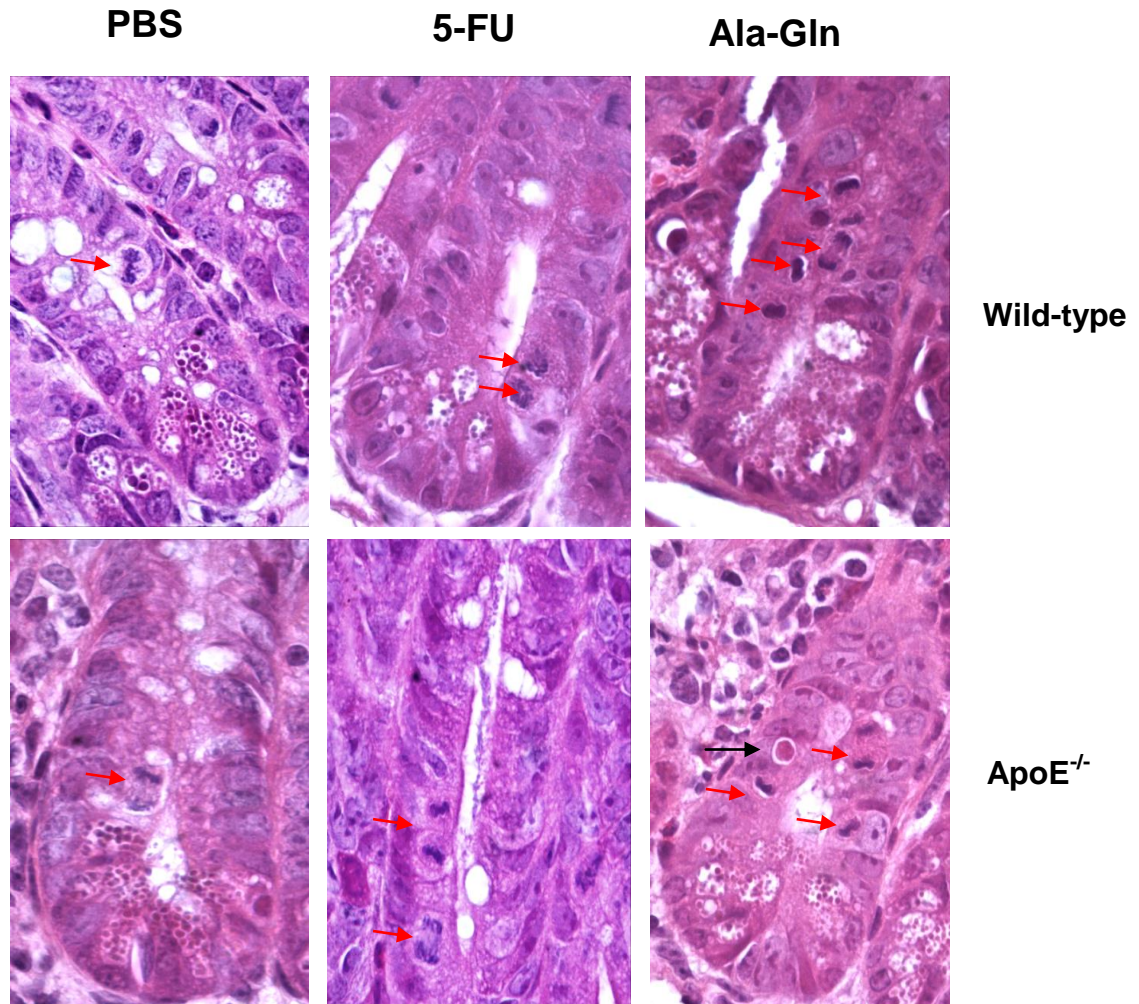


Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way NOVA com correção por Bonferroni. Número de vilos e criptas contadas por animal/ grupo igual ou superior a dez. **a,b** = $p < 0,0001$ vs PBS WT. **a** = $p < 0,0001$ vs 5-FU+Ala-Gln WT. **c,d** = $p < 0,0001$ vs PBS Ko. **c** = $p < 0,0001$ vs 5-FU+Ala-Gln Ko.

5.4 Avaliação do índice mitótico e apoptótico nas criptas

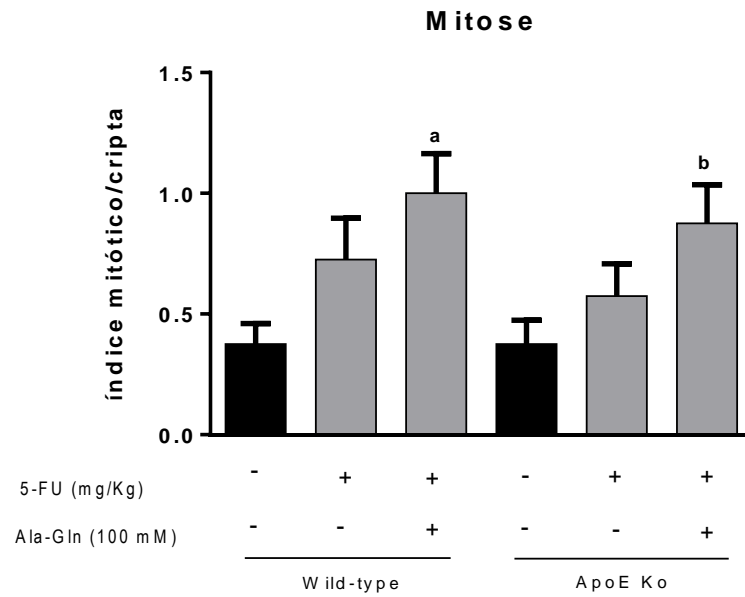
Na figura 19, observa-se cortes longitudinais de criptas de íleo em animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) e tratados com Ala-Gln (100 mM) com a presença de células em mitose e apoptose. Os animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU não tiveram aumento significativo do índice mitótico nas criptas, não havendo diferença entre os controles PBS e os tratados com Ala-Gln. Observou-se apenas aumento significativo de figuras de mitose (figura 20) nas criptas dos animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU tratados com Ala-Gln em relação aos seus controles PBS ($p < 0,01$). No índice apoptótico, observou-se um aumento de células em apoptose (figura 21) nos animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente) em relação ao respectivo controle PBS.

Figura 19 – Histologia representativa das criptas do íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.



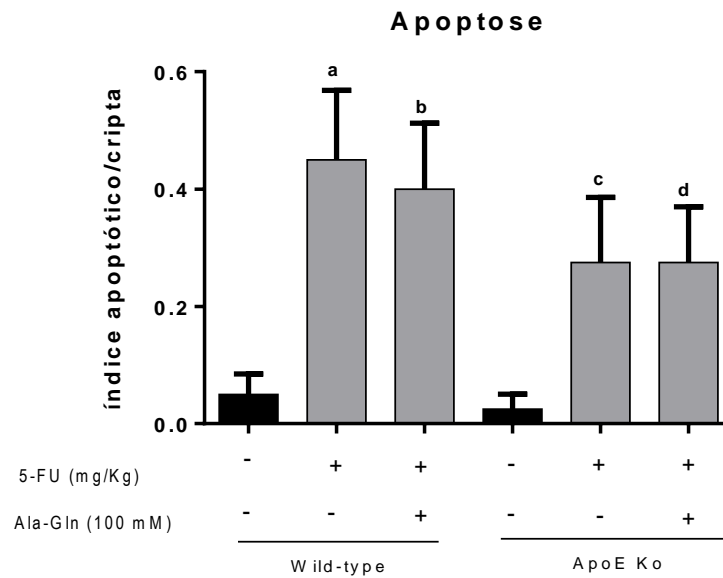
Camundongos *APOE* nocautes e selvagens foram tratados com 5-FU (450 mg/Kg) por via intraperitoneal, dose única, e controles receberam PBS. Os animais receberam Ala-Gln (100 mM) ou PBS por gavagem (0,5 mL) três dias antes da administração do 5-FU ou PBS e durante cinco dias consecutivos, sendo sacrificados no sexto dia experimental. Segmentos longitudinais de criptas de íleo mostrando células em mitose (setas vermelhas) e apoptose (seta preta). Coloração H&E (1000 x).

Figura 20 - Avaliação do índice mitótico das criptas em íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5- FU e tratados com Ala-Gln.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste *T* de *Student* não pareado. Número de 40 criptas por grupo. **a**= $p < 0,01$ vs PBS WT. **b**= $p < 0,01$ vs PBS Ko.

Figura 21 - Avaliação do índice apoptótico das criptas em íleo de camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5- FU e tratados com Ala-Gln.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste *T* de *Student* não pareado. Número de 40 criptas por grupo. **a,b**= $p < 0,01$ vs PBS WT. **c,d**= $p < 0,05$ vs PBS Ko.

5.5 Avaliação dos escores para criptas necróticas

Os animais PBS se enquadram nos critérios estabelecidos para escores de criptas necróticas no grau zero, de acordo com o quadro 1. Os animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) tiveram um aumento significativo nos escores para criptas necróticas ($p < 0,028$) quando comparados com os controles PBS. Apenas os animais selvagens tratados com Ala-Gln tiveram uma redução significativa ($p < 0,04$) nos escores para criptas necróticas, tanto no que se refere à mediana e ao intervalo máximo e mínimo dos escores, em comparação aos respectivos animais desafiados pelo 5-FU (tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação das criptas necróticas em animais selvagens e *APOE* nocautes.

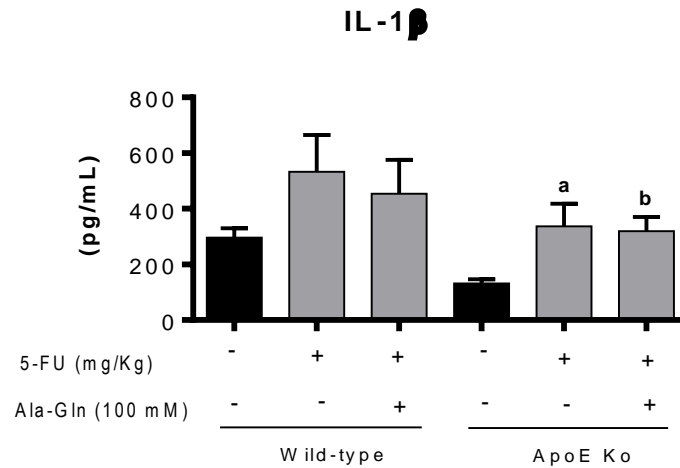
Escore para criptas necróticas					
Grupos	PBS (n=4)	5-FU (n=4)	<i>P</i>	Ala-Gln (n=6)	<i>P</i>
Selvagem	0 (0-0)	2 (2-2)	0,028	1,5 (0-2)	0,04
<i>ApoE</i> ^{-/-}	0 (0-0)	1,5 (1-2)	0,028	1,5 (1-2)	ns

Os valores representam a mediana e a variação e foram analisadas pelo teste Mann-Whitney.

5.6 Avaliação da expressão de IL-1 β detectada por ELISA

Não houve diferença estatística nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β nos animais selvagens desafiados pelo 5-FU (450 mg/Kg) comparados com os respectivos controles PBS e Ala-Gln (100 mM) (figura 22). Contudo, houve um aumento significativo nos níveis de IL-1 β nos animais *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln ($p < 0,05$) em comparação ao respectivo controle PBS.

Figura 22 – Avaliação da expressão da citocina IL-1 β detectadas por ELISA no íleo de animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.

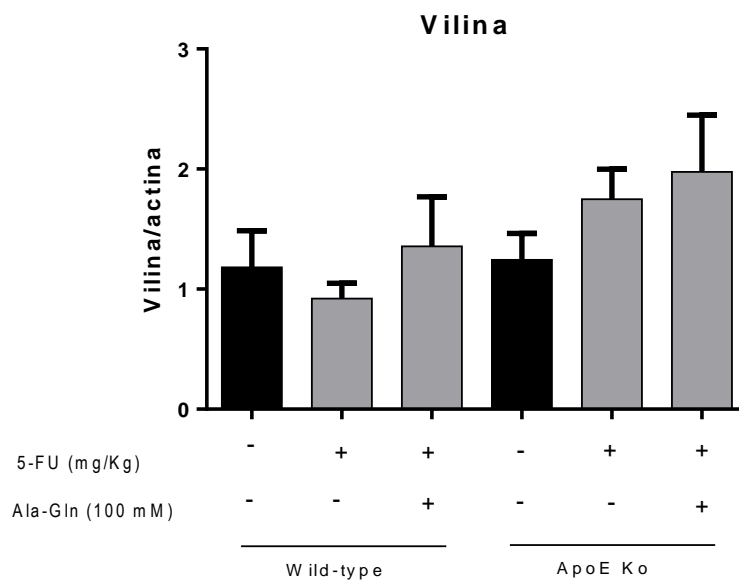
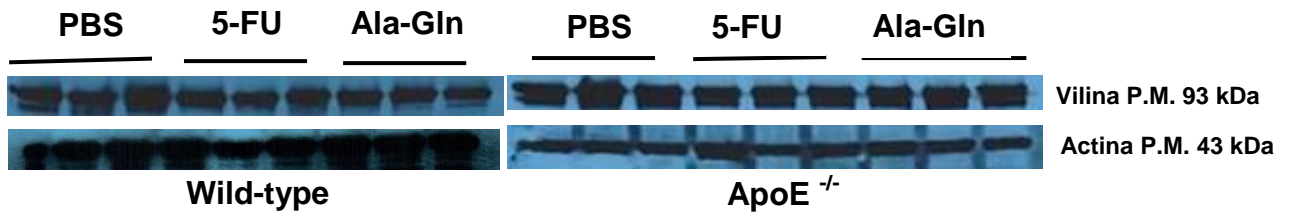


Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way NOVA com correção por Bonferroni. Número de animais por grupo igual a sete. **a,b**= $p < 0,05$ vs PBS Ko.

5.7 Avaliação da expressão de vilina e TNF- α detectadas por Western Blot

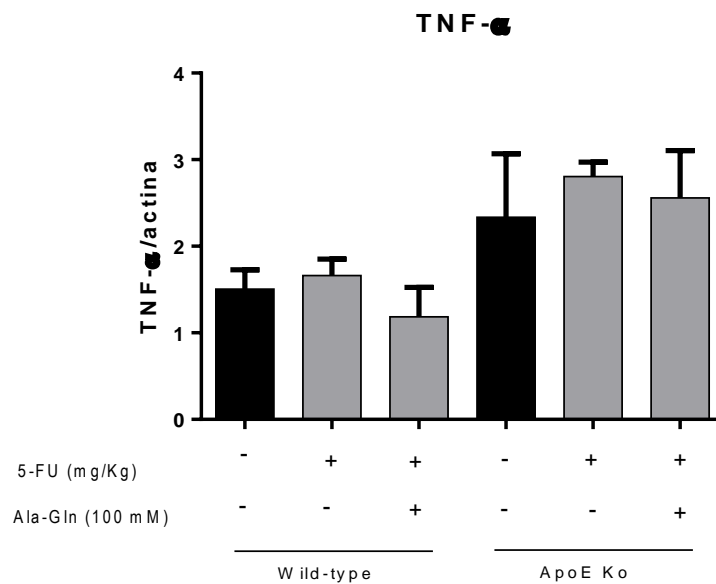
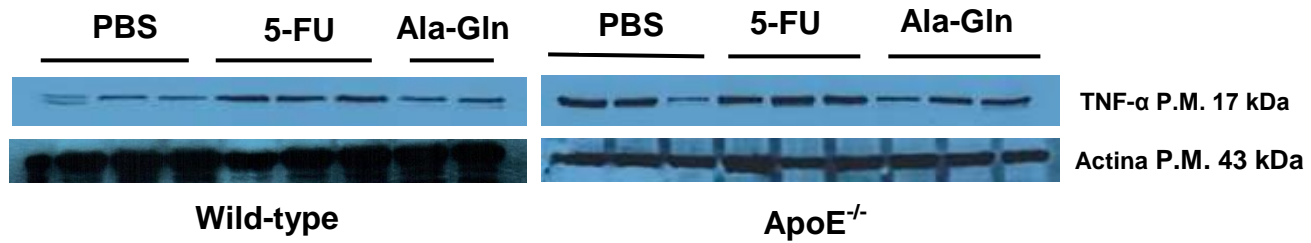
Não houve diferença estatística na expressão de vilina (figura 23) e TNF- α (figura 24) detectadas por Western Blot entre os animais nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) em relação aos controles PBS e tratados com Ala-Gln (100 mM).

Figura 23 – Expressão da vilina no íleo de animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln detectada por Western Blot.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de bandas por grupo igual a seis.

Figura 24 – Expressão de TNF- α no fígado de animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln detectada por Western Blot.

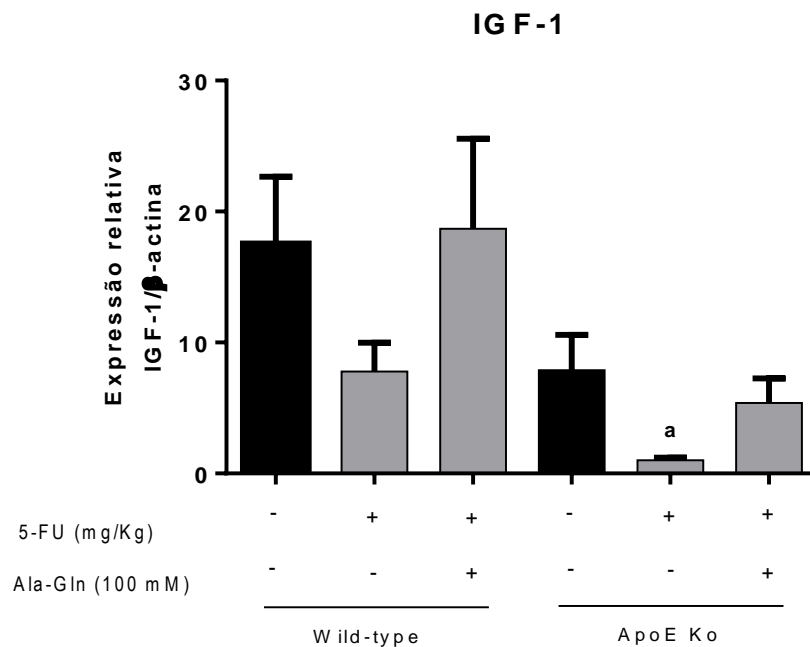


Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de bandas por grupo igual a seis.

5.8 Avaliação dos transcritos de RNAm para IGF-1 e Bcl-2 detectado pelo qPCR

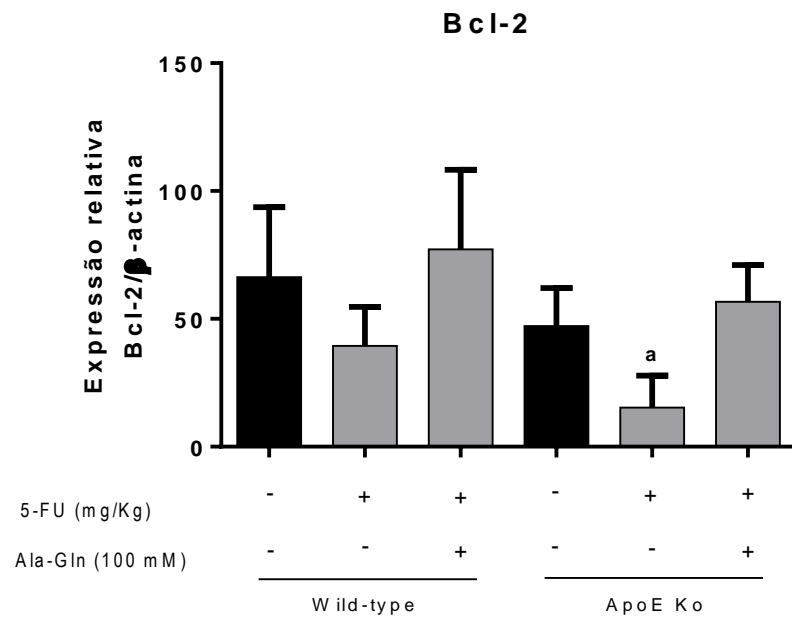
Não houve diferença estatística na transcrição do RNAm de IGF-1 e Bcl-2 entre os animais selvagens, contudo os *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) apresentaram uma redução significativa na transcrição do RNAm de IGF-1 ($p < 0,05$) (figura 25) e Bcl-2 ($p < 0,05$) (figura 26) em relação aos controles PBS e tratados com Ala-Gln (100 mM).

Figura 25 – Transcritos de RNAm para IGF-1 detectados pelo qPCR no íleo de animais selvagens e nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de animais por grupo igual a sete. a= $p < 0,05$ vs PBS e 5-FU+Ala-Gln Ko.

Figura 26 – Transcritos de RNAm para Bcl-2 detectados pelo qPCR no íleo de animais selvagens e nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln.



Os valores representam a média \pm E.P.M. e foram analisados pelo teste one-way ANOVA com correção por Bonferroni. Número de animais por grupo igual a sete. a= $p < 0,05$ vs PBS e 5-FU+Ala-Gln Ko.

6 DISCUSSÃO

O 5-FU é amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, especialmente o colorretal. Um dos seus efeitos adversos limitante da dose é a mucosite intestinal acompanhada de diarreia, causando redução da proliferação e migração dos enterócitos e aumento de apoptose. A mucosite GI pode ser consequência de vários protocolos de quimioterapia e radioterapia antineoplásica. Esses tratamentos, além de induzir a morte de células tumorais, também matam células progenitoras na base das criptas de Lieberkuhn (regiões proliferativas do intestino delgado em que todas as células do epitélio são produzidas), com consequente ruptura da barreira intestinal. Isso leva a uma perda rápida da estrutura e funcionalidade do intestino, com translocação bacteriana (CHANG *et al.*, 2012; DUNCAN; GRANT, 2003).

A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU vem sendo estudada com sucesso em modelos experimentais utilizando animais de laboratório, incluindo camundongos transgênicos. A maior parte desses trabalhos avaliou mais detalhadamente o mecanismo inflamatório e as citocinas envolvidas no comprometimento da barreira intestinal, durante o processo fisiopatológico da mucosite.

Numa contribuição recente, Soares *et al.* (2012) demonstraram que camundongos deficientes de IL-4 e selvagens tratados com 5-FU (450 mg/kg, i.p., dose única, sacrificados após três dias), apresentaram leucopenia, redução significativa dos vilos do duodeno, com aumento da profundidade da cripta e uma diminuição da razão vilo/cripa. Ainda citando Soares *et al.* (2008), ratos desafiados pelo 5-FU foram avaliados nos dias 1, 3, 5, 15 e 30 e apresentaram leucopenia, infiltração de células inflamatórias, encurtamento dos vilos e destruição das criptas no duodeno no 3º dia após desafio com 5-FU.

Azevedo *et al.* (2012), em concordância com Soares *et al.* (2008), observaram que camundongos *Swiss* desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg, i.p., dose única, sacrificados após três dias) também apresentaram leucopenia em relação ao controle salina não desafiado. Ainda, esses mesmos autores utilizando camundongos *Swiss* e *C57BL6J APOE* nocautes e selvagens mostraram que esses animais exibiam atrofia de vilos e comprometimento da arquitetura de criptas, após desafio com 5-FU, em comparação com os controles. Além disso, esses autores

documentaram uma melhor histologia duodenal após o tratamento com o peptídeo mimético COG133, com aumento significativo da altura das vilosidades.

Os resultados obtidos nesse estudo estão em concordância com os achados da literatura, também mostrando leucopenia significativa, confirmando a atividade mielosupressora do 5-FU, acompanhada das alterações morfológicas, incluindo achatamento dos vilos e redução da razão vilo/cripta, em animais deficientes para apolipoproteína E e seus controles selvagens. Verificou-se nos achados que a ausência de ApoE não agravou a leucopenia induzida pelo 5-FU, sugerindo que a ApoE não é suficiente para prevenir a ação mielotóxica do 5-FU. Além disso, o tratamento com Ala-Gln não foi suficiente para recuperar a leucopenia induzida pelo 5-FU.

O 5-FU induz a perda de peso em camundongos por causar lesões intestinais e alterações sistêmicas. Como mostram os estudos feitos por Wu *et al.* (2011), camundongos desafiados pelo 5-FU desenvolveram desidratação, anorexia e exibiram 20% de perda de peso após seis dias da administração do 5-FU (200 mg/kg, i.p., dose única). Azevedo *et al.* (2012) por sua vez, demonstraram que camundongos *Swiss* e nocautes para ApoE desafiados pelo 5-FU apresentaram perda de peso significativo quando comparados aos seus controles salina, não sendo este efeito melhorado pela administração do peptídeo COG 133. Carneiro-Filho *et al.* (2004) demonstraram que camundongos *Balb/c* desafiados pelo 5-FU apresentaram anorexia e perda de peso no dia seguinte, sendo este mais acentuado no sexto dia (perda máxima de 12% do peso), não havendo diferença com o tratamento com Gln ou Ala-Gln. Contudo, todos os grupos experimentais atingiram os pesos similares no oitavo dia. Os resultados encontrados são semelhantes aos trabalhos anteriores. Camundongos selvagens e *APOE* nocautes perderam peso de modo expressivo após administração do 5-FU (450 mg/kg, dose única, i.p.) a partir do terceiro e quarto dia, em relação aos controles PBS, não existindo diferença entre os tratados com Ala-Gln.

Ao contrário dos estudos anteriores que avaliaram mais o processo inflamatório, investigando a mucosite intestinal no 3º dia após o desafio com 5-FU, este estudo avaliou o efeito da Ala-Gln na recuperação da mucosa intestinal e no processo inflamatório no 6º dia após o desafio com 5-FU e se esse dipeptídeo requer a ApoE para seus efeitos benéficos, utilizando animais *APOE* nocautes. A Ala-Gln tem um papel crítico na recuperação da

mucosa intestinal após a injúria (BEUTHEU *et al.*, 2013; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004), com efeitos sinérgicos com fatores tróficos intestinais (GU *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, camundongos *APOE* nocautes e selvagens desafiados pelo 5-FU apresentaram redução dos vilos, da razão vilos/cripta e um aumento da profundidade das criptas. A hiperplasia da cripta presente no 6º dia após o desafio com 5-FU parece ser um fenômeno compensatório para renovar o epitélio intestinal e restituir a superfície absorptiva dos vilos comprometida pelo quimioterápico (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). O tratamento com Ala-Gln reparou a altura dos vilos no íleo dos animais nocautes quando comparados aos tratados com 5-FU e na razão vilos/cripta dos animais selvagens e nocautes.

Carneiro-Filho *et al.* (2004), utilizando uma dose de 150 mg/kg de 5-FU, injeção única, via i.p., em camundongos Balb-c, investigaram o tratamento com Ala-Gln (100 mM), via gavagem, no 6º dia após a injeção do 5-FU, e observaram que a Ala-Gln foi benéfica melhorando a área, mas não a altura dos vilos intestinais, quando comparado ao grupo desafiado sem tratamento, corroborando com o argumento da recuperação parcial da mucosa, no sexto dia pós-desafio. Em um trabalho recente foi demonstrado que a Gln previne às alterações da barreira intestinal induzidas por metrotexato, regulando a expressão de ocludina e claudina, a partir da via Erk e NF- κ B. A combinação da Gln com arginina não teve efeito protetor nesse modelo (BEUTHEU *et al.*, 2013).

A vilina é um componente estrutural das microvilosidades que formam a borda em escova na extremidade apical de enterócitos do intestino delgado. A vilina desempenha um importante papel na manutenção da organização da borda em escova por se ligar a F-actina em uma rede de filamentos. Estudos com animais nocautes para vilina mostraram que embora essa proteína não seja necessária para formar feixes com a F-actina, é um importante fator para reorganização do citoesqueleto e recuperação após estresse (ATHMAN; LOUVARD; ROBINE, 2002). Apesar dos resultados encontrados apresentarem uma redução dos vilos nos animais desafiados pelo 5-FU, a razão vilina/actina não foi significativa em todos os grupos, sugerindo uma recuperação dessa proteína nos animais após o 6º dia da administração do 5-FU. Efeito esse que precede a recuperação da altura do vilos.

Os achados mostraram que após seis dias do desafio com 5-FU, a Ala-Gln não aumentou o índice mitótico dos camundongos selvagens e *APOE* nocautes apesar da hiperplasia de cripta induzida pelo 5-FU. O grupo tratado com Ala-Gln mostrou um aumento significativo de figuras de mitose em comparação ao controle PBS não desafiado. Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, Carneiro-Filho *et al.* (2004) demonstraram um aumento significativo do índice mitótico nas criptas de camundongos Balb-c no 6º dia pós-injeção com 5-FU, no grupo tratado com Ala-Gln (100 mM), mas não no grupo que recebeu Gln (100 mM), no mesmo regime de tratamento. Essa discordância pode ter ocorrido pela diferença na cepa de camundongo utilizada ou na dose mais baixa (150 mg/Kg, via i.p.) do 5-FU usada por esses autores. Neste aspecto, considera-se que na dose mais alta utilizada por esse estudo (450 mg/Kg via i.p.), o 5-FU retardou a recuperação mitótica das criptas desses animais, necessitando talvez de mais de um ciclo de mitose (*turn over* 3-4 dias) para que o efeito proliferativo da Ala-Gln seja observado ou os animais já reduziram a velocidade/taxa do *turn over* epitelial-induzido pelo 5-FU e, portanto, as diferenças já não são aparentes, já posteriormente a hiperplasia da cripta.

Azevedo *et al.* (2012) demonstraram uma redução significativa do índice mitótico em animais selvagens e *APOE* nocautes após três dias da administração do 5-FU (450 mg/kg, i.p., sacrificados após três dias), porém apenas os animais selvagens quando tratados com o peptídeo da ApoE (COG 133) apresentaram um aumento significativo do número de células em mitose nas criptas em relação aos animais desafiados pelo 5-FU. Vale salientar que estudos têm demonstrado o papel da Gln na ativação enzimática da ornitina descarboxilase (ODC), efeito importante na ativação de poliaminas e sua participação na indução mitótica (RAY; JOHNSON, 2013).

O fator de crescimento insulínico (IGF-1), um fator trófico intestinal, derivado do metabolismo do hormônio do crescimento (GH) no fígado, e suas proteínas de ligação (IGFBPs) têm papel crítico na recuperação da mucosa intestinal após agressão citotóxica do 5-FU (COOL *et al.*, 2005). Muitos fatores intervêm na regulação do IGF-1, mas os mais importantes são o GH, a insulina e o *status* nutricional (THISSEN; UNDERWOOD; KETELSLEGERS, 1999). A ingestão adequada de nutrientes é essencial para manter taxas suficientes de IGF-1 e IGFBP-3 circulantes no soro. Fatores circulantes, como o IGF-1, têm sido implicados no controle da proliferação do epitélio intestinal (GORDON *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostraram que camundongos *APOE* nocautes (mas não os selvagens) desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) apresentaram transcrição reduzida do RNAm para IGF-1, quando comparados com seu controle PBS e tratados com Ala-Gln. Os animais deficientes para ApoE foram mais afetados que seu controle selvagem, sugerindo que a ausência da apolipoproteína pode reduzir a expressão de IGF-1. Isso poderia sugerir, em parte, que o tratamento com Ala-Gln pode contribuir na manutenção de suas taxas, já que houve um aumento significativo nos animais *APOE* nocautes tratados com Ala-Gln. A transcrição diminuída do RNAm para IGF-1 no íleo dos animais *APOE* nocautes quando desafiados pelo 5-FU comparados aos controles selvagens sugere que o sistema IGF-1 é comprometido na deficiência da ApoE. Oria *et al.* (2006) demonstraram que camundongos recém-nascidos deficientes em ApoE não se adaptam à desnutrição induzida por separação materna e acentuam fortemente aos danos da mucosa intestinal, possuindo ainda uma deficiência na reconstituição da mucosa e na recuperação do peso após *refeeding*, demonstrando com isso uma redução dramática na adaptação intestinal, sendo provavelmente ligado à uma baixa expressão de IGF-1.

Estudos têm demonstrado a participação ora sinérgica ora independente do IGF-1 e da Gln na estrutura e função do intestino delgado após aloenxerto em ratos (ZHANG *et al.*, 1995) e também durante a adaptação intestinal após nutrição parenteral em ratos (GU *et al.*, 2001). Ratos receberam suplementação de Gln na dieta ou infusão de IGF-1. Gln e IGF-1 individualmente aumentaram hiperplasia de células no íleo. No entanto, a combinação de Gln com o tratamento de IGF-1 aumentaram sinergicamente os níveis plasmáticos de IGF-1, Gln, peso úmido do íleo, DNA e teor de proteína. A Gln na dieta é regulada hepaticamente, mas não o RNAm de IGF-1 nesse modelo, sugerindo que os efeitos tróficos da Gln no intestino não são mediados pela expressão intestinal de IGF-1 (ZIEGLER *et al.*, 1996).

Cool *et al.* (2005) investigaram a mucosite intestinal estudando ratos Sprague-Dawley condicionados por 7 dias de infusão com 4,3mg/kg/dia de IGF-I, desafiados com uma injeção intraperitoneal de 150 mg/kg de 5-FU e sacrificados após 48 hs. Esses autores mostraram que o 5-FU reduziu a altura de vilos no duodeno (23%), jejuno (20%) e íleo (30%) e um aumento de 87 vezes no índice apoptótico das criptas. Esses efeitos foram menos pronunciados (de forma significativa) nos ratos pré-tratados com IGF-I nos quais a apoptose foi aumentada 48 vezes (cerca da metade do que foi observado no grupo infundido com IGF-1).

A apoptose tem um papel crítico para o desenvolvimento e homeostase do tecido, mantendo o equilíbrio entre a proliferação e a eliminação de células nas criptas e vilos no epitélio intestinal (POTTEN, 1997). Ela é caracterizada morfológicamente pela fragmentação do DNA, dobras de membrana, retração e colapso da célula em vesículas cobertas de membrana que são eliminadas rapidamente por fagocitose, evitando, dessa forma, uma resposta inflamatória do hospedeiro a componentes intracelulares (CRYNS; YUAN, 1998). Ao nível molecular, a apoptose clássica é causada pela ativação da família de cisteína proteases (caspases), que clivam as proteínas alvo de ácidos aspárticos específicos (WOLF; GREEN, 1999; RAFF, 1998). Duas grandes vias apoptóticas foram definidas: a via extrínseca, em que a ativação de um receptor de morte (por exemplo, Fas/CD95 e TNFR1/CD120a) por um ligante, como TNF- α ou FasL, leva a ativação da caspase 8 iniciador; e a via intrínseca, que é consequência de estresse celular e citocromo *c* liberado da mitocôndria, levando a ativação da caspase 9 (GREEN; REED, 1998; SALEH *et al.*, 1999). Ambas as vias culminam na ativação das caspases 3 e 6. A ativação destas vias resulta em uma série de eventos, como a clivagem do citoesqueleto de proteínas, a ativação de nucleases, e posterior fragmentação do DNA (LIU *et al.*, 1997; SAKAHIRA; ENARI; NAGATA, 1998). Tem sido demonstrado que caspase 8 cliva e ativa Bid (agonista da morte que interage com BH3), membro da família Bcl-2 pró-apoptótico, que permeabiliza a membrana da mitocôndria e induz a liberação do citocromo *c* (NUNEZ *et al.*, 1998; ZAMZAMI *et al.*, 2000). Desse modo, Bid liga as vias das caspases 8 e 9.

Foi demonstrado que a Gln e Ala-Gln reduzem os danos causados pela toxina A do *Clostridium difficile* (TcdA) em células epiteliais intestinais humanas T84 através da inibição da ativação da caspase 8, reduzindo a apoptose. Além disso, esses nutrientes também diminuíram os danos dessa toxina em um modelo de alça de íleo de coelho, com menor inflamação e secreção (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006) e reduziram a apoptose em células de cripta IEC-6 de jejuno de rato (BRITO *et al.*, 2005).

Carneiro-Filho *et al.* (2004) documentaram um aumento no índice apoptótico nas criptas nos 1º e 6º dias após a administração do 5-FU, com menor intensidade no dia 6, em relação aos controles PBS, não sendo este efeito melhorado com a administração da Gln e Ala-Gln. Em nosso estudo, em concordância com esses resultados, também se encontrou um aumento significativo no índice apoptótico de cripta no 6º dia pós-desafio tanto nos animais *APOE* nocautes e selvagens, efeito que não foi revertido pelo tratamento com Ala-Gln. Para

avaliar o efeito a nível molecular, utilizou-se o marcador anti-apoptótico Bcl-2, a partir de análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) do RNAm. Nessa análise, verificou-se que a Ala-Gln melhorou a atividade de transcrição para o RNAm da Bcl-2 apenas nos animais *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU em comparação ao controle. Segundo Braga Neto *et al.* (2007) em estudos *in vitro*, o 5-FU induziu necrose e apoptose após 12 e 24 horas na linhagem intestinal IEC-6, não sendo este efeito impedido com Gln e Ala-Gln, apesar disso estes aumentaram a migração e proliferação dessas células quando comparados aos controles 5-FU.

A proliferação celular, migração e apoptose ao nível da cripta são criticamente importantes na dinâmica da modulação do *turnover* dos enterócitos. Ueno *et al.* (2011) demonstraram em um modelo de desnutrição induzida pela dieta básica regional (DBR) em camundongos que Ala-Gln atenuou atrofia dos vilos e alterações na proliferação do epitélio intestinal e apoptose induzida pela desnutrição. Mais estudos são necessários para avaliar o efeito da Ala-Gln na apoptose na mucosite intestinal em camundongos deficientes da ApoE.

Sonis *et al.* (1998) demonstraram que camundongos com infiltrado celular inflamatório exibem um aumento de TNF- α e interleucina-1 β em um período de 12-24 h após a administração do 5-FU em um modelo de mucosite oral, demonstrando uma maior atividade dessas citocinas na fase aguda. Em contraste no nosso estudo, os animais selvagens no 6º dia pós-desafio não apresentaram mais esse aumento, evidenciando uma menor participação dessas citocinas na fase tardia.

Nesse estudo, detectou-se por teste imunoenzimático um aumento dos níveis intestinais da IL-1 β proinflamatória apenas nos animais *APOE* nocautes quando desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg), demonstrando que esses animais tem um estado proinflamatório maior na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU. O tratamento da Ala-Gln não foi suficiente para reduzir os níveis dessa citocina quando comparado ao controle. Além disso, a expressão intestinal da citocina TNF- α não apresentou diferença entre os grupos. Esses resultados conjuntamente sugerem que no 6º dia após o desafio, o quadro inflamatório é menos expressivo, o que pode explicar a falta do possível efeito anti-inflamatório da Ala-Gln nesse modelo. Estudos têm demonstrado que a Gln possui um papel anti-inflamatório, podendo agir em diferentes vias, inclusive reduzindo a produção de IL-8, síntese de NF- κ B ou aumento de sua degradação (BRASE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010).

7 CONCLUSÃO

- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) causou redução do peso ponderal nos animais selvagens e *APOE* nocautes após o 3° e 4° dia respectivamente, quando comparados aos controles PBS, não havendo melhora com a administração da Ala-Gln (100 mM).
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) causou leucopenia nos animais selvagens e *APOE* nocautes selvagens, não havendo diferença estatística entre os grupos. Esse efeito mielossupressor não foi melhorado pelo tratamento da Ala-Gln (100 mM).
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) causou uma redução na altura dos vilos do íleo, um aumento da profundidade das criptas e uma redução da razão vilo/cripta nos animais selvagens e *APOE* nocautes comparados aos seus respectivos controles PBS. O tratamento com Ala-Gln (100 mM) reduziu a profundidade das criptas e aumentou a razão vilo/cripta nos animais selvagens e nocautes quando comparados aos desafiados pelo 5-FU. A administração da Ala-Gln melhorou a altura do vilo apenas nos animais *APOE* nocautes.
- O tratamento com Ala-Gln (100 mM) não foi capaz de aumentar o índice de células mitóticas nas criptas de íleo nos animais selvagens e *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU (450 mg/kg) em relação aos seus controles PBS. O desafio pelo 5-FU causou um aumento do índice apoptótico de criptas nos animais selvagens e *APOE* nocautes em relação aos seus controles PBS que não foi melhorado pelo tratamento da Ala-Gln.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) causou um aumento dos escores para criptas necróticas nos animais selvagens e nocautes quando comparados aos controles PBS. O tratamento com Ala-Gln (100 mM) causou uma redução nos escores para criptas necróticas apenas nos animais selvagens em relação aos respectivos animais desafiados pelo 5-FU.
- A mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) não alterou os níveis da citocina proinflamatória IL-1 β detectado por ELISA nos animais selvagens. O desafio

pelo 5-FU aumentou os níveis de IL-1 β nos animais *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU e tratados com Ala-Gln (100 mM) em comparação ao respectivo controle PBS.

- A mucosite induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) não alterou a expressão de vilina e TNF- α no íleo detectadas por Western Blot nos animais selvagens e *APOE* nocautes em relação aos controles PBS e tratados com Ala-Gln (100 mM).
- A mucosite induzida pelo 5-FU (450 mg/kg) não alterou os transcritos de RNAm para IGF-1 e Bcl-2 detectados pelo qPCR no íleo dos animais selvagens, contudo os animais *APOE* nocautes desafiados pelo 5-FU apresentaram uma redução dos seus níveis em relação aos controles PBS e tratados com Ala-Gln (100 mM).

Os resultados sugerem que a Ala-Gln melhora a recuperação da mucosa intestinal, após desafio pelo 5-FU, mesmo na ausência de ApoE, visto que este nutriente melhorou aspectos de lesão intestinal em camundongos geneticamente depletados de ApoE.

O potencial efeito sinérgico da suplementação da ApoE e Ala-Gln ainda merece mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ATHAMAN, R.; LOUVARD, D.; ROBINE, S. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actincytoskeleton dynamics in intestinal cells? **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 283, p. 496-502, 2002.
- AVILA, G. *et al.* Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 5900–5909, 1982.
- AZEVEDO, O. G. R. *et al.* Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **BMC Gastroenterol.**, v.12, p. 35, 2012.
- BERGSTROM, J. *et al.* Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **J. Appl. Physiol.**, v. 36, p. 693-697, 1974.
- BIANCO, J. A. *et al.* Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. **Blood**, v. 78, n. 5, p. 1205-1211, 1991.
- BRAGA-NETO, M. B. *et al.* Alanyl-Glutamine and Glutamine Supplementation Improves 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Epithelium Damage in Vitro. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 2687-2696, 2008.
- BRASSE-LAGNEL, C. G.; LAVOINNE, A. M.; HUSSON, A. S. Amino acid regulation of mammalian gene expression in the intestine. **Biochimie**, v.92, p. 729-735, 2010.
- BRITO, G.A. *et al.* Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 7, p. 1271-1278, 2005.
- BEUTHEU, S. *et al.* Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. **Clin. Nutr.**, p. 1-8, 2013.
- BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.10, p.333-344, 2009.
- CARNEIRO-FILHO, B. A. *et al.* Alanyl-Glutamine hastens morphologic recovery from 5-Fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**, v. 20, p. 934–941, 2004.
- CARNEIRO-FILHO, B. A. *et al.* Caspase and bid involvement in Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2006.
- CAO, Y. *et al.* Glutamine enhances gut glutathione production. **JPEN**, v. 22, p. 224–227, 1998.

- COOL, J. L. *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm IGF Res.**, v. 15, p. 72-82, 2005.
- CHANG, C. *et al.* 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor-kB Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- CALDER, P. C. Glutamine and the immune system. **Clin. Nutr.**, v. 13, p. 2-8, 1994.
- COEFFIER, M. *et al.* P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.285, p. 266-273, 2003.
- CHENG, K. K. F.; CHANG, A. M.; YUEN, M. P. Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy: a randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 1208-1216, 2004.
- CRYNS, V.; YUAN, J. The cutting edge: caspases in apoptosis and disease. In: LOCKSHIN, R.; ZAKERI, Z.; TILLY, J. (Ed.). **When cells die**. New York: Wiley-Liss, 1998. p. 177–210.
- DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis — causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 853–874, 2003.
- FERLAY, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int. J. Cancer**, v.127, p. 2893-2917, 2010.
- FURST, P. New developments in glutamine delivery. **J. Nutr.**, v.131, p. 2562-2568, 2001.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Glutamine-containing dipeptides in parenteral nutrition. **JPEN**, v.14, p.118- 124, 1990.
- FULLERTON, S. M. *et al.* Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. **Exp. Neurol.**, v. 169, n. 1, p. 13-22, 2001.
- GAURAV, K. *et al.* Glutamine: a novel approach to chemotherapy-induced toxicity. **Indian J. Med. Paediatr. Oncol.**, v. 33, 2012.
- GRADISHAR, W. J.; VOKES, E. E. 5-Fluorouracil cardiotoxicity: A critical review. **Ann. Oncol.**, v. 1, p. 409-414, 1990.
- GREM, J. L. Mechanism of action and modulation of fluorouracil. **Semin. Radiat. Oncol.**, v. 7, p. 249-259, 1997.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309–1312, 1998.
- GORDON, P. V. *et al.* Igf-1 accelerates ileal epithelial cell migration in culture and newborn mice and be a mediator of steroid-induced maturation. **Pediatr. Res.**, v. 55, p. 34-41, 2004.

GOLDBERG, R. M. *et al.* A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil Plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p. 23-30, 2004.

GOETERS, C. *et al.* Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. **Crit. Care Med.**, v. 30, p. 2032-2037, 2002.

GUNNLAUGSSON, A. *et al.* The effect on the small bowel of 5-FU and oxaliplatin in combination with radiation using a microcolony survival assay. **Radiat. Oncol.**, v. 4, p.61, 2009.

GU, Y. *et al.* Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. **Clin. Nutr.**, v. 20, p. 159-166, 2001.

HARRIS, S. M. *et al.* Antitumour activity of XR5944 in vitro and in vivo in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. **Br. J. Cancer**, v.92, p. 722-728, 2005.

HALL, P. D. *et al.* The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp. Hematol.**, v. 23, p. 1256-1260, 1995.

HEGGIE, G. D. *et al.* Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. **Cancer Res.**, v. 47, p. 2203-6, 1987.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** 3 ed. Rio de Janeiro, 2008.

IKUNO, N. *et al.* Irinotecan (CTP-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 1876-1883, 1995.

IJIRI, K.; POTTEN, C. S. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. **Br. J. Cancer**, v. 47, p.175-185, 1983.

JEMAL, A. *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v.61, p. 69-90, 2011.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, p. 2137-2150, 2006.

KARUSSIS, D. *et al.* Lack of apolipoprotein-E exacerbates experimental allergic encephalomyelitis. **Mult. Scler.**, v. 9, p. 476-480, 2003.

KEEFE, D. M. K. *et al.* 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. *et al.* Effect of highdose chemotherapy on intestinal permeability in humans. **Clin. Sci.**, v. 92, p. 385-9, 1997.

KÖSTLER, W. J. *et al.* Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA Cancer J. Clin.**, v. 51, p. 290-315, 2001.

KOUANDA, S. *et al.* Insulin Growth Factor-1 in Protein-Energy Malnutrition during Rehabilitation in two Nutritional Rehabilitation Centers in Burkina Faso. **J. Trop. Med.**, v. 2009, p. 832-589, 2009.

LACEY, J.; WILMORE, D. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, v. 48, p. 297-309, 1990.

LEITAO, R. F. *et al.* Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 61, n. 2, p. 215-222, 2008.

LEVITZKI, A.; KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Mol. Aspects Med.**, 2010.
LAMONT, E. B.; SCHILSKY, R. L. The Oral Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 2289–2296, 1999.

LIMA, N. L. *et al.* Wasting and Intestinal Barrier Function in Children Taking Alanyl-Glutamine–Supplemented Enteral Formula. **J. Parent Ent. Nutr.**, v. 44, p. 365-374, 2007.

LIU, X. *et al.* DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v. 89, p. 175–184, 1997.

LYNCH, J. R. *et al.* APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.48529-48533, 2003.

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.

MAHLEY, R.W.; RALL, S.C., Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.1, p.507-537, 2000.

MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; WEISGRABER, K. H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1226-1229, 2006.

MAURO, D. J. *et al.* Mechanism of excision of 5-fluorouracil by Uracil DNA Glycosylase in normal human cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 43, p.854–857, 1993.

MEYERHARDT, J. A; MAYER, R. J. Systemic Therapy for Colorectal Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 476-487, 2005.

METHIA, N. *et al.* ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. **Mol. Med.**, v. 7, n. 12, p. 810-815, 2001.

MURPHY, B. A Clinical and Economic Consequences of Mucositis Induced by Chemotherapy and/or Radiation Therapy. **J. Support Oncol.**, v.5, p.13–21, 2007.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: Where do we go from here? **FASEB J.**, v. 10, p. 829-837, 1996.

NEWSHOLME, E. A. *et al.* A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition**, v. 4, p. 261-268, 1988.

NIEMI, M. *et al.* Apolipoprotein E and colon cancer. Expression in normal and malignant human intestine and effect on cultured human colonic adenocarcinoma cells. **Eur. J. Intern. Med.** v. 13, n. 1, p. 37-43, 2002.

NOORDHUIS, P. *et al.* 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann. Oncol.**, v. 15, p. 1025–1032, 2004.

NUNEZ, G. *et al.* Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 17, p. 3237–45, 1998.

ORIA, R. B. *et al.* Apolipoprotein knockout mice have accentuated malnutrition with mucosal disruption and blunted insuline-like growth factor response to refeeding. **Nutr. Res.**, v. 26, p. 427-435, 2006.

ORIA, R. B. *et al.* APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. **Pediatr. Res.**, v.57, p.310-316, 2005.

PANIGRAHI, P. *et al.* Role of glutamine in bacterial transcytosis and epithelial cell injury. **JPEN**, v. 21, p. 75–80, 1997.

PRITCHARD, D. M. *et al.* Chemically-induced apoptosis: p21 and p53 as determinants of enterotoxin activity. **Toxicol Lett.**, v.102–103, p. 19–27, 1998.

PICO, J. L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. **Oncologist**, v.3, p.446-451, 1998.

PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J. Clin. Oncol.**, v. 6, p. 1653-1664, 1988.

POTTEN, C. S. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G253–257, 1997.

RAFF, M. Cell suicide for beginners. **Nature**, v. 396, p. 119–122, 1998.

RAY, R. M.; JOHNSON, L. R. Regulation of intestinal mucosal growth by amino acids. **Amino Acids**, 2013.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science**, v.307, p.1904-1909, 2005.

REISHER, S. R. *et al.* Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 90, n. 12, p. 5757-5761, 1993.

ROUSE, K. *et al.* Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. **Ann. Surg.**, v. 221, p. 420–426, 1995.

ROGERO, M. M. *et al.* Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutr. Res.**, v. 24, p.261-270, 2004.

SALEH, A. *et al.* Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 17941–17945, 1999.

SAVARESE, D. M. F. *et al.* Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. **Cancer Treat. Rev.**, v. 29, p. 501–513, 2003.

SAMUELSSON, T. Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 6139-6144, 1991.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, p. 96–9, 1998.

SCHEPPACH, W. *et al.* Effector free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. **Gastroenterology**, v. 107, p. 429-434, 1994.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **J. Parent Ent. Nutr.**, v. 14, p. 40S-44S, 1990.

SOARES, P. M. *et al.* Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 713-720, 2011.

SOARES, P. M. *et al.* 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. *et al.* Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, p. 46–49, 2013.

SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol.**, v. 34, p.39-42, 1998.

SONIS, S. T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, p.1995-2025, 2004.

SONIS, S. T. *et al.* Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. **J. Clin. Oncol.**, v. 19, p. 2201-2205, 2001.

SONIS, S. T.; FEY, E. G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**, v. 16, p. 680-686, 2002.

SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WIMORE, D.W. Glutamine metabolism in the intestinal tract. **JPEM J. Parenter Enteral Nutr.**, v. 9, p. 608-617, 1985.

TERKELTAUB, R. A. *et al.* Apolipoprotein (Apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular Apo E and demonstration of Apo E binding to urate crystals in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 20–26, 1991.

TAKACH, S. *et al.* Monoclonal B cells detected in autologous PBSC grafts from patients with classical Hodgkin lymphoma: impact on relapse and survival following transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v.45, p.856-861, 2010.

THISSEN, J. P.; UNDERWOOD, L. E.; KETELSLEGERS, J. M. Regulation of insulin-like growth factor-1 in starvation and injury. **Nutr. Rev.**, v. 57, p. 167-176, 1999.

UENO, P. M. *et al.* Alanyl-Glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostase in vitro in a murine model weanling undernutrition. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 301, p. 612- 622, 2011.

URBINA, J. J. O. *et al.* Effects of Parenteral Nutrition Supplemented with Alanyl-Glutamine on Nutrition Status in Rats. **J. Parent Ent. Nutr.**, v. 29, p. 262-265, 2005.

VAN VLIET, M. J. *et al.* The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **PLoS Pathog.**, v. 6, 2010.

VAN KUILENBURG, A. B. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 939-950, 2004.

VITEK M. P.; BROWN, C. M.; COLTON C. A. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. **Neurobiol Aging.**, v. 30. p. 1350–1360, 2009.

WALSH, N. P. *et al.* Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. **Sports Med.**, v. 26, p. 177-191, 1998.

WARDWELL,N.R.; MASSION, P. P. Novel strategies for the early detection and prevention of lung cancer. **Semin Oncol.**, v. 32, p. 259-268, 2005.

WINDMUELLER, H. G. Glutamine utilization by the small intestine. **Adv. Enzymol.**, v. 53, p. 202-231, 1982.

WOLF, B. B.; GREEN, D. R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 20049–20052, 1999.

WU, Z. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-Fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomed. Pharmacother.**, v. 65, p. 339–344, 2011.

XUE, H. *et al.* Nutrition Modulation of Gastrointestinal Toxicity Related to Cancer Chemotherapy: From Preclinical Findings to Clinical Strategy. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 35, p. 74-90, 2011.

ZHANG, N. *et al.* 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, p. 1551-1569, 2008.

ZHANG, H.; WU, L.; WU, J. Cross-Talk between Apolipoprotein E and Cytokines. **Mediators of Inflamm.**, v. 2011, 2011.

ZHANG, W. *et al.* Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and Glutamine Improve Structure and Function in the Small Bowel Allograft. **J. Surg. Res.**, v. 59, p. 6-12, 1995.

ZAMZAMI, N. *et al.* Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. **Oncogene**, v. 19, p. 6342–50, 2000.

ZIEGLER, T. R. *et al.* Gut adaptation and the insulin-like growth factor system: Regulation by glutamine and insulin-like growth factor-1 administration. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. G866-875, 1996.

ANEXO – Cópia da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 44/2013, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DA ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL6J APOE NOCAUTES E SELVAGENS”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 24 de julho de 2013


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2166369