

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO**

**ESTUDO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NAS MUCOSITES ORAL E  
INTESTINAL INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL E METOTREXATO E EFEITO  
DA GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL.**

FORTALEZA

2007

RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará – UFC

FORTALEZA

2007

RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO

**ESTUDO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NAS MUCOSITES ORAL E  
INTESTINAL INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL E METOTREXATO E EFEITO  
DA GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMINA NA MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 20 de abril de 2007.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gerly Anne de Castro Brito (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Abalen Martins Dias  
Fundação Antônio Prudente – SP

---

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

---

Prof Dr. Eduardo Costa Studart Soares  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, Wilson e Lúcia, e meus irmãos, Raquel, Gilberto e Felipe,  
pelo imenso incentivo e apoio.

Ao meu marido, Rômulo e meus filhos, Rômulo Filho e Clara, por tudo.

## AGRADECIMENTOS

À professora Gerly Anne de Castro Brito, a quem, além da firme orientação do presente trabalho, agradeço pela sua inestimável amizade e competência.

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pelas muitas oportunidades e pelo privilégio de tê-lo compondo a minha banca examinadora.

A todos os professores da pós-graduação em farmacologia que contribuíram em minha formação nesse curso, especialmente aos professores Marcellus e Vietla Rao, pela disponibilidade e atenção.

Ao professor Reinaldo Oriá, pela valiosa contribuição no estudo da mucosite intestinal.

Às mais novas professoras e antigas amigas, Vilma e Mariana, sempre disponíveis e presentes.

Aos estudantes de iniciação científica, Alana, Lorena, Delanie, Emanuelle, Johann, e Júlio Werner, cujas participações foram decisivas e indispensáveis.

Aos amigos do LAFICA, Rosinha, Maria Luisa, Pedro, Antoniella, Carolina, Rosane, Yuri, Maurício e tantos outros, pela convivência agradável e pela amizade.

À Vandinha, por sua presteza em ajudar, sempre.

Ao Ivan, pela boa vontade e dedicação na confecção das lâminas.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rose, Haroldo, Bento, Chiquinho e, muito especialmente, à Áura, pela disposição em ajudar.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da molécula de 5-fluorouracil	13
Figura 2	Estrutura química da molécula de metotrexato	15
Figura 3	Diagrama simplificado da ação do metotrexato na síntese da t	16
Figura 4	Desenho esquemático do protocolo experimental de mucosite oral	30
Figura 5	Desenho esquemático do protocolo experimental da mucosite intestinal ratos ou camundongos	41
Figura 6	Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil e trauma mecânico e que foram tratados com salina (C e D), aminoguanidina (E e F) ou <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; G e H):	47
Figura 7	Efeito dos inibidores da NOS, <i>N</i> $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl ester (L-NM), aminoguanidina (AG) e <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters	51
Figura 8	Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a atividade da nítrico óxido sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters	52
Figura 9	Efeito do <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU).	53
Figura 10	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NOSi de uma mucosa jugal normal (B) ou com mucosite oral experimental recebendo solução salina (C), aminoguanidina (AG; D), ou <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; E).	55
Figura 11	Fotomicrografias de lâminas de mucosas jugais processadas pelo método de TUNEL, de um animal normal (B) ou com mucosite oral experimental tratado com solução salina (C), aminoguanidina (AG; D), ou <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; E).	56
Figura 12	Efeito do <i>N</i> -(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) na produção salivar não estimulada, no 4 <sup>o</sup> (A) e 10 <sup>o</sup> dias (B), de animais submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico.	58
Figura 13	Efeito da aminoguanidina (AG) e <i>N</i> $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME) sobre a altura de vilos no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) dos animais submetidos a mucosite intestinal.	60
Figura 14	Fotomicrografias de jejuno de ratos Wistar normais e de animais submetidos à mucosite intestinal pelo metotrexato (MTX) que receberam salina,	62

	aminoguanidina (AG) ou N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME).	
Figura 15	Efeito da aminoguanidina (AG) e N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME) na atividade de mieloperoxidase (MPO) em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX.	65
Figura 16	Exemplos representativos da marcação imunohistoquímica para enzima nítrico óxido sintase (NOSi; lado direito) e para células TUNEL positivas (lado esquerdo) em segmentos de jejuno de rato.	66
Figura 17	Ensaio de Western Blot para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi; MW ~130kDa) em homogenato de segmentos de jejuno.	68
Figura 18	Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico e que foram tratados com salina, observados no 10 <sup>o</sup> (C e D) e 14 <sup>o</sup> (E e F) dias, com glutamina (G e H) ou alanil-glutamina (I e J), observados no 14 <sup>o</sup> dia de experimento.	71
Figura 19	Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre o nível de glutamina no soro de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU).	75
Figura 20	Efeito glutamina e alanil-glutamina sobre a atividade de mieloperoxidase observada nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental	76
Figura 21	Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.	78
Figura 22	Fotomicrografias de lâminas de mucosas jugais processadas para detecção de apoptose pelo método de TUNEL, de um animal normal (B) ou com mucosite oral experimental tratado com solução salina (C), glutamina (D), ou alanil-glutamina (E).	79

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com aminoguanidina (AG) e N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W)	48
Tabela 2	Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com N $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME)	49
Tabela 3	Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com glutamina e alanil-glutamina durante 10 dias.	72
Tabela 4	Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com glutamina e alanil-glutamina durante 14 dias.	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ m	micrômetro
1400W	N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetaminide
5-FU	Fluorouracil
AG	Aminoguanidina
AL-GLU	Alanil-glutamina
Anova	Análise de variância
DAB	3,3`diaminobenzidine-peróxido
DHFR	Enzima diidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELAM	Moléculas de adesão endotélio-leucócito
epm	Erro padrão da média
FDUMP	5-fluoro-2'-desoxiuridina
FUTP	trifosfato de 5-fluorouridina
G	Gramma
G-CSF	Fator estimulador de crescimento de granulócitos
GLU	Glutamina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos/ monócitos
GMPc	Guanilato monofosfato cíclico
H&E	Hematoxilina e eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF-	Interferon
Ip	Via intra-peritoneal
Kg	Kilograma
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
L-NAME	N $\phi$ -Nitro-L-Arginina Metil Ester
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
Nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida

NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
RNA	Ácido ribonucléico
Sc	Via subcutânea
TCA	ácido tricloracético
TGF	Fator transformador de crescimento
TM	Trauma mecânico
TNF	Fator de necrose tumoral
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end-labeling
VCAM	moléculas de adesão celular vascular

## RESUMO

A mucosite induzida por quimioterápicos é um efeito colateral importante e limitante da terapia do câncer, cuja fisiopatologia não é completamente compreendida. O presente estudo visa investigar o papel do óxido nítrico (NO) na patogênese das mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil (5-FU) e metotrexato (MTX) e os efeitos da glutamina (GLU) e alanil-glutamina (AL-GLU) na mucosite oral induzida por 5-FU. A mucosite oral foi induzida por duas administrações intraperitoneais (i.p.) de 5-FU nos 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias (60 e 40 mg/kg respectivamente), em hamsters. Os animais foram tratados subcutaneamente (s.c.) com os inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; 1 mg/kg), aminoguanidina (AG; 5 or 10 mg/kg), *N*<sub>ϕ</sub>-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME; 5, 10 or 20 mg/kg) ou salina (0,4 ml), uma hora antes do 5-FU e, diariamente, até o sacrifício, no 10<sup>o</sup> dia. Em outro ciclo de experimentos, os animais receberam salina, suspensão de GLU ou de AL-GLU (100 mM) uma hora antes do 5-FU e, diariamente, até o sacrifício, nos 10<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias. A mucosite intestinal foi induzida pela administração de MTX (2,5 mg/kg; s.c.) nos primeiros três dias de experimentos, em ratos Wistar. Os animais foram tratados com AG (10 mg/Kg; i.p.), ou L-NAME (20 mg/Kg; i.p.), uma hora antes do MTX e, diariamente, até o sacrifício, no 5<sup>o</sup> dia. Na investigação do papel do NO na mucosite oral induzida por 5-FU, os seguintes parâmetros foram avaliados: análises micro e macroscópica, atividade de mieloperoxidase (MPO) e da NOS, níveis teciduais de nitrito, imunohistoquímica para NOSi e detecção de morte celular. O efeito do 5-FU na produção salivar também foi avaliado. No estudo dos efeitos da GLU e AL-GLU, análises micro e macroscópicas, atividade de MPO, detecção de morte celular, estoques teciduais de glutathione e concentração sérica de glutamina foram os parâmetros avaliados. No estudo do papel do NO na mucosite intestinal, foram realizadas análise histopatológica, medida da altura de vilos nos três segmentos do intestino delgado, atividade de MPO, detecção de apoptose, assim como, western blot e imunohistoquímica para NOSi. 1400W e AG, contrariamente ao L-NAME, reduziram os parâmetros macro e microscópicos da mucosite oral e a infiltração de células inflamatórias, detectada na histopatologia e na atividade de MPO. Foram observados ainda, no 10<sup>o</sup> dia, maior atividade da NOS e marcação imunohistoquímica para NOSi. 1400W reverteu a diminuição da secreção salivar induzida por 5-FU. A mucosite oral induzida por 5-FU resultou na diminuição dos níveis séricos de glutamina, bem como dos estoques teciduais de glutathione, no 10<sup>o</sup> dia, efeitos que foram revertidos pela administração de GLU e AL-GLU. Apesar de não ter prevenido a mucosite oral no 10<sup>o</sup> dia, o tratamento com GLU ou AL-GLU reduziu os parâmetros macro e microscópicos da mucosite oral, e a atividade de MPO, no 14<sup>o</sup> dia. Na mucosite intestinal, AG e L-NAME preveniram o encurtamento de vilos e reduziram a necrose de criptas, assim como o infiltrado inflamatório, efeitos induzidos pelo MTX, sendo esse último constatado pela análise histopatológica e atividade de MPO. Foi detectado maior marcação imunohistoquímica para NOSi no jejuno de ratos submetidos à mucosite intestinal. Esses resultados sugerem o papel relevante do NO na fisiopatologia das mucosites oral e intestinal. O presente estudo demonstrou ainda que a GLU e AL-GLU aceleraram a recuperação da mucosa dos animais submetidos a mucosite oral por 5-FU, aumentando os níveis teciduais de glutathione, reduzindo a inflamação e promovendo reepitelização.

**Palavras-chaves:** óxido nítrico, mucosite, óxido nítrico sintase, glutamina, 5-fluorouracil, metotrexato.

## ABSTRACT

Mucositis induced by antineoplastic drugs is an important, dose-limiting and costly side effect of cancer therapy, which pathophysiology is not completely understood. The aim of the present study was to investigate the role of nitric oxide (NO) on the pathogenesis of oral and intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) and the effect of glutamine (GLU) and alanyl-glutamine (AL-GLU) on 5-FU-induced experimental mucositis. Oral mucositis was induced by two intraperitoneal (i.p) administrations of 5-FU on the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> days (60 and 40 mg/kg, respectively) in hamsters. Animals were treated subcutaneously (s.c.) with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitors *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W; 1 mg/kg), aminoguanidine (AG; 5 or 10 mg/kg), *N*<sub>ϕ</sub>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; 5, 10 or 20 mg/kg) or saline (0.4 ml), one hour before the injections of 5-FU and daily until sacrifice, on the 10<sup>th</sup> day. In another set of experiments, animals received saline, GLU or AL-GLU suspension (100 mM) one hour before the injections of 5-FU and daily until sacrifice, on the 10<sup>th</sup> or 14<sup>th</sup> day. Intestinal mucositis was induced by three administrations of MTX (2.5 mg/kg; s.c.) on the first three days of the experiment, in Wistar rats. Animals were treated i.p. with AG (10 mg/Kg), or L-NAME (20 mg/Kg), one hour before the injections of MTX and daily until sacrifice, on the 5<sup>th</sup> day. In the investigation of the role of NO on 5-FU induced oral mucositis, the following parameters were evaluated: microscopic and macroscopic analysis, myeloperoxidase (MPO) and NOS activities, nitrite level, immunohistochemistry for NOSi, salivary secretion, and cell death. In order to study the effect of GLU and AL-GLU, microscopic and macroscopic analysis, MPO activity, cell death, glutathione stores and the serum concentration of glutamine, were evaluated. In the MTX-induced intestinal mucositis, histopathological analysis was evaluated and the villus height in all three small intestine segments was measured. MPO activity, cell death, as well as, western blot and immunohistochemistry to evaluate the expression of the NOSi, were also conducted. 1400W or AG, but not L-NAME, reduced macroscopic and histological parameters of oral mucositis, and reduced the inflammatory cell infiltration as detected on histopathology and by MPO activity. Increased NOS activity and immunostaining for NOSi were detected. 5-FU induced a decrease in salivary secretion, observed on 4<sup>th</sup> day, and this effect was prevented by 1400W. The 5-FU-induced oral mucositis significantly decreased the serum GLU level as well as the cheek pouch glutathione stores, observed on day 10. GLU or AL-GLU reversed the 5-FU effects, restoring serum GLU levels and cheek pouch glutathione stores, observed on day 10, but did not prevent oral mucositis at this time. However, GLU and AL-GLU reduced macroscopic and histological parameters of oral mucositis, and reduced the MPO activity on day 14. In the MTX-induced mucositis, AG and L-NAME significantly prevented villous blunting, lamina propria cell death, and reduced crypt necrosis induced by MTX, decreasing neutrophil infiltration as detected by histopathology and by MPO activity. These data were associated with the detection of iNOS expression by Western blot and by immunohistochemistry in the jejunum tissue. These results suggest an important role of NO in the pathogenesis of oral and intestinal mucositis induced by 5-FU and MTX. The present study also demonstrated that GLU or AL-GLU hastens mucosal recovery increasing mucosal tissue glutathione stores, reducing inflammatory parameters and speeding reepithelization.

**Key-words:** nitric oxide, mucositis, nitric oxide synthase, glutamine, 5-fluorouracil, methotrexate.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Mucosite oral</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Mucosite intestinal</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Antimetabólitos</b>	<b>12</b>
1.3.1	5-Fluorouracil	13
1.3.2	Metotrexato	14
<b>1.4</b>	<b>Abordagem farmacológica</b>	<b>17</b>
1.4.1	Óxido Nítrico (NO)	17
1.4.2	Glutamina e alanil-glutamina	21
<b>1.5</b>	<b>Justificativa e objetivos</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Animais</b>	<b>27</b>
2.1.1	Mucosite oral	27
2.1.2	Mucosite intestinal	28
<b>2.2</b>	<b>Drogas, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados</b>	<b>28</b>
<b>2-3</b>	<b>Protocolos experimentais</b>	<b>29</b>
2.3.1	Mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters	29
2.3.1.1	Modelo experimental	29
2.3.1.2	Grupos experimentais	31
2.3.1.2.1	Grupos controles	31
2.3.1.2.2	Grupo tratado com L-NAME	32
2.3.1.2.3	Grupo tratado com aminoguanidina	32
2.3.1.2.4	Grupo tratado com 1400W	32

2.3.1.2.5	Grupo tratado com Glutamina	33
2.3.1.2.6	Grupo tratado com Alanil-glutamina	33
2.3.1.3	Parâmetros avaliados tanto para o estudo do papel do óxido nítrico, quanto para o estudo do efeito da alanil-glutamina e glutamina na mucosite oral induzida por 5-FU	33
2.3.1.3.1	Análise macroscópica das mucosas jugais	33
2.3.1.3.2	Análise histopatológica das mucosas jugais	34
2.3.1.3.3	Dosagem de mieloperoxidase	35
2.3.1.3.4	Imunohistoquímica pelo método de TUNEL (TdT- mediated dUTP Nick end-labeling)	35
2.3.1.4	Parâmetros avaliados no estudo do papel do óxido nítrico na mucosite oral experimental	36
2.3.1.4.1	Determinação da atividade da nítrico óxido sintase (NOS)	36
2.3.1.4.2	Dosagem de nitrito	37
2.3.1.4.3	Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi)	38
2.3.1.4.4	Avaliação da taxa de salivação não estimulada	39
2.3.1.5	Parâmetros avaliados no estudo do efeito da glutamina e alanil-glutamina na mucosite oral experimental	39
2.3.1.5.1	Determinação da concentração sérica de glutamina	39
2.3.1.5.2	Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos	39
2.3.2	Mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos.	40
2.3.2.1	Modelo de mucosite intestinal	40
2.3.2.2	Grupos experimentais	41
2.3.2.2.1	Grupos controles	42
2.3.2.2.2	Grupo tratado com L-NAME	42
2.3.2.2.3	Grupo tratado com L-NAME e L-arginina	42
2.3.2.2.4	Grupo tratado com aminoguanidina	42
2.3.2.3	Parâmetros avaliados	43
2.3.2.3.1	Análise morfométrica	43
2.3.2.3.2	Estudo imunohistoquímico para detecção de NOSi e imunohistoquímica pelo método de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick end-labeling)	43
2.3.2.3.3	Análise por Western Blot	43
<b>2.4</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Efeito do óxido nítrico na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil</b>	<b>45</b>

3.1.1	Efeito dos inibidores de NOS, L-NAME, AG e 1400W sobre as mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU	45
3.1.1.1	Análise Macroscópica	45
3.1.1.2	Análise Microscópica	45
3.1.2	Efeito do L-NAME, aminoguanidina e 1400W sobre a atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental	50
3.1.3	Efeito 5-fluorouracil sobre a atividade da NOS na mucosas jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental	50
3.1.4	Efeito do 1400W sobre a dosagem de nitrito das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-FU	50
3.1.5	Efeito da aminoguanidina e 1400W na marcação imunohistoquímica para nítrico óxido sintase induzida (NOSi)	54
3.1.6	Efeito da aminoguanidina e 1400W na marcação de células TUNEL positivas, como indicativo de apoptose	54
3.1.7	Efeito do 1400W na produção salivar não estimulada de animais submetidos à mucosite experimental	57
<b>3.2</b>	<b>Efeito do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por metotrexato (MTX)</b>	<b>59</b>
3.2.1	Efeito dos inibidores da NOS, AG e L-NAME, sobre as alterações morfométricas e histopatológicas observadas em animais submetidos à mucosite intestinal induzida por metotrexato	59
3.2.2	Efeito da AG e L-NAME sobre a atividade de mieloperoxidase em jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX	63
3.2.3	Efeito do MTX na marcação imunohistoquímica para NOSi e de células TUNEL positivas	63
3.2.4	Western Blot	67
<b>3.3</b>	<b>Efeito da glutamina e alanil-glutamina na evolução da mucosite oral induzida por 5-FU</b>	<b>68</b>
3.3.1	Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre as mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU	68
3.3.1.1	Análise Macroscópica	68
3.3.1.2	Análise Microscópica	69
3.3.2	Efeito 5-FU sobre os níveis de glutamina no soro de hamsters..	74
3.3.3	Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre os estoques de glutathiona nas mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental	74
3.3.4	Efeito glutamina e alanil-glutamina sobre a atividade de mieloperoxidase observada nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental	77
3.3.5	Efeito da glutamina e alanil-glutamina na marcação de células TUNEL positivas, como indicativo de apoptose	77

<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIA</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>124</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Mucosite oral

Mucosite é um termo clínico que descreve uma síndrome caracterizada por ulceração da mucosa do trato digestivo, resultando em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (SONIS; FAY, 2002; SONIS, 2004; SCULLY *et al.*, 2006). Consiste em um efeito adverso comum nos pacientes portadores de câncer submetidos à tratamentos com agentes quimioterápicos diversos, em especial os antimetabólitos e/ou, radioterapia na região de cabeça e pescoço (ALTMANN, 1974; CABALLERO *et al.*, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et al.*, 1991; MAGRATH *et al.*, 1984; BISHOP *et al.*, 1986; SCULLY *et al.*; SCULLY *et al.*, 2003; SCULLY *et al.*, 2004; SCULLY *et al.*, 2006). Deve-se aos efeitos não específicos das drogas antineoplásicas, lesando tanto as células malignas quanto as normais, em processo de divisão celular ativo.

A forma oral caracteriza-se principalmente pela presença de lesões ulcerativas (estomatites) dolorosas e responsáveis por grave desconforto local. Os pacientes queixam-se principalmente de dor intensa, muitas vezes impedindo-os de se alimentar normalmente, o que agrava seu estado nutricional e, como consequência, o estado geral, podendo haver a necessidade de sondas nasogástricas, hospitalização e, nos casos mais graves, interrupção temporária ou definitiva do tratamento, o que resulta no aumento dos custos e comprometimento do prognóstico do caso (SCULLY *et al.*, 2006).

O diagnóstico é clínico e baseia-se no uso de agentes notadamente estomatotóxicos e na localização das lesões orais. A mucosite induzida pela quimioterapia acomete mais comumente áreas não queratinizadas, incluindo as mucosas bucal e labial, assoalho da boca, porção ventral da língua e palato mole, raramente afetando o dorso da língua, o palato duro e a gengiva (McCARTHY *et al.*, 1998), enquanto que a mucosite decorrente de radiação, além da mucosa móvel, acomete também o palato duro (SCULLY *et al.*, 2006). O diagnóstico diferencial deve ser feito para infecções virais e doenças do tipo enxerto contra hospedeiro. As infecções virais diferem clinicamente da mucosite oral por serem localizadas na

mucosa queratinizada do palato duro, gengiva e dorso da língua e o seu aparecimento geralmente coincide com febre. A síndrome enxerto contra hospedeiro é limitada à pacientes submetidos à transplante de células hematopoiéticas e desenvolve-se após a recuperação hematológica (cerca de 21 dias após o transplante), consistindo de lesões orais normalmente liquenóides e, muito freqüentemente, associado à xerostomia (WOO *et al.*, 1997).

Embora seja difícil prever se determinado paciente irá desenvolver mucosite apenas em decorrência das drogas administradas, alguns fatores predis põem o desenvolvimento de mucosite oral. Fatores relacionados ao tratamento, tais como o quimioterápico utilizado, a dose, o esquema posológico e a via de administração (SCULLY *et al.*, 2006), e fatores predisponentes do paciente, como saúde bucal deficiente, pouca produção salivar, traumas por restaurações ou próteses mal-adaptadas, focos de infecção, idade e até mesmo debilidades sistêmicas podem propiciar o aparecimento e definir a severidade da mucosite. Quanto mais jovem o paciente, maior a probabilidade de desenvolver mucosite oral (PLEOVA, 1999; KOSTLER *et al.*, 2001; DENHAM; HAUER-JENSEN, 2002; SONIS; FAY, 2002; BARASCH; PETERSON, 2003; DUNCAN; GRANT, 2003). Os efeitos colaterais bucais em crianças abaixo dos 12 anos de idade aumentam em mais que o dobro que nos pacientes adultos. Parece provável que o índice mitótico elevado das células da mucosa bucal, neste grupo etário, seja um fator adjuvante (MCCARTHY *et al.*, 1998).

A diminuição da produção salivar (xerostomia) tem sido relatada em pacientes com câncer no trato gastrointestinal tratados com 5-fluorouracil (5-FU) (McCARTHY *et al.*, 1998), assim como em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço (ROSARIO *et al.*, 2005). Estudos demonstram que uma produção salivar adequada é imprescindível para a manutenção da saúde oral. A saliva contém imunoglobulinas secretórias (anticorpos) contra os microorganismos na boca, e a lisozima, que hidroliza um componente importante das membranas externas de bactérias. Na ausência de anticorpos e lisozima, os organismos que causam a infecção bucal e cáries dentárias proliferam (MANDEL, 1987; LEVINE, 1989; WOLFF *et al.*, 1990). A combinação dos efeitos citotóxicos do quimioterápico no epitélio oral, e os efeitos da xerostomia, que predis põe a mucosa à injúria, justifica a presença aumentada de

mucosite oral em pacientes com pouca produção salivar (McCARTHY *et al.*, 1998). Além disso, devido ao seu efeito lubrificante, a saliva é importante na mastigação e deglutição dos alimentos. Sua liberação reduzida pode comprometer a nutrição do indivíduo acometido e, como conseqüência, seu quadro geral, deixando-o mais susceptível à infecções secundárias.

Tem sido descrito uma incidência de mucosite em aproximadamente 40% dos pacientes em uso de vários agentes quimioterápicos (ALTMANN, 1974; CABALLERO *et al.*, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et a.*, 1991; MAGRATH *et al.*, 1984; BISHOP *et al.*, 1986; SCULLY *et al.*, SCULLY *et al.*, 2003; SCULLY *et al.*, 2004; SCULLY *et al.*, 2006). A combinação de diferentes drogas antineoplásicas aumenta essa incidência de 40 para 70% (CABALLERO *et al.*, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et a.*, 1991; SCULLY *et al.*, 2006). Nos tratamentos prévios com quimio ou radioterapia para transplante de células hematopoiéticas, a ocorrência de mucosite chega a atingir 75 a 99%, dos pacientes, particularmente nos casos em que se associa irradiação e quimioterapia (DONNELLY *et al.*, 1992; BLIJLEVENS *et al.*, 2000).

Essa complicação oral da quimioterapia ocorre através de dois mecanismos principais: efeito direto do quimioterápico na mucosa oral (estomatotoxicidade direta) ou efeito indireto resultante da mielossupressão (estomatotoxicidade indireta) (SONIS, 2004; DUNCAN; GRANT, 2003). No início, as lesões são geralmente discretas, sendo comum a progressão para áreas confluentes de ulceração.

Apesar do efeito direto dos quimioterápicos na renovação do epitélio e, conseqüente perda de sua capacidade regenerativa, ser um fator chave no desenvolvimento das ulcerações características da mucosite oral, tem-se valorizado, mais recentemente, a participação da submucosa no desencadeamento e severidade dessa desordem (SONIS, 1998; SONIS; FAY, 2002; DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004, SCULLY *et al.*, 2006).

Sonis e colaboradores descreveram a mucosite oral como um processo complexo, no qual ocorre a seguinte seqüência de eventos biológicos interligados: iniciação, resposta primária ao dano, sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (SONIS *et al.*, 2004; SCULLY *et al.*, 2006). A manifestação

de todos os estágios não ocorre obrigatoriamente em todos os casos. Portanto, uma mucosite branda, com poucos danos à mucosa, rápida recuperação e proliferação epitelial, evita a ocorrência da fase ulcerativa, a mais sintomática (SONIS, 1998; SONIS; FAY, 2002).

A fase de iniciação ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A injúria celular direta das células epiteliais basais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS *et al.*, 2004, 2006). De fato, estudos demonstram claramente a presença dessas espécies reativas após exposição a agentes estomatotóxicos (GATE *et al.*, 1999), assim como atenuação da mucosite oral por agentes que bloqueiam, ou são varredores desses radicais livres (CULY; SPENCER, 2001). A geração dos radicais tóxicos de oxigênio e sua capacidade de estimular uma série de fatores de transcrição caracterizam a resposta aguda do tecido ao agente quimioterápico e consiste no marco da fase inicial da mucosite, que, segundo Sonis, precede os outros eventos biológicos (SONIS *et al.*, 2004).

A resposta primária ao dano, observada nas células e tecidos da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (SCULLY *et al.*, 2006).

Normalmente o NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, ligado à proteína inibitória, I $\kappa$ B. Vários estímulos inflamatórios, incluindo agentes quimioterápicos, radioterapia e citocinas inflamatórias, são capazes de ativá-lo, dissociando-o da I $\kappa$ B, através da fosforilação dessa proteína por kinases específicas (BARNES, 1997). A dissociação da I $\kappa$ B resulta na translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde liga-se a sítios específicos de genes inflamatórios e imunes, regulando a produção de várias proteínas e moléculas como, citocinas pró-inflamatórias, [interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], óxido nítrico, enzimas e moléculas de adesão. Os resultados são injúria tecidual e apoptose. Estudos sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B, tanto pelos agentes quimioterápicos como pela radioterapia, é um elemento chave na gênese da mucosite. A regulação positiva de outros genes resulta na expressão de moléculas

de adesão, ativação da via da ciclooxigenase-2 e, conseqüente angiogênese (SONIS *et al.*, 2004, 2006).

A participação do óxido nítrico (NO) na mucosite oral induzida por radiação foi sugerida por Sonis, através da detecção da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), envolvida na síntese de óxido nítrico (NO), através de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), em tecido de mucosa jugal de hamsters (SONIS *et al.*, 2002). A participação do NO na mucosite oral induzida por quimioterápicos, no entanto, não tinha sido demonstrada até a publicação dos resultados que serão apresentados no presente estudo.

Paralelo à ativação do NF- $\kappa$ B, enzimas, como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalizam a síntese de ceramida, são ativadas diretamente pela quimio e/ou radioterapia, ou indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio e TNF- $\alpha$ . A via da ceramida induz apoptose tanto em células submucosas, como epiteliais (MADDENS *et al.*, 2002). Adicionalmente, a destruição da fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite oral, resultando na ativação de macrófagos e subseqüente injúria tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- $\alpha$  (SONIS *et al.*, 2004).

Em resumo, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimio ou radioterapia, resulta em uma série de *feedbacks* positivos, amplificando e prolongando a injúria tecidual, através de seus efeitos nos fatores de transcrição e nas vias da ceramida e caspases, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Corroborando com esses dados, um estudo recente de nosso laboratório demonstrou efeito protetor da pentoxifilina e talidomida, inibidores da síntese de citocinas, na mucosite oral induzida por 5-FU, em hamsters (LIMA *et al.*, 2005).

A fase seguinte, denominada ulcerativa é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. A injúria e morte das células basais epiteliais, resultante das fases anteriores, resultam em mudanças atróficas que culminam na real deteriorização e quebra da mucosa. Nessa fase é comum a infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização

de microorganismos. Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria flora oral, assim como bactérias oportunistas gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*), microrganismos gram-positivos (*Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis* e *staphylococci*), além de fungos como a *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*, como *kruseitropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *aspergillus* e vírus (WINGARD *et al.*, 1991; MCCARTHY; SKILLINGS, 1992; EPSTEIN; WONG, 1994; FELD, 1997). Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa estimulando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas que, associado à neutropenia induzida pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ETING *et al.* 1992). De fato, estudos sugerem que o uso profilático de agentes antifúngicos, absorvidos, ou parcialmente absorvidos pelo trato gastrointestinal, como por exemplo, o fluconazol, reduz as manifestações clínicas de candidíase oral e infecção sistêmica (WORTHINGTON; CLARKSON, 2002).

A fase seguinte, de cicatrização, é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observam-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS *et al.*, 2004; 2006).

Em geral, as alterações iniciais da mucosite oral tornam-se evidentes dentro de quatro a cinco dias após o início da quimioterapia. A lesão atinge seu auge, com o aparecimento de úlceras, dentro de sete a dez dias após a última dose, e, a seguir, observa-se a cicatrização da mucosa nas próximas três semanas (SCULLY *et al.*, 2006). O desenvolvimento da mucosite oral, em hamsters, apresenta-se semelhante ao observado em humanos. Estudos prévios de nosso laboratório (LIMA *et al.*, 2005) demonstraram que as mucosas orais de hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU e trauma mecânico, no 4º dia de experimento, apresentaram aspectos gerais semelhantes aos da normalidade. As lesões mostraram-se significantes somente a partir do 5º dia após o início da quimioterapia ou um dia após o trauma mecânico, verificando-se eritema e hiperemia acentuados, presença de hemorragia, de úlceras extensas, mas ausência de abscessos. É importante ressaltar que o

trauma mecânico, preconizado por Sonis e colaboradores, consiste em ranhuras na mucosa oral, realizadas com uma agulha de ponta romba, a fim de mimetizar os efeitos clínicos de uma irritação crônica, comumente observada em humanos, tais como o trauma causado por restaurações ou próteses mal adaptadas (SONIS *et al.*, 1990). A seguir, a lesão atingiu o auge no 10º dia, tendo sido constatado hiperemia e eritema acentuados, hemorragia, úlceras extensas e abscessos. A partir do 12º dia, as alterações inflamatórias tornaram-se significativamente reduzidas, observando-se no 14º dia, hiperemia e eritema moderados, ausência de hemorragia, de úlceras e abscessos, além de áreas de tecido em cicatrização. Finalmente, no 16º dia experimental, os aspectos avaliados encontraram-se praticamente resolvidos, condizentes com as características da normalidade (LIMA *et al.*, 2005).

Portanto, o modelo proposto por Sonis e colaboradores (SONIS *et al.*, 1990) e modificado em nosso laboratório para o estudo da mucosite oral experimental, mostrou-se capaz de reproduzir experimentalmente os principais achados na mucosite oral em humanos (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007), permitindo uma investigação mais profunda do desenvolvimento dessa alteração inflamatória. No entanto, é importante levar em consideração o fato da mucosite oral humana ser, sobretudo, uma lesão multifatorial, contribuindo para o seu surgimento e a sua evolução, não apenas os efeitos estomatotóxicos diretos da quimioterapia antineoplásica, mas também, fatores locais como bactérias e suas toxinas, patógenos virais ou fúngicos, além de vários aspectos facilitadores da solução de continuidade da mucosa oral, como por exemplo, a irritação decorrente de restaurações ou próteses mal-adaptadas (McCARTHY *et al.*, 1998; WILKES 1998).

O tratamento padrão para mucosite oral induzida por quimioterapia é essencialmente paliativo, com suportes analgésico e nutricional. O conhecimento adequado da fisiopatologia dessa alteração inflamatória é fundamental para a busca de meios preventivos e terapêuticos que permitam melhoria significativa da qualidade de vida dos pacientes acometidos, evitando a redução das doses dos quimioterápicos, ou até mesmo a interrupção temporária ou definitiva do tratamento.

Atualmente tem-se utilizado algumas estratégias objetivando reduzir a exposição dos tecidos orais aos agentes quimioterápicos. O uso de gelo

(crioterapia), levando ao resfriamento da mucosa e, conseqüente vasoconstricção, tem sido de grande valia para tratamentos com drogas de meia-vida curta. Estudos demonstram que o uso de gelo, cinco minutos antes da aplicação de 5-FU em bolus, e mantido na boca por 30 minutos, reduziu a mucosite oral em torno de 50% (MAHOOD *et al.*, 1991; ROCKE *et al.*, 1993; CASCINU *et al.*, 1994). O efeito benéfico da crioterapia tem sido descrito também em pacientes tratados com metotrexato e melfalan (DUMONTET *et al.*, 1994; MELONI *et al.*, 1996).

Agentes que reduzem momentaneamente a excreção salivar, como os antagonistas muscarínicos propantelina e pilocarpina, têm sido utilizados, em algumas situações, na tentativa de reduzir a exposição tópica da mucosa oral às drogas quimioterápicas excretadas na saliva. Os resultados, no entanto, são conflitantes. Estudos demonstraram que a propantelina foi capaz de reduzir a mucosite oral associada ao uso de etoposida (AHMED *et al.*, 1993), e à combinação de etoposida, ifosfamida e carboplatina (OBLON *et al.*, 1997). Da mesma forma, o uso de pilocarpina na prevenção da mucosite oral tem-se mostrado benéfico em alguns estudos (AWIDI *et al.*, 2001; JONHSON *et al.*, 1993), enquanto que, em outros trabalhos, não foi constatado nenhum efeito (WARDE *et al.*, 2002; LOCKHART *et al.*, 2005; SCARANTINO *et al.*, 2006).

Produtos naturais como a camomila (*Matricaria reculita*), devido à seus componentes antiinflamatórios, também têm sido testados na prevenção da mucosite oral, apresentando, no entanto, poucos resultados positivos (SCULLY *et al.*, 2006). Estudos recentes de nosso laboratório obtiveram resultados benéficos com aplicações tópicas, em forma de gel, de babosa (*Aloe barbadensis*) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) na prevenção da mucosite oral experimental induzida por 5-FU (SANTANA *et al.*, 2006).

O fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), tanto na forma de bochechos bucais (IBRAHIM; MULHIM, 1997), como por via subcutânea, tem apresentado resultados benéficos em vários estudos clínicos, reduzindo a severidade e duração da mucosite oral relacionada ao uso de vários agentes quimioterápicos (GABRILOVE *et al.*, 1988; CRAWFORD; O'ROURKE, 1994; CHI *et al.*, 1995; ROSSO *et al.*, 1997; KARTHAUS *et al.*, 1998), constituindo um importante

agente terapêutico, juntamente com o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ 3) (SPIJKERVET; SONIS, 1998).

Outras abordagens preventivas e terapêuticas têm sido investigadas com sucesso, como por exemplo, o uso do antiinflamatório benzidamina e do fator de crescimento queratinócito (KGF) (SCULLY *et al.*, 2006), enquanto várias outras não apresentaram resultados conclusivos, como o uso tópico de prostaglandina E2, de vitamina E (devido seus efeitos antioxidantes), de pentoxifilina, da interleucina antiinflamatória-11 (IL-11), assim como bochechos de clorexidina, clindamicina, ou fluconazol (DONNELLY *et al.*, 2003).

Em suma, os vários estudos sobre prevenção e tratamento da mucosite oral como efeito colateral da quimio e radioterapia, demonstram que nenhuma intervenção isolada é capaz de prevenir completamente a mucosite oral. Futuras pesquisas deverão ser delineadas a fim de avaliar a combinação adequada das diversas intervenções disponíveis para esse fim. Somente o esclarecimento da fisiopatologia dessa condição inflamatória, no entanto, permitirá o desenvolvimento de novas terapias eficazes na prevenção e tratamento da mucosite oral, utilizando apenas um único agente terapêutico.

## 1.2 Mucosite intestinal

Assim como a mucosite oral, a mucosite intestinal também é um efeito colateral importante da terapia do câncer, caracterizada por dor abdominal severa, diarreia e perda de peso (DUNCAN; GRANT, 2003). Além do comprometimento da qualidade de vida (BELLM *et al.*, 2000), os pacientes acometidos ficam mais susceptíveis à infecções por microorganismos provenientes do lúmen intestinal (RUESCHER *et al.*, 1998; ELTING *et al.*, 2003). Apesar de sua alta incidência, seu mecanismo exato não está completamente esclarecido, nem tampouco, há um protocolo definitivo para sua prevenção e tratamento, o que pode reduzir a eficácia da terapia contra o câncer (BELLM *et al.*, 2000; ELTING *et al.*, 2003). De fato, tem sido relatado que, dentre os pacientes com grau severo de mucosite intestinal, em 35% dos casos, o ciclo subsequente de quimioterapia tem que ser adiado. As doses de quimioterápicos são reduzidas em, aproximadamente, 60% desses casos,

enquanto o tratamento precisa ser interrompido em cerca de 30% dos pacientes com grau severo de mucosite intestinal (SONIS *et al.*, 2004).

Estudos realizados em nosso laboratório, em ratos, demonstrou que a administração de MTX por três dias consecutivos, resultou em danos significantes à mucosa intestinal, observados no 5º dia de experimento, nos três segmentos do intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo. A maior parte dos vilos encontravam-se atrofiados e recobertos por células achatadas e vacuoladas, com algumas áreas desnudas, isto é, desprovida de seu revestimento epitelial. Além das alterações morfológicas, foi observado ainda o comprometimento da função intestinal, caracterizado pelo aumento na secreção de sódio e potássio e pela redução significativa da área de superfície absorptiva, detectada pela diminuição da taxa de excreção de manitol, açúcar normalmente absorvido de forma transcelular, através dos poros aquosos presentes na membrana celular (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004a).

Esses resultados corroboram com outros estudos descritos na literatura, nos quais, o tratamento com metotrexato (MTX) resultou em danos às células de rápida divisão, como as células epiteliais das criptas intestinais, comprometendo a proliferação e renovação celulares, devido à inibição de mitoses (VERBURG *et al.*, 2000). Os resultados são atrofia de vilos, alterações absorptivas (DONALDSON; LENON, 1979; KEEFE *et al.*, 1997), aumento da permeabilidade intestinal (SUNDSTROM *et al.*, 1998), ulcerações e diminuição da função de barreira (ANILKUMAR *et al.*, 1992; KEEFE *et al.*, 1997; NAKAMURU *et al.*, 1998). Como consequência, as células imunes da mucosa são expostas a vários estímulos microbianos, como lipopolissacarídeos da parede de bactérias (LPS).

Apesar do efeito imunossupressor do MTX, o sistema imune da mucosa ainda é capaz de responder ao estímulo bacteriano (KONING *et al.*, 2006), com consequente ativação de fatores de transcrição e regulação positiva de vários genes, resultando na ativação de processos pró- e anti-inflamatórios. Tem sido relatado, de fato, tanto a participação da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , quanto o papel anti-inflamatório da IL-10 na fisiopatologia da mucosite intestinal por MTX (KONING *et al.*, 2006). Estudos realizados em nosso laboratório confirmaram a

participação TNF- $\alpha$  na fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por MTX, em ratos (LIMA *et al.*, 2004).

Os efeitos das citocinas no desenvolvimento da mucosite intestinal, pelo menos em parte, podem ser mediados pela liberação de óxido nítrico, visto que, dados da literatura demonstram que a liberação de citocinas em doenças inflamatórias está associada a um aumento na liberação de NO (RALSTON *et al.*, 1995; VAN'T HOF *et al.*, 2000). Ademais, alguns trabalhos demonstram maior produção de NO, por macrófagos de ratos, induzida por estímulos bacterianos, como o LPS (BLIX; HELGELAND, 1998; FROLOV *et al.*, 1998; SHAPIRA *et al.*, 1998). O LPS, de fato, contribui para o desenvolvimento da mucosite intestinal, visto ter sido demonstrado que o pré-tratamento com LPS intensificou o dano intestinal induzido pelo MTX (KONING *et al.*, 2006). Portanto, uma possível explicação para esse fato, seria que o LPS de bactérias do lúmen intestinal estaria induzindo diretamente a expressão de NOSi (SORRELLS *et al.*, 1996), ou desencadeando uma resposta imune, com liberação de citocinas que, subseqüentemente, induziriam a expressão de NOSi. A consequência local da alta produção de NO não apenas está envolvida com os mecanismos de defesa contra microorganismos invasores, mas também contribui para a injúria celular e tecidual (POTOKA *et al.*, 2002). A participação da NOSi foi demonstrada em outras condições *inflamatórias intestinais* (MIDDLETON *et al.*, 1993; BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; SINGER *et al.*, 1996). Portanto, apesar de não ter na literatura um estudo definitivo do papel do NO na mucosite intestinal induzida por MTX, todas essas evidências sugerem a sua participação na resposta inflamatória da mucosite intestinal. O modo de ação desse radical livre, entretanto, ainda requer investigações.

O dano induzido pelos agentes quimioterápicos na mucosa intestinal é semelhante ao observado na mucosa estratificada do epitélio oral, no entanto, os eventos inflamatórios envolvidos, assim como a recuperação da mucosa intestinal, ocorrem mais rapidamente (SONIS *et al.*, 2004). Observou-se apoptose no intestino delgado de humanos logo no primeiro dia após a quimioterapia, seguido por redução do comprimento das criptas, da área dos vilos e do índice mitótico, os quais atingiram o pico no 3º dia. Segue-se a hiperplasia secundária de criptas no 5º dia, na tentativa de repor as células perdidas nos vilos (KEEFE *et al.*, 2000). Em ratos, o

desenvolvimento da mucosite intestinal ocorre de forma semelhante, no entanto, apresenta o curso temporal ainda mais curto (DANIELLE *et al.*, 2001; GIBSON *et al.*, 2002)

Independente dos eventos iniciais no desencadeamento das mucosites oral e intestinal, a injúria à barreira mucosa, tanto no intestino quanto na cavidade oral, apresentam mecanismos semelhantes. Apesar da maior elucidação dos eventos moleculares relativos à mucosite oral em relação à intestinal, é provável que mediadores semelhantes estejam envolvidos nas duas condições. Porém, deve-se considerar que diferenças de origem embrionárias dos epitélios oral (ectoderma) e intestinal (endoderma), assim como diferenças relativas ao sistema imune da mucosa intestinal, com presença de placas de Peyer no íleo, possam acarretar respostas sítio-específicas, enfatizando o estudo detalhado da patogênese da mucosite oral e intestinal isoladamente.

### **1.3 Antimetabólitos**

Os antimetabólitos apresentam forte semelhança estrutural com o ácido fólico e as bases purina e pirimidina envolvidas na síntese de DNA, RNA e determinadas enzimas. Atuam como substratos falsos em reações bioquímicas, inibindo etapas de síntese ou incorporando-se a moléculas e interferindo na função ou replicação celular (KAUFMA; CHABNER, 2001).

Os agentes antimetabólicos exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese de DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (KAUFMA; CHABNER, 2001). Dentre esses diferentes fármacos, destacam-se o 5-fluorouracil (5-FU), análogo da pirimidina, e o metotrexato (MTX), antagonista do ácido fólico, largamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer e selecionados para o presente estudo, sobretudo por seus efeitos colaterais nas células do trato-gastrointestinal, resultando em mucosites, particularmente nas mucosas oral e intestinal.

A mucosite no trato gastrointestinal, de fato, é um efeito colateral que acomete aproximadamente 40% dos pacientes tratados com vários agentes

quimioterápicos, dentre os quais, o 5-FU e o MTX (BALLIS *et al.*, 1985; ROTH *et al.*, 1991; CABALLERO *et al.*, 1985).

### 1.3.1 5-Fluorouracil

A síntese das pirimidinas fluoradas deveu-se à observação de que células de hepatoma de rato utilizavam uracil radiomarcado mais avidamente do que as células normais. Esse estudo sugeriu o envolvimento de diferentes caminhos enzimáticos para o uso do uracil e, possivelmente, de seus análogos, entre as células malignas e normais, o que poderia ser útil na diminuição dos efeitos adversos de agentes quimioterápicos que interferissem com a utilização da uracila (RUTMAN *et al.*, 1954). De fato, embora não se tenha ainda descoberto qualquer propriedade bioquímica peculiar compartilhada com todas as células cancerosas, as células neoplásicas possuem diferenças metabólicas em comparação com as células normais, tornando-as mais susceptíveis aos diversos antimetabólitos.

O 5-fluorouracil foi introduzido em 1958 e está incluído entre os fármacos de maior utilidade para o tratamento de tumores sólidos e leucemias, devido à seus múltiplos efeitos sobre o crescimento celular anormal (GREM, 2001). O 5-FU é uma pirimidina fluorada, preparado a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por outro mais estável de flúor na posição 5 da molécula de uracil (Figura 1).

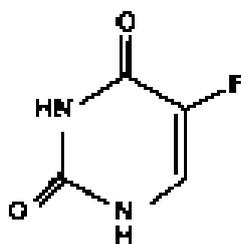


Figura 1 - Estrutura química da molécula de 5-fluorouracil

Fonte:

Pelo menos dois mecanismos primários de ação estão associados à injúria celular por 5-FU. O primeiro e o principal, está relacionado a sua conversão intracelular no nucleotídeo “fraudulento”, monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina

(FDUMP), no fígado. O FDUMP interage com a timidilato sintetase e co-fatores fólicos, mas não pode ser convertido em timidilato porque, no FDUMP, o flúor substitui o hidrogênio em C5, em que ocorreria a metilação, e esta ligação carbono-flúor não é tão susceptível à clivagem enzimática quanto a ligação carbono-hidrogênio. A consequência é a inibição da síntese de DNA, e, conseqüentemente, do crescimento celular (McCARTHY *et al.* 1998). O segundo mecanismo resulta da incorporação de um outro intermediário do metabolismo do 5-FU, o trifosfato de 5-fluorouridina (FUTP), ao RNA, interferindo na sua função (WILKINSON *et al.*, 1975; PINEDO; PETERS 1988).

O 5-FU, como outros antimetabólitos, exerce suas ações sobre as células que se encontram na fase S do ciclo celular, o que contribui para reduzir seus efeitos colaterais, uma vez que a população de células que não se encontram nessa fase são poupadas de suas ações (GREM, 2001). Seus efeitos adversos variam consideravelmente de acordo com o protocolo de tratamento, dose utilizada, e via de administração, e são mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação da medula óssea (resultando em granulocitopenia e trombocitopenia), e do trato gastrointestinal, com conseqüente manifestação de mucosite, faringite, esofagite, gastrite, colite, dentre outros (KOENI; PATEL, 1970; PIRZADA *et al.*, 2000). Vários estudos demonstram incidência de mucosite como efeito colateral do 5-FU em aproximadamente 8 a 89% dos casos de câncer coloretal (MINSKY *et al.*, 1993; LEVI *et al.*, 1994; ROSSO *et al.*, 1994), 15 a 40% dos indivíduos com câncer gástricos (LACAVE *et al.*, 1991; OHTSU *et al.*, 1991; PYRHONEN, *et al.*, 1995), 4 a 74% dos casos de cabeça e pescoço (OSAKI *et al.*, 1992; SHIRINIAN *et al.*, 1994) e 4 a 82% em pacientes portadores de câncer de mama (MOHAPATRO *et al.*, 1992; LAMAR *et al.*, 1994).

Alopecia, dermatite, cardiotoxicidade e, mais raramente, neurotoxicidade, são outros efeitos tóxicos relatados do 5-FU (PIRZADA *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Metotrexato

Em 1948, foi demonstrado por Farber e colaboradores que o análogo do ácido fólico, aminopterina, foi capaz de inibir a proliferação de células leucêmicas e

produzir remissões em casos de leucemias agudas (MESSMANN; ALLEGRA, 2001). Esse trabalho gerou grande interesse nos agentes antifolatos, também conhecidos como antagonistas do ácido fólico. Desde então, o uso desses compostos tem-se mostrado eficaz nos tratamentos de leucemias, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama e bexiga, linfomas e corioncarcinoma (MESSMANN; ALLEGRA, 2001).

Essas drogas constituem, de fato, uma estratégia importante no tratamento do câncer, uma vez que os folatos são essenciais para a síntese dos nucleotídeos purínicos e do timidilato, que, por sua vez, são essenciais à síntese de DNA e à divisão celular. Além das indicações para tratamento das neoplasias malignas, os antifolatos também têm sido utilizados como abordagem terapêutica de doenças não malignas como psoríase, artrite reumatóide, doença enxerto-contra-hospedeiro, infecções bacterianas e parasitárias associadas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (MESSMANN; ALLEGRA, 2001).

O metotrexato é o principal antagonista do ácido fólico e um dos antimetabólitos mais largamente utilizados na quimioterapia do câncer (MESSMANN; ALLEGRA, 2001). Sua estrutura química encontra-se representada na figura 2.

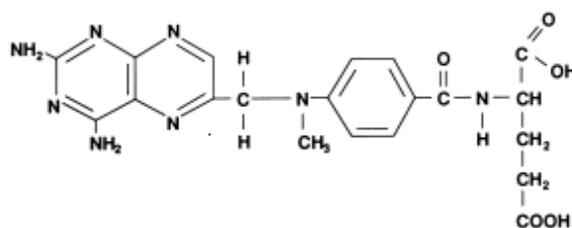


Figura 2 - Estrutura química da molécula de metotrexato

Fonte:

Para o melhor entendimento do mecanismo de ação do metotrexato, é necessário esclarecer que, normalmente, os folatos no sangue apresentam um único resíduo glutâmico, mas muitos folatos intracelulares são convertidos à poliglutamatos e são, preferencialmente, conservados no interior das células. O metotrexato, de forma semelhante, é captado pelas células por transportadores de

ácido fólico e, como este, convertido à forma glutâmica. Os folatos têm que ser reduzidos à tetrahidrofolato ( $\text{FH}_4$ ) para agir como coenzimas. Essa reação é catalizada pela enzima diidrofolato-redutase e ocorre em duas etapas: primeiro o folato é reduzido à diidrofolato ( $\text{FH}_2$ ) e, depois, a  $\text{FH}_4$ . O  $\text{FH}_4$ , por sua vez, funciona como co-fator na transferência de unidades de um carbono, um processo essencial tanto para formar timidilato e, portanto, para a síntese de DNA, como também para a nova síntese de purinas. Durante a formação de timidilato, o  $\text{FH}_4$  é novamente convertido em  $\text{FH}_2$  (Figura 3).

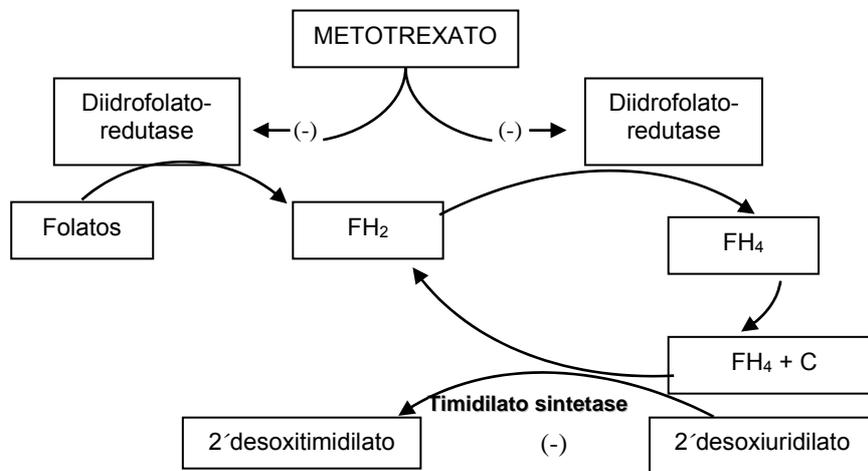


Figura 3 - Diagrama simplificado da ação do metotrexato na síntese da timidilato.

**Legenda:** A poliglutamato tetraidrofolato ( $\text{FH}_4$ ) age como carreador de um unidade de carbono ( $\text{FH}_4 + \text{C}$ ), fornecendo um grupo metil necessário para a conversão da 2'-desoxiuridilato para 2'-desoxitimidilato pela timidilato sintetase. Esta transferência de carbono leva à oxidação do  $\text{FH}_4$  a  $\text{FH}_2$ .

Fonte: Rang *et al.* (1997).

Portanto, a enzima diidrofolato-redutase tem um papel crucial na manutenção do nível de  $\text{FH}_4$  intracelular: pela redução do  $\text{FH}_2$  produzido a partir da redução do ácido fólico e aquele gerado durante a síntese de timidilato. O metotrexato inibe a diidrofolato-redutase (apresentando maior afinidade pela enzima que o  $\text{FH}_2$ ) e depleta o  $\text{FH}_4$  intracelular. A reação mais sensível à depleção de  $\text{FH}_4$  é a síntese de timidilato, que resulta no bloqueio da síntese do DNA e RNA. A síntese das proteínas também é inibida, visto que os folatos reduzidos atuam como co-fatores na conversão da glicina em serina e da homocisteína em metionina (BLEYER 1978).

Os tecidos ativamente proliferativos, tais como os tumores malignos, células do epitélio dérmico, da mucosa gastrintestinal e da bexiga, são os mais sensíveis aos efeitos desse agente, resultando no aparecimento dos efeitos tóxicos, tais como mielossupressão, manifestada na forma de leucopenia e trombocitopenia, que podem resultar em infecção secundária e hemorragia, além de estomatite, faringite, esofagite e de mucosite gastrintestinal (MESSMANN; ALLEGRA, 2001). A ocorrência desses efeitos adversos depende da dose, do esquema terapêutico e da via de administração da droga. A mucosite, em particular, é um importante efeito colateral e usualmente surge por volta de 3 a 7 dias após a terapia com metotrexato. Esta alteração, quando ocorre, é um sinal precoce de toxicidade, podendo causar severo desconforto ao indivíduo acometido, e resultar no comprometimento do tratamento quimioterápico (MESSMANN; ALLEGRA, 2001).

## **1.4 Abordagem farmacológica**

### **1.4.1 Óxido Nítrico (NO)**

Óxido nítrico é um radical livre, altamente reativo, que apresenta importantes funções nos sistemas cardiovascular, neurológico e imune. É sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), liberando L-citrulina como co-produto (MONCADA *et al.*, 1991). Três isoformas de NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOS<sub>n</sub>), inicialmente encontrada no cérebro (BREDT; SNYDER, 1994; SESSA *et al.*, 1992), uma endotelial (NOS<sub>e</sub>), isolada em endotélio (LAMAS *et al.*, 1992) e uma isoforma induzida (NOS<sub>i</sub>), isolada inicialmente em macrófagos (XIE *et al.*, 1992). Ambas NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>e</sub> são constitutivamente expressas em seus leitos de origem, e por essa razão são referidas como enzimas NOS constitutivas (NOS<sub>c</sub>). A atividade das NOS<sub>c</sub> é dependente da concentração citossólica de cálcio [Ca<sup>2+</sup>], que aumenta em decorrência de vários estímulos fisiológicos, liberando NO em pequenas quantidades (concentrações picomolares).

A NOS<sub>i</sub>, por sua vez, é regulada à nível transcripcional, em resposta à estímulos pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo, ao passo que glicocorticóides, citocinas anti-inflamatórias, como

interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ) suprimem a produção de NO (MONCADA *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1994). A ativação da NOSi, independe da concentração do cálcio intra-celular e resulta na liberação de grandes quantidades de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos (NATHAN; XIE, 1994). O NO produzido em altas concentrações atua como uma molécula citotóxica contra fungos, bactérias, protozoários e células tumorais (MONCADA, 1991; WONG; BILLIAR, 1995). Por outro lado, essa liberação de NO têm outras conseqüências biológicas, incluindo vasodilatação, danos teciduais aos tecidos do hospedeiro, dor, lesão tecidual e apoptose (MONCADA *et al.*, 1991; SZABÓ, 1996).

Efeitos paradoxais do NO têm sido apontados nas diversas pesquisas que envolvem essa molécula, em vários tecidos e em diferentes circunstâncias, participando tanto das funções fisiológicas normais, como da injúria tecidual. No trato gastrointestinal, o NO regula a integridade da barreira mucosa sob condições fisiológicas, através da modulação do fluxo sanguíneo e da inibição da agregação plaquetária e adesão leucocitária (HUTCHESON *et al.*, 1990; ALICAN; KUBES, 1996). De fato, estudos em cobaia demonstraram que a inibição da NOSc resultou em ileíte, sugerindo a importância de concentrações basais de NO na proteção da mucosa gastrointestinal (MILLER *et al.*, 1994).

No metabolismo ósseo, níveis basais de NO parecem ser necessários para a homeostase, uma vez ter sido demonstrado que a produção constitutiva de NO por osteoblastos, desempenha um importante papel na regulação do crescimento dessas células (RALSTON *et al.*, 1995). Esses estudos sugerem ainda que a produção de NO por osteoclastos, via NOSc, exerce uma ação supressiva autócrina em sua atividade reabsortiva (KASTEM *et al.*, 1994), e que a inibição desses níveis basais pode ter um impacto dramático na reabsorção óssea localizada e na integridade de todo o osso (SUNYER *et al.*, 1996).

Níveis basais de NO também desempenham papéis homeostáticos no sistema cardiovascular, via regulação da pressão sanguínea e do tônus vascular, modulação do crescimento de células locais e proteção dos vasos contra injúrias, eventualmente causadas pelas plaquetas e células circulantes (NASEEM, 2005). A

diminuição da liberação constitutiva de NO pode resultar em constrição das artérias coronárias durante exercícios ou em situações de estresse e contribuir para a isquemia de miocárdio em pacientes portadores de doença coronariana, além de facilitar a inflamação vascular, com conseqüente formação da placa aterosclerótica (CANON, 1998). De fato, o passo inicial para a aterosclerose é o recrutamento e deposição local de leucócitos nas paredes arteriais (LI *et al.*, 1993), processos facilitados pelas moléculas de adesão, VCAM-1 (moléculas de adesão celular vascular 1), ICAM-1 (moléculas de adesão intra celular 1), ELAM-1 (moléculas de adesão endotélio-leucócito 1) ou E-selectinas (BEVILACQUA *et al.*, 1987; SPRINGER, 1990, 1994; CYBULSKY; GIMBRONE, 1991). A regulação negativa de moléculas de adesão tais como VCAM-1, E-selectinas e, em menor proporção, ICAM-1, por NO, tem sido descrito na literatura (DE CATERINA *et al.*, 1995; PENG *et al.*, 1998) e, provavelmente deve-se à inibição do NF- $\kappa$ B (DE CATERINA *et al.*, 1995; SPIEKER *et al.*, 1997). Juntos, esses resultados explicam, pelo menos em parte, os efeitos antiinflamatórios de níveis basais de NO, assim como seus efeitos na prevenção da aterosclerose.

Por outro lado, grandes quantidades de NO, produzidas pela NOS<sub>i</sub>, estão associadas à várias patologias inflamatórias, dentre as quais, septicemia (HUTCHESON *et al.*, 1990; PETROS *et al.*, 1991, 1994; FANG, 1997), psoríase (KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994), artrite (MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993; STEFANOVIC-RACIC *et al.*, 1993), esclerose múltipla (PARKINSON *et al.*, 1997), dentre outras. No trato gastrointestinal, a liberação de grandes quantidades de NO, via NOS<sub>i</sub>, resulta em injúria celular e comprometimento da integridade da mucosa intestinal, tanto em modelos experimentais quanto em humanos (POTOKA *et al.*, 2002; BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; MIDDLETON *et al.*, 1993; SINGER *et al.*, 1996). De acordo com esse dado, o aumento da expressão e atividade da NOS<sub>i</sub> no trato gastrointestinal foi previamente constatado em modelo de colite em rato (SEO *et al.*, 1995) e em modelo de ileíte em cobaia (MILLER *et al.*, 1993), assim como no intestino de ratos expostos à endotoxinas (TEPPERMAN *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1996; HOFFMAN *et al.*, 1997). No metabolismo ósseo, foi demonstrado que altas concentrações de NO, liberadas pela NOS<sub>i</sub>, via ativação de citocinas, estão associadas à redução da formação óssea, observada em algumas patologias, como na osteopenia inflamatória (PFEILSHIFTER *et al.*, 1987), além de atuar como

estimulador da reabsorção óssea, uma vez que inibidores da NOS suprimiram a atividade de osteoclastos isolados e inibiram a reabsorção óssea estimulada por IL-1 e TNF (RALSTON *et al.*, 1995).

Corroborando com os vários trabalhos citados, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram efeitos pró-inflamatórios do NO na doença periodontal (LEITÃO *et al.*, 2004, 2005), artrite reumatóide (ROCHA *et al.*, 2002) e cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997). A ferramenta farmacológica bastante utilizada nessas pesquisas e em vários outros trabalhos descritos na literatura, consta do bloqueio da síntese de NO, por meio de análogos estruturais da L-arginina, que atuam como falsos substratos enzimáticos e ocupam sítios de ligação entre a L-arginina e a NOS (KNOWLES; MONCADA, 1994). Existem disponíveis para esse fim, vários inibidores enzimáticos, com seletividades diferentes para as diversas isoformas da NOS, dentre os quais, foram utilizados no presente trabalho, o inibidor não-seletivo, N $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME), a aminoguanidina, mais seletiva para a NOS<sub>i</sub> (GRIFFITHS *et al.*, 1993; MUSCARA; WALLACE, 1999) e o N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamida (1400W), um dos inibidores disponíveis mais seletivos para NOS<sub>i</sub>, cuja potência e seletividade foi demonstrada tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (GARVEY *et al.*, 1997).

A administração exógena de NO também tem sido utilizada na investigação de seus efeitos em determinados sistemas, revelando, algumas vezes, resultados inesperados. Em estudo realizado em nosso laboratório, a inibição da síntese de NO, pela administração sistêmica de L-NAME ou AG, foi capaz de prevenir a perda óssea, característica da doença periodontal. De forma contraditória, nesse mesmo estudo, a administração exógena de NO, através da aplicação local de seu doador, isossorbida, também reduziu significativamente a reabsorção óssea (LEITÃO *et al.*, 2004). Esses resultados são contraditórios, visto que tanto a inibição da liberação de NO durante o processo inflamatório, quanto sua administração exógena, preveniram a perda óssea. Estudos da literatura, de fato, revelam diferentes ações do óxido nítrico no metabolismo ósseo, associadas à diferentes concentrações: níveis basais endógenos, produzidos pela NOS<sub>c</sub>, são necessários para a homeostase, níveis endógenos elevados, produzidos pela NOS<sub>i</sub>, ativada no processo inflamatório, parecem estar envolvidos na reabsorção óssea, provavelmente através do

recrutamento e ativação de osteoclastos, enquanto que a administração exógena de NO, previne a perda óssea, possivelmente pela indução de apoptose em osteoclastos (WEI *et al.*, 1995; RALSTON *et al.*, 1995).

Muitos dos processos fisiológicos mediados por NO, como relaxamento do músculo liso, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e adesão leucocitária, são mediados pelo sistema da guanilato sintase, com aumento da produção de guanilato monofosfato cíclico (GMPc) (FRIEBE; KOESLING, 2003). Existem evidências, porém, de que outros mecanismos não-dependentes de GMPc possam estar envolvidos em algumas situações ( MacINTYRE *et al.*, 1991; RALSTON *et al.*, 1995). Os efeitos deletérios de NO, por outro lado, estão associados à formação de seus metabólitos ativos, como nitrito, nitrato, nitrosaminas e, principalmente peroxinitrito, ânion citotóxico formado pela combinação do NO com o superóxido, ambos largamente produzidos durante processos inflamatórios. Esse composto, altamente tóxico, é responsável pela peroxidação lipídica (RUBBO *et al.*, 1994), oxidação dos grupamentos sulfidril de proteínas (RADI *et al.*, 1991a,1991b), nitração de vários tipos de proteínas contendo resíduos de tirosina e nitrosilação de ácidos nucleicos e proteínas, resultando em alterações genéticas, perda da função protéica, inativação de várias enzimas, incluindo enzimas mitocondriais, com conseqüente inibição da respiração mitocondrial e apoptose (BECKMAN, 1996, BECKMAN; KOPPENOL, 1996; ISCHIROPOULOS *et al.*, 1992; KONG *et al.*, 1996; SZABO *et al.*, 1996; MURPHY, 1999; LALA; CHAKRABORTY, 2001; WINK *et al.*, 1998).

#### 1.4.2. Glutamina e alanil-glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e tecidos de seres humanos (MURPHY; WSHOLME, 1999). Seu peso molecular é de 146,15 kDa. É importante ressaltar que a glutamina é instável em solução, particularmente em ácido, ou quando estocada por períodos prolongados, podendo resultar na geração de produtos tóxicos, como o glutamato, o que tem limitado o seu uso (KHAN; ELIA, 1991). Esse problema, no entanto, tem sido superado pela adição de dipeptídeos à molécula de glutamina, formando compostos estáveis e altamente solúveis, como a alanil-glutamina. O uso da alanil-glutamina tem-se mostrado bem

tolerado, seguro (FURST *et al.*, 1989) e eficaz, tanto em estudos clínicos (TREMEL *et al.*, 1994; MORLION *et al.*, 1998), quanto experimentais (CARNEIRO *et al.*, 2003, 2004a; BRITO *et al.*, 2005).

A glutamina do organismo advém da produção endógena, somada à aquisição pela dieta, apresentando uma boa absorção pelos enterócitos (WINDMUELLER; SPAETH, 1974). A sua síntese envolve a adição de um grupamento amino à molécula de glutamato, catalizada endogenamente pela glutamina sintetase.

Em condições normais, a produção endógena sozinha responde pelas necessidades de glutamina, por isso, tradicionalmente, a glutamina era considerada um aminoácido não-essencial. No entanto, seus estoques podem ser depletados na vigência de estados catabólicos, como trauma cirúrgico, infecção, jejum prolongado, exercício extenuante, queimaduras extensas e infecção. Nesses casos, a concentração de glutamina plasmática declina, podendo ficar abaixo da metade dos valores normais, o que reflete sua maior utilização por leucócitos, enterócitos, fibroblastos e outras células, cuja atividade é estimulada nessas situações (DECOMBAZ *et al.*, 1979; ASKANAZI *et al.*, 1980; VENDE *et al.*, 1989; LACEY; WILMORE, 1990; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990, 1992; PETERSEN *et al.*, 1996; FURUKAWA *et al.*, 2000). Nesses casos, faz-se necessário um suplemento de glutamina através da dieta, para a manutenção de seus níveis plasmáticos fisiológicos. Por isso, a glutamina tem sido caracterizada como um aminoácido condicionalmente essencial (LACEY; WILMORE, 1990; SMITH; WILMORE, 1990).

A molécula de glutamina compreende cinco carbonos e tem muitas funções metabólicas importantes. Devido à sua larga distribuição em todo o corpo e por ser constituída por dois grupos amina ( $\text{NH}_4^+$ ), a glutamina participa da transferência de nitrogênio e carbono entre tecidos. Esse efeito é particularmente importante no sistema nervoso central, onde a metabolização de aminoácidos resulta na produção de grupamentos de amônia, os quais são tóxicos em grandes quantidades. A amônia pode ser incorporada à moléculas de glutamina e, posteriormente, liberada no fígado para a síntese mitocondrial de uréia, produto final do metabolismo dos aminoácidos, e excretada pelos rins. O papel principal da glutamina no sistema nervoso central, no entanto, é a sua participação, como precursora da síntese dos

neurotransmissores glutamato e ácido gamaaminobutírico (GABA) (CURTIS; JOHNSTON, 1974). A glutamina também participa na manutenção do equilíbrio ácido-básico através do transporte de íons amônio para os rins, possibilitando sua posterior eliminação na urina (SMITH, 1990).

A glutamina é também muito importante para os processos mitóticos por exercer um papel essencial na síntese de precursores de macromoléculas celulares e na geração de energia, sendo substrato para a gliconeogênese. Por isso, é utilizada rapidamente, como combustível oxidativo por células de intensa atividade mitótica, incluindo linfócitos, fibroblastos, enterócitos e células tumorais (WINDMUELLER; SPAETH, 1985). Os grupamentos  $\text{NH}_2$  da glutamina ainda podem ser utilizados para a produção de novos aminoácidos ou incorporados à purinas e pirimidinas, na síntese de ácidos nucléicos. Ademais, tem sido demonstrado que a glutamina, através da conversão à glutamato, é um importante precursor na síntese de glutathione, o principal antioxidante intracelular (HONG et al., 1992; DENNO *et al.* 1996; YU *et al.*, 1996, 1999), essencial para o funcionamento celular normal (DENNO *et al.*, 1996).

Pelas propriedades da glutamina, é razoável supor que a disponibilidade reduzida desse aminoácido pode levar ao comprometimento da função imune por alterações na capacidade de proliferação das células envolvidas. De fato, foi demonstrado que a proliferação linfocitária induzida pelo bacilo Calmette-Guerin (BCG) e vírus do sarampo *in vitro* é dependente da presença de glutamina no meio (CHANG *et al.*, 1999). Curi e colaboradores evidenciaram que glutamina age em neutrófilos normais *in vitro*, aumentando sua atividade bactericida (CURI *et al.*, 2000). Adicionalmente, tem sido apontado a importância do metabolismo da glutamina na função de macrófagos, durante reações inflamatórias e imunológicas, provavelmente via liberação de citocinas. (COSTA ROSA *et al.*, 1994). Esses dados sugerem que níveis apropriados de glutamina influenciam as respostas imunológicas a diferentes antígenos e que pacientes depletados de glutamina apresentam-se mais susceptíveis à infecções. Ensaio controlados randomizados evidenciaram que, nesse grupo de pacientes, a reposição de glutamina associava-se à uma redução da incidência de pneumonia, bacteremia e sepse (HOUDIJK *et al.*, 1998), do tempo e custo de internação hospitalar (JONES *et al.*, 1999; MORLION *et al.*, 1998) e de

parâmetros inflamatórios, como a concentração de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (HOUDJIK *et al.*, 1998), ou de proteína C-reativa no plasma (WISCHMEYER *et al.*, 2001). Um estudo recente demonstrou efeitos positivos da glutamina, diminuindo as taxas de mortalidade em pacientes em estados graves, provavelmente devido a seus efeitos benéficos na proteção e função metabólica tecidual, além da atenuação da inflamação e do estresse oxidativo (WISCHMEYER, 2006).

Reforçando o papel da glutamina na inflamação, nosso grupo, demonstrou recentemente que a deficiência de glutamina *in vivo* resulta no aumento da produção de citocinas e na migração neutrofílica, e que esses efeitos são revertidos pela administração de glutamina em doses capazes de restabelecer sua concentração sérica fisiológica (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Os efeitos proliferativos da glutamina levaram ao delineamento de muitas pesquisas, a fim de investigar o seu possível papel na prevenção de efeitos tóxicos da quimio ou radioterapia em tecidos normais com alta taxa de renovação celular, como o epitélio da cavidade oral e do intestino, resultando em mucosites oral e intestinal, respectivamente. Os resultados, no entanto, são conflitantes. Estudos avaliando o papel da glutamina na prevenção da mucosite oral em indivíduos submetidos a transplante de medula óssea, demonstraram redução da severidade e duração dessa condição inflamatória apenas nos pacientes submetidos à transplantes autólogo, mas não nos casos de transplante alogênico, onde foi utilizado um agente imunossupressor a fim evitar doenças do tipo enxerto-contrahospedeiro (ANDERSON *et al.*, 1998). A administração endovenosa de alanil-glutamina, assim como a administração oral de glutamina mostraram-se eficazes na redução de mucosite oral em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos à quimio e/ou radioterapia (HUANG *et al.*, 2000; CERCHIETTI *et al.*, 2006). Da mesma forma, glutamina, por via oral, em crianças e adultos submetidos a diferentes tratamentos quimioterápicos, diminuiu significativamente a incidência de mucosite oral (SKUBITZ; ANDERSON, 1996; ANDERSON *et al.*, 1998). Além dos estudos clínicos, vários estudos experimentais, relataram efeitos positivos da glutamina na redução da morbidade e da mortalidade de animais tratados com agentes citotóxicos, como o metotrexato (FOX *et al.*, 1988), e o 5-FU (O'DWYER *et al.*, 1987).

Vários trabalhos, no entanto, não demonstraram efeitos benéficos da glutamina na prevenção da mucosite oral e/ou intestinal, decorrentes da terapia antineoplásica. Não foram observados efeitos protetores desse aminoácido em pacientes oncológicos tratados com 5-FU (JEBB *et al.*, 1994; OKUNO *et al.*, 1999), tampouco da alanil-glutamina em indivíduos submetidos a diversos tratamentos quimioterápicos (VAN ZANEN *et al.*, 1994). Da mesma forma, a suplementação de glutamina, tampouco de alanil-glutamina, não apresentou efeito na mucosite oral em pacientes transplantados (PYTLÍK *et al.*, 2002). De acordo com esses dados, estudos experimentais de nosso grupo demonstraram que glutamina e alanil-glutamina, não preveniram as lesões intestinais causadas pelo 5-FU (CARNEIRO-FILHO, 2004b).

A participação da glutamina na prevenção dos efeitos colaterais da terapia do câncer levantou o questionamento se a administração desse aminoácido a pacientes oncológicos estimularia o crescimento do tumor, visto ter sido demonstrado que a glutamina, como fonte energética fundamental, é utilizada pelos tumores de crescimento rápido (KLIMBERG; MCCLELLAN, 1996; MEDINA, 2001). De fato, pacientes portadores de neoplasias malignas avançadas apresentam depleção da glutamina (JOHNSON *et al.*, 2003). Pesquisas demonstram, no entanto, que dietas enriquecidas com glutamina podem repletar os estoques e manter o metabolismo muscular da glutamina sem estimular o crescimento tumoral (KLIMBERG *et al.*, 1990). Ademais, além de atenuar a perda protéica muscular em pacientes oncológicos, estudos sugerem ainda que a suplementação de glutamina apresenta outros efeitos positivos nesses pacientes. De fato, a progressão tumoral, além do ávido consumo dos estoques de glutamina do indivíduo acometido, está associada à depressão da atividade das células *natural killer* devido à diminuição das concentrações de glutatona nessas células. Portanto, a suplementação dietética de glutamina, pode apresentar efeitos positivos, restaurando os níveis de glutatona das células de defesa, com conseqüente aumento da imunidade (AUSTGEN *et al.*, 1992; MEDINA; NUNEZ DE CASTRO, 1990), assim como protegendo diversas células teciduais do estresse oxidativo induzido pelos quimioterápicos ou pela radioterapia. Adicionalmente, estudos sugerem que a suplementação oral de glutamina pode aumentar a seletividade das drogas anti-tumorais por proteger os tecidos normais (CAO Y, 1999; DECKER-BAUMANN *et al.*, 1999) e, possivelmente,

por sensibilizar as células tumorais para o dano relacionado ao tratamento quimioterápico (ROUSE *et al.*, 1995).

### 1.5 Justificativa e objetivos

A mucosite oral, assim como a mucosite intestinal constituem uma síndrome inflamatória debilitante e dolorosa e que acomete pacientes em uso de agentes quimioterápicos e/ou raditerapia. As lesões das mucosas oral e intestinal são uma porta de entrada para microorganismos, fato que associado a neutropenia causada também pelos quimioterápicos, aumenta o risco de septicemia (ETING *et al.* 1992). Estes fatores limitam o uso dos agentes antineoplásicos, particularmente os agentes citotóxicos e antimetabólitos, tais como 5-fluorouracil e o metotrexato (LOPRINZI *et al.* 1995), levando algumas vezes ao comprometimento do tratamento do câncer.

Atualmente, o tratamento das mucosites oral e intestinal consiste apenas em uma abordagem essencialmente paliativa, não existindo um protocolo de atendimento preventivo e eficaz, provavelmente, devido à deficiência da compreensão precisa dos mecanismos e mediadores envolvidos. Entretanto, sabe-se que determinados mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1, são importantes na sua patogenia (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2006; SCULLY *et al.*, 1990), assim como está bem definido a ocorrência de estresse oxidativo no desenvolvimento dessas condições inflamatórias (SONIS *et al.*, 2004, 2006).

Portanto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o papel do óxido nítrico na mucosite oral, em hamsters, e na mucosite intestinal, em ratos, induzidas por 5-FU e metotrexato, respectivamente, visto não ter sido previamente descrito na literatura, até a publicação dos resultados do presente trabalho, um estudo definitivo do papel do óxido nítrico no desenvolvimento das mucosites oral e intestinal.

Ademais, o presente trabalho objetivou ainda investigar o efeito da glutamina e de seu análogo estável, alanil-glutamina, na mucosite oral induzida por 5-FU, em hamsters, uma vez que estudos *in vivo* e *in vitro* de nosso grupo demonstram efeitos positivos desse aminoácido, assim como de seu derivado estável, alanil-glutamina, no reparo do epitélio intestinal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004b; BRITO *et al.*, 2005), o que vislumbra perspectivas para a prevenção da mucosite oral.

Como objetivos específicos, o presente estudo buscou:

- Avaliar o efeito dos inibidores da NOS, aminoguanidina, L-NAME e 1400W, nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato, respectivamente.
- Avaliar a expressão e a atividade da NOS na mucosite oral e intestinal induzida por 5-fluorouracil e metotrexato.
- Avaliar se na mucosite oral induzida por 5-FU há depleção da glutamina sérica e dos estoques teciduais de glutatona e investigar se a reposição de glutamina é capaz de prevenir ou diminuir a severidade das lesões.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC para uso de animais experimentais (processo nº 38/06), os quais foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

#### **2.1.1 Mucosite oral**

Foram utilizados hamsters *Golden (Mesocricetus auratus)* machos, com massa corpórea entre 140 e 160 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), onde foram alojados em caixas de plástico, em número de quatro animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de sementes e cereais, como aveia, milho, semente de girassol e abóbora (sem sal). A água foi disponibilizada à vontade.

A seleção de hamster foi baseada na facilidade de observação de suas mucosas jugais e por sua habilidade em tolerar doses do quimioterápico capazes de induzir mucosite sem mortalidade significativa (SONIS et al., 1990)

### .2.1.2 Mucosite Intestinal Experimental

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 180 e 240 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Esses animais foram alojados em caixas de plástico, em número de seis animais em cada uma delas, com livre acesso à água e comida.

## 2.2 Drogas, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados

- Fluorouracil: ampola de 10 ml (25 mg/ml) – Fluoro-Uracil<sup>®</sup> (Roche, Rio de Janeiro, Brasil);
- Metotrexato: frasco-ampola de 2ml (25 mg/ml) – Metotrexato<sup>®</sup> (Pharmacia, Rio de Janeiro, Brasil);
- N $\phi$ -Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Aminoguanidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetaminide (1400W) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Alanil-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Anticorpo primário de coelho anti-NOSi (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo secundário (de detecção) biotinilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biothechnology);
- *Kit* ApopTag Peroxidase para detecção de apoptose (Chemicon International, S7100);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Cloral hidratado 10% (Reagen);
- Formaldeído 40% (Reagen);
- Hematoxilina (Reagen);

- Eosina (Merck);

Fluorouracil (5-FU), Metotrexato (MTX), L-NAME, aminoguanidina (AG), 1400W, glutamina e alanil-glutamina foram diluídas em solução salina 0,9%.

## **2.3 Protocolos experimentais**

### **2.3.1 Mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters**

#### **3.1.1.1 Modelo experimental**

Utilizou-se o modelo de mucosite oral experimental, desenvolvido por Sonis e colaboradores (SONIS et al. 1990) e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005).

Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-FU nos dias 1 e 2, por via intraperitoneal (ip), respectivamente. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais, previamente anestesiadas com hidrato de cloral (300 mg/kg), com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potenciador para a mucosite, ou seja, conferindo um trauma mecânico (TM). As ranhuras foram distribuídas em número de três no sentido horizontal e cruzadas por mais três, em ambas as faces das mucosas (Figura 4).

Em função de estudos previamente realizados no LAFICA (LIMA et al., 2005), o 10º dia foi escolhido como sendo ideal para o sacrifício, por ser o dia no qual foi observado maior intensidade do processo inflamatório. Para a avaliação do efeito da glutamina e alanil-glutamina na evolução da mucosite oral, o experimento foi prolongado até o 14º dia para avaliar o efeito dessas substâncias no período de recuperação.

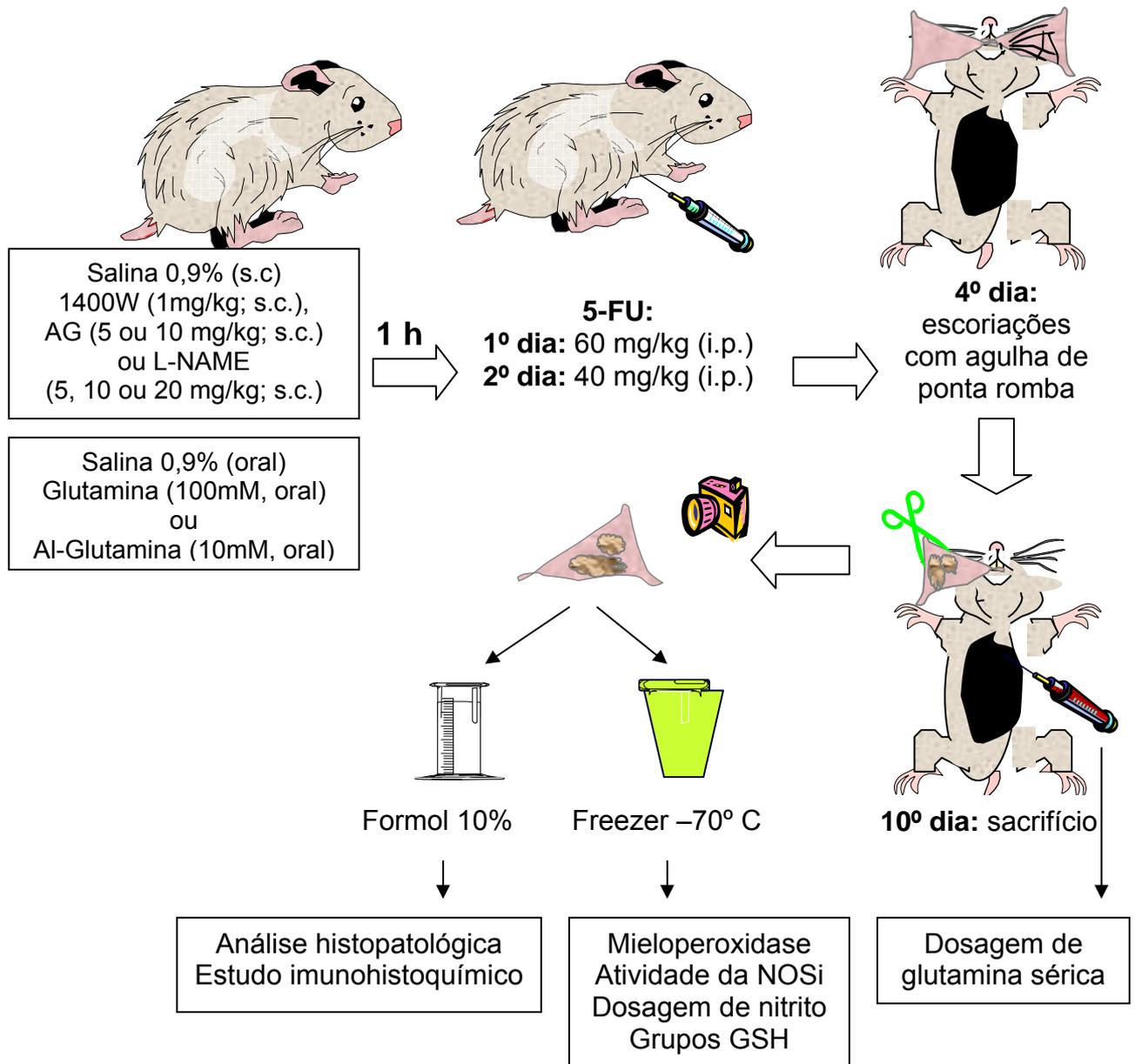


Figura 4: Desenho esquemático do protocolo experimental de mucosite oral

**Legenda:** Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-fluorouracil nos dias 1 e 2. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potenciador para a mucosite, distribuídas em número de três no sentido horizontal e cruzadas por mais três, em ambas as faces das mucosas. No 10º ou 14º dias, as mucosas jugais foram fotografadas, removidas, divididas em partes iguais para serem congeladas ou fixadas em formol e subseqüentes processamentos para coloração pelo método H&E.

### 2.3.1.2 Grupos experimentais

Foram utilizados cento e trinta e dois hamsters durante o decorrer desse estudo, sendo setenta e dois nos experimentos para avaliação do papel do óxido nítrico na mucosite oral e sessenta para avaliação da glutamina e alanil-glutamina na prevenção e cicatrização da mucosite oral experimental.

#### 2.3.1.2.1 Grupos controles

Os grupos controles foram constituídos, cada um deles, por, no mínimo, seis hamsters. Esses grupos consistem de:

- animais que não foram submetidos à mucosite oral experimental (**Normal**).

Esse grupo recebeu injeções de solução salina a 0,9% (0,5 ml), administradas por via subcutânea (sc), nos experimentos para avaliação do papel do óxido nítrico ou, por via oral, nos experimentos para avaliação do efeito da glutamina e alanil-glutamina, 1 hora antes de cada injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina (no lugar de 5-FU) e, diariamente, até o sacrifício, no 10º ou 14º dias.

- animais submetidos à mucosite experimental por 5-FU e escoriações nas mucosas jugais no 4º dia (**Salina**).

Esse grupo recebeu 5-FU (60 e 40 mg/kg; i.p.), nos 1º e 2º dias e foi submetido ao trauma mecânico na mucosa jugal, no 4º dia. Recebeu ainda, administração de solução salina 0,9%, por via subcutânea, nos experimentos para avaliação do papel do óxido nítrico, ou por via oral, nos experimentos para avaliação do efeito da glutamina e alanil-glutamina, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU e do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 10º ou 14º dias.

- animais submetidos apenas as escoriações nas mucosas jugais (trauma mecânico) no 4º dia de experimento (**TM**) .

Esse grupo foi submetido apenas ao trauma mecânico (TM) na mucosa jugal, no 4º dia. Não recebeu administração de 5-FU, mas de solução salina 0,9%, por via subcutânea, nos experimentos para avaliação do papel do óxido nítrico, ou por via oral, nos experimentos para avaliação do efeito da glutamina e alanil-glutamina, diariamente, até o sacrifício, no 10º ou 14º dias.

#### 2.3.1.2.2 Grupo tratado com L-NAME

Os animais, submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil, foram subdivididos em 3 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam L-NAME, nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente, administradas por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e diariamente durante dez dias.

#### 2.3.1.2.3 Grupo tratado com aminoguanidina

Os animais, submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil, foram subdivididos em 2 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam aminoguanidina, nas doses de 5 e 10 mg/kg, administradas por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, diariamente, durante dez dias.

#### 2.3.1.2.4 Grupo tratado com 1400W

O grupo de seis animais, submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil, recebeu 1400W, na dose de 1 mg/kg, administrado por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, diariamente, durante dez dias.

#### 2.3.1.2.5 Grupo tratado com alanil-glutamina

O grupo de seis animais, submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil, recebeu solução oral de alanil-glutamina 100mM, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, diariamente, durante dez ou quatorze dias.

#### 2.3.1.2.6 Grupo tratado com glutamina

O grupo de seis animais, submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil, recebeu solução oral de glutamina 100mM, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, diariamente, durante dez ou quatorze dias.

2.3.1.3 Parâmetros avaliados tanto para o estudo do papel do óxido nítrico, quanto para o estudo do efeito da alanil-glutamina e glutamina na mucosite oral induzida por 5-FU

##### 2.3.1.3.1 Análise macroscópica das mucosas jugais

No 10º ou 14º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas jugais foram fotografadas antes de serem removidas. Para a análise macroscópica foram avaliados a presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados de acordo como os escores citados a seguir:

- *Score 0*: hiperemia e eritema ausentes ou discretos; hemorragia ausente; ausência de úlceras e de abscessos.
- *Score 1*: hiperemia e eritema moderados; hemorragia ausente; ausência de úlceras; ausência de abscessos; presença de tecido cicatricial.
- *Score 2*: hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, presença de úlceras pequenas, de até 1 cm de diâmetro, presença de maior área cicatricial e ausência de abscessos.

- *Score 3*: hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, de úlceras extensas e abscessos.

#### 2.3.1.3.2 Análise histopatológica das mucosas jugais

Os estudos histológicos das mucosas jugais foram realizados em cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, ao microscópio óptico (x 40). No 10º ou 14º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e divididas, onde uma parte foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, e a outra, congelada. Para análise microscópica foram avaliados aspectos inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados em nosso laboratório, citados a seguir:

- *Score 0*: epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Score 1*: ingurgitamento vascular discreto; áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, com maior número de leucócitos mononucleares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Score 2*: ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
- *Score 3*: ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

### 2.3.1.3.3 Dosagem da mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, cuja presença foi determinada pelo método colorimétrico ELISA. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas a partir das mucosas jugais dos hamsters, usando uma versão modificada do método descrito por Bradley e colaboradores (BRADLEY *et al.*, 1982). No 10º ou 14º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas, pesadas e congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. Durante a determinação, as amostras foram incubadas em solução de HTAB 0.5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por mL. Em seguida, foram homogeneizadas e centrifugadas (1500g/15min./4°C), sob condições adequadas de refrigeração. Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs e novamente centrifugados (10 min.) para a melhor remoção de contaminantes. Após plaquetamento de 7µL do sobrenadante, em duplicata, (placas de 96 wells), 200µL da solução de leitura (5 mg de O-dianisidine; 15µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, 3 mL de NaPO<sub>4</sub> buffer; 27 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destilada) foram adicionados aos poços e foi realizada a leitura a 460nm (t<sub>0</sub>=0 min. e t<sub>1</sub>= 1 min.). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO)

### 2.3.1.3.4 Imunohistoquímica pelo método de TUNEL (TdT- mediated dUTP Nick end-labeling)

No 10º ou 14º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e divididas, onde uma parte foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10%, a fim de serem devidamente processadas para inclusão, microtomia (4µm) e montagem em lâminas cobertas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Utilizou-se para a detecção de células TUNEL positivas, como indicativo de apoptose, o *kit* ApopTag<sup>R</sup> S 7100. Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 70%). Em seguida, lavados

com solução tampão fosfato (PBS) e incubados em temperatura ambiente com proteinase K por 15 minutos, a fim de promover a recuperação antigênica. Depois de lavado com água destilada, o material foi tratado com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em PBS durante 15 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Seguiu-se nova lavagem com PBS e incubação com o *Equilibration Buffer* por 10s e, imediatamente depois, com a enzima TDT (desoxinucleotidil transferase) associada aos nucleotídeos marcados com digoxigenina (*reaction buffer*), os quais se ligam às hidroxilas livres do DNA fragmentado das células apoptóticas. O controle negativo não recebeu a enzima. Após incubação em estufa a 37° por 1 h, a reação foi bloqueada pela solução *stop* e as lâminas lavadas em PBS. Seguiu-se a adição do conjugado antidigoxigenina e nova incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se a coloração com o cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB), seguida por contra-coloração com *methyl green*. Por fim, foi feita nova lavagem com água destilada, imersão em N-butanol 100% e xilol e, em seguida, montagem das lâminas.

2. 3.1.4 Parâmetros avaliados no estudo do papel do óxido nítrico na mucosite oral experimental.

2.3.1.4.1 Determinação da atividade da nítrico óxido sintase (NOS)

As medidas de atividade da NOS, foram realizadas a partir das mucosas jugais dos hamsters, utilizando método previamente descrito (GOMES *et al.*, 2004). No 10° dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e mantidas em *freezer* a -70° C até serem enviadas para Ribeirão Preto para a realização do ensaio, devidamente refrigeradas em gelo seco. As amostras homogeneizadas (Politron- PT 3100) em 0,2 mL de tampão de extração pH=7 (320mM sucrose; 50 mM Tris; 1 mM EDTA; 1mM DTT; 10µg/mL leupeptina; 10µg/mL soybean tripsin inhibitor; 2µg/mL aprotinina; 2mM PMSF) e centrifugados (10.000 rpm/20min/4°C). A seguir, 40 µL de cada sobrenadante foram incubados com 100 µL do tampão de ensaio pH 7,4 (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,25mM CaCl<sub>2</sub>; 0,12mM β-NADPH; 60 mM L-valina; 1 mM L-citrulina; 50µM BH<sub>4</sub>; 4µM FAD; 1mM DTT) por 1 hora. As amostras foram preparadas em triplicata. **Tubo 1:** sem inibidores de NOS; **Tubo 2:** L-NAME (inibidor não específico de NOS) e

aminoguanidina (inibidor específico de NOSi); **Tubo 3:** EGTA (quelante de cálcio para as isoformas constitutivas). L-arginina-<sup>14</sup>C (270 $\mu$ Ci/mmol) foi adicionada à razão de 100  $\mu$ L para cada 1,0 mL de tampão de ensaio. Como controles do ensaio, quatro grupos foram preparados: 1) tubo para avaliar o background (este tubo não continha amostra); 2) tubo para quantificar o total de com – contas por minuto (neste tubo não foi adicionado o Dowex e tampouco as amostras); 3) tubo com  $2 \times 10^6$  macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  controle NOS induzida) e 4) tubo com homogenato de cerebelo (controle NOS neuronal). Em seguida, 1 mL de resina Dowex AG-50X8 sódica (1:1 em água, pH 6,0) foi adicionado aos tubos de ensaio, homogeneizados e centrifugados (10.000 rpm/10min/4°C). Foram colocados 400  $\mu$ L do sobrenadante destes tubos em 3 mL de líquido de cintilação e após agitação, a radioatividade foi quantificada por contador beta por 1 minuto para cada tubo. Também foi realizada a quantificação das proteínas totais de cada amostra pelo método de Comassie Blue (Comassie Blue Reagent; Pierce Chemical, Rockford, IL). Os resultados foram expressos como pmol de citrulina/hora/mg de proteína. A atividade da sintase de NO (NOS total) foi determinada pela diferença entre o valor obtido da cpm dos tubos com os inibidores aminoguanidina + L-NAME da cpm dos tubos sem inibidores.

#### 2.3.1.4.2 Dosagem de nitrito

No 10<sup>o</sup> dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ ) na mucosa jugal através da concentração total nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Inicialmente, 200 mg de tecido da mucosa jugal foram homogeneizados em 2 mL de uma solução gelada de cloreto de potássio (KCL) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. O nível total de  $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$  foi determinado com  $\text{NO}_3^-$  das amostras (0,04 mL) convertido em  $\text{NO}_2^-$  pela incubação em um solução de 0,04 mL de nitrato redutase, NADPH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água destilada “overnight”. Após plaquetamento de 80  $\mu$ L de cada amostra, em

duplicata (placas de 96 poços), uma série de diluições da curva-padrão de referência de  $\text{NO}_2^-$  (640  $\mu\text{M}$ , 320  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  e 0,625  $\mu\text{M}$ ) foi preparada. A seguir, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  da solução de Griess (2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

#### 2.3.1.4.3 Imunohistoquímica para detecção da enzima (NOSi)

Imunohistoquímica para NOSi foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 10º dia, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais removidas e fixadas em formol 10% por 24 h para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NOSi diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

#### 2.3.1.4.4 Avaliação da taxa de salivação não estimulada

Os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU que receberam administração diária de salina 0,9% (Salina) ou 1400W (1 mg/kg), assim como o grupo controle normal, foram anestesiados com hidrato de cloral no 4º e 10º dias de experimento para avaliação da taxa de salivação. Para tal, a saliva pré-existente nas cavidades bucais foi retirada por bolinhas de algodão, posicionadas no assoalho bucal. Em seguida, cones de papel de filtro para uso em endodontia (TANARI Industrial LTDA, Brasil) foram pesados e posicionados bilateralmente no assoalho bucal para absorção da saliva secretada durante 5 minutos. Após esse período, os cones foram retirados e novamente pesados. A produção salivar durante 5 min. resulta da diferença entre as duas pesagens.

#### 2.3.1.5 Parâmetros avaliados no estudo do efeito da glutamina e alanil-glutamina na mucosite oral experimental

##### 2.3.1.5.1 Deteminação da concentração plasmática de glutamina

Imediatamente antes do sacrifício, no 10º dia, coletou-se sangue através de punção cardíaca em hamsters anestesiados com hidrato de cloral. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4º C. O plasma obtido de cada amostra foi congelado em freezer a 70ºC negativos até serem encaminhadas, em gelo seco, ao laboratório Clementino Fraga para a realização do ensaio com cromatografia líquida (HPLC) com detecção ultravioleta, seguindo método previamente descrito (BIDLIGMEYER et al., 1984).

##### 2.3.1.5.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos nas mucosas jugais

No 5º ou 10º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas, pesadas e mantidas em *freezer* a 70º C negativos até a realização do ensaio, seguindo protocolo previamente descrito (SEDLAK; LINDSAY, 1968) para a dosagem de grupos sulfidrílicos não protéicos, representados principalmente pela glutatona. Durante a determinação, as amostras

foram trituradas em homogeneizador Politron Ultra-Turrax em 1 mL de EDTA 0.02M para cada 100 mg de tecido, sob condições adequadas de refrigeração. Alíquotas de 400 µL do homogenato foram adicionadas a 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloracético 50% (TCA) para a precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados (3000rpm/15minutos/4°C) e alíquotas de 400 µL do sobrenadante foram adicionadas a 800 µL de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 20 µL de DTNB e agitados por 3 minutos no agitador de tubos, imediatamente antes da leitura em aparelho de ELISA , com absorvância de 412 nm. A quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos nas mucosas jugais foi descrita como µg/mg de tecido.

### 2.3.2 Mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos

#### 2.3.2.1 Modelo de mucosite intestinal

Utilizou-se o modelo de mucosite intestinal experimental descrito por Vanderhoof (VANDERHOOF *et al.*, 1990), e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Os ratos receberam três doses de 2,5 mg/kg de metotrexato nos dias 1, 2 e 3, via subcutânea (s.c.). Em função de dados prévios obtidos no LAFICA (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004) foi escolhido o 5º dia para o sacrifício, no qual foi observado maior intensidade do processo inflamatório e, portanto, ideal para se proceder às modulações farmacológicas com L-NAME e aminoguanidina (Figura 5).

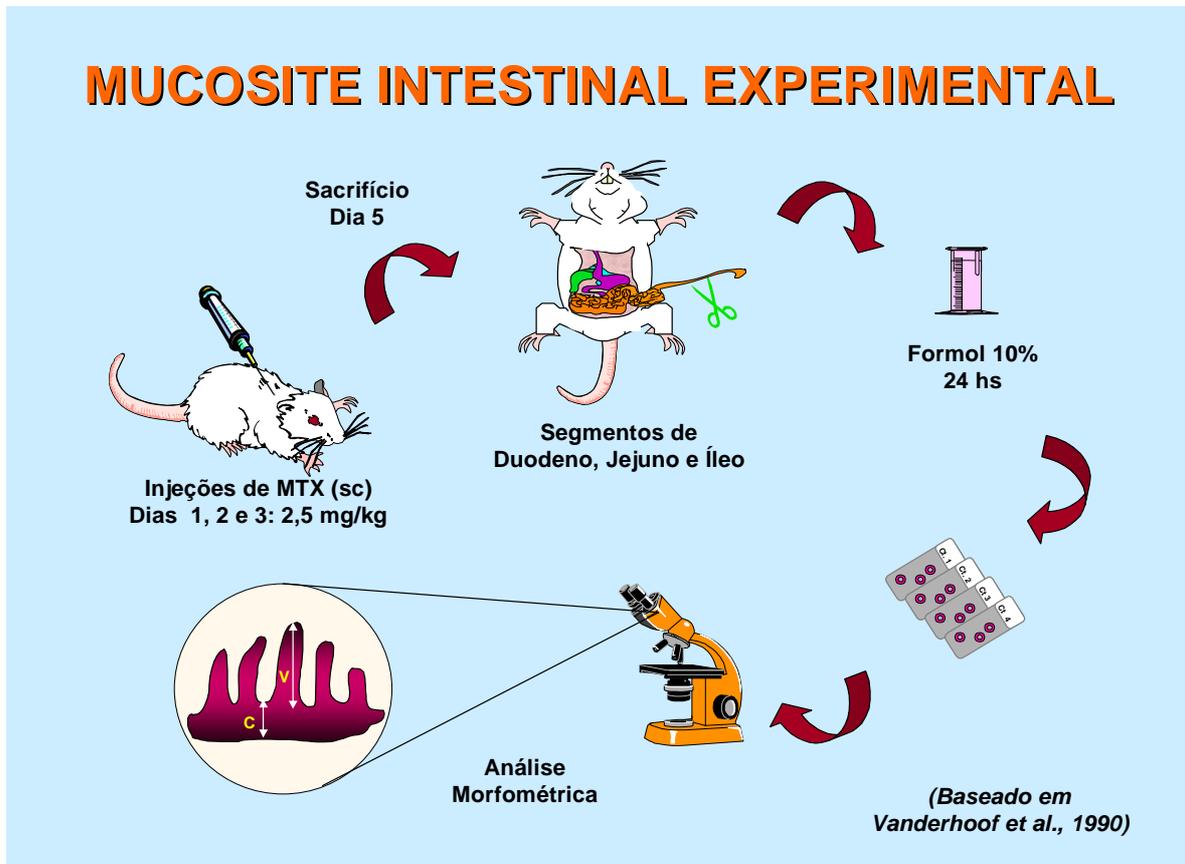


Figura 5 - Desenho esquemático do protocolo experimental da mucosite intestinal ratos ou camundongos

**Legenda:** Os animais receberam três injeções 2,5 mg/kg de metotrexato nos dias 1, 2 e 3, respectivamente. No 5º dia, os mesmos foram mortos e tiveram segmentos de duodeno, jejunum e íleo removidos, divididos em partes iguais para serem congeladas ou fixados em formol e subsequentes processamentos para coloração H&E.

### 2.3.2.2 Grupos experimentais

Foram utilizados cento e oito ratos durante todo o decorrer desse estudo, distribuídos nos diversos grupos experimentais discriminados a seguir:

#### 2.3.2.2.1 Grupos controles

Os grupos controles foram constituídos, cada um deles, por, no mínimo, seis ratos. Esses grupos consistem de:

2.4 animais que não foram submetidos à mucosite intestinal por MTX .

Esse grupo recebeu injeções de salina 0,9%, via subcutânea (s.c) e intraperitoneal (i.p), diariamente, durante 5 dias (**Normal**).

2.5 animais que receberam MTX nos 3 primeiros dias. Esse grupo recebeu injeções de salina a 0.9% (i.p.) 1 hora antes de cada injeção de metotrexato e diariamente até o sacrifício, no 5° dia (**Salina**).

#### 2.3.2.2.2 Grupo tratado com L-NAME

Os animais submetidos à mucosite intestinal por metotrexato receberam L-NAME na dose de 20 mg/kg, a cada vinte e quatro horas por via intra-peritoneal, até o 5° dia.

#### 2.3.2.2.3 Grupo tratado com L-NAME e L-arginina

Os animais, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato receberam L-NAME na dose de 20 mg/kg, seguida pela administração imediata de L-arginina, na dose de 300 mg/kg, a cada 24 horas, ambas administradas por via intra-peritoneal, até o 5° dia.

#### 2.3.2.2.4 Grupo tratado com aminoguanidina

Os animais, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato receberam aminoguanidina, na dose de 10 mg/kg, a cada vinte e quatro horas, administrada por via intra-peritoneal, até o 5° dia.

### 2.3.2.3 Parâmetros avaliados

#### 2.3.2.3.1 Análise morfométrica

Os animais foram sacrificados no 5º dia por deslocamento cervical e segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos. Considerou-se como duodeno, o segmento que corresponde à porção anterior a 3 cm do ligamento de Treitz; jejuno, a porção que compreende à porção anterior a 10 cm do ligamento de Treitz; e íleo, a porção anterior a 6 cm da válvula íleo-cecal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). As amostras foram, então, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e subseqüentemente processadas para a técnica de coloração pelo método H&E. As medidas das alturas dos vilos foram feitas, a partir do topo da vilosidade até a junção vilo-cripta, através de microscópio óptico (ocular graduada 10x, acoplado à uma câmara digital de alta resolução (LEICA DM LS 2; Wetzlar, Alemanha). Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (epm) das alturas de 7 a 10 unidades de vilos bem orientadas por secção, expressas em  $\mu\text{m}$ .

#### 2.3.2.3.2 Estudo imunohistoquímico para detecção de NOSi e imunohistoquímica pelo método de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling)

No 5º dia, os animais foram sacrificados e segmentos de jejuno foram removidos. As amostras foram, então, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e, subseqüentemente, processadas em parafina. Cortes (4  $\mu\text{m}$ ) seriados foram feitos em lâminas adequadas, cobertas com L-polilisina.

As técnicas já foram descritas anteriormente, como parte dos parâmetros avaliados no estudo do papel do óxido nítrico na mucosite ora experimental.

#### 2.3.2.3.3 Avaliação da expressão de NOSi por Western Blot

Os animais foram sacrificados no 5º dia por deslocamento cervical e segmentos de jejuno foram removidos e mantidos em *freezer* a  $-70^\circ\text{C}$  até o ensaio.

As amostras foram submetidas à sonicação com solução de lise celular (Trinton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM), sendo transferidas posteriormente para tubos testes contendo inibidor de protease e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo ensaio de BCA – *bicinchoninic acid* (Pierce), em tubos eppendorf, com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 562nm). Padronizou-se a quantidade de proteína para 50µg, de acordo com uma curva padrão para proteína. Os lisados foram congelados a –70° C até a análise. Em seguida, foi feita a separação eletroforética (Bio Rad mini-gel) das amostras após desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS- Page), com o marcador de proteína (Invitrogen). O gel foi, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose *overnight* em aparelho de transferência 36v (Bio Rad mini-transfercell) a 4° C. No dia seguinte, a membrana de celulose foi bloqueada com leite desnatado por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário durante 1 hora e meia, diluição 1:500 em BSA 5%. Após lavagens com tampão contendo TRIS, glicina, Tween 20 e água destilada, foi feita incubação com anticorpo secundário, diluído 1:500 em leite desnatado, durante 1 hora e meia, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana de nitrocelulose pela técnica de ECL, em filme de raio-X (Kodak X-Omat), em sala escura. Em seguida, foi feita a leitura e o diagnóstico das bandas.

## 2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como Média  $\pm$  erro padrão (Média  $\pm$  epm) ou mediana, acompanhada de valores extremos, de acordo com o parâmetro avaliado. Para comparações entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (ANONA) e teste de Bonferroni, para comparar médias, e teste de Kruskal-Wallis e Dunn's, para medianas. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito do óxido nítrico na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

3.1.1. Efeito dos inibidores de NOS, L-NAME, AG e 1400W sobre as mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

##### 3.1.1.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica das mucosas jugais do grupo de animais submetidos a mucosite oral por 5-FU que receberam apenas solução salina (**Salina**), no 10º dia, constatou presença de hiperemia e eritema acentuados, hemorragia, úlceras extensas e abscessos, recebendo escore e variação 3(2-3) (Figura<sup>1</sup> 6C; Tabelas 1 e 2), significativamente diferente do grupo controle normal (Normal), cujo escore e variação foram 0(0-0) (Figura. 6A; Tabelas 1 e 2) ou dos animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), com escore e variação 0.5(0-1) (Tabelas 1 e 2).

O tratamento dos animais submetidos à mucosite oral com os inibidores da NOS, AG (10 mg/kg) ou 1400W (1 mg/kg) preveniu, de forma significativa, os danos à mucosa oral causados pela administração de 5-FU. A análise macroscópica das mucosas jugais desses animais constatou redução de eritema e ausência de ulcerações e abscessos, observados no 10º dia de experimento (Figura 6E e 6G; Tabela 1). AG, na dose de 5 mg/kg (Tabela 1), assim como o inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, em todas as doses utilizadas (Tabela 2), não foram capazes de prevenir, de forma significativa, as lesões induzidas pela mucosite oral experimental.

##### 3.1.1.2 Análise Microscópica

A análise histopatológica das mucosas jugais do grupo não tratado (Salina) revelou acentuada vasodilatação, infiltrado celular intenso, com predominância de neutrófilos, hemorragia, edema e úlceras extensas (Figura 6D), recebendo escore e variação 3(1-3) (Tabela 1), significativamente diferentes aos atribuídos ao grupo

---

<sup>1</sup> Para uma melhor compreensão desta seção, a Figura 6 foi dividida em 8 partes, e cada uma delas foi identificada sequencialmente com as letras A a H, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 6A; Figura 6B.....;Figura 6H.

submetido apenas ao trauma mecânico (TM; Tabela 1 e 2) e também ao grupo controle normal (Normal; Figura 6B; Tabelas 1 e 2).

O tratamento com AG (Figura 6F; Tabela 1) ou 1400W (Figura 6H; Tabela 1) reduziu, de forma significativa ( $p < 0.05$ ), a infiltração de células inflamatórias, presença de edema e hemorragia e preveniu a formação de úlceras e abscessos (Tabela 1). Observou-se ainda, nas mucosas jugais de animais tratados com esses inibidores, áreas de reepitelização (Figura 6).

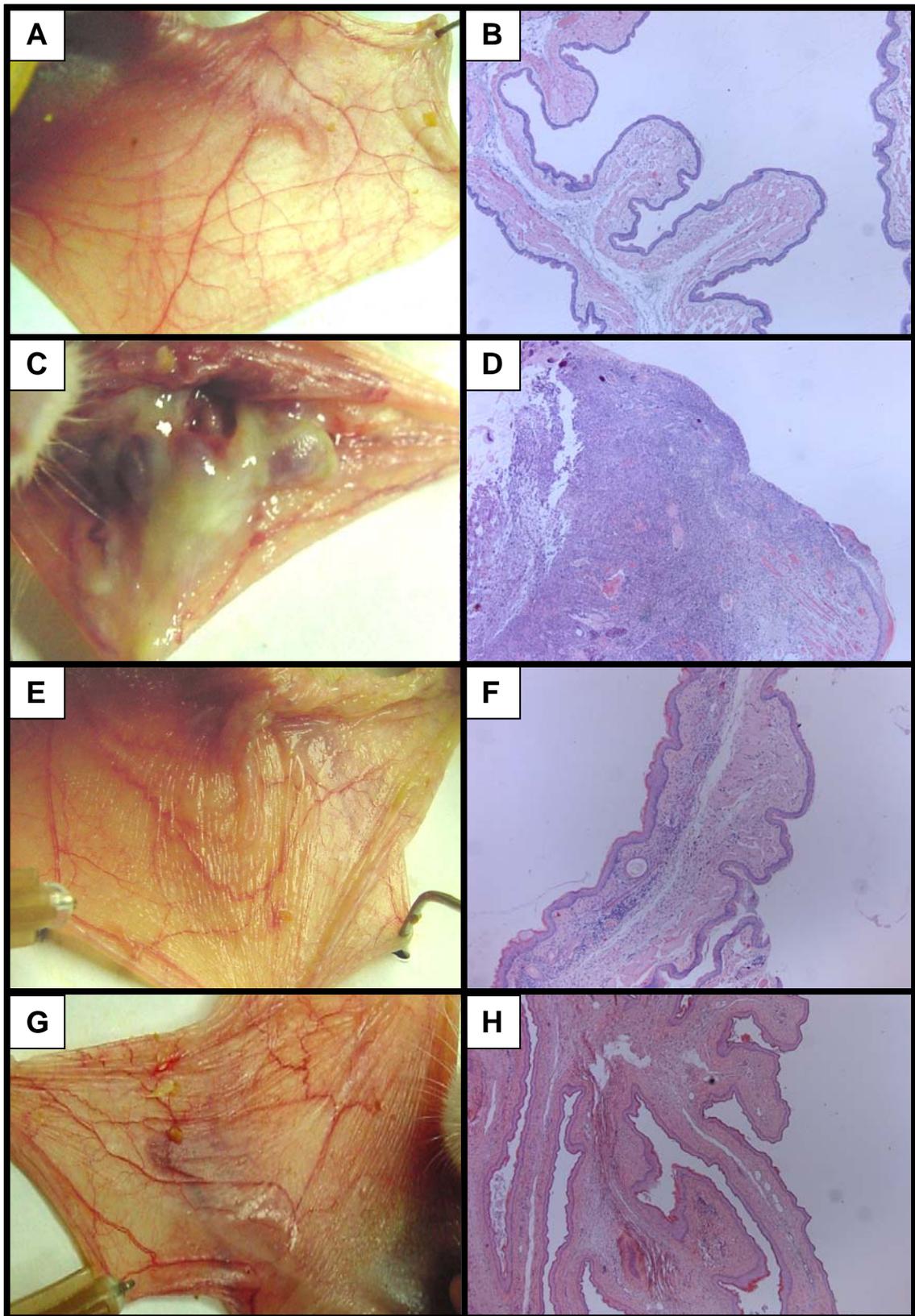


Figura 6 - Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil e trauma mecânico e que foram tratados com salina (C e D), aminoguanidina (E e F) ou *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; G e H):

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam aminoguanidina (10 mg/kg; s.c), 1400W (1mg/kg; s.c) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico e, diariamente, durante 10 dias, quando então, foram sacrificados e devidamente fotografados. Amostras foram removidas, fixadas em formol a 10% e processadas para coloração H&E (x40).

Tabela 1 - Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com aminoguanidina (AG) e N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W)

Grupos Experimentais	5-FU					
	NORMAL	TM	SALINA	AG		1400W
				5mg/kg	10mg/kg	1mg/kg
<b>Análise macroscópica</b>	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (2-3)*	3 (1-3)*	2 (1-3)***	1 (1-3)***
<b>Análise microscópica</b>	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (1-3)*	3(1-3)*	1.5 (1-3)***	1 (1-3)***

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil (5-FU) e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam aminoguanidina (AG; 5 e 10 mg/kg; sc), 1400W (1 mg/kg; sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico e, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras, para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de

abscessos, para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal (Normal); \*\* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais com mucosite oral não tratados, que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Dunn's).

Tabela 2 - Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com N $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME)

Grupos Experimentais	5-FU					
	NORMAL	TM	SALINA	L-NAME (mg/Kg)		
				5	10	20
<b>Análise macroscópica</b>	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (2-3)*	3 (2-3)*	3 (2-3)*	3(2-3)*
<b>Análise microscópica</b>	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (1-3)*	3 (1-3)*	3 (2-3)*	2,5(2-3)*

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam L-NAME (5, 10 ou 20 mg/kg-s.c) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico e, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras, para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos, para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal (Normal) (Kruskal-Wallis e Dunn's).

### 3.1.2 Efeito do L-NAME, aminoguanidina e 1400W sobre a atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A atividade da enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais do grupo de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (Salina), encontra-se significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ), no 10º dia de experimento, em comparação ao grupo controle normal (Normal) ou ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). O tratamento com aminoguanidina (10 mg/kg) ou 1400W (1 mg/kg), reduziu, de forma significativa, a atividade dessa enzima, quando comparados ao grupo salina, restaurando esse parâmetro aos níveis encontrados nos grupos normal e TM. Foi observado ainda, aumento significativo da atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental e tratados com L-NAME (20 mg/Kg) (Figura 7).

### 3.1.3. Efeito 5-fluorouracil sobre a atividade da NOS na mucosas jugal de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A administração de 5-FU, seguida por trauma mecânico resultou no aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade da NOS, no 10º dia de experimento, nas mucosas jugais dos animais que receberam solução fisiológica a 0,9% (Salina), quando comparado ao grupo controle normal (Figura 8).

### 3.1.4. Efeito do 1400W sobre a dosagem de nitrito das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-FU

Os níveis de nitrito encontrados nas mucosas jugais de animais submetidos a 10 dias de mucosite oral induzida por 5-FU (Salina), encontram-se significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo controle normal (Normal) ou ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). A administração diária de 1400W (1 mg/kg) preveniu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), o aumento dos níveis de nitrito nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental, restaurando esse parâmetro aos níveis encontrados nos grupos controle normal e TM (Figura 9)

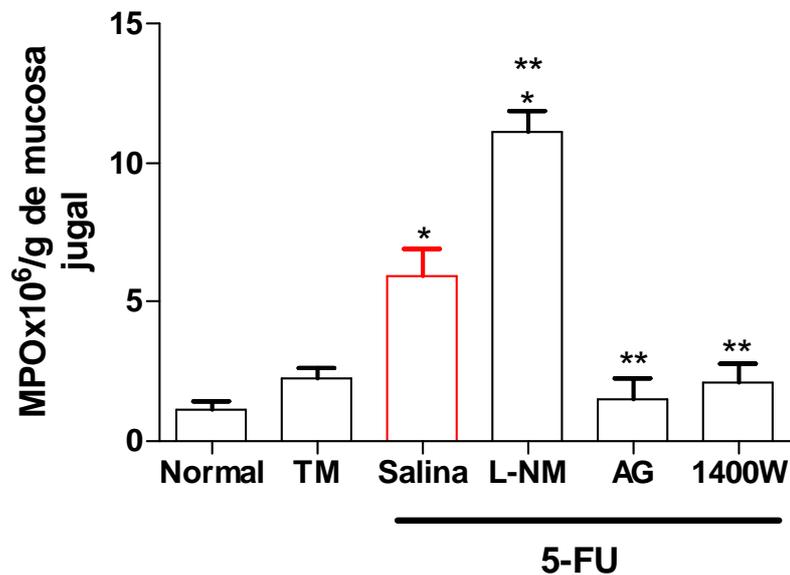


Figura 7 - Efeito dos inibidores da NOS, N $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl ester (L-NM), aminoguanidina (AG) e *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina, L-NAME (20 mg/kg), AG (10 mg/kg) ou 1400W (1 mg/kg), uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico (TM) e, diariamente, até o sacrifício, no 10<sup>o</sup> dia. Amostras de mucosa foram coletadas e congeladas em freezer -70<sup>o</sup> C. As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de MPO x 10<sup>6</sup>/grama de mucosa jugal. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatísticas em relação aos animais submetidos a mucosite experimental que receberam salina (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

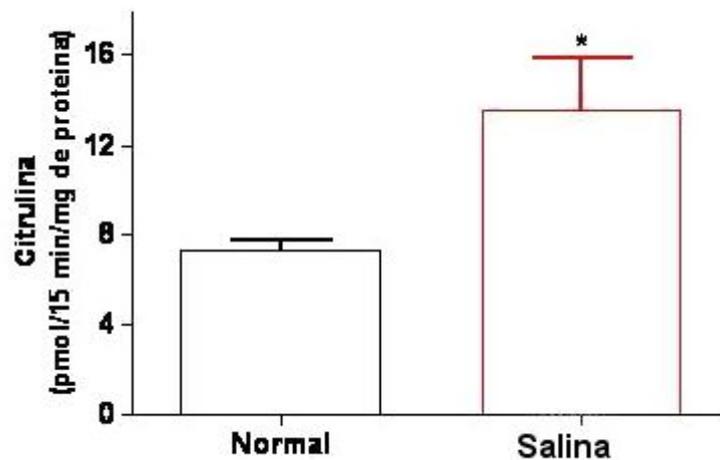


Figura 8 - Efeito do 5-fluorouracil (5-FU) sobre a atividade da níttrico óxido sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters.

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 10º dia. Amostras de mucosa foram coletadas e congeladas em freezer -70º C. As barras representam Média  $\pm$  EPM da produção de citrulina (pmol/15 min/mg de proteína) \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

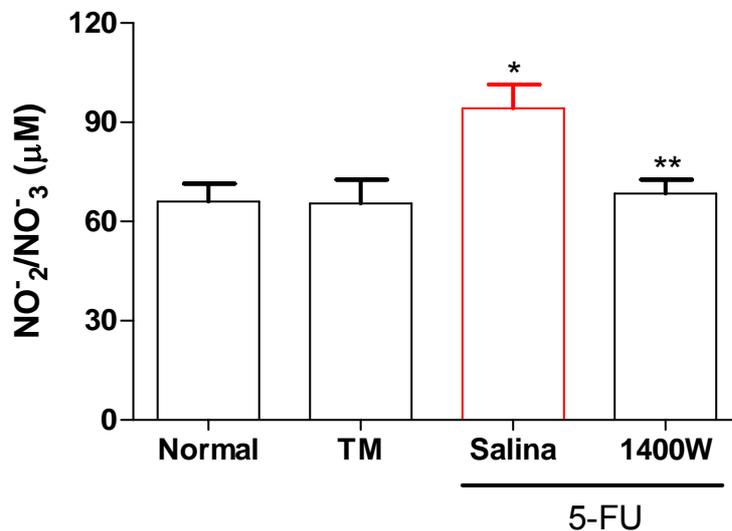


Figura 9 - Efeito do *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU).

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina, ou 1400W (1 mg/kg), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico (TM) e, diariamente, até o sacrifício, no 10º dia. Amostras de mucosa foram coletadas e congeladas em freezer -20º C. As barras representam Média ± EPM da quantidade de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (µM) da mucosa jugal. \*p<0,05 representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). \*\*p<0,05 representa diferença estatísticas em relação aos animais submetidos a mucosite experimental que receberam salina (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

### 3.1.5 Efeito da aminoguanidina e 1400W na marcação imunohistoquímica para nítrico óxido sintase induzida (NOSi)

Observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para enzima NOSi nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral experimental (Figura10C), em relação à marcação observada na mucosa de um animal normal, não submetido à mucosite oral (Figura10B). O tratamento com AG (10 mg/kg; Figura10D) ou 1400W (1 mg/kg; Figura10E), reduziu, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para NOSi, quando comparado ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina 0,9% (Salina). O controle negativo (10A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi.

### 3.1.6 Efeito da aminoguanidina e 1400W na marcação de células TUNEL positivas, como indicativo de apoptose

Observou-se aumento claro de células TUNEL positivas nas células do tecido conjuntivo e do epitélio da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e trauma mecânico (Figura<sup>2</sup> 11C) quando comparada à mucosa de um animal normal, não submetido à mucosite oral (Fig.ura11B). O tratamento com AG (10 mg/kg; Figura 11D) ou 1400W (1 mg/kg; Figura 11E), reduziu a marcação de células TUNEL positivas, sugerindo a diminuição de células em apoptose, em relação ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina (Salina; Figura 11). O controle negativo (Figura 11A) representa uma amostra de mucosa jugal que não recebeu a enzima TdT que cataliza a adição dos nucleotídeos do *kit* à terminação OH do DNA fragmentado, passo fundamental para a marcação celular.

---

<sup>2</sup> Para melhor compreensão desta seção, as Figuras de números 10 e 11 foram divididas em partes, cada uma delas recebeu as numerações originais, acrescidas de uma letra do alfabeto romano, obedecendo a ordem seqüencial.

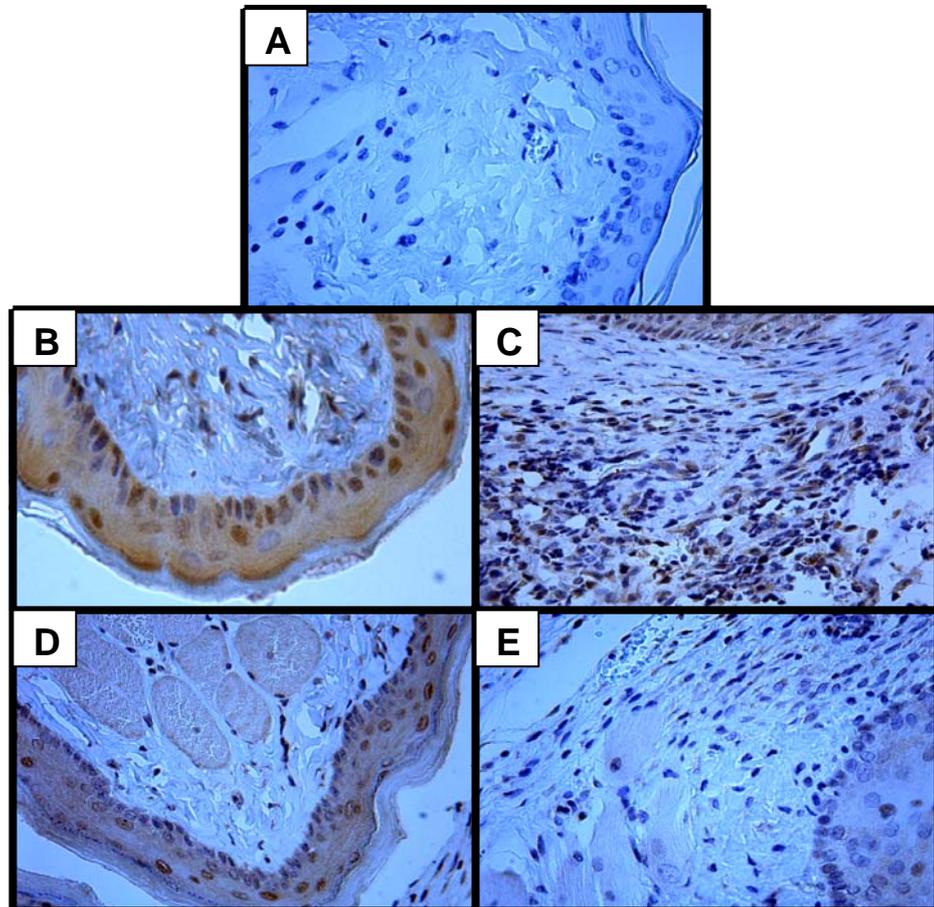


Figura 10 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NOSi de uma mucosa jugal normal (B) ou com mucosite oral experimental recebendo solução salina (C), aminoguanidina (AG; D), ou *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine (1400W; E).

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina, aminoguanidina (10 mg/kg) ou 1400W (1 mg/kg), uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico (TM) e, diariamente, até o sacrifício, no 10º dia. Amostras de mucosa jugal coletadas, colocadas em formal a 10% e processadas para a confecção de lâminas apropriadas para a técnica de imunohistoquímica para detecção de NOSi (aumento de 400x). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi.

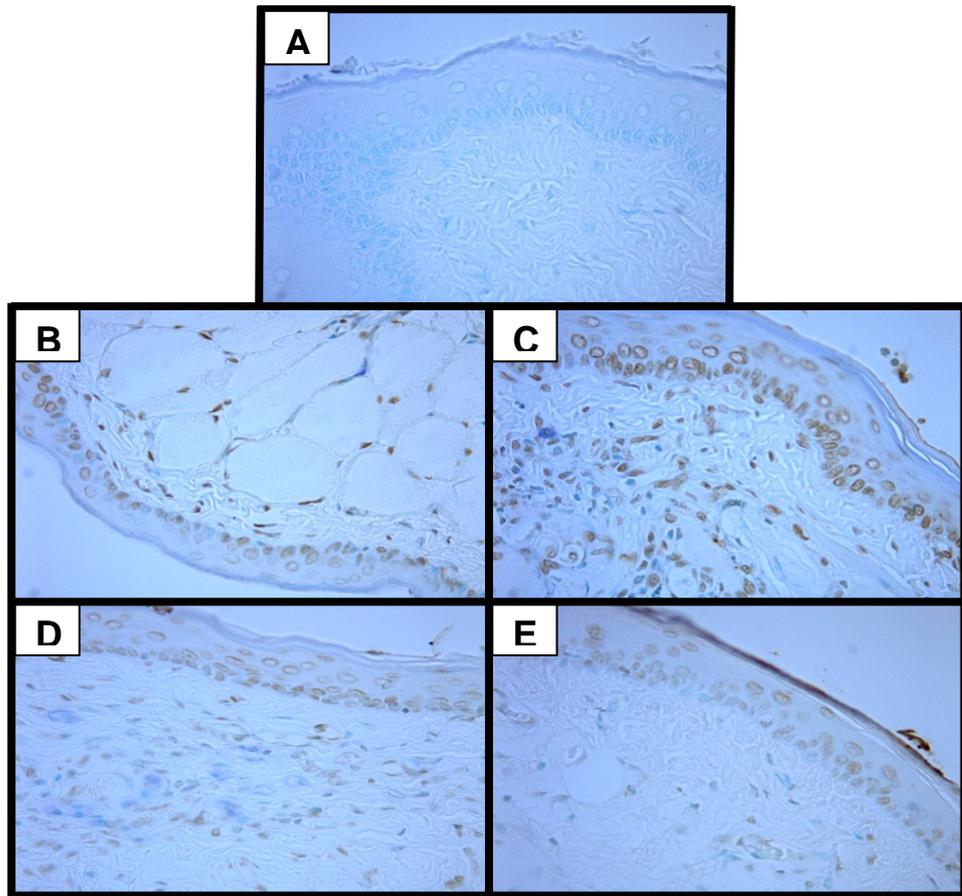


Figura 11 - Fotomicrografias de lâminas de mucosas jugais processadas pelo método de TUNEL, de um animal normal (B) ou com mucosite oral experimental tratado com solução salina (C), aminoguanidina (AG; D), ou *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W; E).

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil (5-FU) e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina, AG (10 mg/kg) ou 1400W (1 mg/kg), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico e, diariamente, até o sacrifício, no 10º dia. Amostras da mucosa jugal foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10º dia, colocadas em formal a 10% e processadas para a confecção de lâminas apropriadas para marcação de células TUNEL positivas (aumento de 400x). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal que não recebeu a enzima TdT que

cataliza a adição dos nucleotídeos do *kit* à terminação OH do DNA fragmentado, passo fundamental para a marcação celular.

### 3.1.7 Efeito do 1400W na produção salivar não estimulada de animais submetidos à mucosite experimental

Observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) da produção de saliva, no 4º dia de experimento, no grupo de animais submetidos à mucosite oral experimental e que recebeu solução fisiológica 0,9% (Salina), quando comparada ao grupo controle normal (Normal). O tratamento dos animais submetidos à mucosite oral por 5-FU e trauma mecânico com 1400W (1 mg/kg) preveniu, significativamente ( $p < 0,05$ ), a diminuição da produção salivar, mantendo os mesmos níveis observados no grupo controle normal (Normal; Figura<sup>3</sup> 12A). No 10º dia de experimento, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos: controle normal (Normal), grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu salina 0,9% (Salina) e grupo tratado com 1400W (Figura 12B).

---

<sup>3</sup> Para melhor compreensão desta seção, a Figura 12 foi dividida em duas partes, cada uma delas foi identificada sequencialmente com a letra A e B, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 12A; Figura 12B

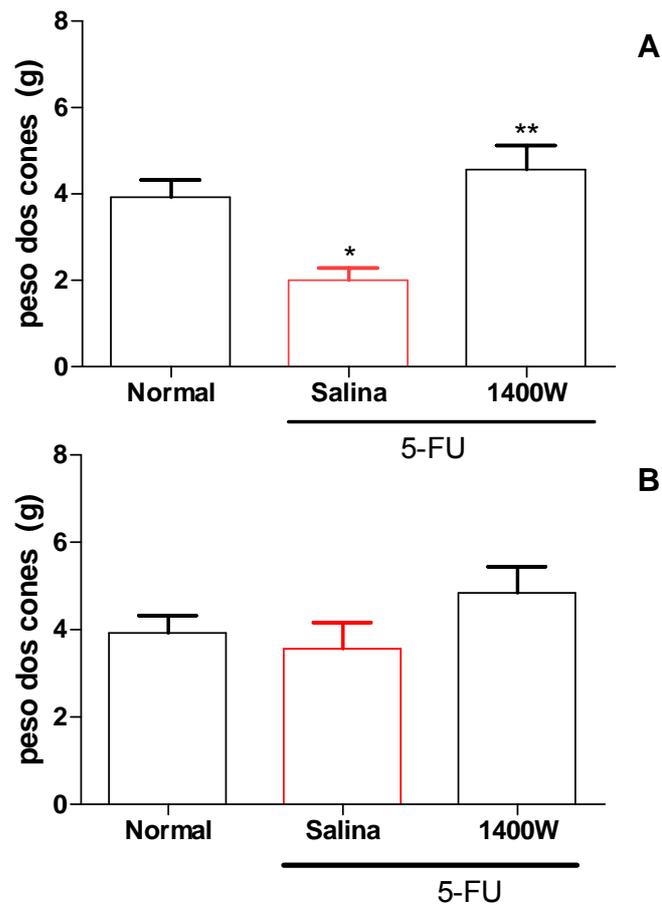


Figura 12 - Efeito do *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W) na produção salivar não estimulada, no 4º (A) e 10º dias (B), de animais submetidos à mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico.

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam injeções subcutâneas de 0,5 ml de salina ou 1400W (1 mg/kg), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico e, diariamente, até 10º dia. No 4º e 10º dias, após anestesia com hidrato de cloral e previa secagem da saliva pré-existente nas cavidades bucais, cones de papel de filtro pesados previamente foram posicionados bilateralmente no assoalho bucal para absorção da saliva secretada durante 5 minutos. Após esse período, os cones foram novamente pesados. A produção de saliva durante 5 min resulta da diferença entre as duas pesagens. As barras representam Média  $\pm$  EPM do peso dos cones (g). \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatísticas em relação aos animais

submetidos a mucosite experimental que receberam salina (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

### **3.2 Efeito do óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por metotrexato (MTX)**

#### **3.2.1 Efeito dos inibidores da NOS, AG e L-NAME, sobre as alterações morfológicas e histopatológicas observadas em animais submetidos à mucosite intestinal induzida por metotrexato**

Observa-se, no 5º dia de experimento, encurtamento significativo ( $p < 0,05$ ) dos vilos em todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) dos animais submetidos à mucosite intestinal por metotrexato e que receberam salina 0,9% (Salina), quando comparados às mucosas de ratos normais, não submetidos à mucosite intestinal (Normal; Figura <sup>4</sup>13). Observou-se ainda, no jejuno dos animais do grupo salina, vilos encurtados e recobertos por células vacuoladas e planas, intenso infiltrado de células inflamatórias, células de músculo liso verticalmente orientadas na lâmina própria (Figura<sup>5</sup> 14C) e criptas necróticas com infiltrado neutrofílico (Figura 14D). Esses achados inflamatórios não estão presentes no jejuno do grupo controle normal (Figura 14A e 14B).

O tratamento com AG (10 mg/kg) e L-NAME (20 mg/kg) foram capazes de prevenir, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), mas parcial, o encurtamento dos vilos causado pelo metotrexato nos segmentos de duodeno e jejuno. Apenas o tratamento com AG, no entanto, preveniu significativamente ( $p < 0,05$ ) o encurtamento dos vilos no íleo (Figura 13). Ambos, AG (Figura 14E e 14F) e L-NAME (Figura 14G e 14H) reduziram as alterações observadas nos vilos dos três segmentos do intestino delgado, assim como a necrose das criptas ocasionadas pela administração de MTX, conforme pode-se observar nos segmentos representativos de jejuno (Figura 14).

---

<sup>4</sup> Para melhor compreensão desta seção, a Figura 13 foi dividida em três partes, cada uma delas foram identificadas sequencialmente com as letras A; B e C, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 13A; Figura 13B e Figura 13C

<sup>5</sup> A Figura 14 foi dividida em 8 partes, cada uma delas foram identificadas sequencialmente com as letras A; B; C; D; E; F; G e H, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 14A.....Figura 14H.

A administração do substrato verdadeiro da NOS, L-arginina (300 mg/Kg; i.p.), simultaneamente à injeção de L-NAME, não foi capaz de reverter os efeitos do L-NAME em nenhum dos três segmentos do intestino delgado (Figura 13).

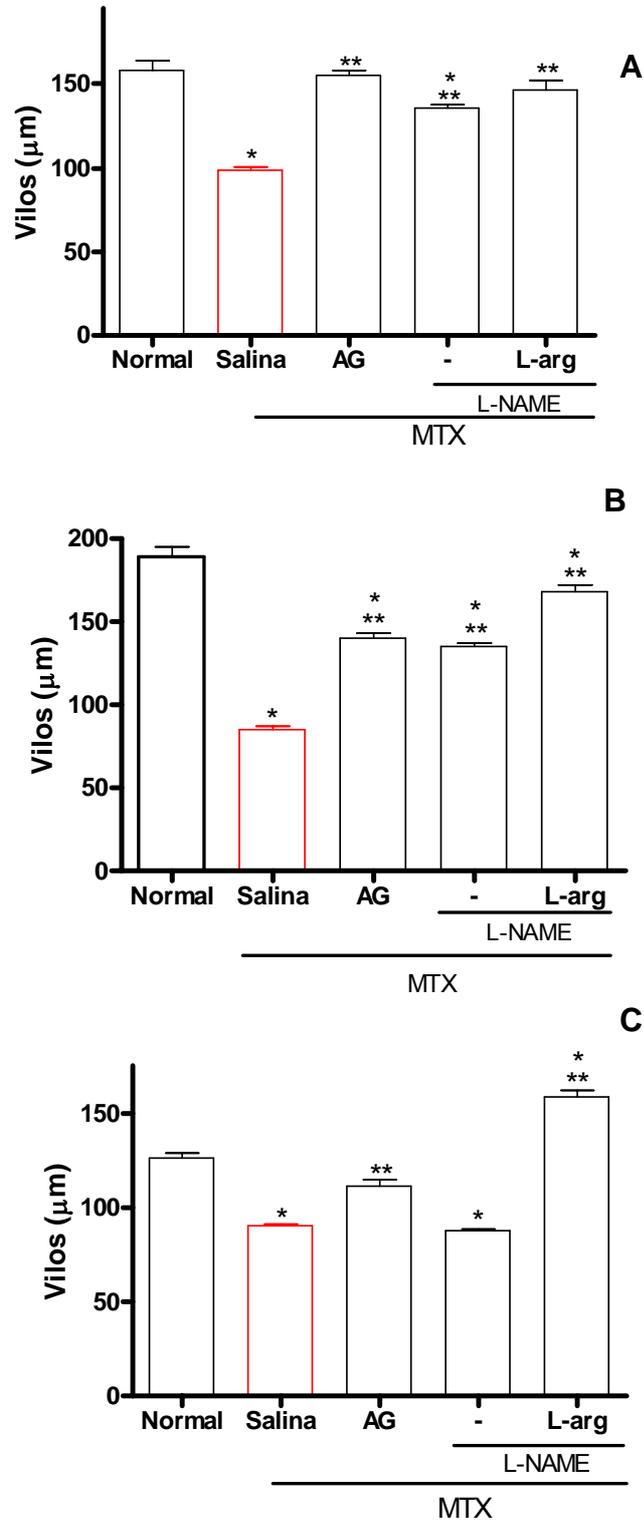


Figura 13 - Efeito da aminoguanidina (AG) e N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME) sobre a altura de vilos no duodeno (A), jejuno (B) e íleo (C) dos animais submetidos a mucosite intestinal.

**Legenda:** A mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg (s.c) de metotrexato, em ratos. Os animais receberam antes da administração do quimioterápico, solução salina 0.9% (i.p.), AG (10 mg/kg; i.p.) ou L-NAME (20 mg/kg; i.p.) diariamente, até o sacrifício, no 5o dia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a coloração pelo método H&E para análise morfométrica. \*p<0,05 representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal (Normal). \*\*p<0,05 representa diferenças estatísticas em relação ao grupo salina. O número de ratos utilizados foi, no mínimo, seis. (Anova; Bonferroni).

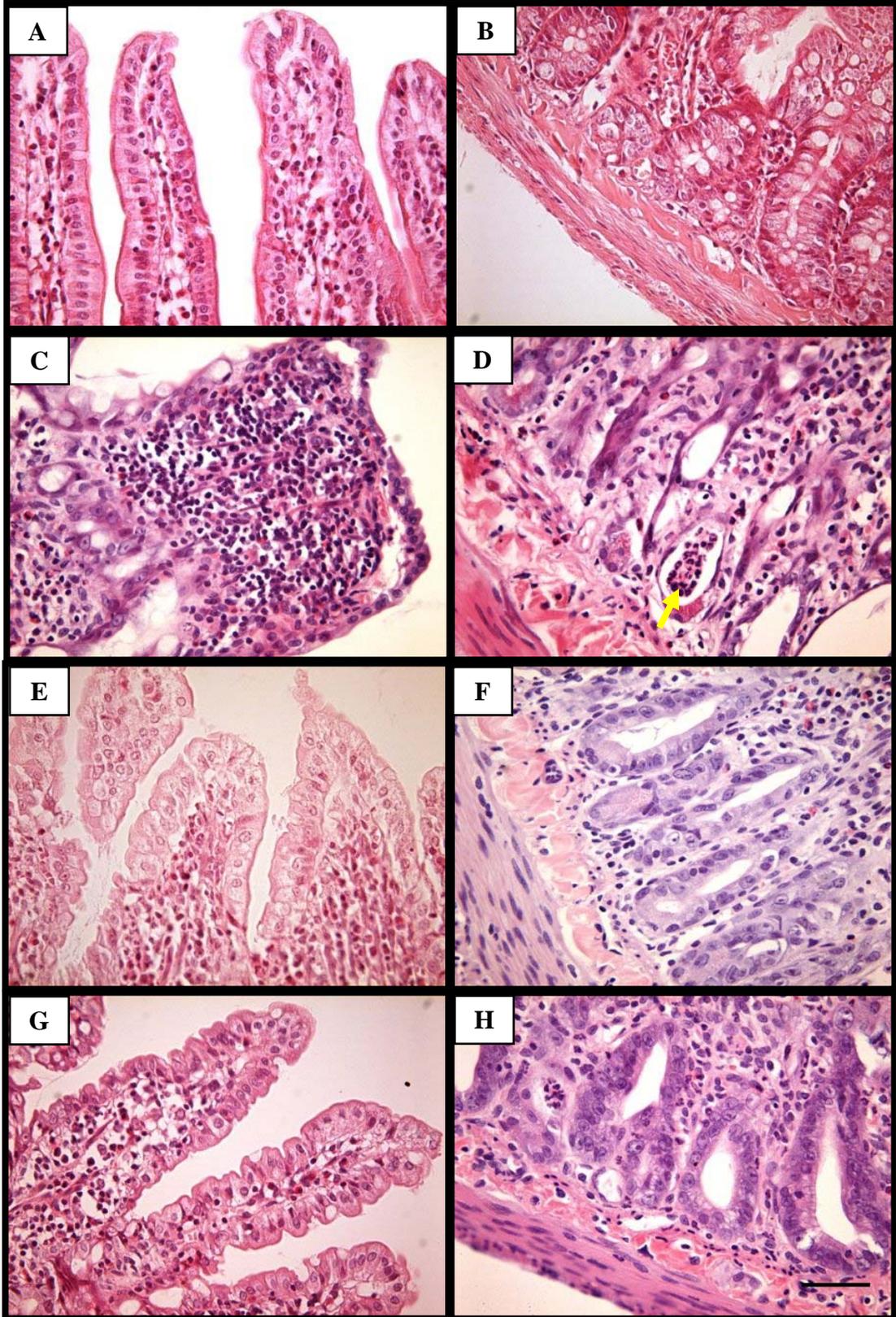


Figura 14 - Fotomicrografias de jejuno de ratos Wistar normais e de animais submetidos à mucosite intestinal pelo metotrexato (MTX) que receberam salina, aminoguanidina (AG) ou N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME).

**Legenda:** A mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de MTX (2,5 mg/kg; s.c.). Os animais receberam solução salina 0.9% (i.p.), AG (10 mg/kg; i.p.) ou L-NAME (20 mg/kg; i.p.) , 1 hora antes da administração do quimioterápico e diariamente, até o sacrifício, no 5<sup>o</sup> dia. O jejuno de cada animal foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (aumento de 400x). Fotomicrografias representativas de jejuno normal, mostrando a região de vilos (A) e criptas (B); jejuno de um animal submetido à mucosite intestinal por MTX, mostrando vilos encurtados e recobertos por células vacuoladas e achatadas, intenso infiltrado de células inflamatórias, células de músculo liso verticalmente orientadas na lâmina própria (C) e criptas necróticas com infiltrado neutrofílico (seta amarela; D). A administração sistêmica de aminoguanidina (E e F) e N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME; G e H) preveniu o encurtamento dos vilos, assim como a destruição das criptas nos segmentos de jejuno de animais tratados com MTX. A barra mede 10 $\mu$ m.

### 3.2.2 Efeito da AG e L-NAME sobre a atividade de mieloperoxidase em jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX

Observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade da enzima mieloperoxidase nos segmentos de jejuno do grupo de hamsters submetidos à mucosite intestinal por MTX (Salina), no 5<sup>o</sup> dia de experimento, em comparação ao grupo controle normal. O tratamento com aminoguanidina (10 mg/kg) ou L-NAME (20 mg/kg), reduziu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a atividade dessa enzima, restaurando esse parâmetro aos níveis normais. (Figura 15).

### 3.2.3 Efeito do MTX na marcação imunohistoquímica para NOSi e de células TUNEL positivas.

Observou-se, em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX, marcação imunohistoquímica acentuada para enzima NOSi, nas células

epiteliais que recobrem os vilos, em células da lâmina própria (Figura<sup>6</sup>16G) e nas células inflamatórias presentes nos arredores e no interior das criptas necróticas (Figura16I), quando comparada à tênue marcação observada na região de vilos (Figura16C) e criptas (Figura16E) de um animal do grupo controle normal. O controle negativo representa uma amostra de jejuno aonde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi (A).

Observou-se, ainda, em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX (Salina), aumento acentuado de células TUNEL positivas na lâmina própria (Figura16F), quando comparado ao jejuno de um animal do grupo controle normal (Figura16D). O tratamento com AG (Figura16H) e L-NAME (Figura 16I) reduziu consideravelmente o número de células TUNEL positivas marcadas na lâmina própria. O controle negativo representa uma amostra de jejuno aonde a enzima TdT foi substituída pelo *reaction buffer* e não mostra marcação para células TUNEL positivas (Figura16B).

---

<sup>6</sup> Para melhor compreensão desta seção, a Figura 16 foi dividida em 10 partes, cada uma delas foram identificadas sequencialmente com as letras A; B; C; D; E; F; G ; H; I e J, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 13A.....Figura 13I.

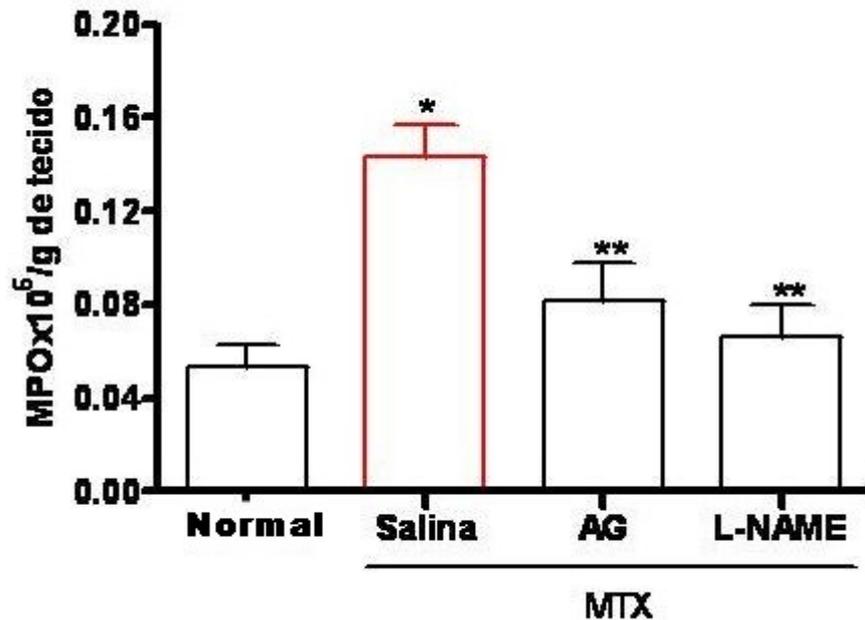


Figura15. - Efeito da aminoguanidina (AG) e N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME) na atividade de mieloperoxidase (MPO) em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX.

**Legenda:** A mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg (s.c) de metotrexato em ratos. Os animais receberam antes de cada administração do quimioterápico, solução salina, AG (10 mg/kg) ou L-NAME (20 mg/kg) diariamente, até o sacrifício, no 5<sup>o</sup> dia. Segmentos de jejuno foram coletados e congelados em freezer  $-70^{\circ}$ . As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de MPO x 10<sup>6</sup>/grama de tecido. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal (Normal). \*\* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo salina. O número de ratos utilizados foi, no mínimo, seis. (Anova; Bonferroni).

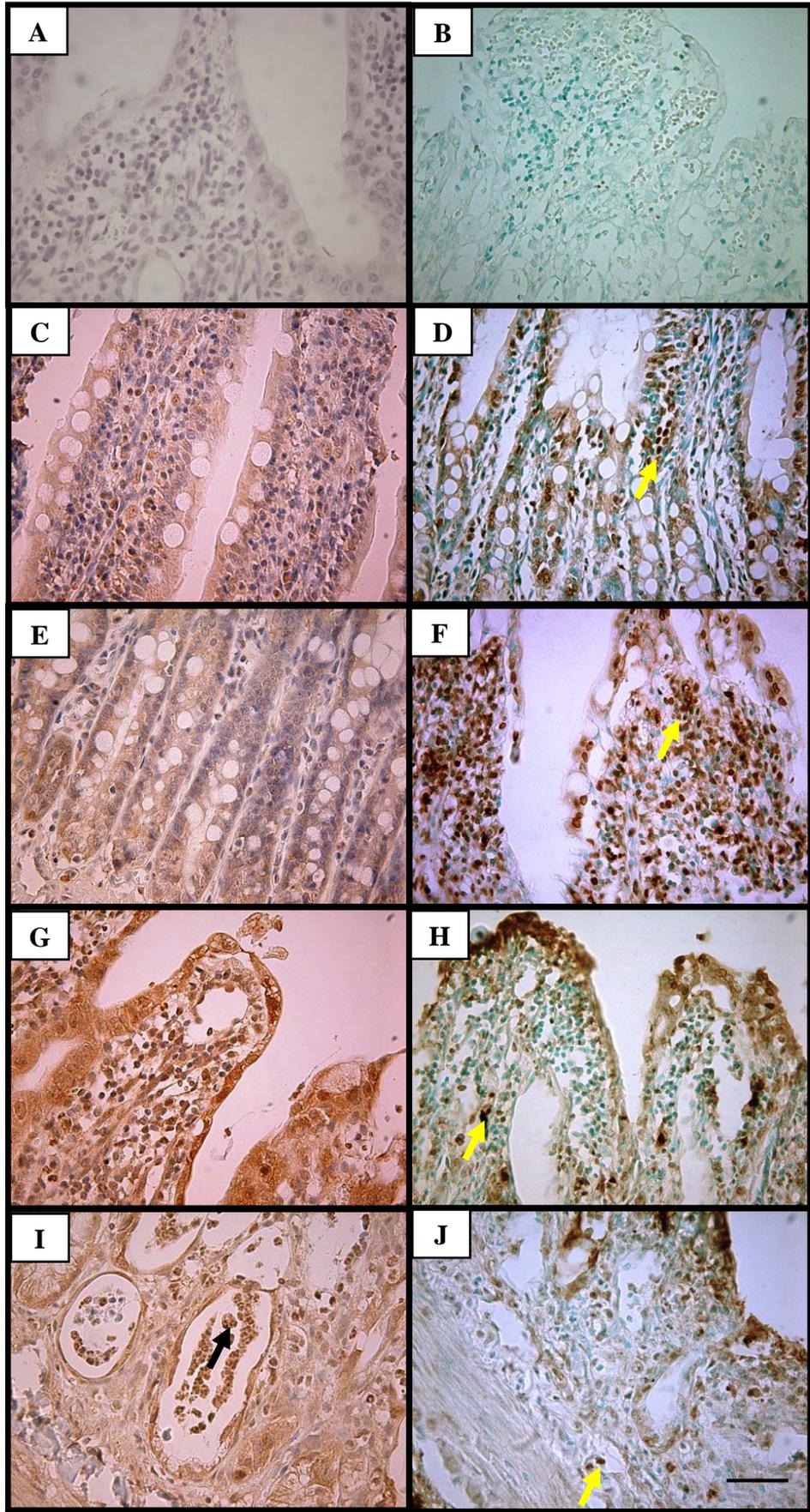


Figura 16 - Exemplos representativos da marcação imunohistoquímica para enzima nítrico óxido sintase (NOSi; lado direito) e para células TUNEL positivas (lado esquerdo) em segmentos de jejuno de rato.

**Legenda:** Os animais receberam MTX ou salina (s.c.) por três dias consecutivos. Foram sacrificados no quinto dia experimental e tiveram os jejunos removidos para a confecção de lâminas apropriadas para a técnica de detecção de células TUNEL positivas e de imunohistoquímica para NOSi (aumento de 400X). Jejuno de um animal submetido à mucosite intestinal por metotrexato apresenta marcação imunohistoquímica intensa para NOSi, tanto nas células epiteliais que recobrem os vilos e nas células da lâmina própria (G), quanto nas células inflamatórias situadas nos arredores e no interior das criptas necrosadas (I; seta preta), quando comparado à marcação discreta nas regiões de vilos (C) e criptas (E) de um animal não submetido à mucosite intestinal por MTX. O controle negativo representa uma amostra de jejuno aonde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi (A). Essa figura mostra ainda, em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX, aumento acentuado de células TUNEL positivas na lâmina própria (F), quando comparado ao jejuno de um animal do grupo controle normal (D). O tratamento com aminoguanidina (H) e N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME; I) reduziu consideravelmente o número de células TUNEL positivas marcadas na lâmina própria. O controle negativo (B) representa uma amostra de jejuno que não recebeu a enzima TdT que cataliza a adição dos nucleotídeos marcados à terminação OH do DNA fragmentado, passo fundamental para a marcação celular. As setas amarelas indicam células TUNEL positivas. A barra mede 10  $\mu$ m.

### 3.2.4 Western Blot

A expressão da NOSi foi claramente detectada no segmento de jejuno de um animal submetido à mucosite intestinal por MTX, pelo método de Western Blot. Não foi detectada a expressão da enzima nos segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal e tratados com aminoguanidina (10 mg/kg) ou L-NAME (20 mg/kg), nem tampouco em amostras de jejuno de animais do grupo controle normal (Figura17).

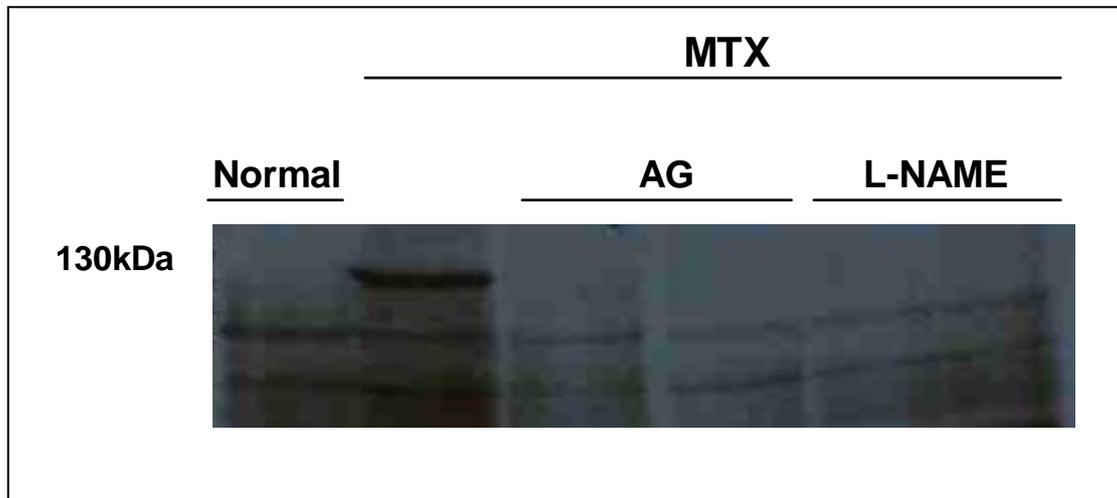


Figura 17 - Ensaio de Western Blot para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi; MW ~130kDa) em homogenato de segmentos de jejuno.

**Legenda:** A expressão da enzima NOSi foi detectada no jejuno de um animal submetido à mucosite intestinal por MTX. A enzima não foi detectada nas amostras de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal com MTX e tratados com aminoguanidina (AG; 10 mg/kg) ou N $\phi$ -Nitro-L-arginine methyl (L-NAME; 20 mg/kg), tampouco no jejuno de um animal normal, não submetido à mucosite intestinal. A figura representa *blot* de 2 experimentos.

### 3.3 Efeito da glutamina e alanil-glutamina na evolução da mucosite oral induzida por 5-FU

3.3.1 Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre as mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

#### 3.3.1.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica das mucosas jugais do grupo de animais submetidos a mucosite oral por 5-FU que receberam apenas solução salina (Salina), no 10<sup>o</sup> dia, constatou presença de hiperemia e eritema acentuados, hemorragia, úlceras

extensas e abscessos, recebendo escore e variação 3(2-3) (Figura<sup>7</sup>18C; Tabela 3), sendo significativamente diferente do grupo controle normal (Normal), cujo escore e variação foram 0(0-0) (Figura18A; Tabelas 3) ou dos animais submetidos apenas ao trauma mecânico (TM), com escore e variação 0,5(0-1) (Tabela 3).

O tratamento dos animais submetidos à mucosite oral com glutamina (100 mM) ou alanil-glutamina (100 mM) não foi capaz de prevenir, de forma significativa, os danos à mucosa oral causados pela administração de 5-FU, observados no 10º dia de experimento (Tabela 3). Por outro lado, no 14º dia, observou-se que o tratamento, tanto com alanil-glutamina (Figura18G; Tabela 4) quanto com glutamina (Figura18I; Tabela 4), reduziu significativamente as alterações inflamatórias, quando comparados ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu salina 0,9% (Salina), aonde ainda observava-se eritema, edema e ulceração, apesar do visível processo de cicatrização (Figura18E, Tabela 4).

### 3.3.1.2 Análise Microscópica

A análise histopatológica das mucosas jugais do grupo não tratado (Salina), no 10º dia de experimento, revelou acentuada vasodilatação, infiltrado celular intenso, com predominância de neutrófilos, hemorragia, edema e úlceras extensas (Figura18D), recebendo escore e variação 3(1-3) (Tabela 3), apresentando diferença estatística em relação ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM; Tabela 3 e 4) e também ao grupo controle normal (Normal; Figura18B; Tabelas 3 e 4).

O tratamento com alanil-glutamina (Figura18F; Tabela 3) ou glutamina (Figura18H; Tabela 3) não foi capaz de reduzir a infiltração de células inflamatórias, presença de edema e hemorragia, tampouco de prevenir a formação de úlceras e abscessos, observados no 10º dia. Por outro lado, observou-se, no 14º dia de experimento, maiores áreas de reepitelização nos grupos tratados com alanil-glutamina (Figura18H; Tabela 4) ou glutamina (Figura18J; Tabela 4), quando

---

<sup>7</sup> Para melhor compreensão desta seção, a Figura 18 foi dividida em 10 partes, cada uma delas foram identificadas sequencialmente com as letras A; B; C; D; E; F; G; H; I e J, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 18A.....Figura 18I.

comparados ao grupo de animais submetidos à mucosite oral experimental por 5-FU que receberam salina 0,9% (Salina; Figura18F; Tabela 4).

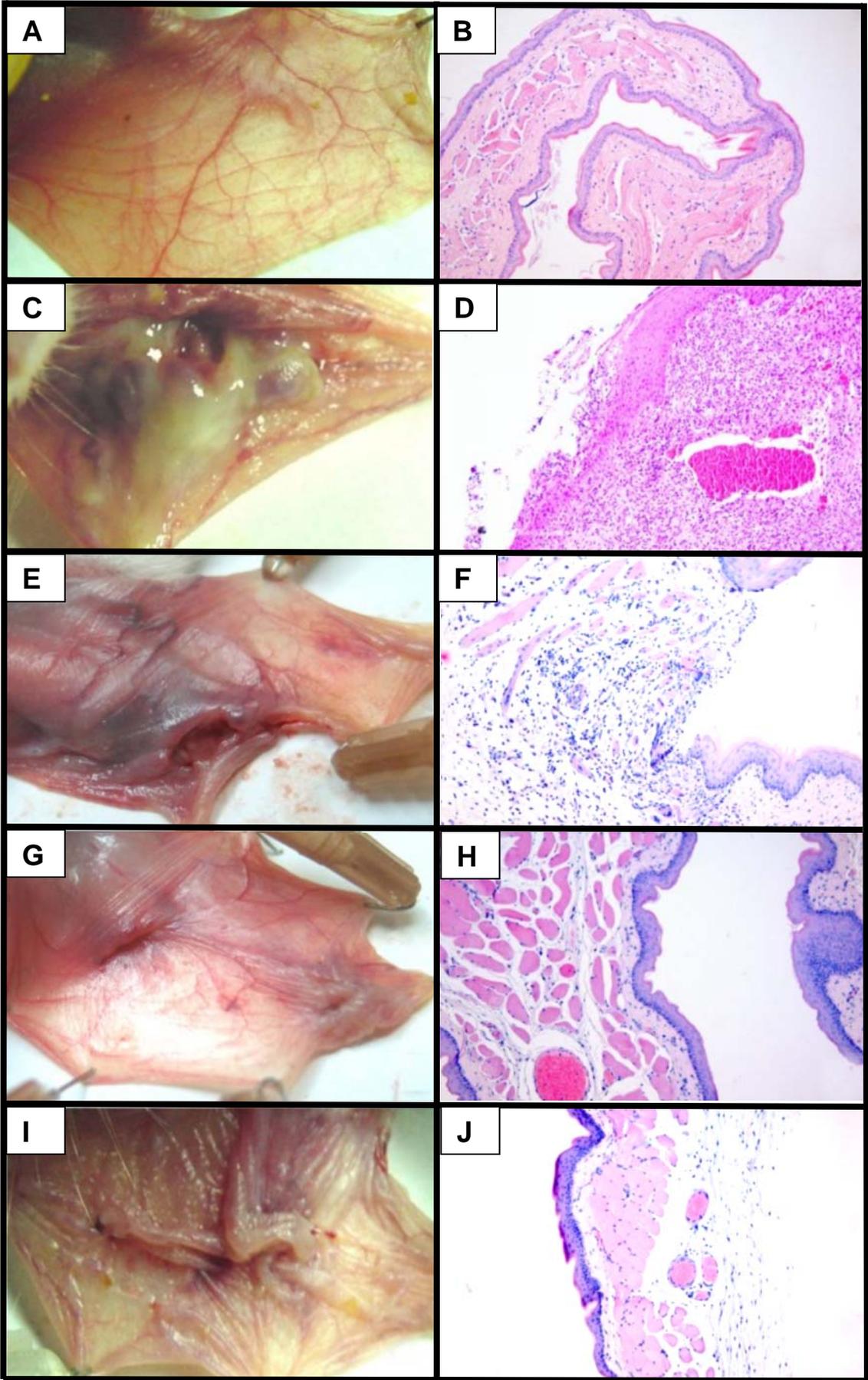


Figura 18 - Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico e que foram tratados com salina, observados no 10º (C e D) e 14º (E e F) dias, com glutamina (G e H) ou alanil-glutamina (I e J), observados no 14º dia de experimento

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam solução oral de glutamina (100mM), alanil-glutamina (100mM) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico e, diariamente, durante 10 ou 14 dias, quando então, foram sacrificados e devidamente fotografados. Amostras foram removidas, fixadas em formol a 10% e processadas para coloração H&E (x40).

TABELA 3 - Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com glutamina e alanil-glutamina durante 10 dias.

Grupos experimentais	NORMAL	TM	5-FU		
			SALINA	GLU	AL-GLU
Análise macroscópica	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (2-3)*	3 (1-3)*	3 (1-3)*
Análise microscópica	0 (0-0)	0.5 (0-1)	3 (1-3)*	2 (1-3)*	2 (1-3)*

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam AG (5 e 10 mg/kg; sc), 1400W (1 mg/kg; sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6

hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal (Normal); \*\* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais com mucosite oral não tratados, que constituem o grupo salina (Kruskal-Wallis e Dunn's).

TABELA 4 - Escores das análises macroscópicas e microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental e tratados com glutamina e alanil-glutamina durante 14 dias.

Grupos experimentais	NORMAL	TM	5-FU		
			SALINA	GLU	AL-GLU
Análise macroscópica	0 (0-0)	0.5 (0-1)	2 (2-3)*	2 (1-2)*,**	2 (1-2)*,**
Análise microscópica	0 (0-0)	0.5 (0-1)	2 (1-3)*	2 (1-3)*,**	1 (1-2)*,**

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam AG (5 e 10 mg/kg; sc), 1400W (1 mg/kg; sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico e, diariamente, durante 14 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras para análise histopatológica e presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos para análise macroscópica. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle normal

(Normal); \*\* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais com mucosite oral não tratados, que constituem o grupo salina (Kruskal-Wallis e Dunn's).

### 3.3.2 Efeito 5-FU sobre os níveis de glutamina no soro de hamsters.

A administração de 5-FU, seguida por trauma mecânico, causou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de glutamina no soro dos animais que receberam solução fisiológica a 0,9% (Salina), no 10º dia de experimento, quando comparado ao grupo controle normal. A administração de glutamina e alanil-glutamina, nas doses utilizadas, restaurou os níveis séricos de glutamina para a dosagem dos animais normais (Figura 19).

### 3.3.3 Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre os estoques de glutathione nas mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental.

Os estoques de glutathione nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-fluorouracil e trauma mecânico (Salina) encontram-se significativamente diminuídos ( $p < 0,05$ ), no 10º dia, quando comparados ao grupo controle normal e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). A administração oral de alanil-glutamina (100mM) ou glutamina (100mM) foi capaz de reverter, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), os efeitos da mucosite oral experimental nos estoques de glutathione na mucosa jugal, no 10º dia, visto que, nesses 2 grupos, não se observou diminuição dos estoques de glutathione nas bochechas dos animais. (Figura 20).

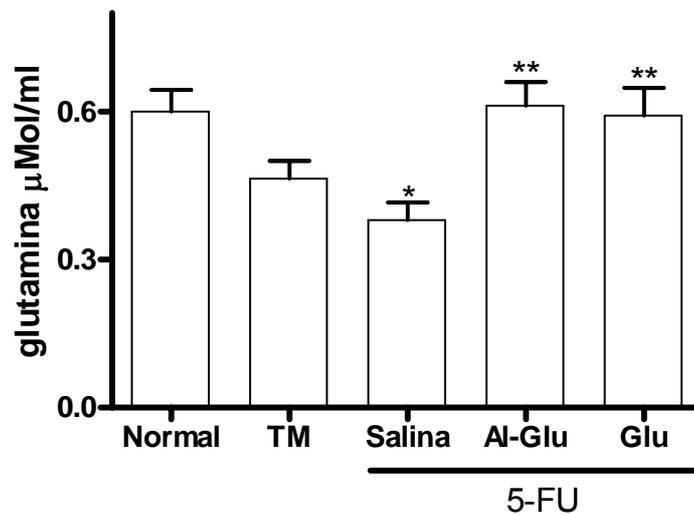


Figura 19 - Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre o nível de glutamina no soro de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU).

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam administrações orais de 0,5 ml de salina, glutamina (100mM), ou alanil-glutamina (100mM), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico (TM). Imediatamente antes do sacrifício, no 10º dia, sangue foi coletado a partir de punção cardíaca, sob anestesia, centrifugados e congelados em freezer 70º negativos para dosagem de glutamina. As barras representam Média ± EPM da quantidade de glutamina (mMol/ml) do soro. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatísticas em relação aos animais submetidos a mucosite experimental que receberam salina (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

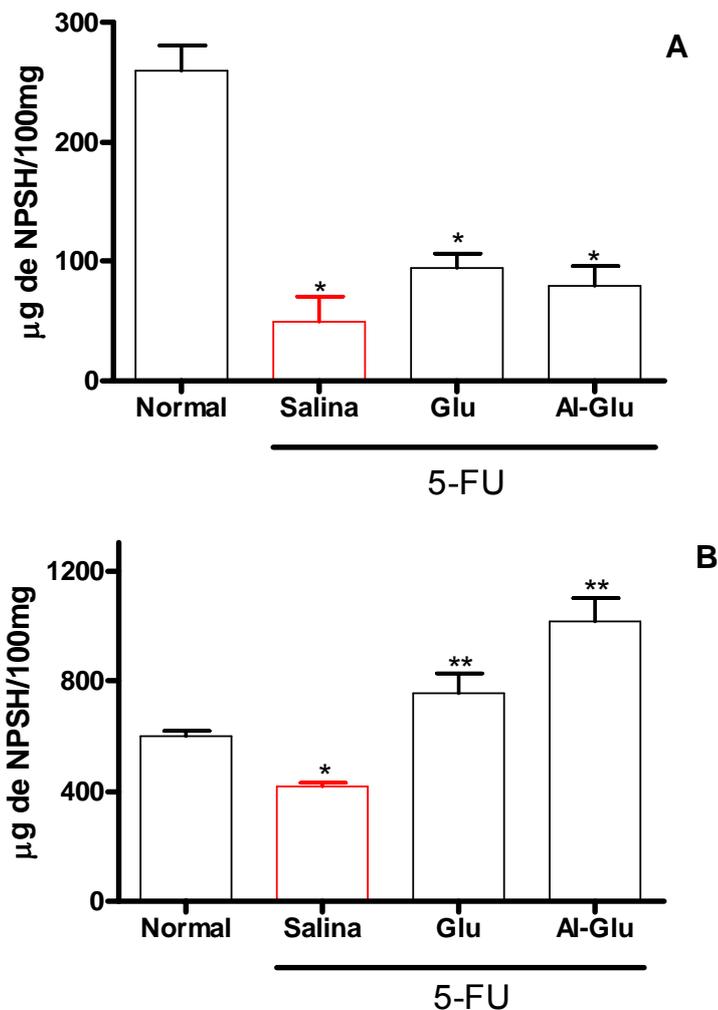


Figura 20 - Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre os estoques de glutathiona nas mucosas jugais de hamsters submetidoa à mucosite oral por 5-fluorouracil (5-FU), no 5° (A) e 10° (B) dias.

**Legenda:**A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-FU e de trauma mecânico com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam administrações orais de 0,5 ml de salina, glutamina (100mM), ou alanil-glutamina (100mM), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico. Amostras de mucosa foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 5° e 10° dias e congeladas em freezer 70o negativos. As barras representam Média  $\pm$  EPM dos estoques de glutathiona ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de mucosa jugal). \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (Normal). \*\* $p < 0,05$  representa diferença estatísticas em relação aos animais submetidos a mucosite experimental que receberam salina (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

### 3.3.4 Efeito glutamina e alanil-glutamina sobre a atividade de mieloperoxidase observada nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas mucosas jugais do grupo de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU (Salina), encontra-se significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ), no 10º dia de experimento, em comparação ao grupo controle normal ou ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). O tratamento com alanil-glutamina, tampouco com glutamina não foi capaz de reduzir, de forma significativa, a atividade dessa enzima, quando comparados ao grupo salina, no 10º dia de experimento. No 14º dia, no entanto, tanto alanil-glutamina quanto glutamina reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ), o aumento da atividade de mieloperoxidase induzido pela mucosite oral experimental, comparada com a atividade de MPO no 10º dia (Figura 21).

### 3.3.5 Efeito da glutamina e alanil-glutamina na marcação de células TUNEL positivas, como indicativo de apoptose

Observou-se um aumento claro de células TUNEL positivas no tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e trauma mecânico (Figura<sup>8</sup> 22C) quando comparada à mucosa de um animal normal, não submetido à mucosite oral (Figura 22B). O tratamento com alanil-glutamina (Figura 22D) ou glutamina (Figura 22E), reduziu a quantidade de células TUNEL positivas, sugerindo a diminuição de células em apoptose, em relação ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina 0,9% (Figura 22C). O controle negativo representa uma amostra mucosa aonde a enzima TdT foi substituída pelo *reaction buffer* e não mostra marcação para células TUNEL positivas (Figura 22A).

---

<sup>8</sup> Para melhor compreensão desta seção, a Figura 22 foi dividida em 5 partes, cada uma delas foram identificadas seqüencialmente com as letras A; B; C; D e E, sendo citadas no texto da seguinte forma: Figura 22A.....Figura 22E.

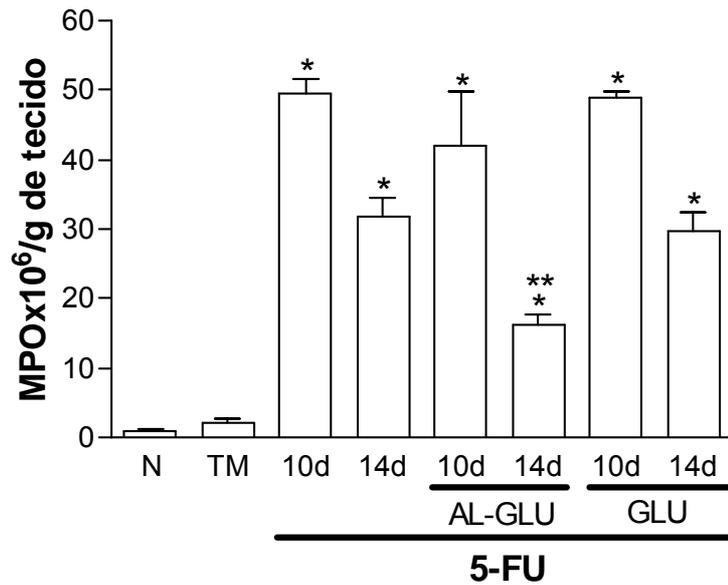


Figure 21 - Efeito da glutamina e alanil-glutamina sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil (5-FU) e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam administrações orais de 0,5 ml de salina, glutamina (100mM) ou alanil-glutamina (100mM), uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico (TM) e, diariamente, até o sacrifício, no 10° ou 14° dias. Amostras de mucosa foram coletadas e congeladas em freezer - 20o C. As barras representam Média ± EPM da quantidade de MPO x 106/grama de mucosa jugal. \*p<0,05 representa diferenças estatísticas em relação aos animais normais (N) e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM). \*\*p < 0,05 representa diferença estatísticas em relação aos animais submetidos a mucosite experimental que receberam salina durante 14 dias (5-FU 14d). O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

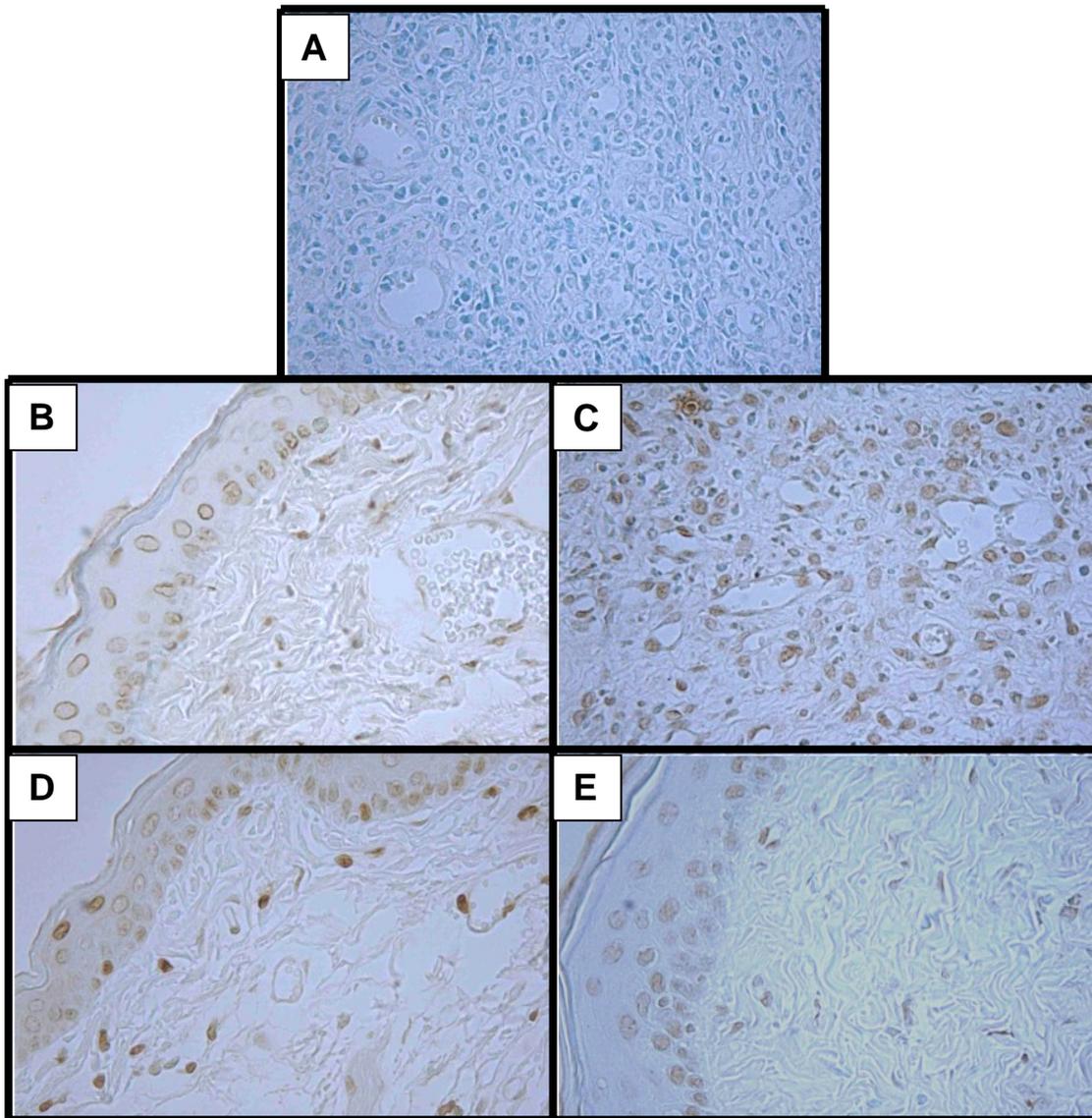


Figura 22 - Fotomicrografias de lâminas de mucosas jugais processadas para detecção de apoptose pelo método de TUNEL, de um animal normal (B) ou com mucosite oral experimental tratado com solução salina (C), glutamina (D), ou alanil-glutamina (E).

**Legenda:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil (5-FU) e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam administrações orais de 0,5 ml de salina, glutamina (100 mM) ou alanil-glutamina (100 mM), uma hora antes de cada injeção de 5-FU ou do trauma mecânico (TM). Amostras da mucosa jugal foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10º dia, colocadas em formal a 10% e processadas para a confecção de lâminas apropriadas para a detecção de

células TUNEL positivas (aumento de 400x). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal que não recebeu a enzima TdT que cataliza a adição dos nucleotídeos marcados à terminação OH do DNA fragmentado, passo fundamental para a marcação celular.

#### 4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra claramente que o tratamento de hamsters com aminoguanidina (AG) e *N*-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W), inibidores da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (NOSi) (GRIFFITHS *et al.*, 1993; MUSCARA; WALLACE, 1999; GARVEY *et al.*, 1997), reduziu, de forma significativa, os danos à mucosa oral causados pela mucosite induzida por 5-fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico. O tratamento com esses inibidores preveniu a infiltração de células inflamatórias, assim como o edema, a hemorragia e a formação de úlceras e abscessos. A administração de *N*φ-Nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME), um inibidor não específico da NOS (MONCADA *et al.*, 1991), entretanto, não foi capaz de prevenir as alterações inflamatórias da mucosite oral. Estes dados, em conjunto, sugerem a participação do óxido nítrico (NO), derivado da NOSi, na patogênese da mucosite oral induzida por 5- FU.

O óxido nítrico é uma molécula composta por um átomo de nitrogênio e oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado, o que o torna altamente reativo, com uma meia vida de 2 a 30 segundos. Dessa forma, após transmitir um sinal, transforma-se espontaneamente em nitrito e nitrato (CRISTOPHERSON *et al.*, 1997). NO é formado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), numa reação que combina oxigênio molecular com o nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina, liberando citrulina como co-produto. Três isoformas de NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOSn), inicialmente encontrada no cérebro (BREDT *et al.*, 1994; SESSA *et al.*, 1992), uma endotelial (NOSe), isolada em endotélio ( LAMAS *et al.*, 1992) e uma isoforma induzida (NOSi), isolada inicialmente em macrófagos (XIE *et al.*, 1992). Ambas NOSn e NOSe são constitutivamente expressas em seus leitos de origem, e por essa razão são referidas como enzimas NOS constitutivas (NOSc). Suas atividades são reguladas, principalmente, pela concentração do cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]$ . Dessa forma, o aumento do  $[Ca^{2+}]$  rapidamente ativa a NOSc,

pela ligação do complexo cálcio-calmodulina ao sítio para calmodulina na enzima. Este caminho de síntese de NO é caracterizado por sua liberação em pequenas quantidades (concentração picomolar) que pode ser rapidamente modulada por qualquer estímulo externo que altere a  $[Ca^{2+}]$ . O NO produzido por essa enzima regula várias respostas fisiológicas (EVANS; RALSTON, 1996). A níttrico óxido sintase induzida (NOSi), por sua vez, é principalmente regulada à nível transcripcional. Citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas são potentes indutoras da expressão dessa enzima em vários tipos de células, ao passo que, glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias como IL-4 e IL-10 e o fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ) suprimem a produção de NO por essa enzima (MONCADA *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1994). A ativação da NOSi, independe da concentração do cálcio intra-celular e resulta na liberação de grandes quantidades de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos (NATHAN; XIE, 1994).

Mucosite oral é um processo complexo iniciado pela injúria às células basais do epitélio e tecido subjacente pelas drogas quimioterápicas ou pela radiação. Além do efeito direto desses agentes na atividade proliferativa das células epiteliais (DUNCAN; GRANT, 2003), a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio constituem uma das etapas iniciais para o desenvolvimento da mucosite. As espécies reativas de oxigênio causam danos diretos às células, tecidos, vasos sanguíneos, além de estimular fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), que regula a expressão de múltiplos genes imunes e inflamatórios. Dessa forma, a ativação do NF- $\kappa B$  resulta na liberação de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias como, interleucina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (HALL *et al.*, 1995; KRENGER; FERRARA, 1999a, 1999b; SONIS *et al.*, 2000). Estudo realizado no nosso laboratório demonstra efeitos protetores significativos dos inibidores da síntese de citocinas, pentoxifilina e talidomida, induzida por 5-FU em hamsters na mucosite oral (LIMA *et al.*, 2005). Esses dados são corroborados por diversos estudos clínicos que sugerem a participação de TNF- $\alpha$  e IL-1 na fisiopatologia da mucosite oral induzida por radioterapia (EPSTEIN *et al.*, 1986; EPSTEIN *et al.*, 1989; EPSTEIN *et al.*, 2001).

A investigação da participação do óxido nítrico na mucosite oral induzida por 5-FU, portanto, teve como base vários trabalhos na literatura que demonstram que citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de NO e que o NO é um dos mediadores dos efeitos citotóxicos dessas citocinas na inflamação (ESTRADA *et al.*, 1992, LIU *et al.*, 2005; RALSTON *et al.*, 1994). Reforçando o papel do óxido nítrico em eventos inflamatórios, nosso grupo tem demonstrado a participação dessa molécula na patogênese de várias doenças inflamatórias, como a periodontite (LEITÃO *et al.*, 2004, 2005), artrite reumatóide (ROCHA *et al.*, 2002) e cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997). Estes resultados são reforçados por dados da literatura que também relatam a participação do NO em várias outras patologias inflamatórias (HUTCHESON *et al.*, 1990; KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994; PETROS *et al.*, 1991, PETROS *et al.*, 1994; BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1996; MIDDLETON *et al.*, 1993; STEFANOVIC-RACIC *et al.*, 1993; TEPPERMAN *et al.*, 1993; FANG, 1997; PARKINSON *et al.*, 1997; LAPPIN *et al.*, 2000; LOHINAI *et al.*, 2001; SINGER *et al.*, 1996; SORRELLS *et al.*, 1996; FORD *et al.*, 1997; UNNO *et al.*, 1997; DICKSON *et al.*, 1999).

O efeito protetor do 1400W e da aminoguanidina, observado no presente estudo, está associado à redução na infiltração de neutrófilos na mucosa oral, detectada pela análise histopatológica e pela atividade de mieloperoxidase. A mieloperoxidase é uma enzima microbicida presente em grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada amplamente como marcador da presença destas células no tecido inflamado (BRADLEY *et al.*, 1982). Nosso trabalho demonstrou, de fato, uma relação entre a atividade detectável de mieloperoxidase e a intensidade das lesões. O menor infiltrado neutrofílico observado nas mucosas jugais de hamsters tratados com 1400W ou AG é corroborado com estudos que demonstram que camundongos nocauteados para NOS<sub>i</sub>, ou animais tratados com inibidores da NOS, apresentaram redução significativa na migração neutrofílica induzida por enterotoxina B, produtos da parede bacteriana, carragenina ou zymosan (AJUEBOR *et al.*, 1998; CUZZOCREA *et al.*, 2000; FRANCO-PENTEADO *et al.*, 2001a, FRANCO-PENTEADO *et al.* 2001b). Outros estudos sugerem, contudo, que o NO regula negativamente a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, resultando na diminuição do influxo de neutrófilos ao sítio inflamado (PENG *et al.*, 1998; KUBES *et al.*, 1991; DAL SECCO *et al.*, 2003). Uma explicação razoável para

essa controvérsia pode estar relacionada ao efeito bifásico de NO, relatado em vários estudos, em diferentes modelos experimentais (WEI *et al.*, 1995; LEITÃO *et al.*, 2004; RALSTON *et al.*, 1995). No que diz respeito à migração de células inflamatórias, tem sido demonstrado que, enquanto baixos níveis de NO, produzidos pela NOS<sub>c</sub>, levariam à supressão da adesão de neutrófilos às células endoteliais (HICKEY *et al.*, 1994a, HICKEY *et al.*, 1994b), níveis mais elevados de NO, produzidos em processos inflamatórios, via NOS<sub>i</sub>, em resposta às citocinas, estaria levando ao aumento da migração e ao dano tecidual, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (AJUEBOR *et al.*, 1998). Uma possível explicação pode ser atribuída à formação de peroxinitrito, durante os eventos inflamatórios, a partir da reação entre o NO e produtos reativos de oxigênio (CROW; BECKMAN, 1996; SZABO, 1996; SZABO *et al.*, 1997), ambos produzidos concomitantemente em resposta às citocinas pró-inflamatórias (CUZZOCREA *et al.*, 1998). O peroxinitrito promove peroxidação lipídica (RADDI *et al.*, 1991b; RUBBO *et al.*, 1994), oxidação de proteínas (RADDI *et al.*, 1991a), além da nitrosilação de resíduos de tirosina de uma grande variedade de proteínas, resultando na inativação de enzimas e/ou de receptores (BECKMAN, 1996; BRENNER *et al.*, 1997; ISCHIROPOULOS *et al.*, 1992; KONG *et al.*, 1996; SZABO, 1996), com conseqüente injúria tecidual, maior infiltração de células inflamatórias e amplificação da inflamação. Ademais, tem sido demonstrado, que o NO produzido em grandes quantidades pela NOS<sub>i</sub>, promove a liberação de vários mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas, que por sua vez, induzem a liberação de quantidades adicionais de NO (HIERHOLZER *et al.*, 1998; AJUEBOR *et al.*, 1998; BRENNER *et al.*, 1997) e que a inibição da NOS acarreta no aumento da produção da interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória (MUHL; DINARELLO, 1997). Portanto, o menor influxo de neutrófilos observado nas mucosas jugais de hamsters tratados com AG ou 1400W, provavelmente, deve-se à supressão da produção de NO pela NOS<sub>i</sub> e suas conseqüências.

Por outro lado, observou-se que o inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, (MONCADA *et al.*, 1991) não preveniu, de forma significativa, as lesões induzidas pela mucosite oral experimental, tampouco, a infiltração de neutrófilos, observada na análise histopatológica e no ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase. De forma contrária, o tratamento com L-NAME promoveu um aumento significativo da

atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental. Em concordância com esse dado, foi demonstrado que na disfunção endotelial, que resulta na supressão dos níveis basais de NO, observou-se supra-regulação das moléculas de adesão, particularmente de P-selectina, acarretando no aumento da migração de células inflamatórias e no maior dano tecidual (LEFER; LEFER, 1996). Adicionalmente, foi demonstrado que inibidores da NOS, incluindo L-NAME, aumentam a adesão leucocitária em endotélio mesentérico de gato, possivelmente devido a regulação positiva da expressão das moléculas de adesão CD11/CD18 (SZABO, 1996), uma vez que esse efeito foi revertido por anticorpos monoclonais contra CD18 (KUBES *et al.*, 1991). Portanto, a inibição da isoforma constitutiva da NOS pelo L-NAME pode explicar sua falta de efeito na prevenção da mucosite oral induzida por 5-FU, e a maior infiltração de neutrófilos nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral e tratados com L-NAME. Em suma, esses resultados sugerem que níveis basais de NO são essenciais para a manutenção da homeostase, enquanto níveis elevados de NO, produzidos pela NOSi durante as reações inflamatórias, contribuem para o dano tecidual local (BRENNER *et al.* 1997; AJUEBOR *et al.*, 1998; HIERHOLZER *et al.*, 1998; LOHINAI *et al.*, 1998).

O aumento significativo da atividade da NOS, dos níveis de nitrito e, mais especificamente, da marcação imunohistoquímica para NOSi, detectados no 10º dia de experimento, nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por 5-FU e trauma mecânico, confirmam o envolvimento do óxido nítrico na fisiopatologia dessa condição inflamatória. Esses achados são corroborados por um estudo, realizado por Sonis e colaboradores, no qual demonstra-se a expressão do gene para NOSi em mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral por radiação (SONIS *et al.*, 2002). A participação do NO na patogênese da mucosite oral induzida por quimioterápicos, no entanto, não havia sido descrito na literatura, até a publicação dos resultados apresentados nesse estudo (LEITÃO *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que no presente trabalho, observou-se marcação imunohistoquímica para NOSi mesmo no epitélio da mucosa de hamster normal, não submetido à mucosite oral. Provavelmente, esse resultado deve-se à expressão da NOSi no epitélio da mucosa oral, em resposta ao ambiente bucal, normalmente

contaminado. Estudos adicionais, no entanto, são necessários para confirmar essa hipótese. Observou-se também uma diminuição considerável da marcação imunohistoquímica para NOSi nas células da lâmina própria da mucosa oral dos animais submetidos à mucosite oral por 5-FU e trauma mecânico e tratados com AG ou 1400W, quando comparados à marcação encontrada na mucosa oral de animais submetidos à mucosite que receberam solução salina. Esse achado, provavelmente é uma consequência da menor lesão inflamatória, em função da menor produção de NO no tecido conjuntivo das mucosas jugais dos animais tratados com AG ou 1400W. É importante ressaltar que AG e 1400W bloqueiam a produção de NO por competirem com a L-arginina pelo sítio ativo da enzima, não sendo relatado consensualmente, a inibição da expressão da enzima por esses agentes.

O efeito protetor da aminoguanidina e do 1400W na mucosite oral experimental também pode estar relacionado à diminuição da morte celular, visto que o tratamento com esses inibidores da NOS reduziu claramente a marcação de células TUNEL positivas, sugerindo diminuição de células apoptóticas, em relação ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina. De fato, a apoptose participa da fisiopatologia da mucosite oral induzida por quimioterápicos (SONIS *et al.*, 2004) e vários estudos demonstram que altas concentrações de NO induzem apoptose em vários tipos de células (BECKMAN *et al.*, 1996; BRUNE *et al.*, 1998; UEHARA *et al.*, 1999; KANAOKA *et al.*, 2000), por diferentes mecanismos, dentro os quais, inibição reversível da respiração mitocondrial, inativação irreversível das enzimas mitocondriais e/ou indução da permeabilidade mitocondrial transitória (MURPHY, 1999). Corroborando com esse dado, tem sido demonstrado que a produção excessiva de NO contribui para o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas, (HANTRAYE *et al.*, 1996; PRZEDBORSKI *et al.*, 1996), e inflamatórias (YAGMUR *et al.*, 2007), via indução de apoptose.

No presente estudo, observou-se ainda, no 4º dia de experimento, diminuição da produção salivar não estimulada, no grupo submetido à mucosite oral experimental por 5-FU que recebeu solução salina, em comparação ao grupo de animais normais. A diminuição da produção salivar foi previamente relatada em pacientes com câncer no trato gastrointestinal tratados com 5-FU (McCARTHY *et al.*,

1998), assim como em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço (ROSÁRIO *et al.*, 2005), ambos por mecanismos não esclarecidos. De fato, é aceitável que alterações na composição e quantidade salivar, influencie a susceptibilidade da mucosa oral aos agentes citotóxicos, assim como sua capacidade de reparo (SONIS *et al.*, 2004), devido às suas ações protetoras. A saliva, além de lubrificar e higienizar os tecidos da cavidade oral, contém imunoglobulina A e substâncias antimicrobianas, como lactoferrina e lisozima, limitando o acesso de agentes potencialmente nocivos ao trato gastrointestinal. Contém ainda componentes bioativos, como fator de crescimento epidérmico que provavelmente apresentam efeitos proliferativos sobre o epitélio da mucosa oral (CHRISTENSEN *et al.*, 1996; EGEA *et al.*, 2002). Ademais, a xerostomia, condição causada pela falta ou diminuição de saliva, causa dificuldades na deglutição, afetando a ingestão de alimentos e comprometendo ainda mais o estado geral do paciente (ORD; BLANCHAERT, 2001). O tratamento com 1400W preveniu significativamente a diminuição da produção salivar, mensurada no 4º dia, no grupo de hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU, mantendo esse parâmetro semelhante ao encontrado no grupo controle normal e sugerindo uma possível participação do NO, via NOSi, na toxicidade do 5-FU nas glândulas salivares. Na avaliação da taxa salivar não estimulada, no 10º dia, não se observou diferenças significativas entre o grupo controle normal e os grupos submetidos à mucosite oral que receberam salina ou 1400W, provavelmente devido ao declínio das ações, diretas ou indiretas, do 5-FU nas glândulas salivares. Apesar do efeito do 1400W na produção salivar, demonstrado nesse trabalho, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar mais profundamente o papel do NO no efeito do 5-FU nas glândulas salivares e na produção salivar.

Continuando nosso estudo sobre o papel do NO na mucosite induzida por agentes antineoplásicos, o presente trabalho demonstrou ainda que o tratamento de ratos submetidos à mucosite intestinal por MTX, com L-NAME ou AG, preveniu as alterações morfológicas intestinais induzidas por MTX, como encurtamento de vilos e necrose de criptas.

Mucosite intestinal é um efeito colateral da quimioterapia do câncer que leva à importantes alterações, como diminuição da absorção de nutrientes, aumento da

permeabilidade intestinal, diarréia recorrente e perda de peso, comprometendo o estado geral do paciente (DUCAM ; GRANT, 2003).

Metotrexato é uma droga citotóxica causadora de danos às células de rápida divisão, como as células epiteliais das criptas intestinais, diminuindo, dessa forma, a renovação celular. Nosso grupo demonstrou anteriormente que a administração de MTX em ratos causa atrofia de vilos, diminuição da função de barreira e redução da área de superfície absorptiva (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). Como consequência da perda da função de barreira, o sistema imune da mucosa é exposto a vários estímulos microbianos, como lipopolissacarídeos, respondendo com a liberação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (TSUJI *et al.*, 2003).

De fato, estudos demonstram a participação de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da mucosite intestinal (HALL *et al.*, 1995; KONING *et al.*, 2006). Conforme já citado, citocinas especialmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a expressão da NOSi, com conseqüente produção de NO (ESTRADA *et al.*, 1992; RALSTON *et al.*, 1994). Portanto, de acordo com os dados apresentados, NO, via NOSi, estaria contribuindo para os danos à mucosa intestinal, de forma semelhante à sua participação na mucosite oral induzida por 5-FU, conforme demonstrada no nosso estudo (LEITÃO *et al.*, 2007). Dados da literatura sugerem, entretanto, que pequenas quantidades de NO, produzidos pela isoforma constitutiva da NOS desempenha papel homeostático no trato gastrointestinal (POTOKA *et al.*, 2002).

A participação da NOSi no desenvolvimento da mucosite intestinal por MTX, descrita neste trabalho, é reforçada pelo claro aumento da expressão dessa enzima, detectado por imunohistoquímica e por western blot em segmentos de jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal por MTX que receberam solução salina. Corroborando com nossos dados, o aumento da expressão e atividade da NOSi foi previamente constatado em modelo de colite em rato (SEO *et al.*, 1995) e em modelo de ileíte em cobaia, sendo nesse último, também prevenido pela administração de L-NAME (MILLER *et al.*, 1993). Da mesma forma, no nosso trabalho, o L-NAME reduziu as alterações morfológicas e inflamatórias induzidas pelo MTX na mucosite intestinal. Esse dado difere dos aqui apresentados anteriormente para mucosite oral, onde o L-NAME não foi capaz de prevenir as

alterações inflamatórias induzidas por 5-FU, e sugere a participação do NO, via NOS<sub>c</sub>, no desenvolvimento da mucosite intestinal, visto ser o L-NAME um inibidor não específico da NOS (MONCADA et al., 1991). Uma possível explicação para os diferentes resultados encontrados na mucosite oral e intestinal, em relação à participação da NOS<sub>c</sub> e NOS<sub>i</sub>, pode ser atribuída à respostas distintas das mucosas oral e intestinal frente à agressão. É importante enfatizar as diferenças embrionárias dos epitélios da mucosa oral (ectoderma) e intestinal (endoderma). Além disso, o fato dos estudos terem sido realizados em espécies animais diferentes pode ter contribuído para esses resultados.

No presente estudo, foi observado diminuição da expressão da NOS<sub>i</sub>, detectada por western blot, no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal com MTX e tratados com AG ou L-NAME. Provavelmente esse resultado, conforme discutido para mucosite oral, seja uma consequência da redução da inflamação no tecido conjuntivo, por esses inibidores da NOS.

A marcação imunohistoquímica para NOS<sub>i</sub> foi mais evidente nos neutrófilos situados dentro e nos arredores das criptas necróticas dos animais submetidos à mucosite intestinal por MTX e que receberam salina, sugerindo a forte participação do NO liberado por essas células na destruição das criptas intestinais, resultando em retardo da recuperação das células de revestimento dos vilos. A importância dos neutrófilos nessa condição inflamatória foi mais uma vez confirmada pelo aumento da atividade de mieloperoxidase no jejuno dos animais do grupo MTX (submetidos à mucosite intestinal que receberam salina). Foi observado ainda que o efeito protetor do L-NAME e AG está associado à redução da infiltração neutrofilica, constatado tanto pela histopatologia, quanto pela atividade de mieloperoxidase.

Embora estudos clássicos demonstrem a regulação negativa de moléculas de adesão pelo NO (KUBES *et al.*, 1991; PENG *et al.*, 1998), o resultado apresentado no presente estudo é corroborado por um outro trabalho, o qual demonstra que o L-NAME inibiu a formação de edema induzido por carragenina, um agente inflamatório conhecido por promover aumento da permeabilidade vascular às custas da infiltração de leucócitos (MARTIN *et al.*, 1994). Acredita-se que o menor infiltrado inflamatório observado nos segmentos de jejuno dos animais tratados com L-NAME

e AG seja resultado da liberação diminuída de NO, com diminuição na formação de peroxinitrito, um potente oxidante, o qual pode causar danos teciduais (RADI *et al.*, 1991a, RADI *et al.*, 1991b; BECKMAN; KOPPENOL, 1996; KONG *et al.*, 1996; GOW *et al.*, 1996), levando à amplificação da resposta inflamatória e conseqüentemente, maior infiltração de células inflamatórias, conforme já discutido neste trabalho para a mucosite oral. Reforçando essa hipótese, estudos demonstram a participação de NO, via formação de peroxinitrito, no desencadeamento da injúria à mucosa intestinal, em condições clínicas associadas à expressão acentuada de NOSi no intestino, provavelmente via apoptose de enterócitos dos vilos intestinais, resultando numa área descoberta, sem células, susceptível à bactérias e seus produtos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; POTOKA *et al.*, 2002). A indução de apoptose por peroxinitrito tem sido descrito em vários tipos de células (LIN *et al.*, 1998; BATINELLI; LOSCALZO, 2000; CASSINA *et al.*, 2002; ESTEVEZ; JORDAN, 2002; JOVANOVIC *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2004; OIAO *et al.*, 2005), incluindo as células epiteliais intestinais (SANDOVAL *et al.*, 1997a, SANDOVAL *et al.*, 1997b; POTOKA *et al.*, 2003).

A apoptose de células epiteliais da mucosa intestinal e de criptas fazem parte dos mecanismos desencadeadores da mucosite intestinal (PARIS *et al.*, 2001,). Um estudo clínico demonstrou que a mucosite intestinal induzida por quimioterápicos está associada à apoptose de criptas, detectada pelo método de TUNEL (KEEFE *et al.*, 2000). Demonstrou-se também apoptose induzida por MTX em linhagem celular epitelial de ratos (PAPACONSTANTINO *et al.*, 2001). Corroborando com esses trabalhos, observou-se, no presente estudo, aumento acentuado de células TUNEL positivas no jejuno de animais submetidos à mucosite intestinal, quando comparado à marcação observada no jejuno de um animal do grupo controle normal, sugerindo o envolvimento da apoptose no mecanismo de citotoxicidade do MTX. Demonstrou-se ainda no nosso trabalho, que o tratamento com L-NAME ou AG foi capaz de prevenir a morte celular, detectada pela diminuição da marcação de células TUNEL positivas sugerindo que o NO deve ser um mediador envolvido na indução de morte celular na mucosite intestinal induzida por MTX.

O presente estudo demonstrou que a administração do substrato verdadeiro da NOS, L-arginina, simultaneamente à administração do L-NAME, não foi capaz de

reverter os efeitos do L-NAME em nenhum dos três segmentos do intestino delgado. O L-NAME é um análogo estrutural da L-arginina, atuando como falso substrato enzimático, ocupando os sítios de ligação entre a L-arginina e a NOS (KNOWLES; MONCADA, 1994). A inibição da enzima por esse substrato análogo pode ser revertida pela aplicação simultânea de concentrações molares equivalentes de L-arginina, o que é consistente com o seu bloqueio competitivo do sítio ativo da enzima (BREDT; SNYDER, 1994). No presente estudo, objetivando investigar se o efeito benéfico do L-NAME na mucosite intestinal deve-se à sua ação específica sobre o bloqueio da NOS, administraram-se injeções simultâneas de L-NAME e L-arginina em um grupo de ratos submetidos à mucosite intestinal por MTX. De forma surpreendente, observou-se, entretanto, que os animais desse grupo específico, apresentaram vilos menos achatados, assim como criptas mais íntegras, quando comparado ao grupo tratado apenas com L-NAME. Essa diferença é estatisticamente significativa nos segmentos de jejuno e íleo e, possivelmente, deve-se a um outro papel da L-arginina, independente de seu efeito na síntese de NO.

L-arginina é um aminoácido não essencial, que possui múltiplas propriedades biológicas e desempenha vários papéis no organismo, incluindo a liberação de hormônios, síntese de colágeno durante processos de cicatrização, além de participar de respostas imunes e inflamatórias (KIRK; BARBUL, 1990; SUCHNER *et al* 2002). Por esses motivos, a L-arginina é especialmente importante durante a recuperação após estados catabólicos (GRABON, 2006). Foi relatado que a suplementação dietética com arginina, em modelo experimental de ileite, resultou na diminuição do tempo de cicatrização das úlceras (SUKUMAR *et al.*, 1997) e estimulou a recuperação da mucosa do intestino delgado após injúria por radiação (GURBUZ *et al.*, 1998). Um trabalho recente mostra ainda que a administração oral de arginina diminuiu o dano intestinal causado por endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos em ratos (SUKHOTNIK *et al.*, 2005). Os mecanismos responsáveis por esses efeitos positivos, todavia, não estão esclarecidos. Foi sugerido que a liberação de hormônio de crescimento ou produção de poliaminas, a partir de arginina e ornitina, seriam responsáveis pelos efeitos benéficos da arginina exógena na recuperação da mucosa após isquemia/reperfusão (CYNOBER, 1994). Ademais, foi demonstrado previamente o papel das poliaminas na manutenção da integridade do epitélio intestinal (WANG, 1995) sugerindo que a biossíntese desse

aminoácido, influencia o crescimento normal da mucosa e a proliferação celular (WANG *et al.*, 1991).

Não se pode excluir, todavia, a possibilidade do efeito protetor da L-arginina, observado no presente trabalho, ser conseqüência da produção de grandes quantidades de NO, lembrando que a L-arginina é o substrato verdadeiro para sua síntese. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado em nosso laboratório, no qual foi constatado o efeito bifásico do NO na reabsorção óssea, em modelo de periodontite experimental. Neste estudo, a inibição da síntese de NO, pela administração sistêmica de L-NAME ou AG, foi capaz de prevenir a perda óssea, característica da doença periodontal. De forma contraditória, a aplicação local do doador de NO, isossorbida, também reduziu significativamente a reabsorção óssea (LEITÃO *et al.*, 2004). De fato, o efeito dual do NO tem sido extensivamente relatado (WEI *et al.*, 1995; RALSTON *et al.*, 1995). Em concordância com esse dado, um estudo demonstrou efeito protetor da L-arginina, via aumento na produção de NO, na injúria por reperfusão após transplante pancreaticoduodenal em ratos (YUAN *et al.*, 2004).

Em suma, os resultados apresentados aqui demonstram que a inibição da NOS protege significativamente a mucosa intestinal contra os danos induzidos por MTX. Nossos dados, mostrando um aumento da expressão da NOSi reforçam a participação do NO no dano da mucosa intestinal durante o tratamento com MTX.

Considerando os dados demonstrados no presente trabalho, mostrando o papel relevante do NO na mucosite oral e intestinal e a prevenção das lesões associadas a esta condição por inibidores de sua síntese, torna-se razoável especular que a sua modulação possa vir a ser no futuro uma opção na prevenção e/ou tratamento destas condições. Obviamente esta opção está condicionada ao surgimento de novos moduladores seguros para uso em humanos. Nesse contexto, é importante uma breve discussão sobre o papel do óxido nítrico e de suas isoenzimas no crescimento do tumor, após revisão da literatura. A expressão de NOS e a produção de NO tem sido detectada em vários tumores humanos. As células tumorais normalmente expressam NOSi e, em alguns casos, NOSe e NOSn, dependendo do tipo do tumor e de seu estágio. No entanto, no que diz respeito ao

papel do NO na progressão do câncer, têm sido relatados dados conflitantes; estudos demonstram que o NO pode promover ou inibir o crescimento tumoral e a metástase. Esses efeitos opostos parecem depender de alguns fatores, tais como, a concentração e o tempo de exposição ao NO, além da sensibilidade da célula tumoral à essa molécula. Ainda não foram desenvolvidos até o momento, estudos pré-clínicos esclarecendo a relação entre produção de NO, função linfática e metástase no desenvolvimento do câncer (FUKUMURA *et al.*, 2006). Estudos adicionais aos atualmente divulgados na literatura, portanto, são necessários no sentido de definir o papel do NO e de suas enzimas associadas, na evolução do tumor, considerando sempre as diferenças entre os vários tipos de câncer e o estágio no qual se encontram. Mesmo após a definição do papel do NO no câncer e, caso seja confirmado a vantagem de sua modulação, o uso localizado no tumor seria vantajoso em relação ao sistêmico, considerando o papel crítico da NOSe na homeostasia de vários sistemas fisiológicos, como por exemplo, o cardiovascular.

Por fim, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da suplementação de glutamina e de seu derivado estável, alanil-glutamina, na prevenção da mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters, assim como na fase de cicatrização das lesões características dessa condição inflamatória. Inicialmente detectamos que o 5-FU induziu uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de glutamina no grupo de hamsters submetidos à mucosite oral por esse quimioterápico, em relação ao grupo controle normal, no 10º dia de experimento. De acordo com esse resultado, tem sido amplamente demonstrado declínio da concentração de glutamina plasmática na vigência de estados catabólicos, como injúria e infecção (DECOMBAZ *et al.*, 1979; ASKANAZI *et al.*, 1980; VENTE *et al.*, 1989; LACEY; WILMORE, 1990; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1990, 1992; PETERSEN *et al.*, 1996; FURUKAWA *et al.*, 2000). Esse fato é relevante, especialmente em indivíduos susceptíveis, como pacientes em recuperação pós-operatória, recém-nascidos de baixo peso, ou ainda indivíduos com câncer (NEU; DEMARCO, 2002). Ademais, demonstrou-se que o crescimento tumoral depleta os estoques de glutamina do indivíduo acometido, resultando em caquexia (MEDINA, 2001; JOHNSON *et al.*, 2003). Tem sido relatado que pacientes com câncer de cabeça e pescoço são naturalmente depletados de glutamina (KUBOTA *et al.*, 1992), condição que pode ser exacerbada pelos efeitos

do tratamento do câncer, como sugerido pelos dados apresentados no nosso estudo.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante nos músculos e sangue de seres vivos (MURPHY; NEWSHOLME, 1999). Sua molécula compreende cinco carbonos e tem muitas funções metabólicas importantes, tais como: combustível oxidativo, transferência de nitrogênio e carbono entre tecidos, regulação na homeostasia ácido-base, como precursora da amônia excretada pelo rim, além de ser uma molécula precursora da gliconeogênese, da biossíntese de purinas, de pirimidinas (e, conseqüentemente, ácidos nucléicos) e de outros aminoácidos. Dessa forma, a glutamina é muito importante para os processos mitóticos por exercer um papel essencial na geração de energia e na síntese de precursores de macromoléculas celulares. Além disso, sabe-se que o crescimento tumoral está associado ao ávido consumo de glutamina pelas células do tumor e à menor atividade de células natural killer devido à diminuição das concentrações de glutathione nessas células (MEDINA 2001). A glutathione é o principal antioxidante intracelular, envolvida em várias funções biológicas, sintetizada a partir da glutamina. Esses dados nos levam a supor, por conseguinte, que a suplementação de glutamina em pacientes com câncer poderia apresentar efeitos benéficos, restaurando os níveis de glutathione nas células de defesa do tipo natural killer, o que resultaria no fortalecimento do processo de defesa do organismo. De fato, estudos experimentais, em ratos, indicam que o suplemento dietético de glutamina foi capaz de diminuir o crescimento tumoral por restaurar a função dessas células (FAHR *et al.*, 1994; YOSHIDA *et al.*, 1995). Um estudo clínico recente, em pacientes com câncer de mama demonstrou que a administração oral de glutamina não interferiu com o efeito do tratamento quimioterápico no crescimento do tumor (LI *et al.*, 2006). Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que a glutamina, e especialmente a alanil-glutamina, têm efeitos expressivos na proteção da mucosa intestinal contra a agressão por 5-FU e toxinas bacterianas (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004b; BRITO *et al.*, 2005). Estes dados, em conjunto, nos estimularam a estudar o efeito da glutamina e alanil-glutamina na evolução das lesões encontradas na mucosite oral induzida por 5-FU.

Apesar da administração de glutamina ou alanil-glutamina, na dose utilizada nesse estudo, ter sido suficiente para reverter o efeito do 5-FU na diminuição dos níveis séricos de glutamina, e também para aumentar significativamente os estoques de glutatona nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental, não foi capaz de prevenir as lesões induzidas pela mucosite oral por 5-FU, observadas no 10º dia. Esses resultados, apesar de inesperado, provavelmente estão associados ao efeito direto do agente quimioterápico utilizado, que não pode ser revertido pela glutamina. O 5-FU atua como potente antimetabólito ligando-se à enzima timidilato sintetase, inibindo-a. Tal atividade resulta em inibição da síntese do ácido timidílico e comprometimento da síntese de DNA e, conseqüentemente, do crescimento celular (PINEDO; PETERS, 1988). O efeito direto do 5-FU sobre as mitoses de células de rápida divisão celular, presentes nas camadas basais do epitélio oral, desempenha papel importante no desenvolvimento da mucosite oral, visto que diminui a taxa de renovação epitelial, resultando em alterações atróficas da mucosa e, eventualmente, ulceração (GUGGENHEIMER *et al.*, 1977; LOCKHART; SONIS, 1991). Diante do exposto, apesar da glutamina ser essencial para a proliferação celular, e um substrato metabólico importante para as células de rápida divisão celular (NEWSHOLME *et al.*, 1988), a suplementação de glutamina, tampouco de alanil-glutamina, não foi capaz de antagonizar os efeitos do 5-FU na inibição da proliferação celular, 10 dias após sua primeira administração. Estudos clínicos demonstraram resultados semelhantes, aonde a suplementação de glutamina ou de alanil-glutamina, não apresentaram nenhum efeito na mucosite oral em pacientes transplantados (PYTLÍK *et al.*, 2002), tampouco em pacientes com câncer gastrointestinal (OKUNO *et al.*, 1999), fazendo uso de 5-FU.

Os aspectos macroscópicos observados no 10º dia foram confirmados pela análise histopatológica, a qual constatou vasodilatação, acentuada infiltração de células inflamatórias, áreas hemorrágicas, edema, ulcerações e abscessos nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite experimental que receberam salina, assim como nos grupos tratados com glutamina ou alanil-glutamina.

O 14º dia de experimento foi selecionado para a avaliação do efeito da glutamina e alanil-glutamina na fase de cicatrização das lesões induzidas por 5-FU e trauma mecânico, baseado em estudos prévios de nosso grupo (LIMA *et al.*, 2005).

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração diária de glutamina ou alanil-glutamina reduziu o tempo de cicatrização das lesões características da mucosite oral, com diminuição dos parâmetros inflamatórios, avaliados 14 dias após a primeira administração de 5-FU, quando comparados ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina. Uma explicação razoável para esse fato pode estar relacionada ao declínio da ação antimetabólica do 5-FU, o que permitiu que a glutamina e alanil-glutamina exercessem suas ações proliferativas. Nosso grupo obteve resultado semelhante em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos, o qual demonstrou que, apesar de glutamina, tampouco alanil-glutamina, não terem sido capazes de prevenir as lesões intestinais causadas pelo 5-FU, a alanil-glutamina foi capaz de acelerar a recuperação da mucosa intestinal, de forma significativa (CARNEIRO-FILHO, 2004b). Esse efeito positivo da glutamina e alanil-glutamina é associado à diminuição da infiltração neutrofílica, detectada pela histopatologia e pela redução significativa da atividade de mieloperoxidase, observada no grupo submetido à mucosite oral e tratados com glutamina ou alanil-glutamina. Esses resultados corroboram com estudos prévios realizados no nosso laboratório, os quais demonstraram aumento significativo da atividade de mieloperoxidase em ratos depletados de glutamina e submetidos à edema de pata por carragenina ou pela toxina A do *Clostridium difficile*. Esse estudo demonstrou ainda que a reposição de glutamina foi capaz de reverter esse efeito inflamatório (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Alguns aspectos devem ser considerados para justificar os benefícios da suplementação de glutamina na redução do tempo de cicatrização, observado nesse estudo. Em primeiro lugar, a glutamina é capaz de ativar a ornitina descarboxilase, a primeira enzima da síntese de poliamina, de forma dose-dependente, com conseqüente aumento da síntese de DNA. Ademais, glutamina ativa também a sinalização mitótica, incluindo proteínas quinases ativadoras de mitose e de fatores de transcrição, resultando em respostas proliferativas (KANDIL *et al.*, 1995; RHOADS *et al.*, 1997). Em segundo lugar, tem sido demonstrado o papel positivo da glutamina no sistema imune e na síntese de glutathione, reduzindo o estresse oxidativo (HONG *et al.*, 1992; DENNO *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996, 1999, AMORES-SANCHEZ; MEDINA, 1999), importante desencadeador da mucosite oral (SONIS *et al.*, 2004). De fato, demonstrou-se nesse estudo, aumento dos estoques de

glutathione, no 10º dia, nas mucosas jugais de hamsters com mucosite oral induzida por 5-FU e tratados com glutamina ou alanil-glutamina.

Apesar da cisteína e outros compostos tióis serem considerados limitantes na biossíntese de glutathione, foi demonstrado que na vigência de estresses metabólicos, a glutamina é essencial para a restauração dos níveis depletados de glutathione (WELBOURNE , 1979; HONG *et al.*, 1982; WELBOURNE; DASS *et al.*, 1982).

Glutathione, o principal antioxidante intracelular, está envolvida em várias funções biológicas, incluindo a varredura de radicais livres, defesa contra xenobióticos e carcinogênicos, reações redox e biossíntese de DNA e proteínas (JOHNSON *et al.*, 2003), sendo essencial para o funcionamento celular normal (DENNO *et al.*, 1996). Ademais, glutathione apresenta efeito inibitório da síntese de várias citocinas (KARMALI, 1984; BUCKLEY *et al.*, 1991). Os resultados desse estudo sugerem que o aumento da biodisponibilidade de glutamina, como consequência da administração exógena, foi capaz de restaurar gradativamente os níveis de glutathione, o que pode ter diminuído a geração de radicais livres e estresse oxidativo e resultando em maior proteção e proliferação celulares. No 5º dia após a primeira administração de 5-FU, glutamina e tampouco alanil-glutamina não foram capazes de reverter o efeito do 5-FU sobre os estoques de glutathione (dado não mostrado). Esse resultado, em parte, pode explicar o efeito tardio dessas substâncias na mucosite oral induzida por 5-FU.

Em suma, demonstrou-se que o 5-FU reduziu significativamente os níveis de glutamina no soro de hamsters, assim como os estoques de glutathione nas mucosas jugais desses animais. A administração de glutamina ou alanil-glutamina, não foi capaz de prevenir as alterações inflamatórias, observados no 10º dia de mucosite oral induzida por 5-FU. No entanto, os animais submetidos à mucosite oral por 5-FU tratados com essas substâncias apresentaram reduções dos parâmetros inflamatórios e aumento considerável das áreas de re-epitelialização, observados no 14º dia de experimento, quando comparados aos animais submetidos à mucosite oral que receberam salina. Em outras palavras, a glutamina, assim como a alanil-glutamina, não foram capazes de prevenir a mucosite oral por 5-FU, mas foram

eficazes em acelerar a cicatrização ou recuperação das lesões, reduzindo, de forma significativa, as alterações inflamatórias avaliadas.

## 5 CONCLUSÕES

- Os inibidores da NOS preveniram as mucosites oral e intestinal, induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato, sugerindo o papel do óxido nítrico na fisiopatologia dessas alterações inflamatórias. De acordo com os resultados apresentados, pode-se sugerir a participação do NO produzido pela NOSi na mucosite oral e pelas isoformas NOSc e NOSi na mucosite intestinal.
- A participação do óxido nítrico nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato é reforçada pela maior atividade de NOS na mucosite oral e pela maior expressão da enzima NOSi, detectadas tanto na mucosite oral e intestinal.
- A glutamina e seu derivado alanil-glutamina em doses capazes de restaurar os níveis séricos de glutamina e os níveis teciduais de glutathione, não preveniram a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil, no entanto, aceleraram a recuperação da mucosa reduzindo a inflamação e promovendo reepitelização.

## 6 REFERÊNCIA

AHMED, T., ENGELKING, C., SZALYGA, J., HELSON, L., COOMBE, N., COOK, P., CORBI, D., PUCCIO, C., CHUN, H., MITTELMAN, A. Propantheline prevention of mucositis from etoposide. **Bone Marrow Transplant.**, v. 12, n.2, p. 131-132, 1993.

AJUEBOR, M.N., VIRAG, L., FLOWER, R.J., PERRETTI, M., SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology.** v. 95, n. 4, p. 625-630, 1998.

ALICAN, I., KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **Am J Physiol.**, v. 270, p. G225-237, 1996.

ALTMANN, G.G. Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. **Am J Anat.**, v. 140, n. 2, p. 263-279, 1974.

AMORES-SANCHEZ, M.I., MEDINA, M.A. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. **Mol Genet Metab.** v. 67, n. 2, p. 100-1005, 1999.

ANDERSON, P.M., RAMSAY, N.K., SHU, X.O., RYDHOLM, N., ROGOSHESKE, J., NICKLOW, R., WEISDORF, D.J., SKUBITZ, K.M. Effect of low-dose oral glutamine on painful stomatitis during bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 4, p. 339-344, 1998.

ANDERSON, P.M., SCHROEDER, G., SKUBITZ, M.D. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. **Cancer**, v. 83, n. 7, p. 1433-1439, 1998.

ANILKUMAR, T. V., SARRAF, C. E., HUNT, T. AND ALISON, M. R. The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts. **Br. J. Cancer**, v. 65, p. 552, 1992.

ASKANAZI, J., CARPENTIER, Y.A., MICHELSEN, C.B., ELWYN, D.H., FURST, P., KANTROWITZ, L.R., GUMP, F.E., KINNEY, J.M. Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. **Ann Surg.**, v. 192: 78-85, 1980.

AUSTGEN, T.R., DUDRICK, P.S., SITREN, H., BLAND, K.I., COPELAND, E., SOUBA, W.W. The effects of glutamine-enriched total parenteral nutrition on tumor growth and host tissues. **Ann Surg.**, v. 215, n. 2, p. 107-113, 1992.

AWIDI, A., HOMSI, U., KAKAIL, R.I., MUBARAK, A., HASSAN, A., KELTA, M., MARTINEZ, P., SULAITI, S., AL QADY, A., JAMHOURY, A., DANIEL, M., CHARLES, C., AMBROSE, A., EL-ALOOSY, A.S. Double-blind, placebo-controlled cross-over study of oral pilocarpine for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patients with cancer. **Eur J Cancer.**, v. 37, n.16, p. 2010-2014, 2001.

BALIS F.M., SAVITCH J.L., BLEYER W.A., REAMAN G.H., POPLACK D.G. Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. **J Clin Oncol.** v. 3, n.4, p.485-489, 1985.

BARASCH A., PETERSON D.E. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol.**, v. 39, p. 91–100, 2003.

BARNES, P.J. Nuclear Factor  $\kappa$ B. **Int. J Biochem. Cell Biol.**, v.29, p.867-870, 1997.

BATTINELLI, E.; LOSCALZO, J. Nitric oxide induces apoptosis in megakaryocytic cell lines. **Blood.**, v. 95, n.11, p. 3451-3459, 2000.

BECKMAN, J.S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chem Res Toxicol.** v.9, n. 5, p.836-844. 1996.

BECKMAN, J.S, KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol.** v.271, p.1424-1437, 1996.

BELLM, L. A., EPSTEIN, J. B., ROSE-PED, A., MARTIN, P. AND FUCHS, H. J.. Patient reports of complications of bone marrow transplantation. **Support. Care Cancer** v. 8, p. 33, 2000.

BEVILACQUA, M.P., POBER, J.S., MENDRICK, D.L., COTRAN, R.S., GIMBRONE, M.A. JR. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 84, n. 24, p. 9238-9242, 1987.

BIDLIGMEYER, B.A., COHEN, S.A., TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J Chromatogr.**, v. 336, n.1, p. 93-104, 1984.

BISHOP, J.F., JOSHUA, D.E., LOWENTHAL, R.M., KRONENBERG, H., WHITESIDE, M.G., COBCROFT, R., DODDS, A., WOLF, M., MANOHARAN, A. A phase I-II study of cytosine arabinoside, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust N Z J Med.**, v.6, n.1, p. 48-51, 1986.

BLEYER, W. A. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. **Cancer**, v. 41, n.1, p. 36-51, 1978.

BLIJLEVENS N.M., DONNELLY J.P., PAUW B.E. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant**, v.25, p.1269–1278, 2000.

BLIX, I.J., HELGELAND, K. LPS from *Actinobacillus actino- mycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. **Eur J Sci.**, v. 106, p. 576-581, 1998.

BOGDAN C, VODOVOTZ Y, PAIK J, XIE Q, NATHAN C. Mechanism of supression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **J Leukocyte Biol.**, v. 55, p. 227-233, 1994.

BOUGHTON-SMITH, N.K., EVANS, S.M., HAWKEY, C.J., COLE, A.T., BALSITIS, M., WHITTLE, B.J., MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet.** v. 342, n. 8867, p. 338-40, 1993.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.**, v. 78, n.3, p. 206-209, 1982.

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. **Annu Rev Biochem.**, v. 63, p. 175-195, 1994.

BRENNER, T., BROCKE, S., SZAFER, F., SOBEL, R.A., PARKINSON, J.F., PEREZ, D.H., STEINMAN, L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** v. 158, n.6, p. 2940-2946, 1997.

BRITO, G.A., CARNEIRO-FILHO, B., ORIA, R.B., DESTURA, R.V., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. 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.

BRUNE, B., VON KNETHEN, A., SANDAU, K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur J Pharmacol.**, v.351, p. 261-272, 1998.

BUCKLEY, B.J., KENT, R.S., WHORTON, A.R. Regulation of endothelial cell prostaglandin synthesis by glutathione. *J Biol Chem.*, v. 266, n. 25, p. 16659-16666, 1991.

CABALLERO G.A., AUSMAN R.K., QUEBBEMAN E.J. Longterm, ambulatory, continuous IV infusion of 5-FU for the treatment of advanced adenocarcinomas. **Cancer Treat Rep.**, v. 69, n.1, p.13-15, 1985

CANNON, R.O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin Chem.**, v. 44, p. 1809-1819, 1998.

CAO, Y., KENNEDY, R., KLIMBERG, V.S. Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **J Surg Res.**, v. 85, n.1, p. 178-182, 1999.

CARNEIRO-FILHO, B.A., BUSHEN, O.Y., BRITO, G.A., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. Glutamine Analogues As Adjunctive Therapy for Infectious Diarrhea. **Curr Infect Dis Rep.** v. 5, n. 2, p.114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO, B.A., LIMA, I.P., ARAUJO, D.H., CAVALCANTE, M.C., CARVALHO, G.H., BRITO, G.A., LIMA, V., MONTEIRO, S.M., SANTOS, F.N., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Dig Dis Sci.**, v. 9, n.1, p. 65-72, 2004a.

CARNEIRO-FILHO, B.A., ORIA, R.B., WOOD REA, K., BRITO, G.A., FUJII, J., OBRIG, T., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition.**, v. 20, n.10, p.934-941, 2004b.

CASCINU, S., FEDELI, A., FEDELI, S.L., CATALANO, G. Oral cooling (cryotherapy), an effective treatment for the prevention of 5-fluorouracil-induced stomatitis. **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v. 30, p. 234-236, 1994.

CASSINA, P., PELUFFO, H., PEHAR, M., MARTINEZ-PALMA, L., RESSIA, A., BECKMAN, J.S., ESTEVEZ, A.G., BARBEITO, L. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. **J Neurosci Res.** v. 67, n.1, p. 21-29, 2002.

CERCHIETTI, L.C., NAVIGANTE, A.H., LUTTERAL, M.A., CASTRO, M.A., KIRCHUK, R., BONOMI, M., CABALAR, M.E., ROTH, B., NEGRETTI, G., SHEINKER, B., UCHIMA, P. Double-blinded, placebo-controlled trial on intravenous L-alanyl-L-glutamine in the incidence of oral mucositis following chemoradiotherapy in patients with head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v.65, n.5, p. 1330-1337, 2006.

CHANG, W.K., YANG, K.D., SHAIQ, M.F. Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells. **Clin Immunol.**, v. 93, n.3, p. 294-301, 1999.

CHEN, J.C., CHEN, H.M., SHYR, M.H., FAN, L.L., CHI, T.Y., CHI, C.P., CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J Formos Med Assoc.**, v. 99, n.3, p. 213–218, 2000.

CHEN, K., INOUE, M., OKADA, A. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in rat digestive tissues after endotoxin and its role in intestinal mucosal injury. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 224, n.3, p. 703-708, 1996.

CHI KH, CHEN CH, CHAN WK, CHOW KC, CHEN SY, YEN SH, CHAO JY, CHANG CY, CHEN KY. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on oral mucositis in head and neck cancer patients after cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy. **J Clin Oncol.**, v. 13, n. 10, p. 2620-2628, 1995.

CHOI, J.Y., LEE, K.M., NOH, D.Y., AHN, S.H., LEE, J.E., HAN, W., JANG, I.J., SHIN, S.G., YOO, K.Y., HAYES, R.B., KANG, D. Genetic polymorphisms of eNOS, hormone receptor status, and survival of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 100, n.2, p. 213-218, 2006.

CHRISTENSEN, M.E., HANSEN, H.S., POULSEN, S.S., BRET LAU, P., NEXO, E. Immunohistochemical and quantitative changes in salivary EGF, amylase and haptocorrin following radiotherapy for oral cancer. **Acta Otolaryngol.** v. 116, p. 137–143, 1996.

CHRISTOPHERSON, K.S., BREDT, D.S. Perspective series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Nitric oxide in excitable tissues: physiologic roles and disease. **J. Clin. Invest.**, v.100, p. 2424-2429, 1997.

COSTA ROSA, L.F., SAFI, D.A., CURI, R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. **J Leukoc Biol.**, v. 56, n.1, p. 10-14, 1994.

CRAWFORD J, O'ROURKE MA. Vinorelbine (Navelbine)/carboplatin combination therapy: dose intensification with granulocyte colony-stimulating factor. **Semin Oncol.**, v. 21, p. 73-78, 1994.

CROW, J.P., BECKMAN, J.S. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. **Adv Exp Med Biol.** v.387, p.147-161, 1996.

CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T.C., GARCIA, C., GUIMARÃES, A.R.P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 15-21, 1995.

CURTIS, D.R., JOHNSTON, G.A. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. **Ergeb Physiol.**, v. 69, n.0, p. 97-188, 1974.

CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., HAKE, P., SALZMAN, A.L., SZABO, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radic Biol Med.**, v. 24, n.3, p. 450–459, 1998.

CUZZOCREA, S., MAZZON, E., CALABRO, G., DUGO, L., DE SARRO, A., VAN DE LOO, F.A., CAPUTI, A.P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.162, n. 5, p.1859-1866, 2000.

CYBULSKY, M.I., GIMBRONE, M.A. JR. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. **Science**, v. 251, n. 4995, p. 788-791, 1991.

CYNOBER, L. Can arginine and ornithine support gut functions? **Gut**, v. 35, n. 1, p. 42-45, 1994.

DAL SECCO, D., PARON, J.A., OLIVEIRA, S.H.P., FERREIRA, S.H., SILVA, J.S., CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: Nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v.9, p.153-164, 2003.

DANIELE, B., PERRONE, F., GALLO, C., PIGNATA, S., DE MARTINO, S., DE VIVO, R., BARLETTA, E., TAMBARO, R., ABBIATI, R., D'AGOSTINO, L. Oral glutamine in the prevention of fluorouracil induced intestinal toxicity: a double blind, placebo controlled, randomised trial. **Gut**. v. 48, n. 1, p. 28-33, 2001.

DE CATERINA, R., LIBBY, P., PENG, H.B., THANNICKAL, V.J., RAJAVASHISTH, T.B., GIMBRONE, M.A. JR., SHIN, W.S., LIAO, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest.**, v. 96, n. 1, p. 60-68, 1995.

DECKER-BAUMANN, C., BUHL, K., FROHMULLER, S., VON HERBAY, A., DUECK, M., SCHLAG, P.M. Reduction of chemotherapy-induced side-effects by parenteral glutamine supplementation in patients with metastatic colorectal cancer. **Eur J Cancer.**, v. 35, n. 2, p. 202-207, 1999.

DECOMBAZ J, REINHARDT P, ANANTHARAMAN K, VON GLUTZ G, POORTMANS JR. Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea and creatinine. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, v. 41, p. 61-72, 1979.

DENHAM JW, HAUER-JENSEN M. The radiotherapeutic injury — a complex 'wound'. **Radiother Oncol.**, v. 63, p. 129–145, 2002.

DENNO, R., ROUNDS, J.D., FARIS, R., HOLEJKO, L.B., WILMORE, D.W. Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state.

**J Surg Res.**, v. 61, n. 1, p. 35-38, 1996.

DICKINSON, E., TUNCER, R., NADLER, E., BOYLE, P., ALBER, S., WATKINS, S., FORD, H. NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. **Am J Physiol.**, v. 277, p. 1281-1287, 1999.

DONALDSON, S.S., LENON, R.A. Alterations of nutritional status: impact of chemotherapy and radiation therapy. **Cancer**, v. 43, n. 5, p.2036-2052, 1979.

DONNELLY, J.P., BELLM, L.A., EPSTEIN, J.B., SONIS, S.T., SYMONDS, R.P. Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis. **Lancet Infect Dis.**, v. 3, n. 7, p. 405-412, 2003.

DONNELLY, J.P., MUUS, P., SCHATTENBERG, A., DE WITTE, T., HORREVORTS, A., DEPAUW, B.E.. A scheme for daily monitoring of oral mucositis in allogeneic BMT recipients. **Bone Marrow Transplant.**, v. 9, p. 409–413, 1992.

DUMONTET C., SONNET A., BASTION Y., SALLES G., ESPINOUSE D., COIFFIER B. Prevention of high dose L-PAM-induced mucositis by cryotherapy. **Bone Marrow Transplant.**, v. 14, p. 492–494, 1994.

DUNCAN M., GRANT G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 18, p. 853-874, 2003.

EGEA, J.C., HIRTZ, C., VALCARCEL, J., DEVILLE, D.E., PERIERE, D. Epidermal growth factor: a probable oral and digestive health protector. **Pathol Biol.**, v. 50, p. 608–12, 2002.

ELTING, L. S., BODEY, G. P., KEEFE, B. H., Septicemia e shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 1201-1207, 1992.

ELTING, L. S., COOKSLEY, C., CHAMBERS, M., CANTOR, S. B., MANZULLO, E., RUBENSTEIN, E. B. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer** v.,98, p.1531, 2003.

EPSTEIN, J.B., STEVENSON-MOORE, P. Benzzydamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 62, n. 2, p. 145-148, 1986.

EPSTEIN, J.B., SILVERMAN, S. JR., PAGGIARINO, D.A., CROCKETT, S., SCHUBERT, M.M., SENZER, N.M., LOCKHART, P.B., GALLAGHER, N.J., PETTERSON, D.E., LEVEQUE, F.G. Benzzydamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Cancer**, v. 92, n. 4, p. 875-885, 2001.

EPSTEIN, J.B., STEVENSON-MOORE, P., JACKSON, S., MOHAMED, J.H., SPINELLI, J.J. Prevention of oral mucositis in radiation therapy: a controlled study with benzydamine hydrochloride rinse. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 16, n. 6, p. 1571-1575, 1989.

EPSTEIN, J.B., WONG, F.L. The efficacy of sucralfate suspension in the prevention of oral mucositis due to radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 28, n. 3, p. 693-698, 1994.

ESTEVEZ, A.G., JORDAN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 962, p. 207-211, 2002.

ESTRADA, C., GOMEZ, C., MARTIN, C., MONCADA, S., GONZALEZ, C. Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 186, n.1, p. 475-482, 1992.

EVANS DE, RALSTON SH. Nitric oxide and bone. **J Bone Miner Res.**, v. 11, p. 300-305, 1996.

FAHR, M.J., KORNBLUTH, J., BLOSSOM, S., SCHAEFFER, R., KLIMBERG, V.S. HARRY, M. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 18, n. 6, p. 471-476, 1994.

FANG, F.C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest.**, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, 1997.

FELD, R.. The role of surveillance cultures in patients likely to develop chemotherapy-induced mucositis. **Support Care Cancer.**, v. 5, n. 5, p. 371-375, 1997.

FORD, H., WATKINS, S., REBLOCK, K., ROWE, M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **J Pediatr Surg.**, v. 32, n. 2, p. 275-282, 1997.

FOX, A.D., KRIPKE, S.A., DE PAULA. J., BERMAN, J.M., SETTLE, R.G., ROMBEAU, J.L. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 12, n. 4, p. 325-331, 1988.

FRANCO-PENTEADO, C.F., DE SOUZA, I., TEIXEIRA, S.A., RIBEIRO, D.A., SILVA, G., DE NUCCI, G., ANTUNES, E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. **Toxicon.** v. 39, n. 9, p.1383-1386, 2001.

FRANCO-PENTEADO, C.F., DE SOUZA, I., TEIXEIRA, S.A., RIBEIRO, D.A. SILVA, G., DE NUCCI, G., ANTUNES, E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochem Pharmacol.** v.61, n. 10, p.1305-1311, 2001.

FRIEBE, A., KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ Res.**, v. 93, n. 2, p. 96-105, 2003.

FROLOV, I., HOURI-HADAD, Y., SOSKOLNE, A., SHAPIRA, L. In vivo exposure to *Porphyromonas gingivalis* up-regulates nitric oxide but suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$  production by cultured macrophages. **Immunology**, v. 93, p. 323-328, 1998.

FURST, P., ALBERS, S., STEHLE, P. Availability of glutamine supplied intravenously as alanylglutamine. **Metabolism**, v. 38, p. 67-72, 1989.

FURUKAWA, S., SAITO, H., INOUE, T., MATSUDA, T., FUKATSU, K., HAN, I., IKEDA, S., HIDEMURA, A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. **Nutrition** v. 16, p. 323-329, 2000.

GABRILOVE, J.L., JAKUBOWSKI, A., SCHER, H., STERNBERG, C., WONG, G., GROUS, J., YAGODA, A., FAIN, K., MOORE, M.A., CLARKSON, B., et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. **N Engl J Med**, v. 318, n. 22, p. 1414-1422, 1998.

GANSER, A. Effect of topical oral G-CSF on oral mucositis: a randomised placebo-controlled trial. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 8, p. 781-785, 1998.

GARVEY, E.P., OPLINGER, J.A., FURFINE, E.S., KIFF, R.J., LASZLO, F., WHITTLE, B.J., KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, v 272, n. 8, p. 4959-4963, 1997.

GIBSON, R.J., KEEFE, D.M., THOMPSON, F.M., CLARKE, J.M., GOLAND, G.J., CUMMINS, A.G. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. **Dig Dis Sci**. v. 47, n.12, p.2751-2757, 2002.

GOMES, D.A., REIS, W.L., VENTURA, L.L., GIUSTI-PAIVA, A., ELIAS, L.L., CUNHA, F.Q., RODRIGUES, A.JR. The role of carbon monoxide and nitric oxide in hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus in vitro. **Brain Res**, v. 1016, n. 1, p. 33-39, 2004

GOW, A.J., DURAN, D., MALCOLM, S., ISCHIROPOULOS, H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. **FEBS Lett**, v. 385(1-2), p. 63-66, 1996.

GRABON W. Arginine as a crucial amino acid in carcinogenesis and tumor growth. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v 60, p. 483-489, 2006.

GREM, J.,L. 5-fluoropyrimidines. *In*: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy**: principles and practice. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 8, p. 185-264.

GRIFFITHS, M.J.D., MESSENT, M., MACALLISTER, R.J., EVANS, T.W. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol.**, v. 110, p. 963-968.

GUGGENHEIMEIR, J., VERBIN, R.S., APPEL, B.N., SCHMUTZ, J. Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. **Oral. Surg.**, v. 44, p. 58-63, 1977.

GURBUZ, A.T., KUNZELMAN, J., RATZER, E.E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. **J Surg Res.**, v. 74, n. 2, p. 149-154, 1998.

HALL, P.D., BENKO, H., HOGAN, K.R., STUART, R.K. 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, n.12, p.1256-1260, 1995.

HANTRAYE, P., BROUILLET, E., FERRANTE, R., PALFI, S., DOLAN, R., MATTHEWS, R.T., BEAL, M.F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. **Nature Med.**, v.2, p. 1017-1021, 1996.

HICKEY, M.J., KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. **Exp Physiol.** v.82, n. 2, p.339-348, 1997a.

HICKEY, M.J., SHARKEY, K.A., SIHOTA, E.G., REINHARDT, P.H., MACMICKING, J.D., NATHAN, C., KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J.**, v. 11, n.12, p. 955-964, 1997b.

HIERHOLZER, C., HARBRECHT, B., MENEZES, J.M., KANE, J., MACMICKING, J., NATHAN, C.F., PEITZMAN, A.B., BILLIAR, T.R., TWEARDY, D.J. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. **J Exp Med.** v. 187, n. 6, p. 917-928, 1998.

HOFFMAN, R.A., ZHANG, G., NUSSLER, N.C., GLEIXNER, S.L., FORD, H.R., SIMMONS, R.L., WATKINS, S.C. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. **Am J Physiol.**, v. 272, p. G383-392, 1997.

HONG, R.W., ROUNDS, J.D., HELTON, W.S., ROBINSON, M.K., WILMORE, D.W. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. **Ann Surg.**, v. 215, n. 2, p. 114-119, 1992.

HOUDIJK AP, RIJNSBURGER ER, JANSEN J, WESDORP RI, WEISS JK, MCCAMISH MA, TEERLINK T, MEUWISSEN SG, HAARMAN HJ, THIJIS LG, VAN LEEUWEN PA. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. **Lancet.** v. 352, n. 9130, p. 772-776, 1998.

HSU, S.M., RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem.**, v. 29, n.11, p. 1349-1353, 1981.

HUANG, E.Y., LEUNG, S.W., WANG, C.J., CHEN, H.C., SUN, L.M., FANG, F.M., YEY, S.A., HSU, H.C., HSIUNG, C.Y. Oral glutamine to alleviate radiation-induced oral mucositis: a pilot randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 46, n. 3, p. 535-539, 2000.

HUTCHESON, I.R., WHITTLE, B.J., BOUGHTON-SMITH, N.K. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. **Br J Pharmacol.** v. 101, n. 4, p. 815-820, 1990.

IBRAHIM, E.M., AL-MULHIM, FA. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced oral mucositis in non-neutropenic cancer patients. **Med Oncol.**, v. 14, n.1, p. 47-51, 1997.

ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., CHEN, J., TSAI, M., MARTIN, J.C., SMITH, C.D., BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch Biochem Biophys.**, v. 298, n. 2, p.431-437, 1992.

ITO, S., WU, G.S., KIMOTO, T., HISATOMI, T., ISHIBASHI, T., RAO, N.A. Peroxynitrite-induced apoptosis in photoreceptor cells. **Curr Eye Res.**, v. 28, n. 1, p. 17-24, 2004.

JEBB, S.A., OSBORNE, R.J., MAUGHAN, T.S., MOHIDEEN, N., MACK, P., MORT, D., SHELLEY, M.D., ELIA, M. 5-fluorouracil and folinic acid-induced mucositis: no effect of oral glutamine supplementation. **Br J Cancer**, v. 70, n. 4, p. 732-735, 1994.

JOHNSON JT, FERRETTI GA, NETHERY WJ, VALDEZ IH, FOX PC, NG D, MUSCOPLAT CC, GALLAGHER SC. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **N Engl J Med.**, v. 329, n. 6, p. 390-395, 1993.

JOHNSON, A.T., KAUFMANN, Y.C., LUO, S., TODOROVA, V., KLIMBERG, V.S. Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF- $\beta_1$ . **J Surg Res.**, v. 111, p. 222-228, 2003.

JONES C, PALMER TE, GRIFFITHS RD. Randomized clinical outcome study of critically ill patients given glutamine-supplemented enteral nutrition. **Nutrition**, v. 15, n. 2, p.108-115, 1999.

JOVANOVIC, D.V., MINEAU, F., NOTOYA, K., REBOUL, P., MARTEL-PELLETIER, J, PELLETIER, J.P. Nitric oxide induced cell death in human osteoarthritic synoviocytes is mediated by tyrosine kinase activation and hydrogen peroxide and/or superoxide formation. **J Rheumatol.**, v. 29, n. 10, p. 2165-2175, 2002.

KANAOKA, K., KOBAYASHI, Y., HASHIMOTO, F., NAKASHIMA, T., SHIBATA, M., KOBAYASHI, K., KATO, Y., SAKAI, H. A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. **Endocrinology.**, v. 141, n. 8, p. 2995-3005, 2000.

KANDIL, H.M., ARGENZIO, R.A., CHEN, W., BERSCHNEIDER, H.M., STILES, A.D., WESTWICK, J.K., RIPPE, R.A., BRENNER, D.A., RHOADS, J.M. L-glutamine and L-

asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. **Am J physiol.**, v. 269, p. 591-599, 1995.

KARMALI, R.A. Growth inhibition and prostaglandin metabolism in the R3230AC mammary adenocarcinoma by reduced glutathione. **Cancer Biochem Biophys.**, v. 7, n. 2, p. 147-154, 1984.

KARTHAUS, M., ROSENTHAL, C., HUEBNER, G., PAUL, H., ELSER, C., HERTENSTEIN, B., KRAUTER, J., SCHARMANN, T., GEISLER, R.G., HEIL, G., KASTEN, T.P., COLLIN-OSDOBY, P., PATEL, N., OSDOBY, P., KRUKOWSKI, M., MISKO, T.P., SETTLE, S.L., CURRIE, M.G., NICKOLS, G.A. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 9, p. 3569-3573, 1994.

KAUFMAN, D.C., CHABNER, B.A. Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. *In*: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy: principles and practice.** 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 1, p. 1-16.

KEEFE, D.M., BREALEY, J., GOLAND, G.J., CUMMINS, A.G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut** v., 47, p. 632-637, 2000.

KEEFE, D.M., CUMMINS, A.G., DALE, B.M., KOTASEK, D., ROBB, T.A., SAGE, R.E.: Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. **Clin Sci (Colch)**, v. 92, p. 385-389, 1997

KHAN, K., ELIA, M. Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. **Clin Nutr.**, v. 10, n. 4, p.186-92, 1991.

KIRK, S.J., BARBU, L A. Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 14, n. 5, p. 226-229, 1990.

KLIMBERG, V.S., MCCLELLAN, J.L. Glutamine, cancer, and its therapy. **Am J Surg.** v,172, n. 5, p. 418-424, 1996.

KLIMBERG, V.S., SOUBA, W.W., SALLOUM, R.M., PLUMLEY, D.A., COHEN, F.S., DOLSON, D.J., BLAND, K.I., COPELAND, E.M. Glutamine-enriched diets support muscle glutamine metabolism without stimulating tumor growth. **J Surg Res.**, v. 48, n. 4, p. 319-323, 1990.

KNOWLES, R.G., MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J.**, v. 298, p. 249-258, 1994.

KOENIG, H., PATEL, A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. **Arch Neurol.**, v. 23(2), p.155-160.

KOLB-BACHOFEN, V., FEHSEL, K., MICHEL, G., RUZICKA, T. Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. **Lancet.**, v. 344, n. 8915, p. 139, 1994.

KONG, S.K., YIM, M.B., STADTMAN, E.R., CHOCK, P.B. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH<sub>2</sub> peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 93, n. 8, p. 3377-3382, 1996.

KONING, B.A., VAN DIEREN, J.M., LINDENBERGH-KORTLEVE, D.J., VAN DER SLUIS, M., MATSUMOTO, T., YAMAGUCHI, K., EINERHAND, A.W., SAMSOM, J.N., PIETERS, R., NIEUWENHUIS, E.E. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int Immunol.**, v. 18, n. 6, p. 941-949, 2006.

KOSTLER WJ, HEJNA M, WENZEL C, ET AL. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA Cancer J Clin.**, v. 51, p. 290–315, 2001.

KUBES. P., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.88, n. 11, p.4651-4655, 1991.

KUBOTA, A., MEGUID, M., HITCH, D. Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors. **Cancer**, v. 69, n. 9, p.2343-2348, 1992.

LACAVE, A.J., BARON, F.J., ANTON, L.M., ESTRADA, E., DE SANDE, L.M., PALACIO, I., ESTEBAN, E., GRACIA, J.M., BUESA, J.M., FERNANDEZ, O.A., et al. Combination chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil 5-day infusion in the therapy of advanced gastric cancer: a phase II trial. **Ann Oncol.**, v. 2, n. 10, p. 751-754, 1991.

LACEY, J., WILMORE, D.. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr rev.**, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.

LAMAR, R.E., GRECO, F.A., JOHNSON, D.H., MURPHY, P.B., HAINSWORTH, J.D. High-dose, brief duration, multiagent chemotherapy for metastatic breast cancer. High-dose, brief duration, multiagent chemotherapy for metastatic breast cancer. **Cancer.**, v. 73, n. 7, p. 1842-1848, 1994.

LAMAS, S., MARSDEN, P.A., LI, G.K., TEMPST, P., MICHE, L. T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, n. 14, p. 6348-6352, 1992.

LAPPIN, D.F., KJELDSEN, M., SANDER, L., KINANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J Periodontal Res.**, v. 35, n. 6, p. 369–373, 2000.

LEFER, A.M., LEFER, D.J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovasc Res.** v. 32, p. 743-751, 1996.

LEITÃO, R.F.C., RIBEIRO, R.A., CHAVES, H.V., ROCHA, F.A.C., LIMA, V., BRITO, G.A.C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 76, n. 6, p. 956–963, 2005.

LEITAO RF, RIBEIRO RA, BELLAGUARDA EA, MACEDO FD, SILVA LR, ORIA RB, VALE ML, CUNHA FQ, BRITO GA. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p.603-12, 2007.

LEITÃO, R.F.C., ROCHA, F.A.C., CHAVES, H.V., LIMA, V., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., BRITO, G.A.C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 75, n. 9, p. 1227–1232, 2004.

LEVI, F.A., ZIDANI, R., VANNETZEL, J.M., PERPOINT, B., FOCAN, C., FAGGIUOLO, R., CHOLLET, P., GARUFI, C., ITZHAKI, M., DOGLIOTTI, L., et al. Chronomodulated versus fixed-infusion-rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: a randomized multi-institutional trial. **J Natl Cancer Inst.**, v. 86, n. 21, p. 1608-1617, 1994.

LEVINE R.S. Saliva: 1. The nature of saliva. **Dent Update.**, v.16, n. 3, p.102-106, 1989.

LI, H., CYBULSKY, M.I., GIMBRONE, M.A. JR., LIBBY, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. **Arterioscler Thromb.**, v. 13, n. 2, p. 197-204, 1993.

LI, J., LI, W., SU, J., LIU, W., ALTURA, B.T., ALTURA, B.M. Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases. **Exp Biol Med.**, v. 229, n. 3, p. 264-269, 2004.

LI, Y., YU, Z., LIU, F., TAN, L., WU, B., LI, J. Oral glutamine ameliorates chemotherapy-induced changes of intestinal permeability and does not interfere with the antitumor effect of chemotherapy in patients with breast cancer: a prospective randomized trial. **Tumori.** v. 92, n. 5, p. 396-401, 2006.

LIMA, V. **Evidências da participação de TNF- $\alpha$  e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais.** 2004. 197 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIMA V., BRITO G.A.C., CUNHA F.Q., REBOUÇAS C.G., FALCÃO B.A.A., AUGUSTO R.F., SOUZA M.L.P., LEITÃO B.T., RIBEIRO R.A. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210–217, 2005.

LIN, K.T., XUE, J.Y, LIN, M.C., SPOKAS, E.G., SUN, F.F., WONG, P.Y. Peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease. **Am J Physiol.**, v. 274, p. 855-860, 1998.

LIU, X., BUVINGTON, J.A., TJALKENS, R.B. NF-kappaBdependent production of nitric oxide by astrocytes mediates apoptosis in differentiated PC12 neurons following exposure to manganese and cytokines. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 141, n. 1, p. 39-47, 2005

LOCKHART, P.B., BRENNAN, M.T., KENT, M.L., PACKMAN, C.H., NORTON, H.J., FOX, P.C., FRENETTE, G. Randomized controlled trial of pilocarpine hydrochloride for the moderation of oral mucositis during autologous blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 35, n. 7, p. 713-720, 2005.

LOCKHART, P.B., SONIS, S.T. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v. 7, p. 1019-1025, 1981.

LOHINAI, Z., BENEDEK, P., FEHER, E., GYORFI, A., ROSIVALL, L., FAZEKAS, A., SALZMAN, A.L., SZABO, C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br J Pharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 353-360, 1998.

LOHINAI, Z., STACHLEWITZ, R., VIRAG, L., SZEKELY, A.D., HASKO, G., SZABO, C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. **J Dent Res.**, v. 80, n. 2, p. 470-475, 2001.

LOPRINZI, C.L., FOOTE, R.L., MICHALAK, J. Alleviation of cytotoxic therapy-induced normal tissue damage. **Semin Oncol.**, v. 22, p. 95-97, 1995.

MACINTYRE, I., ZAIDI, M., ALAM, A.S., DATTA, H.K., MOONGA, B.S., LIDBURY, P.S., HECKER, M., VANE, JR. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 88, n. 7, p.2936-2940, 1991.

MADDENS S., CHARRUYER A., PLO I., DUBREUIL P., BERGER S., SALLES B., LAURENT G., JAFFREZOU J.P. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, v. 100, p.1294-1301, 2002.

MAGRATH, I.T., JANUS, C., EDWARDS, B.K., SPIEGEL, R., JAFFE, E.S., BERARD, C.W., MILIAUSKAS, J., MORRIS, K., BARNWELL, R. An effective therapy for both undifferentiated (including Burkitt's) lymphomas and lymphoblastic lymphomas in children and young adults. **Blood.**, v. 63, n. 5, p. 1102-1111, 1984.

MAHOOD DJ, DOSE AM, LOPRINZI CL, VEEDER MH, ATHMANN LM, THERNEAU TM, SORENSEN JM, GAINEY DK, MAILLIARD JA, GUSA NL, et al. Inhibition of fluorouracil-induced stomatitis by oral cryotherapy. **J Clin Oncol.**, v. 9, p. 449-452, 1991.

MANDEL ID. The functions of saliva. **J Dent Res.** v. 66, p. 623-627, 1987.

MARTIN, S.W., STEVENS, A.J., BRENNAN, B.S., DAVIES, D., ROWLAND, M., HOUSTON, J.B. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: Characterization of the inflammatory response to carrageenan. **J Pharmacolog Toxicolog Meth.**, v. 32, p. 139-147, 1994.

MCCARTHY, G.M., SKILLINGS, J.R. Orofacial complications of chemotherapy for breast cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 74, n. 2, p.172-178, 1992.

MCCARTHY GM, AWDE JD, GHANDI H, VINCENT M, KOCHA WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. **Oral Oncol.**, v. 34, n. 6, p.484-490, 1998.

MCCARTNEY-FRANCIS, N., ALLEN, J.B., MIZE, D.E., ALBINA, J.E., XIE, Q.W., NATHAN, C.F., WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J Exp Med.**, v. 178, n. 2, p. 749-754, 1993.

MEDINA, M.A., NUNEZ DE CASTRO, I. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int J Biochem.**, v. 22, n. 7, p. 681-683, 1990

MEDINA, M.A. Glutamine and cancer. **J Nutr.** v. 131, n. 9, p. 2539-2542, 2001.

MELONI G., CAPRIA S., PROIA A., TRISOLINI S.M., MANDELLI F. Ice pops to prevent melphalan-induced stomatitis. **Lancet**, v. 347, p. 1691–1692, 1996.

MESSMANN, R.A., ALLEGRA, C.J. Antifolates. *In*: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy**: principles and practice. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 7, p. 139-184.

MIDDLETON, S.J., SHORTHOUSE, M., HUNTER, J.O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**. v. 341, n. 8843, p. 465-466, 1993.

MILLER, M.J., MUNSHI, U.K., SADOWSKA-KROWICKA, H., KAKKIS, J.L., ZHANG, X.J., ELOBY-CHILDRESS, S., CLARK, D.A. Inhibition of calcium-dependent nitric oxide synthase causes ileitis and leukocytosis in guinea pigs. **Dig Dis Sci.**, v. 39, n. 6, p. 1185-92, 1994.

MILLER, M.J., SADOWSKA-KROWICKA, H., CHOTINARUEMOL, S., KAKKIS, J.L., CLARK, D.A. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 264, n. 1, p. 11-16, 1993.

MINSKY, B.D., COHEN, A.M., KEMENY, N., ENKER, W.E., KELSEN, D.P., SCHWARTZ, G., SALTZ, L., DOUGHERTY, J., FRANKEL, J., WISEBERG, J. Pre-operative combined 5-FU, low dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** v. 25, n. 5, p. 821-827, 1993.

MOHAPATRO, S.K., DANDAPAT, M.C., PADHI, N.C. Toxicity and side-effects of combination chemohormonal therapy of advanced breast cancer. **J Indian Med Assoc.** v. 90, n. 2, p. 39-42, 1992.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIBBS, J.R., HIGGS, A.E. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v.43, p.109, 1991.

MORLION, B.J., STEHLE, P., WACHTLER, P., SIEDHOFF, H.P., KOLLER, M., KONIG, W., FURST, P., PUCHSTEIN, C. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. **Ann Surg.**, v. 227, n. 2, p. 302-308, 1998.

MUHL, H., DINARELLO, C.A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. **J Immunol.** v. 159, n. 10, p. 5063-5069, 1997.

MURPHY, C., NEWSHOLME, P. Macrophage-mediated lysis of a beta-cell line, tumour necrosis factor-alpha release from bacillus Calmette-Guerin (BCG)-activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. **Clin Sci (Lond).**, v. 96, n. 1, p. 89-97, 1999.

MURPHY, M.P. Nitric oxide and cell death. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1411, p. 401-414, 1999.

MUSCARA, M.N., WALLACE, J.L. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.**, v. 276, p. 1313-1316, 1999.

NAKAMURU, M., MASUBUCHI, Y., NARIMATSU, S., AWAZU, S., HORIE, T. Evaluation of damaged small intestine of mouse following methotrexate administration. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 41, p. 98-102, 1998.

NASCIMENTO, S.B., SOUSA, R.B., MARTINS, M.J., SOUZA GOMES, A., SOUZA, M.H., GUERRANT, R.L., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., BRITO, G.A. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or Clostridium difficile toxin A in rats. **Immunology.**, v. 116, n. 3, p. 328-336, 2005.

NASEEM, K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol Aspects Med.**, v. 26, n. 1-2, p. 33-65, 2005.

NATHAN, C., XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell.**, v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994.

NEU, J., DEMARCO, V., LI, N. Glutamine: clinical applications and mechanisms of action. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n.1, p. 69-75, 2002.

NEWSHOLME, E.A., NEWSHOLME, P., CURI, R., CHALLONER, E., ARDAWI, M.S.M. A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition**, v. 4, p. 261-268, 1988.

OBLON, D.J., PAUL, S.R., OBLON, M.B., MALIK, S. Propantheline protects the oral mucosa after high-dose ifosfamide, carboplatin, etoposide and autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 20, n. 11, p. 961-963, 1997.

O'DWYER, S.T., SCOTT, T., SMITH, R.J., WILMORE, D.W. 5-fluorouracil toxicity on small intestinal mucosa but not white blood cells is decreased by glutamine. **Clin. Res.**, v. 35, p. 367A, 1987.

OHTSU, A., YOSHIDA, S., SAITO, D., SHIMADA, Y., MIYAMOTO, K., FUJII, T., YOSHINO, M., YOSHIMORI, M.. An early phase II study of 5-fluorouracil combined with cisplatin as a second line chemotherapy against metastatic gastric cancer. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 21, n. 2, p. 120-124, 1991.

OIAO, S., LI, W., TSUBOUCHI, R., HANEDA, M., MURAKAMI, K., YOSHINO, M. Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Neurosci Res.**, v. 51, n. 2, p. 175-183, 2005.

OKUNO, S.H., WOODHOUSE, C.O., LOPRINZI, C.L., SLOAN, J.A., LAVASSEUR, B.I., CLEMENS-SCHUTJER, D., SWAN, D., AXVIG, C., EBBERT, L.P., TIRONA, M.R., MICHALAK, J.C., PIERSON, N. Phase III controlled evaluation of glutamine for decreasing stomatitis in patients receiving fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy. **Am J Clin Oncol.** v. 22, n. 3, p. 258-261, 1999.

ORD RA, BLANCHAERT RH JR. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. **J Am Dent Assoc.**, v. 132, p. 19-23, 2001.

OSAKI, T., UETA, E., YONEDA, K., HIROTA, J., YAMAMOTO, T. Prophylaxis of oral mucositis associated with chemoradiotherapy for oral carcinoma by Azelastine hydrochloride (Azelastine) with other antioxidants. **Head Neck.**, v. 16, n. 4, p. 331-339, 1994.

PAPACONSTANTINO, H.T., XIE, C., ZHANG, W., ANSARI, N.H., HELLMICH, M.R., TOWNSEND, C.M, JR., KO, T.C. The role of caspases in methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. **Surgery.** v.,130, n. 5, p. 859-865, 2001.

PARIS, F., FUKS, Z., KANG, A., CAPODIECI, P., JUAN G., EHLEITER, D., HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., CORDON-CARDO, C., KOLESNICK, R.. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science.** v. 293, n. 5528, p. 293-297, 2001.

PARKINSON, J.F., MITROVIC, B., MERRILL, J.E. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **J Mol Med.**, v. 75, n. 3, p. 174-186, 1997.

PARRY-BILLINGS, M., BAIGRIE, R.J., LAMONT, P.M., MORRIS, P.J., NEWSHOLME, E.A. Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. **Arch Surg.**, v. 127, p. 1237-1240, 1992.

PARRY-BILLINGS, M., EVANS, J., CALDER, P.C., NEWSHOLME, E.A. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? **Lancet.**, v. 336, p. 523-525, 1990.

PENG, H.B., SPIECKER, M., LIAO, J.K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J Immunol.**, v. 161, n. 4, p. 1970-1976, 1998.

PETERSEN, S.R., JEEVANANDAM, M., HOLADAY, N.J., LUBHAN, C.L. Arterial-jugular vein free amino acid levels in patients with head injuries: important role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism. **J Trauma.**, v. 41, n. 4, p. 687-694, 1996.

PETROS, A., BENNETT, D., VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet.**, v. 338, n. 8782-8783, p. 1557-1558, 1991.

PETROS, A., LAMB, G., LEONE, A., MONCADA, S., BENNETT, D., VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc Res.**, v. 28, n. 1, p. 34-39, 1994.

PFEILSCHIFTER, J., WUSTER, C., VOGEL, M., ENDERES, B., ZIEGLER, R., MINNE, H.W. Inflammation-mediated osteopenia (IMO) during acute inflammation in rats is due to a transient inhibition of bone formation. **Calcif Tissue Int.**, v. 41, n. 6, p. 321-5, 1987.

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

PIRZADA, N.A., ALI, I.I., DAFER, R.M. Fluorouracil-induced neurotoxicity. **Ann Pharmacother.**, v. 34, n. 1, p. 35-38, 2000.

PLEVOVA P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 453-470, 1999.

POTOKA, D.A., NADLER, E.D., UPPERMAN, J.S., FORD, H.R. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. **World J Surg.**, v. 26, n. 7, p. 806-811, 2002.

POTOKA, D.A., UPPERMAN, J.S., ZHANG, X.R., KAPLAN, J.R., COREY, S.J., GRISHIN, A., ZAMORA, R., FORD, H.R. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 285, n. 5, p. 86186-86189, 2003.

PRZEDBORSKI, S., JACKSON-LEWIS, V., YOKOYAMA, R., SHIBATA, T., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, n. 10, p. 4565-4571, 1996.

PYRHONEN, S., KUITUNEN, T., NYANDOTO, P., KOURI, M. Randomised comparison of fluorouracil, epidoxorubicin and methotrexate (FEMTX) plus supportive care with supportive care alone in patients with non-resectable gastric cancer. **Br J Cancer.**, v. 71, n. 3, p. 587-591, 1995.

PYTLÍK, R., BENES, P., PATORKOVÁ, M., CHOČENSKÁ, E., GREGORA, E., PROCHÁZKA, B., KOZÁK, T. Standardized parenteral alanyl-glutamine dipeptide supplementation is not beneficial in autologous transplant patients: a randomized, double-blind, placebo controlled study. **Bone Marrow Transplantation**, v.30, n. 12, p. 953-961, 2002.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J Biol Chem**. v. 266, n. 7, p. 4244-4250, 1991a.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, n. 2, p. 481-487, 1991b.

RALSTON, S.H., HO, L.P., HELFRICH, M.H., GRABOWSKI, P.S., JOHNSTON, P.W., BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J Bone Miner Res.**, v. 10, n. 7, p.1040-1049, 1995.

RALSTON, S.H., TODD, D., HELFRICH, M.H., BENJAMIN, N., GRABOWSKI, P. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinology**. v.135, p. 330-336, 1994.

RHOADS, J.M., ARGENZIO, R.A., CHEN, W., RIPPE, R.A., WESTWICK, J.K., COX, A.D., BERSCHNEIDER, H.M., BRENNER, D.A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. **Am J Physiol.**, v. 272, p. 943-953, 1997.

ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E., JANCAR, S., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A., ROCHA, F.A. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol.**, v. 136, n. 4, p.588–596, 2002.

ROCKE L.K., LOPRINZI C.L., LEE J.K., KUNSELMAN S.J., IVERSON R.K., FINCK G., LIFSEY D., GLAW K.C., STEVENS B.A., HATFIELD A.K., et al. (1993). A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis. **Cancer**, v. 72, p. 2234–2238, 1993.

ROTH B.J., SLEDGE G.W. Jr., WILLIAMS S.D., MEYER S.C., ANSARI R., FISHER W.B. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic. **Cancer**, v. 68, n. 2, p. 248-252, 1991.

ROUSE, K., NWOKEDI, E., WOODLIFF, J.E., EPSTEIN, J., KLIMBERG, V.S. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. **Ann Surg.**, v. 221, n. 4, p. 420-426, 1995.

ROSARIO, P.W., CARDOSO, L.D., BARROSO, A.L., PADRAO, E.L., REZENDE, L.L., PURISCH, S.. Safety of radioiodine therapy in patients with thyroid carcinoma younger than 21 years. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v.49, n. 2, p. 241-245, 2005.

ROSSO M, BLASI G, GHERLONE E, ROSSO R. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on prevention of mucositis in head and neck cancer patients treated with chemo-radiotherapy. **J Chemother.**, v. 9, n. 55, p. 38238-5, 1997.

ROSSO, R., MAZZEI, T., SOBRERO, A., MINI, E., CARTEI, G., CONTE, P., LABIANCA, R., CARTEI, F., FALCONE, A., PANCERA, G., et al. Phase II trial of 5-fluorouracil and the natural I isomer of folinic acid in the treatment of advanced colorectal carcinoma. **Eur J Cancer.** v. 30A, n. 3, p. 338-343, 1994.

RUBBO, H., RADY, L., TRUGILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J Biol Chem.** v. 269, n. 42, p.26066-26075, 1994.

RUESCHER, T. J., SODEIFI, A., SCRIVANI, S. J., KABAN, L. B. AND SONIS, S. T. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. **Cancer** v. 82, p. 2275, 1998.

RUTMAN, R.J., CANTAROW, A., PASCHKIS, K.E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. **Cancer Res.** v., 14, n. 2, p.119-23, 1954.

SANDOVAL, M., LIU, X., MANNICK, E.E., CLARK, D.A., MILLER, M.J. Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine. **Gastroenterology.**, v. 113, n. 5, p.1480-1488, 1997a.

SANDOVA, L M., ZHANG, X.L., LIU, X., MANNICK, E.E., CLARK, D.A., MILLER, M.J. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, n. 3, p. 489-495, 1997b.

SANTANA, R.O. **Abordagens terapêuticas na mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil: papel dos extratos de *myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) e *aloe barbadensis* (babosa).** 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina – Univeridade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SCARANTINO C., LEVEQUE F., SWANN R.S., WHITE R., SCHULSINGER A., HODSON D.I., MEREDITH R., FOOTE R., BRACHMAN D., LEE N. Effect of pilocarpine during radiation therapy: results of RTOG 97-09, a phase III randomized study in head and neck cancer patients. **J Support Oncol.**, v. 4, n. 5, p. 252-258, 2006.

SCOTT, D.J., HULL, M.A., CARTWRIGHT, E.J., LAM, W.K., TISBURY, A., POULSOM, R., MARKHAM, A.F., BONIFER, C., COLETTA, P.L. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. **Gastroenterology**, v. 121, n. 4, p. 889-899, 2001.

SCULLY, C., EPSTEIN, J., SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head Neck.**, v. 25, n. 12, p. 1057-1070, 2003.

SCULLY, C., EPSTEIN, J., SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis. **Head Neck.**, v. 26, n. 1, p. 77-84, 2004.

SCULLY, C., SONIS, S., DIZ, P.D. Oral mucositis. **Oral Dis.**, v. 12, n. 3, p. 229-241, 2006.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEO, H.G., TAKATA, I., NAKAMURA, M., TATSUMI, H., SUZUKI, K., FUJII, J., TANIGUCHI, N. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. **Arch Biochem Biophys.**, v. 324, n. 1, p. 41-47, 1995.

SESSA, W.C., HARRISON, J.K., BARBER, C.M., ZENG, D., DURIEUX, M.E., D'ANGELO, D.D., LYNCH, K.R., PEACH, M.J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 22, p. 15274-15276, 1992.

SHAPIRA, L., CHAMPAGNE, C., VAN DYKE, T.E., AMAR, S. Strain-independent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun.**, v. 66, p. 2736-2742, 1998.

SHIRINIAN, M.H., WEBER, R.S., LIPPMAN, S.M., DIMERY, I.W., EARLEY, C.L., GARDEN, A.S., MICHAELSON, J., MORRISON, W.H., KRAMER, A., BYERS, R., et al. Laryngeal preservation by induction chemotherapy plus radiotherapy in locally advanced head and neck cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. **Head Neck.**, v. 16, n.1, p. 39-44, 1994.

SINGER, I.I., KAWKA, D.W., SCOTT, S., WEIDNER, J.R., MUMFORD, R.A., RIEHL, T.E., STENSON, W.F. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 111, n. 4, p. 871-885, 1996.

SKUBITZ, K.M., ANDERSON, P.M. Oral glutamine to prevent chemotherapy induced stomatitis: a pilot study. **J Lab Clin Med.** v. 127, n. 2, p. 223-228, 1996.

SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 14, n. 4, p. 40S-44S, 1990.

SMITH, R.J., WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 14, n. 4, p. 94-99, 1990.

SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 39–43, 1998.

SONIS, S.T., FEY, E.G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology.**, v. 16, p. 680–686, 2000.

SONIS, S.T., TRACEY, C., SHKLAR, G., JENSON, J., FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.69, n. 4, p. 437-443, 1990.

SONIS, S.T., SCHERER, J., PHELAN, S., LUCEY, C.A., BARRON, J.E., O'DONNELL, K.E., BRENNAN, R.J., PAN, H., BUSSE, P., HALEY, J.D. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. **Cell Prolif.**, v. 35, n. 1, p. 93–102, 2002.

SONIS, S.T., ELTING, L.S., KEEFE, D., PETERSON, D.E., SCHUBERT, M., HAUER-JENSEN, M., BEKELE, B.N., RADER-DURLACHER, J., DONNELLY, J.P., RUBENSTEIN E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, n. 9, p. 1995-2025, 2004.

SORRELLS, D.L., FRIEND, C., KOLTUKSUZ, U., COURCOULAS, A., BOYLE, P., GARRETT, M., WATKINS, S., ROWE, M.I., FORD, H.R. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. **Arch Surg.**, v. 131, n. 11, p. 1155-1163, 1996.

SOUZA-FILHO, M.V., LIMA, M.V., POMPEU, M.M., BALLEJO, G., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol.**, v. 150, n. 1, p.247–256, 1997.

SPIECKER, M., PENG, H.B., LIAO, J.K. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I $\kappa$ B $\alpha$ . **J Biol Chem.**, v. 272, n. 49, p. 30969-30974, 1997.

SPIJKERVET FK, SONIS ST. New frontiers in the management of chemotherapy-induced mucositis. **Curr Opin Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 23-27, 1998.

SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature.**, v. 346, n. 6283, p. 425-434, 1990.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell.**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994.

STEFANOVIC-RACIC, M., STADLER, J., EVANS, CH. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 36, n. 8, p.1036–1044, 1993.

SUCHNER, U., HEYLAND, D.K., PETER, K. Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill. **Br J Nutr.**, v. 87, n. 1, p. 121-132, 2002.

SUKHOTNIK, I., HELOU, H., MOGILNER, J., LURIE, M., BERNSTEYN, A., CORAN, A.G., SHILONI, E. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. **Pediatr Surg Int.**, v. 21, n. 3, p. 191-196., 2005

SUKUMAR, P., LOO, A., MAGUR, E., NANDI, J., OLER, A., LEVINE, R.A. Dietary supplementation of nucleotides and arginine promotes healing of small bowel ulcers in experimental ulcerative ileitis. **Dig Dis Sci.**, v. 42, n. 7, p. 1530-1536, 1997.

SUNDSTROM, G.M., WAHLIN, A., NORDIN-ANDERSSON, I., SUHR, O.B. Intestinal permeability in patients with acute myeloid leukemia. **Eur J Haematol.**, v. 61, n. 4, p. 250-4, 1988.

SUNYER, T., ROTHE, L., JIANG, X., OSDOBY, P., COLLIN-OSDOBY, P. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. **J Cell Biochem.**, v. 60, n. 4, p. 469-483.

SZABO, C.. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v.6, n. 2, p. 79-88, 1996.

SZABO, C., FERRER-SUETA, G., ZINGARELLI, B., SOUTHAN, G.J., SALZMAN, A.L., RADI, L. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **J Biol Chem.** v. 272, n. 14, p. 9030-9036, 1997.

TEPPERMAN, B.L., BROWN, J.F., WHITTLE, B.J. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. **Am J Physiol.**, v. 265, p. 214-218, 1993.

TREMEL H, KIENLE B, WEILEMANN LS, STEHLE P, FURST P. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. **Gastroenterology.** v. 107(6), p. 1595-601, 1994.

TSUJI E, HIKI N, NOMURA S, FUKUSHIMA R, KOJIMA J, OGAWA T, MAFUNE K, MIMURA Y, KAMINISHI M. Simultaneous onset of acute inflammatory response, sepsis-like symptoms and intestinal mucosal injury after cancer chemotherapy. **Int J Cancer.**, v. 107, n. 2, p. 303-308, 2003.

UEHARA, T., KIUCHI, Y., NOMURA, Y. Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells. **J Neurochem.**, v. 72, p. 169-205, 1999.

UNNO, N., WANG, H., MENCONI, M.J., TYTGAT, S.H., LARKIN, V., SMITH, M., MORIN, M.J., CHAVEZ, A., HODIN, R.A., FINK, M.P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology.** v. 113, n. 4, p. 1246-1257, 1997.

VANDERHOOF, J.A., PARK, J.H.Y., MOHAMMADPOUR, H., BLACKWOOD, D. Effects of dietary lipids on recovery from mucosal injury. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1226-1231, 1990.

VAN ZAAANEN, H.C., VAN DER LELIE, H., TIMMER, J.G, FURST, P., SAUERWEIN, H.P. Parenteral glutamine dipeptide supplementation does not ameliorate chemotherapy-induced toxicity. **Cancer**, v.74, n.10, p. 2879-2884, 1994.

VAN'T HOF, R.J., ARMOUR, K.J., SMITH, L.M., ARMOUR, K.E., WEI, X.Q., LIEW, F.Y., RALSTON, S.H. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, n. 14, p; 7993-7998, 2000.

VENTE, J.P., MEYENFELDT, M.F., VAN EIJK, H.M., VAN BERLIN, C.L., GOUMA, D.J., VAN DER LINDEN, C.J., SOETERS, P.B. Plasma amino acid profiles in sepsis and stress. **Ann Surg.**, v. 209, p. 57- 62, 1989.

VERBURG, M., RENES, I.B., MEIJER, H.P., TAMINIAU, J.A., BULLER, H.A., EINERHAND, A.W., DEKKER, J. Selective sparing of goblet cells and Paneth cells in the intestine of methotrexate treated rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, p. G1037–1047, 2000.

WANG, J.Y., JOHNSON, L.R., TSAI, Y.H., CASTRO, G.A. Mucosal ornithine decarboxylase, polyamines, and hyperplasia in infected intestine. **Am J Physiol.**, v. 260, p. 45-51, 1991.

WARDE P, O'SULLIVAN B, ASLANIDIS J, KROLL B, LOCKWOOD G, WALDRON J, PAYNE D, BAYLEY A, RINGASH J, KIM J, LIU FF, MAXYMIW W, SPRAGUE S, CUMMINGS BJ. A Phase III placebo-controlled trial of oral pilocarpine in patients undergoing radiotherapy for head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 54, n. 1, p.9-13, 2002.

WEI, X.Q., CHARLES, I.G., SMITH, A., URE, J., FENG, G.J., HUANG, F.P., XU, D, MULLER, W., MONCADA, S., LIEW, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, p. 408-411, 1995.

WELBOURNE, T.C. Ammonia production and glutamine incorporation into glutathione in the functioning rat kidney. **Can J Biochem.**, v. 57, n. 3, p. 233-237, 1979.

WELBOURNE, T.C., DASS, P.D. Function of renal gamma-glutamyltransferase: significance of glutathione and glutamine interactions. **Life Sci.**, v. 30, n. 10, p. 793-801, 1982.

WILKES, J.D. Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. **Semin Oncol.**, v. 25, n. 5, p. 538-551, 1998.

WILKINSON, D.S., TLSTY, T.D., HANAS, R.J. The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. **Cancer Res.**, v. 35, p. 3014-3020, 1975.

WINDMUELLER HG, SPAETH AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **J Biol Chem.**, v. 249, n. 16, p. 5070-5079, 1974.

WINGARD, J.R., MERZ, W.G., RINALDI, M.G., JOHNSON, T.R., KARP, J.E., SARAL, R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N Engl J Med.**, v. 325, 18, p. 1274-1277, 1991.

WISCHMEYER, P.E. The glutamine story: where are we now? **Curr Opin Crit Care**, v. 12, n. 2, p. 142-148, 2006.

WISCHMEYER, P.E., LYNCH, J., LIEDEL, J., WOLFSON, R., RIEHM, J., GOTTLIEB, L., KAHANA, M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. **Crit Care Med.**, v. 29, n. 11, p. 2075-2080, 2001.

WOLFF A., FOX P.C., SHIP J.A., ATKINSON J.C., MACYNSKI A.A., BAUM B.J. Oral mucosal status and major salivary gland function. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 70, n. 1, p. 49-54, 1990.

WONG JM, BILLIAR TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Adv Pharmacol.**, v. 34, p. 155-70, 1995.

WOO, S.B., LEE, S.J., SCHUBERT, M.M. Graft-vs.-host disease. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 8, n. 2, p. 201-216, 1997.

WORTHINGTON, H.V., CLARKSON, J.E. Prevention of oral mucositis and oral candidiasis for patients with cancer treated with chemotherapy: cochrane systematic review. **J Dent Educ.** v. 66, n. 8, p. 903-911, 2002.

XIE, K., DONG, Z., FIDLER, I.J. Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. **J Leukoc Biol.**, v. 59, n. 6, 797-803, 1996.

XIE QW, CHO HJ, CALAYCAY J, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD, DING A, TROSO T, NATHAN C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science.**, v. 256, n. 5054, p. 225-228, 1992.

XU, W., LIU, L., SMITH, G.C., CHARLES, G. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. **Nat Cell Biol.**, v. 2, n. 6, p. 339-345, 2000.

YAGMUR, E., TRAUTWEIN, C., LEERS, M.P., GRESSNER, A.M., TACKE, F. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. **Clin Biochem.** 2007 [Epub ahead of print].

YOSHIDA S, KAIBARA A, YAMASAKI K, ISHIBASHI N, NOAKE T, KAKEGAWA T. Effect of glutamine supplementation on protein metabolism and glutathione in tumor-bearing rats. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 19, n. 6, p. 492-497, 1995.

YU, J.C., JIANG, Z.M., LI, D.M., YANG, N.F., M-X, B. Alanyl-glutamine preserves hepatic glutathione stores after 5-FU treatment. **Clin Nutr.**, v. 15, n. 5, p. 261-265, 1996.

YU, J.C., JIANG, Z.M., LI, D.M. Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver. **World J Gastroenterol.**, v. 5, n. 2, p.143-146, 1999.

YUAN, C.H., LIU, Y.F., CHENG, Y., ZHAO, N., LI, G.C., LIANG, J., HE S.G. Protective effects of L-arginine on reperfusion injury after pancreaticoduodenal transplantation in rats. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.**, v. 3, n. 3, p. 349-354, 2004.

## 7 ANEXOS