

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO PESO CORPORAL,
HEMOGRAMA E NA PRODUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS DE RATOS
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA**

BIANCA DEPIERI BALMANT

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO PESO CORPORAL,
HEMOGRAMA E NA PRODUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS DE RATOS
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA**

BIANCA DEPIERI BALMANT

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis

613.28
B194e

Balmant, Bianca Depieri

Efeito da suplementação com L-arginina no peso corporal, hemograma e na produção das imunoglobulinas de ratos submetidos à quimioterapia / Bianca Depieri Balmant. – Presidente Prudente, 2017.

58 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Luis Souza Lima de Souza Reis.

1. Imunomodulador. 2. Imunossupressão. 3. Câncer. 4. 5-fluorouracil. I. Título.

BIANCA DEPIERI BALMANT

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO PESO CORPORAL,
HEMOGRAMA E NA PRODUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS DE RATOS
SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 29 de Novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis - Orientador
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho
Universidade Norte do Paraná – Unopar
Araongas - PR

DEDICATÓRIA

A Deus, meus pais e meu noivo,
que me deram sempre muito mais do que eu
poderia desejar em oração.

AGRADECIMENTOS

A vida nunca existiu em função de uma única pessoa, e certamente escrever uma dissertação não ocorreria se dependesse de uma única pessoa.

Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis, obrigada por ter acreditado e dedicado o seu tempo ao projeto. Sua preocupação em transmitir não apenas seus saberes, mas em criar possibilidades para a construção do meu conhecimento, o faz merecedor de todo o mérito.

Agradeço à mestrandia Eloisa O. N. Araújo e as discentes Denise Yabuki e Amanda B. Novais, por se atirarem arduamente ao projeto.

Um agradecimento especial à Profa. Dra. Cecília Braga Laposy, que nos permitiu a entrada no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário e despendeu seu tempo para que clareasse os nossos questionamentos.

À Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai, pela orientação quanto ao experimento animal, bem como os materiais disponibilizados para que este projeto pudesse acontecer.

Uma apreciação para toda equipe da farmácia de Oncologia do Hospital Regional de Presidente Prudente, que acreditou nesta ideia e nos auxiliou nas doses e manipulação do quimioterápico.

Agradeço ainda a equipe do Biotério da Universidade do Oeste Paulista, pelos seus serviços e espírito de equipe.

À Profa. Marilda Moreira e Profa. Ms. Sandra Genaro, vocês foram parte integrante na concretização deste trabalho, já que tornaram possível a conciliação de horas na graduação. Admiro a liderança, cumplicidade e amizade verdadeira que temos entre nós.

Mais uma vez, obrigada a todos que fizeram deste projeto uma realidade!

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida
e viver com paixão, perder com classe e vencer com
ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a
VIDA É MUITO para ser insignificante.”
Charlie Chaplin*

RESUMO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO PESO CORPORAL, HEMOGRAMA E NA PRODUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS DE RATOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com L-arginina, em diferentes doses, no peso corporal, no hemograma, na produção das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM e no processo inflamatório do intestino delgado de ratos Wistar submetidos à quimioterapia. Foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (8 ratos/grupo) com peso corporal semelhante: grupo controle (G_C), os ratos receberam ração e água; G_{5-FU} receberam ração, água e uma dose de 5-FU; $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ que receberam ração, 295 mg e 458 mg de L-arginina, respectivamente, adicionada na água e uma dose de 5-FU. A 5-FU foi aplicada após o período de adaptação (dia 7) na dose única de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Os ratos foram pesados individualmente, sempre no período da manhã e sem jejum prévio, para determinação do ganho de peso antes e depois da aplicação da 5-FU. Quatro dias após da aplicação da 5-FU, os ratos foram anestesiados com tionembutal e colheu-se amostras de sangue e do intestino delgado. A suplementação com 295 mg de L-arginina mostrou-se benéfica na redução de perda de peso corporal durante o tratamento com o quimioterápico 5-FU. A concentração de plaquetas foi menor ($P < 0,05$) nos grupos G_{5-FU} e $G_{Arg458+5-FU}$, porém, semelhantes entre os grupos G_C e $G_{Arg295+5-FU}$. A concentração de leucócitos totais apresentou redução significativa nos grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ quando comparados ao grupo G_C , entretanto, houve redução significativa de neutrófilos somente no grupo G_{5-FU} . Ocorreu um aumento ($P < 0,05$) na concentração de fibrinogênio nos grupos tratados com L-arginina ($G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$). Nos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$, a concentração sérica de IgA aumentou significativamente em relação ao grupo G_{5-FU} . Os ratos suplementados com L-arginina apresentaram menor processo inflamatório no intestino delgado. Conclui-se que a suplementação com 295 mg de L-arginina/dia atenuou a perda de peso corporal imediata dos ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU e que a suplementação diária tanto com 295 mg como 458 mg de L-arginina pode amenizar alguns efeitos colaterais da 5-FU como a plaquetopenia, a neutropenia e imunomodular a produção de IgA, além de reduzir processos inflamatórios intestinais.

Palavras-chave: Imunomodulador. Imunossupressão. Câncer. 5-fluorouracil.

ABSTRACT

EFFECT OF L-ARGININE SUPPLEMENTATION ON BODY WEIGHT, HEMOGRAM AND PRODUCTION OF IMMUNOGLOBULINS IN RATS SUBJECTED TO CHEMOTHERAPY

The purpose of this study was to evaluate the effect of supplementation with L-arginine, in different doses, on body weight, hemogram, production of IgA, IgG and IgM immunoglobulins and in the small bowel inflammatory process of Wistar rats subjected to chemotherapy. A total of 32 *Rattus norvegicus* Wistar rats were randomly distributed in 4 groups (8 rats / group) with similar body weight: control group (CG), the rats were given ration and water; G5-FU was given ration, water and a dose of 5-FU; Garg295 + 5-FU and Garg458 + 5-FU were given, respectively, 295 mg and 458 mg of L-arginine, which was added to the water and a dose of 5-FU. 5-FU was applied after the adaptation period (day 7) in a single dose of 200 mg of 5-FU / kg body weight, intraperitoneally. The rats were weighed individually, always in the morning and without previous fasting, to determine the weight gain before and after the application of 5-FU. Four days after application of 5-FU, the rats were anesthetized with thionembutal, blood and small intestine samples were collected. Supplementation with 295 mg of L-arginine was shown to be beneficial in reducing body weight loss during treatment with the 5-FU chemotherapeutic. The concentration of platelets was lower ($P < 0.05$) in the G5-FU and GArg458 + 5-FU groups, but similar between the GC and GArg295 + 5-FU groups. The total leukocyte concentration showed a significant reduction in the G5-FU, GArg295 + 5-FU and GArg458 + 5-FU groups when compared to the GC group, however, there was a significant reduction of neutrophils only in the G5-FU group. There was an increase ($P < 0.05$) in fibrinogen concentration in the groups treated with L-arginine (GArg295 + 5-FU and GArg458 + 5-FU). In the GArg295 + 5-FU and GArg458 + 5FU groups, the serum IgA concentration increased significantly in relation to the G5-FU group. Rats supplemented with L-arginine had a minor inflammatory process in the small intestine. It was concluded that supplementation with 295 mg of L-arginine / day attenuated the immediate body weight loss of Wistar rats subjected to 5-FU chemotherapy and that daily supplementation with both 295 mg and 458 mg of L-arginine may ease some side effects of 5-FU such as thrombocytopenia, neutropenia and immunomodular production of IgA, in addition to reducing intestinal inflammatory processes.

Keywords: Immunomodulator. Immunosuppression. Cancer. 5-fluorouracil.

LISTA DE SIGLAS

5-FU	– 5-Fluorouracil
OMS	-- Organização Mundial da Saúde
TS	– Timidilato-sintetase
TNF-alfa	– Fator alfa de necrose de tumor
IL-1	– Interleucina-1
IL-2	– Interleucina-2
IL-6	– Interleucina-3
IgA	– Imunoglobulina A
IgG	– Imunoglobulina G
IgM	– Imunoglobulina M
VGM	– Volume globular médio
HGM	– Hemoglobina globular média
CHGM	– Concentração de hemoglobina globular média
RDW	-- Amplitude de distribuição do diâmetro das hemácias
AST	-- Aminotransferase de aspartate
ALT	-- Aminotransferase de alanine
INCA	-- Instituto Nacional do Câncer

SUMÁRIO

1	ARTIGO A: SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA ATENUA A PERDA DE PESO IMEDIATA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA.....	10
1.1	Instruções para autores: Revista de Nutrição.....	20
2	ARTIGO B: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO LEUCOGRAMA, INFILTRADO INFLAMATÓRIO DO INTESTINO E IGA COM USO DE 5-FU EM RATOS.....	27
2.1	Instruções para autores: Nutrition and Cancer Journal.....	54
3	ANEXO: PARECER FINAL DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) E DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA).....	58

1 ARTIGO A

Este artigo será submetido no formato de nota científica para a Revista de Nutrição.

Suplementação com L-arginina atenua a perda de peso imediata em ratos Wistar submetidos à quimioterapia

Bianca Depieri BALMANT¹

Eloisa O. N. ARAÚJO²

Sandra Cristina GENARO³

Cecilia Braga LAPOSY⁴

Marcelo George Mungai CHACUR⁵

Luis Souza Lima de Souza REIS⁶

¹ Mestranda em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, R. José Bongiovani, n. 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Telefone: (+55 18) 98146-9636. Correspondência para/Correspondence to: BD BALMANT. E-mail: <biancadedepieribalmant@hotmail.com>.

² Mestranda em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: eloisanazario@hotmail.com

³ Mestre em Ciência Animal e doutoranda em Fisiopatologia Animal na Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. E-mail: sandragenaro@hotmail.com

⁴ Doutora. Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: claposy@unoeste.br

⁵ Pós-doutor. Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: chacur@unoeste.br

⁶ Pós-doutor. Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: luisreis@unoeste.br

Article based on the master dissertation of BD BALMANT, entitled “Efeito da suplementação com L-arginina no peso corporal, hemograma e na produção das imunoglobulinas de ratos submetidos à quimioterapia”. Universidade do Oeste Paulista; 2016.

Declaração de Interesse

Todos os autores contribuíram para a preparação e interpretação dos dados e da escrita, revisão e aprovação do manuscrito. Todos os autores declararam não haver conflito de interesse.

RESUMO

Objetivo

Avaliar o efeito da suplementação com diferentes doses de L-arginina na perda de peso corporal imediata de ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Métodos

Foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (8 ratos/grupo) com peso corporal semelhante: grupo controle (G_C), os ratos receberam ração e água; G_{5-FU} recebeu ração, água e uma dose de 5-FU; $G_{Arg295mg+5-FU}$ e $G_{Arg458mg+5-FU}$ que receberam ração, 295 mg e 458 mg de L-arginina, respectivamente, adicionada na água e uma dose de 5-FU. A 5-FU foi aplicada nos ratos após o período de adaptação (dia 7), na dose única de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Os ratos foram pesados individualmente, sempre no período da manhã e sem jejum prévio, para determinação do ganho de peso antes e depois da aplicação da 5-FU.

Resultados

A suplementação com 295 mg de L-arginina mostrou-se benéfica na redução de perda de peso corporal durante o tratamento com o quimioterápico 5-FU e não interferiu no consumo de ração pelos ratos antes ou após a quimioterapia. Porém, nos ratos onde a dosagem de L-arginina foi maior (458 mg), o consumo de ração foi menor, indicando que a suplementação na dose 458 mg pode prejudicar a ingestão alimentar, favorecendo a perda de peso, que foi semelhante ao grupo não suplementado (G_{5-FU})

Conclusão

A suplementação com 295 mg de L-arginina/dia atenuou a perda de peso corporal imediata dos ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Termos de Indexação: Aminoácido. Câncer. 5-fluorouracil.

INTRODUÇÃO

A 5-fluorouracil (5-FU), é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de carcinomas de mama, cabeça e pescoço, pâncreas, estômago, cólon, reto e da pele^{1,2,3}. No entanto, a 5-FU tem baixa especificidade, e seletividade somente para as células tumorais e, portanto, ela também pode acometer as células sadias do organismo, inibindo síntese da timidilato-sintetase (TS) e/ou da incorporação no DNA e RNA dessas células⁴, resultando em efeitos colaterais indesejáveis que pode comprometer o pleno funcionamento dos órgãos e a saúde do paciente em quimioterapia^{3,5}.

Os efeitos colaterais provenientes do uso da 5-FU são diversos e variam conforme a dose, estado clínico do paciente e via de administração². Dentre estes efeitos, destaca-se a perda de peso, expondo os pacientes à depleção do estado nutricional⁶.

A desnutrição é uma complicação frequente no paciente portador de uma neoplasia maligna, podendo atingir até 66,4% deles, sendo que um terço dos adultos com a doença apresenta perda de peso superior a 10%^{7,8}.

Dos fatores associados à desnutrição destacam-se a ingestão alimentar, que é influenciada pelo tumor e os efeitos colaterais do tratamento oncológico, as alterações no metabolismo energético e dos nutrientes, o jejum prolongado para exames pré ou pós-operatórios e o aumento nas perdas nutricionais, devido a vômitos, má-absorção, diarreia e falência renal⁹. Todos estes fatores são agravados por condições socioeconômicas precárias e hábitos alimentares inadequados^{5,9}.

O estado nutricional depauperado, principalmente quando evidenciado pela perda de massa corporal magra, está associado ao aumento no tempo de hospitalização e na morbimortalidade. Tal associação decorre do fato de que um aumento percentual da perda de peso está diretamente associado a prejuízos nos

processos de cicatrização, fraqueza muscular, redução da imunidade com aumento das infecções e morte^{9,10}.

Na tentativa de minimizar a perda de peso corporal de pacientes em quimioterapia e, desta forma, beneficiar a saúde, a sobrevivência e a qualidade de vida de pacientes oncológicos, a nutrição por meio da suplementação com o aminoácido L-arginina vem despertando interesse como suplemento alimentar que pode beneficiar alguns mecanismos de defesa anti-tumorais de pacientes durante a quimioterapia^{11,12,13,14,15}. Entretanto, ainda há necessidade de novos estudos que avaliem o efeito deste aminoácido como redutor da perda de peso imediata nesses pacientes.

Neste contexto, o estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com diferentes doses de L-arginina na perda de peso corporal imediata de ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU.

MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, sob o protocolo de número 2755.

Foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com peso corporal médio de $161,5 \pm 9,0$ gramas. Esses ratos foram distribuídos, randomicamente, em 4 grupos experimentais (8 ratos/grupo) e mantidos sob as mesmas condições ambientais, com padrão de iluminação de claro/escuro de 12/12 horas e com temperatura ambiente em torno de 23 a 25 °C, e receberam os seguintes tratamentos:

- Grupo controle (G_C): os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água filtrada *ad libitum*.
- Grupo 5-FU (G_{5-FU}): os ratos receberam ração comercial balanceada e água filtrada *ad libitum* e também aplicou uma dose de 200 mg de 5-FU/kg de peso corporal por via intraperitoneal, após 7 dias de adaptação dos ratos à suplementação com L-arginina e as condições experimentais conforme recomendado por Leocádio et al.¹⁵.
- Grupo Arg295+5-FU ($G_{Arg295+5-FU}$): os ratos receberam ração comercial balanceada, suplementação média diária de 295 mg de L-arginina, que foi adicionada na água *ad libitum*, e também aplicou uma dose de 200 mg de 5-FU/kg de peso corporal por via

intraperitoneal, após 7 dias de adaptação dos ratos à suplementação com L-arginina e as condições experimentais conforme recomendado por Leocádio et al.¹⁵.

- Grupo Arg458+5-FU ($G_{Arg458+5-FU}$): os ratos receberam ração comercial balanceada, suplementação média diária de 458 mg de L-arginina, que foi adicionada na água *ad libitum*, e também aplicou uma dose de 200 mg de 5-FU/kg de peso corporal por via intraperitoneal, após 7 dias de adaptação dos ratos à suplementação com L-arginina e as condições experimentais conforme recomendado por Leocádio et al.¹⁵.

Para suplementação de L-arginina utilizou-se comprimidos efervescentes de aspartato de arginina sem adição de vitamina C (Tagifor®, Sanofi-Aventis).

O consumo da L-arginina nos ratos Wistar de todos os grupos experimentais foi determinado diariamente durante o experimento por meio do consumo diário de água dos ratos. Para isto, mediu-se o volume de água antes de ser colocado no bebedouro dos ratos e, após 24 horas, mediu-se o volume da sobra de água no bebedouro. Subtraindo-se o segundo volume de água do primeiro volume, obteve-se o consumo médio diário da água de cada grupo experimental dos ratos Wistar, que foi dividido pelo número de ratos Wistar de cada grupo experimental.

O consumo da ração pelos ratos Wistar de todos os grupos experimentais também foi determinado diariamente durante todo o experimento. Para isto, a ração foi pesada antes de ser colocada no comedouro dos ratos e, após 24 horas, pesada a sobra da ração no comedouro. Subtraindo-se o segundo peso do primeiro peso, obteve-se o consumo médio diário da ração de cada grupo experimental dos ratos Wistar, que foi dividido pelo número de ratos Wistar de cada grupo experimental.

A ração comercial balanceada consumida ratos Wistar durante o experimento era composta por (níveis de garantia/Kg de ração): 22,0% de proteína bruta; 2,5% de extrato etéreo; 6,0% de matéria fibrosa; 10% de matéria mineral; 1,2% de cálcio; 0,7% de fósforo; 3.000 mg de metionina; 7.000 UI de vitamina A; 50 mg de vitamina C; 2.000 UI de vitamina D3; 15 UI de vitamina E; 1,0 mg de vitamina K3; 2,0 mg de vitamina B1; 6,0 mg de vitamina B2; 3,0 mg de vitamina B6; 9,0 mg de vitamina B12; 1,0 mg de ácido fólico; 12,0 mg de ácido pantotênico; 0,5 mg de biotina; 500,0 mg de colina; 20,0 mg de niacina; 9,0 mg de cobre; 40,0 mg de ferro; 0,7 mg de iodo; 90,0 mg de manganês; 0,4 mg de selênio; 50,0 mg de zinco.

Os ratos foram pesados individualmente no início do experimento, no dia da aplicação da 5-FU e no quarto dia após a administração da 5-FU, sempre no período da manhã e sem jejum prévio, para determinação do ganho de peso antes e depois da aplicação da 5-FU.

Os resultados do peso corporal, ganho de peso, consumo de ração e água dos animais apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilk e foram submetidos a ANOVA *Oneway* e teste de Tukey com significância de 5%.

RESULTADOS

O consumo de ração pelos ratos antes e também após aplicação da 5-FU não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os grupos G_C , G_{5-FU} e $G_{Arg295+5-FU}$, mas o consumo dos ratos do grupo $G_{Arg458+5-FU}$ foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 1). Comparando os momentos experimentais (antes e após a quimioterapia) dentro de um mesmo grupo, observa-se na Tabela 1 que houve redução significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração dos ratos dos grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ após a aplicação da 5-FU.

A ingestão de água dos ratos do grupo G_{5-FU} apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) antes da quimioterapia e após a quimioterapia com 5-FU a ingestão reduziu significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo G_C (Tabela 1). Enquanto que o consumo de água pelos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos grupos G_C e G_{5-FU} antes e após a quimioterapia (Tabela 1). Comparando os momentos experimentais (antes e após a quimioterapia) dentro de um mesmo grupo, observa-se na Tabela 1 que houve redução significativa ($p < 0,05$) na ingestão de água dos ratos dos grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ após a aplicação da 5-FU.

A perda de peso corporal entre os grupos G_{5-FU} e $G_{Arg458+5-FU}$ foi semelhante, porém os ratos do grupo $G_{Arg295+5-FU}$ apresentaram redução ($p < 0,05$) na perda de peso corporal após a aplicação da 5-FU na ordem 209,6% e 160,3% em relação aos grupos G_{5-FU} e $G_{Arg458+5-FU}$, respectivamente (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A elevada ingestão de água pelos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ antes e após a quimioterapia (Tabela 1) foi provavelmente devido ao aumento da palatabilidade que ocorreu com a adição da L-arginina na água. No entanto, este aumento na ingestão de água pelos ratos não interferiu no consumo diário da L-arginina, uma vez que a dose de arginina era ajustada constantemente em função da ingestão de água por cada grupo experimental.

A suplementação com 295 mg de L-arginina mostra-se benéfica na redução de perda de peso corporal durante o tratamento com o quimioterápico 5-FU, uma vez que o aumento da perda de peso está diretamente associado a prejuízos nos processos de cicatrização, fraqueza muscular, redução da imunidade com aumento das infecções e morte^{9,10}.

Embora a suplementação com 295 mg de L-arginina não tenha interferido no consumo de ração pelos ratos antes ou após a aplicação do quimioterápico, os ratos onde a dosagem da L-arginina foi maior (458 mg), a ingestão alimentar foi prejudicada (Tabela 1), favorecendo a perda de peso mesmo com a suplementação de L-arginina.

Ao analisar estudos com proteínas e outros suplementos dietéticos, a combinação com L-arginina tem mostrado resultados interessantes^{16,17,18}. Um estudo que avaliou a suplementação com diferentes combinações, revelou que os pacientes ganharam uma média de cerca de 2 kg de peso corporal¹⁶. Entretanto, em outro estudo com cerca de 470 pacientes com câncer, não foi encontrada diferença significativa no ganho de massa magra corporal após 8 semanas, porém houve uma forte tendência na direção de um aumento das medidas corporais, bem como do peso corporal¹⁷.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que a suplementação com 295 mg de L-arginina/dia atenuou a perda de peso corporal imediata dos ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU. Porém, o efeito isolado da suplementação com L-arginina sobre o ganho de peso corporal a longo prazo deve ser investigado em estudos adicionais em pacientes com câncer durante o tratamento quimioterápico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Martins CG, Wagner SC, Linden R. Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2013;59(2):271-280.
2. Neto MC. Guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia. São Paulo: Hosp. Albert Einstein. 2013;1:113-116.
3. Zhang X, Sun B, Lu Z. Evaluation of Clinical Value of Single Nucleotide Polymorphisms of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene to Predict 5-Fluorouracil Toxicity in 60 Colorectal Cancer Patients in China. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10(7):894-902.
4. Chabner BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas: agentes citotóxicos. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. (2012). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12*. AMGH Editora. 2012;1695-1698.
5. Smiderle CA, Gallon, CW. Desnutrição em oncologia: revisão de literatura. *Nutrição Clínica*. 2012;27(4):250-6.
6. Soares GMP, Junior-Lima PCR, Mota CSMJ, Justino CFP, Brito CAG, Ribeiro AR, Cunha Q F, Souza PLHM. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2011;68:713-720.
7. Stewart BW, Wild CP (Ed.). *World Cancer Report*. World Health Organization: 2014. Lyon: IARC, 2014:28-30.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2016 [acesso em maio 2016].
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-24042016.pdf>.
9. Pinho NB, Oliveira GPC, Correia MITD, Oliveira AGL, Souza CM, Cukier C, et al. Terapia nutricional na Oncologia. In: Jatene FB, Bernardo WM. *Projeto Diretrizes (DITEN)*. Volume IX. São Paulo: Associação Médica Brasileira; Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina. 2011:127-137.

10. Kyle UG, Pirlich M, Schuetz T, Lochs H, Pichard C. Is nutritional depletion by nutritional risk index associated with increased length of hospital stay? A population-based study. *JPEN*. 2004;28(2):99-104.
11. Novaes MRCG, de Melo Pantaleão C. Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. *Revista de Ciências Médicas*. 2012;14(1):34-40.
12. Kang K, Shu XL, Zhong JX, Yu TT, Lei T. Effect of L-arginine on immune function: a meta-analysis. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2014;23(3):351-359.
13. Ellinger S. Micronutrients, Arginine, and Glutamine: Does Supplementation Provide an Efficient Tool for Prevention and Treatment of Different Kinds of Wounds? *Advances in Wound Care*. 2014;3(11):691-707.
14. Mcrae MP. Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Journal Chiropractic Medicine*. 2016 Sep;15(3):184-9.
15. Leocádio P, Antunes M, Teixeira L, Leonel A, Alvarez-Leite J, Machado D. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. *Nutrition and Cancer*. 2015;67(3):486-493.
16. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am Journal Surgical Pathology*. 2002;183:471-479.22.
17. Berk L, James J, Schwartz A, Hug E, Mahadevan A, Samuels M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a beta-hydroxyl beta-methyl butyrate, glutamine, and arginine mixture for the treatment of cancer cachexia (RTOG 0122). *Support Care Cancer*. 2008;16:1179-1188.
18. Mochamat, Cuhls H, Marinova M, Kaasa S, Stieber C, Conrad R, Radbruch L, Mücke M. A systematic review on the role of vitamins, minerals, proteins, and other supplements for the treatment of cachexia in cancer: a European Palliative Care Research Centre cachexia project. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017; 8:25-39

Tabela 1. Ganho de peso e ingestão média (\pm desvio padrão) de água e ração ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil (5-FU)

Grupos	Ganho de peso (g)		Consumo de ração (g/dia)		Consumo de água (mL/dia)	
	Antes da 5-FU	Depois da 5-FU	Antes da 5-FU	Depois da 5-FU	Antes da 5-FU	Depois da 5-FU
G_C	34.5 \pm 11.8 ^{Aa}	44.4 \pm 13.8 ^{Aa}	66.3 \pm 3.7 ^{Aa}	62.3 \pm 3.7 ^{Aa}	33.5 \pm 0.3 ^{Aa}	33.4 \pm 0.5 ^{Aa}
G_{5-FU}	38,4 \pm 7,5 ^{Aa}	-22,6 \pm 13,8 ^{Cb}	66.1 \pm 2.4 ^{Aa}	61.2 \pm 4.1 ^{Ab}	36.4 \pm 0.6 ^{Da}	31.3 \pm 3.1 ^{Ab}
G_{Arg295+5-FU}	42.0 \pm 5.2 ^{Aa}	-7.3 \pm 15.6 ^{Bb}	67.8 \pm 0.8 ^{Aa}	61.5 \pm 0.5 ^{Ab}	54.3 \pm 0.8 ^{Ca}	42.6 \pm 0.3 ^{Bb}
G_{Arg458+ 5-FU}	35.9 \pm 10.5 ^{Aa}	-19.0 \pm 14.6 ^{Cb}	62.9 \pm 0.5 ^{Ba}	58.2 \pm 0.3 ^{Bb}	58.8 \pm 1.1 ^{Ba}	48.1 \pm 0.3 ^{Ab}

^{A,B,C,D} – Nas colunas, médias seguidas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

^{a,b} - Nas linhas, médias seguidas de letras minúsculas distintas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), dentro de um mesmo grupo experimental, entre os momentos experimentais, ante e depois da quimioterapia.

G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

1.1 Instruções para Autores: Revista de Nutrição

A Revista de Nutrição (e-ISSN 1678-9865) é um periódico especializado que publica artigos que contribuem para o estudo da Nutrição em suas diversas subáreas e interfaces. Com periodicidade bimestral, está aberta a contribuições da comunidade científica nacional e internacional.

Os manuscritos podem ser rejeitados sem comentários detalhados após análise inicial, por pelo menos dois editores da Revista, se os artigos forem considerados inadequados ou de prioridade científica insuficiente para publicação na Revista.

Todos os artigos devem ser submetidos de forma eletrônica pela página <<http://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo>>.

Todo processo de avaliação dos manuscritos terminará na segunda e última versão.

A Revista de Nutrição não publica mais que 1 (um) artigo do mesmo autor no mesmo ano (volume), para evitar a endogenia. Esse procedimento visa aumentar o número de temas e de colaborações provenientes de autores nacionais e internacionais.

Conflito de Interesse

Autores: Os autores devem declarar, de forma explícita, individualmente, qualquer potencial conflito de interesse financeiro, direto e/ou indireto, e não financeiro etc., bem como qualquer conflito de interesse com revisores *ad hoc*.

Revisores ad hoc: No caso da identificação de conflito de interesse da parte dos revisores, o Comitê Editorial encaminhará o manuscrito a outro revisor *ad hoc*.

Categoria dos artigos

A Revista só publica artigos inéditos no idioma inglês. No entanto, os autores podem submeter os artigos em português e, após a avaliação do manuscrito, o mesmo passará pelo processo de tradução com tradutores credenciados pela Revista, com o custo da tradução arcado pelos autores, nas seguintes categorias:

- Original: contribuições destinadas à divulgação de resultados de pesquisas inéditas, tendo em vista a relevância do tema, o alcance e o conhecimento gerado para a área da pesquisa (limite máximo de 3.500 palavras).
- Revisão (a convite): síntese de conhecimentos disponíveis sobre determinado tema, mediante análise e interpretação de bibliografia pertinente, de modo a conter uma análise crítica e comparativa dos trabalhos na área, que discuta os limites e alcances metodológicos, permitindo indicar perspectivas de continuidade de estudos naquela linha de pesquisa (limite máximo de 4 mil palavras). Serão publicados até dois trabalhos por fascículo.
- Nota Científica: dados inéditos parciais de uma pesquisa em andamento (limite máximo de 1.500 palavras).
- Seção Temática (a convite): seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual (máximo de 10 mil palavras no total).

Categoria e a Área Temática do Artigo

Os autores devem indicar a categoria do artigo e a área temática, a saber: alimentação e ciências sociais, avaliação nutricional, bioquímica nutricional, dietética, educação nutricional, epidemiologia e estatística, micronutrientes, nutrição clínica, nutrição experimental, nutrição e geriatria, nutrição materno-infantil, nutrição em produção de refeições, políticas de alimentação e nutrição e saúde coletiva.

Autoria

A indicação dos nomes dos autores logo abaixo do título do artigo é limitada a 6. O crédito de autoria deverá ser baseado em contribuições substanciais, tais como concepção e desenho, ou análise e interpretação dos dados. Não se justifica a inclusão de nomes de autores cuja contribuição não se enquadre nos critérios acima. Também deve estar registrado na 1ª página do artigo a origem institucional e titulação acadêmica de cada autor.

A revista recomenda fortemente que todos os autores e coautores tenham seus currículos atualizados na Plataforma Lattes, para submissão de artigos.

A tramitação do artigo só será iniciada após a inclusão destas informações na página do título.

Os manuscritos devem conter, na página de identificação, explicitamente, a contribuição de cada um dos autores.

Informar o número de Registro *ORCID*[®] (*Open Researcher and Contributor ID*). Caso não possua, fazer o cadastro através do link: <<https://orcid.org/register>>. O registro é gratuito. Os autores devem indicar três possíveis revisores para o manuscrito com os respectivos e-mails e as instituições as quais estão vinculados. Opcionalmente, podem indicar três revisores para os quais não gostaria que seu trabalho fosse enviado.

Preparo do Manuscrito

O texto deverá contemplar o número de palavras de acordo com a categoria do artigo.

As folhas deverão ter numeração personalizada desde a folha de rosto (que deverá ser numerada como número 1). O papel deverá ser de tamanho A4, com formatação de margens superior e inferior (no mínimo 2,5 cm), esquerda e direita (no mínimo 3 cm), preparados em espaço entrelinhas 1,5, com fonte Arial 11. O arquivo deverá ser gravado em editor de texto similar à versão 2010 do Word.

Recomenda-se fortemente que o(s) autor(es) busque(m) assessoria linguística profissional (revisores e/ou tradutores certificados em língua portuguesa e inglesa) antes de submeter(em) originais que possam conter incorreções e/ou inadequações morfológicas, sintáticas, idiomáticas ou de estilo.

Devem ainda evitar: (i) o uso da primeira pessoa "meu estudo...", ou da primeira pessoa do plural "percebemos...", pois em texto científico o discurso deve ser impessoal, sem juízo de valor e na terceira pessoa do singular; (ii) no início de frases os números devem estar por extenso, e não em algarismo arábico; (iii) as sentenças devem ser curtas, claras e objetivas, (iv) parágrafos de uma única oração não são aceitáveis.

Os artigos devem ter, aproximadamente, 30 referências, exceto no caso de artigos de revisão, que podem apresentar em torno de 50. Sempre que uma referência possuir o número de *Digital Object Identifier* (DOI), este deve ser informado.

Página de rosto deve conter:

- Título completo em português: (i) deverá ser conciso e evitar palavras desnecessárias e/ou redundantes, como "avaliação do...", "considerações

acerca de...", "Um estudo exploratório sobre..."; (ii) sem abreviaturas e siglas ou localização geográfica da pesquisa.

- Sugestão obrigatória de título abreviado para cabeçalho, não excedendo 40 caracteres (incluindo espaços), em português (ou espanhol) e inglês.
- Título completo em inglês, compatível com o título em português.
- Nome de cada autor, por extenso. Não abreviar os prenomes.
- Informar os dados de origem, da titulação e afiliação institucional atual de cada autor, por extenso, sem nenhuma sigla.
- Indicação do endereço completo da instituição à qual o autor de correspondência está vinculado.
- Informar telefone e endereço de e-mail de todos os autores.
- Informar, explicitamente, a contribuição de cada um dos autores no artigo. O crédito de autoria deverá ser baseado em contribuições substanciais, tais como concepção e desenho, análise e interpretação dos dados, revisão e aprovação da versão final do artigo. Não se justifica a inclusão de nomes de autores cuja contribuição não se enquadre nos critérios acima.
- Informar se o artigo é oriundo de Dissertação ou Tese, indicando o título, autor, universidade e ano da publicação.
- Poderá ser incluída nota de rodapé contendo apoio financeiro e o número do processo e/ou edital, agradecimentos pela colaboração de colegas e técnicos, em parágrafo não superior a três linhas. Observação: esta deverá ser a única parte do texto com a identificação dos autores.

Resumo deve conter:

- Todos os artigos submetidos em português ou espanhol deverão ter resumo no idioma original e em inglês, com um mínimo de 150 palavras e máximo de 250 palavras.
- O texto não deve conter citações e abreviaturas. Destacar no mínimo três e no máximo seis termos de indexação, utilizando os descritores em Ciência da Saúde - DeCS - da Bireme <<http://decs.bvs.br>>.
- Os artigos submetidos em inglês deverão vir acompanhados de resumo em português, além do abstract em inglês.

- Para os artigos originais, os resumos devem ser estruturados destacando objetivos, métodos básicos adotados, informação sobre o local, população e amostragem da pesquisa, resultados e conclusões mais relevantes, considerando os objetivos do trabalho, e indicando formas de continuidade do estudo.
- Para as demais categorias, o formato dos resumos deve ser o narrativo, mas com as mesmas informações.

Estrutura do texto:

- Texto: com exceção dos manuscritos apresentados como Revisão, Comunicação, Nota Científica e Ensaio, os trabalhos deverão seguir a estrutura formal para trabalhos científicos:
- Introdução: deve conter revisão da literatura atualizada e pertinente ao tema, adequada à apresentação do problema, e que destaque sua relevância. Não deve ser extensa, a não ser em manuscritos submetidos como Artigo de Revisão.
- Métodos: deve conter descrição clara e sucinta do método empregado, acompanhada da correspondente citação bibliográfica, incluindo: procedimentos adotados; universo e amostra; instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação; tratamento estatístico. Em relação à análise estatística, os autores devem demonstrar que os procedimentos utilizados foram não somente apropriados para testar as hipóteses do estudo, mas também corretamente interpretados. Os níveis de significância estatística (ex. $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) devem ser mencionados. Informar que a pesquisa foi aprovada por Comitê de Ética credenciado junto ao Conselho Nacional de Saúde e fornecer o número do processo. Ao relatar experimentos com animais, indicar se as diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais - ou se qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório -, foram seguidas.
- Resultados: sempre que possível, os resultados devem ser apresentados em tabelas ou figuras, elaboradas de forma a serem auto-explicativas e com análise estatística. Evitar repetir dados no texto.

- Ilustrações: São consideradas ilustrações todo e qualquer tipo de tabelas, figuras, gráficos, desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, mapas, organogramas, diagramas, plantas, quadros, retratos, etc., que servem para ilustrar os dados da pesquisa. É imprescindível a informação do local e ano do estudo para artigos empíricos. Não é permitido que figuras representem os mesmos dados de tabelas ou de dados já descritos no texto. A quantidade total de ilustrações aceitas por artigo é de 5 (cinco), incluindo todas as tipologias citadas acima. As ilustrações devem ser inseridas após o item Referências e também enviadas separadamente em seu programa original, através da plataforma ScholarOne, no momento da submissão. As ilustrações devem ser editáveis, sendo aceitos os seguintes programas de edição: Excel, GraphPrism, SPSS 22, Corel Draw Suite X7 e Word. Caso opte pelo uso de outro programa, deverá ser usada a fonte padrão Frutiger, fonte tamanho 7, adotada pela revista na edição.

As imagens devem possuir resolução igual ou superior a 600 dpi. Gráficos e desenhos deverão ser gerados em programas de desenho vetorial (Microsoft Excel, CorelDraw, Adobe Illustrator etc.), acompanhados de seus parâmetros quantitativos, em forma de tabela e com nome de todas as variáveis. Não são aceitos gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D).

A cada ilustração deverá ser atribuído um título breve e conciso, sendo numeradas consecutiva e independentemente, com algarismos arábicos, de acordo com a ordem de menção dos dados. Os quadros e tabelas terão as bordas laterais abertas.

As palavras Figura, Tabela e Anexo, que aparecerem no texto, deverão ser escritas com a primeira letra maiúscula e acompanhadas do número a que se referirem. Os locais sugeridos para inserção de figuras e tabelas deverão ser indicados no texto.

- Discussão: deve explorar, adequada e objetivamente, os resultados, discutidos à luz de outras observações já registradas na literatura.
- Conclusão: apresentar as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho, e indicar formas de continuidade do estudo. Não serão aceitas citações bibliográficas nesta seção.

- Agradecimentos: podem ser registrados agradecimentos, em parágrafo não superior a três linhas, dirigidos a instituições ou indivíduos que prestaram efetiva colaboração para o trabalho.
- Anexos: deverão ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do texto. Caberá aos editores julgar a necessidade de sua publicação.
- Abreviaturas e siglas: deverão ser utilizadas de forma padronizada, restringindo-se apenas àquelas usadas convencionalmente ou sancionadas pelo uso, acompanhadas do significado, por extenso, quando da primeira citação no texto. Não devem ser usadas no título e no resumo.
- Referências de acordo com o estilo *Vancouver*: devem ser numeradas consecutivamente, seguindo a ordem em que foram mencionadas pela primeira vez no texto, conforme o estilo *Vancouver*. Nas referências com dois até o limite de seis autores, citam-se todos os autores; acima de seis autores, citam-se os seis primeiros autores, seguido de et al. As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com o *Index Medicus*. Citações bibliográficas no texto: deverão ser expostas em ordem numérica, em algarismos arábicos, meia linha acima e após a citação, e devem constar da lista de referências. Se forem dois autores, citam-se ambos ligados pelo "&"; se forem mais de dois, cita-se o primeiro autor, seguido da expressão et al.

Em citações diretas traduzidas pelos autores deve constar em nota de rodapé o trecho no idioma original. Na indicação da fonte deve constar: Tradução minha ou tradução nossa. Exemplo: (Rodgers et al., 2011, tradução nossa).

2 ARTIGO B

Este artigo será submetido no formato de artigo completo para a revista *Nutrition and Cancer Journal*

Efeito da suplementação com L-arginina no leucograma, infiltrado inflamatório do intestino e IgA com uso de 5-FU em ratos

Bianca D. Balmant, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: biancadedepieribalmant@hotmail.com. Tel.: +55 18 98146-9636. Autor correspondente.

Eloisa O. N. Araújo, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: eloisanazario@hotmail.com

Denise Yabuki, Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: deniseyabuki.7@gmail.com

Amanda B. Novais, Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: amanda.bn01@hotmail.com

Sandra C. Genaro, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: sandragenaro@hotmail.com

Cecilia B. Laposy, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: claposy@unoeste.br

Paulo F. I. Giozo, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: paulofelipe@unoeste.br

Marcelo G. M. Chacur, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: chacur@unoeste.br

Rogério Giuffrida, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: rgiuffrida@unoeste.br

Luis S. L. S. Reis, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: luisreis@unoeste.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com L-arginina no hemograma, na concentração sérica de imunoglobulinas e no infiltrado inflamatório do intestino de ratos submetidos à quimioterapia com 5-Fluorouracil (5-FU). Utilizou-se 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, distribuídos randomicamente em 4 grupos (8 ratos/grupo): grupo controle (G_C) os ratos receberam ração e água; grupo G_{5-FU} os ratos receberam ração, água e uma dose de 5-FU; grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ os ratos receberam ração, água adicionada com 295 mg e 458 mg de L-arginina, respectivamente, e uma dose de 5-FU. Aplicou-se a 5-FU por via intraperitoneal (200 mg) após sete dias da suplementação. Quatro dias após a aplicação, colheram-se amostras de sangue e do intestino. As plaquetas do grupo $G_{Arg298+5-FU}$ não diferiram do grupo G_C . Os grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ aumentaram significativamente os neutrófilos e a concentração sérica de IgA em relação ao G_{5-FU} . Todos os ratos do grupo G_C apresentaram infiltrado inflamatório moderado, porém 57% dos ratos do grupo $G_{Arg458+5-FU}$ apresentaram discreto infiltrado inflamatório. Conclui-se que as diferentes doses de L-arginina imunomodula a produção de IgA e atenua a

plaquetopenia e a neutropenia. Além disso, 458 mg de L-arginina pode minimizar o infiltrado inflamatório no intestino após a quimioterapia com 5-FU.

Palavra-chaves: imunomodulador; aminoácido; câncer; 5-fluorouracil.

INTRODUÇÃO

O câncer é apontado como um problema mundial de saúde pública (1-3), sendo que para o ano de 2030, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma incidência de 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer anualmente (1).

Devido à elevada mortalidade e a incidência de novos casos de câncer na população, a cancerologia vem desenvolvendo pesquisas objetivando compreender o desenvolvimento da neoplasia no organismo e a busca de tratamentos adequados para cada tipo de câncer (4,5).

A quimioterapia antineoplásica é um método que utiliza compostos químicos que agem destruindo as células malignas na tentativa de controlar ou curar o câncer (6,7).

Há várias drogas quimioterápicas, dentre elas, a 5-fluorouracil (5-FU), uma droga que nos últimos 40 anos tem sido amplamente utilizada (8) por ser um fármaco de baixo custo (9) e ser indicada no tratamento de diversos tumores como os de mama, cabeça e pescoço, pâncreas, estômago, cólon, reto e pele (10). No entanto, a 5-FU tem baixa especificidade e seletividade somente para as células tumorais e, portanto, ela também pode agredir as células saudáveis do organismo, inibindo síntese da timidilato-sintetase (TS) e/ou da incorporação no DNA e RNA dessas células (11), o que resulta em efeitos colaterais indesejáveis que podem comprometer o pleno funcionamento dos órgãos e a saúde do paciente em quimioterapia (8,12).

Dentre os vários efeitos colaterais da 5-FU estão a supressão da medula óssea, levando a trombocitopenia, leucopenia, neutropenia (9,12) e imunossupressão, que pode resultar na diminuição da dose do quimioterápico ou no aumento do intervalo entre os ciclos de quimioterapia e/ou retardar o tratamento do tumor, favorecendo o aparecimento de metástases tumorais e deixando os pacientes expostos à contraírem doenças infecciosas secundárias à quimioterapia (8,13,14).

A busca por tratamentos adjuvantes à quimioterapia - na tentativa de minimizar seus efeitos colaterais e melhorar a saúde, a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes oncológicos - desperta interesse na suplementação com o aminoácido L-arginina (15,16).

Apesar da L-arginina ser sintetizada pelo organismo, nos pacientes oncológicos essa produção é insuficiente para atender suas necessidades nutricionais, por ser um aminoácido importante para as reações bioquímicas que ocorrem no citoplasma e na biossíntese proteica nuclear das células (17), ter potencial para aumentar a atividade dos macrófagos, neutrófilos, linfócitos (18), células *Natural Killer*, células *T-helper* e estimular a produção do fator alfa de necrose do tumor (TNF-alfa) e das citocinas: interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), receptor IL-2, interleucina-6 (IL-6) (15,19). Além disto, a arginina também pode estimular o processo de cicatrização, reduzir a incidência de infecções secundárias ou oportunistas e quadros de septicemia (20, 21). Desta forma, a L-arginina tem potencial para reduzir o tempo de internação e aumentar a qualidade de vida dos pacientes com câncer (22-24). No entanto, ainda não está totalmente esclarecida a dose ideal de suplementação com L-arginina para esses pacientes, uma vez, que as doses de suplementação com L-arginina utilizadas nos experimentos são variadas e algumas vezes com resultados conflitantes.

Apesar dos modelos animais não reproduzirem na totalidade os efeitos que se deseja estudar em relação aos seres humanos, os ratos têm sido utilizados como modelo experimental para avaliação de diversos efeitos da nutrição devido as suas vantagens no tempo e nos níveis desejados quantitativamente e qualitativamente na reprodução de diversos quadros de desnutrição (25).

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com L-arginina, em diferentes doses, no hemograma, na produção das imunoglobulinas (Ig): A, G, M e no processo inflamatório do intestino delgado de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, sob o protocolo de número 2755.

Delineamento Experimental

Para a realização do experimento foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com peso corporal médio de $161,5 \pm 9,0$ g. Esses ratos foram distribuídos randomicamente em 4 grupos experimentais (8 ratos/grupo) e mantidos sob as mesmas condições ambientais com padrão de iluminação de claro/escuro de 12/12 horas e com temperatura ambiente em torno de 23 °C (26), que receberam os seguintes tratamentos:

- Grupo controle (G_C): os ratos receberam somente ração comercial balanceada (Supralab[®], Alisul, Brasil) e água filtrada *ad libitum*.
- Grupo 5-FU (G_{5-FU}): os ratos receberam ração comercial balanceada (Supralab[®], Alisul, Brasil), água filtrada *ad libitum* e também foi administrado uma dose de 5-FU.
- Grupo Arg_{295+5-FU} ($G_{Arg295+5-FU}$): os ratos receberam ração comercial balanceada (Supralab[®], Alisul, Brasil), suplementação média diária de 295 mg de L-arginina que foi adicionada na água *ad libitum* e também foi administrado uma dose de 5-FU.
- Grupo Arg_{458+5-FU} ($G_{Arg458+5-FU}$): os ratos receberam ração comercial balanceada (Supralab[®], Alisul, Brasil), suplementação média diária de 458 mg de L-arginina que foi adicionada na água *ad libitum* e também foi administrado uma dose de 5-FU.

Os primeiros 7 dias do experimento foi considerado o período de adaptação dos ratos as condições experimentais e a suplementação com L-arginina. O dia zero do experimento foi considerado o dia da aplicação da dose da 5-FU nos ratos.

A 5-FU foi aplicado nos ratos no sétimo dia do período de adaptação na dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal conforme recomendado por Leocádio et al. (27).

A suplementação dos ratos com a L-arginina foi realizada diluindo comprimidos efervescentes de aspartato de arginina (Tagifor[®], Sanofi-Aventis, França) na água desses animais. O controle do consumo médio diário de L-arginina pelos ratos foi realizado aferindo o volume de água antes de ser colocada no bebedouro dos ratos e, após 24 horas, foi aferido o volume de água que sobrava no

bebedouro. Subtraindo-se o volume de água da segunda aferição do volume de água da primeira aferição, foi considerado o consumo médio diário de água do grupo experimental. O consumo diário médio do grupo experimental foi dividido pela quantidade de ratos presente no grupo, e assim, foi determinado o consumo médio diária da ingestão de água e L-arginina de cada rato.

A ração comercial balanceada (Supralab[®], Alisul, Brasil) consumida pelos ratos Wistar durante o experimento foi composta por (níveis de garantia/Kg de ração): umidade (máx) 12,0 %, proteína bruta (mín) 22,0%, extrato etéreo (mín) 2,5%, matéria fibrosa (máx) 6,0 %, matéria mineral (máx) 10,0%, cálcio (mín) 0,8%, Cálcio (máx) 1,2%, fósforo (mín) 0,7%, metionina (mín) 3.000 mg/kg, vitamina A (mín) 7.000 UI/kg, vitamina C (mín) 50 mg/kg, vitamina D3 (mín) 2.000 UI/kg, vitamina E (mín) 15 UI/kg, vitamina K3 (mín) 1,0 mg/kg, vitamina B1 (mín) 2,0 mg/kg, vitamina B2 (mín) 6,0 mg/kg, vitamina B6 (mín) 3,0 mg/kg, vitamina B12 (mín) 9,0 mcg/kg, ácido fólico (mín) 1,0 mg/kg, ácido pantotênico (mín) 12,0 mg/kg, biotina (mín) 0,5 mg/kg, colina (mín) 500,0 mg/kg, niacina (mín) 20,0 mg/kg, cobre (mín) 9,0 mg/kg, ferro (mín) 40,0 mg/kg, iodo (mín) 0,7 mg/kg, manganês (mín) 90,0 mg/kg, selênio (mín) 0,4 mg/kg, zinco (mín) 50,0 mg/kg.

O consumo da ração pelos ratos Wistar de todos os grupos experimentais também foi determinado diariamente durante todo o experimento. Para isto, a ração foi pesada antes de ser colocada no comedouro dos ratos e, após 24 horas, foi pesada a sobra da ração no comedouro. Subtraindo-se o segundo peso do primeiro peso, foi determinado o consumo médio diário de ração de cada grupo experimental. O consumo médio de ração do grupo experimental foi dividido pela quantidade de ratos presentes no grupo e, assim, determinou o consumo de ração diário médio de cada rato.

Sacrifício, Colheita das Amostras de Sangue e Intestino Delgado dos Ratos

As amostras de sangue e intestino dos ratos Wistar foram colhidas 4 dias após a aplicação da 5-FU. Neste dia os ratos foram anestesiados com tionembutal (Thiopentax[®], Cristália, Brasil) na dose de 40 mg/Kg de peso corporal (28) e colheram-se duas amostras de sangue de todos os ratos por punção cardíaca: a primeira amostra foi colhida em tubos à vácuo contendo EDTA para realização do hemograma, fibrinogênio e proteína plasmática total; a segunda amostra de sangue foi colhida em tubos à vácuo sem anticoagulante que foram

centrifugados à 2.500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo para determinação da concentração de AST, ALT, uréia, creatinina, albumina, ferro e imunoglobulinas A, G, e M.

Logo após as colheitas de sangue, aprofundou-se o plano anestésico dos ratos utilizando uma dose de 100 mg de tionembutal/Kg de peso corporal e os ratos foram sacrificados por exsanguinação para a realização das colheitas das amostras de intestino delgado que foram fixadas em solução de formalina a 10%.

Exames laboratoriais

Determinação da Concentração Sérica de Creatinina, Uréia, Albumina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

A avaliação da função hepática e renal por meio das determinações séricas de ALT e AST, creatinina e uréia foi necessário pelo fato da arginina ser produzida pelo rim e armazenada no fígado (17).

As concentrações séricas de creatinina dos ratos foram determinadas por meio de teste enzimático colorimétrico utilizando kit comercial (Creatinina PAP FS[®], Kovalent, Brasil).

Para as dosagens séricas de uréia dos ratos utilizou-se o teste UV enzimático “Urease – GLDH” através de kit comercial (Uréia UV WS[®], Kovalent, Brasil).

As concentrações séricas de ALT e AST foram determinadas através do teste UV otimizado de acordo com a IFCC (Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial) utilizando os kits comerciais TGP (IFCC)[®] (Kovalent, Brasil) e TGO (IFCC)[®] (Kovalent, Brasil), respectivamente.

Todas as dosagens de ALT, AST, creatinina e uréia foram monitoradas por meio da utilização de soro controle normal (TopKon N[®], Kovalent, Brasil) para uso de exatidão e precisão na determinação de testes quantitativos *in vitro* de analitos em sistemas fotométricos (TopKon N[®], Kovalent, Brasil).

Determinação do Hemograma

Os valores de eritrócitos, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição do diâmetro das

hemácias (RDW) e contagem de leucócitos totais foram obtidos utilizando o analisador hematológico modelo POCH-100iV DIFF.

Para a contagem diferencial de leucócitos, confeccionaram-se esfregaços sanguíneos corados por coloração rápida para posteriormente serem analisados em microscópio óptico em aumento de 100X.

Determinação da Concentração das Proteínas Plasmáticas Totais e do Fibrinogênio

Para determinação quantitativa das proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio, aplicou-se o teste por refratometria (modelo ATC-ITREF-200, Instrutemp, Brasil). A concentração de proteínas plasmáticas totais foi estimada em g/dL a partir da leitura do teste e a concentração de fibrinogênio obtida através da precipitação a pelo calor (56 °C).

Determinação da Concentração Sérica de Albumina

As concentrações séricas de albumina foram dosadas pelo método fotométrico usando o verde de bromocresol por meio de Kits comerciais (Albumina WS[®], Kovalent, Brasil).

As dosagens de albumina foram monitoradas por meio da utilização de soro controle normal (TopKon N[®], Kovalent, Brasil) para uso de exatidão e precisão na determinação de testes quantitativos *in vitro* de analitos em sistemas fotométricos.

Determinação da Concentração Sérica de Ferro

As concentrações séricas de ferro dos ratos foram determinadas através do teste fotométrico utilizando ferene por meio de kit comercial (Ferro Ferene US[®], Kovalent, Brasil).

As dosagens de ferro foram monitoradas por meio da utilização de soro controle normal (TopKon N[®], Kovalent, Brasil) para uso de exatidão e precisão na determinação de testes quantitativos *in vitro* de analitos em sistemas fotométricos.

Dosagem das Concentrações Séricas das Imunoglobulinas A, G e M

A determinação quantitativa de IgA, IgG e IgM no soro dos ratos Wistar foi realizada por meio do método de imunoturbidimetria utilizando kits comerciais (Aptec[®], Kovalent, Brasil).

As dosagens das imunoglobulinas A, G e M foram monitoradas por meio da utilização de soro controle normal (TopKon N[®], Kovalent, Brasil) para uso de exatidão e precisão na determinação de testes quantitativos *in vitro* de analitos em sistemas fotométricos.

Coloração dos Cortes Histológicos do Intestino Delgado

As amostras significativas dos intestinos foram colhidas e fixadas em solução de formalina a 10%, onde permaneceram por no mínimo 48 horas. Após a fixação, as amostras de intestino delgado foram recortadas, acondicionadas em cassetes histológicos e processadas para inclusão em blocos de parafina seguindo as técnicas rotineiras do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista (29). Os cortes de 3 μm de espessura foram obtidos de cada bloco de parafina com auxílio de um micrótomo rotativo de precisão, em seguida foram distendidos em lâminas de vidro para microscopia e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina.

Os cortes histológicos do intestino dos ratos foram avaliados por microscopia óptica e os infiltrados inflamatórios foram graduados quanto a intensidade, sendo: 0 = ausente, 1 = discreta, 2 = moderada e 3 = severa.

Análise Estatística

Os resultados das hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, RDW-CV, leucócitos totais, linfócitos, proteínas plasmáticas totais, albumina, Fe, IgA, IgG, IgM, creatinina e uréia, apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk. Assim, foram analisados por meio da ANOVA on-way e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises aplicou-se a significância de 5% (30).

Os resultados do CHCM, plaquetas, segmentados, eosinófilos, monócitos, fibrinogênio, AST e ALT apresentaram distribuição não normal segundo o teste de Shapiro-Wilk. Dessa forma, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e as

medianas foram comparadas pelo teste de Dunn. Em todas as análises aplicou-se a significância de 5% (30).

RESULTADOS

O consumo de ração pelos ratos do grupo $G_{\text{arg458+5-FU}}$ foi significativamente menor ($P < 0,05$) aos demais grupos experimentais (Tabela 1). Comparando os momentos experimentais (antes e após a quimioterapia) dentro de um mesmo grupo, observa-se na Tabela 1 que houve redução significativa ($P < 0,05$) no consumo de ração dos ratos dos grupos G_{5-FU} , $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{arg458+5-FU}}$ após a aplicação da 5-FU.

A ingestão de água dos ratos do grupo G_{5-FU} apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) antes da quimioterapia e após a quimioterapia com 5-FU a ingestão reduziu significativamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo G_C (Tabela 1). Enquanto que o consumo de água pelos ratos dos grupos $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{Arg458+5-FU}}$ foi significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos grupos G_C e G_{5-FU} antes e após a quimioterapia (Tabela 1). Comparando os momentos experimentais (antes e após a quimioterapia) dentro de um mesmo grupo, observa-se na Tabela 1 que houve redução significativa ($P < 0,05$) na ingestão de água dos ratos dos grupos G_{5-FU} , $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{arg458+5-FU}}$ após a aplicação da 5-FU.

A concentração sérica de ALT dos ratos dos grupos G_C , G_{5-FU} , $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{Arg458+5-FU}}$ não apresentou diferença significativa ($P = 0.12$) (Tabela 2).

A concentração sérica de AST do grupo G_{5-FU} era significativamente menor ($P = 0.0006$) do que a concentração do grupo $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ (Tabela 2). As concentrações de AST sérica dos grupos $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{Arg458+5-FU}}$ apresentou aumento significativo comparado com a concentração do grupo G_C (Tabela 2).

A concentração sérica de creatinina dos ratos do grupo G_{5-FU} após a quimioterapia era significativamente maior ($P = 0,009$) que a concentração do grupo $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ (Tabela 2).

A concentração sérica de uréia dos ratos dos grupos G_C , G_{5-FU} , $G_{\text{Arg295+5-FU}}$ e $G_{\text{Arg458+5-FU}}$ não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais ($P = 0.07$) após a quimioterapia (Tabela 2).

A concentração de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, RDW-CV e ferro dos ratos não diferiram significativamente entre os grupos experimentais após a quimioterapia (Tabela 3).

As concentrações de HCM e CHCM dos ratos apresentaram-se menores ($P = 0,0005$ e $P = 0,0008$, respectivamente) nos grupos $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ quando comparados com o G_{C} após a quimioterapia (Tabela 3).

A contagem de plaquetas dos ratos do grupo $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ não diferiu significativamente entre os grupos G_{C} , $G_{5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ após a quimioterapia (Tabela 3) e a contagem de plaquetas dos ratos do grupo $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ era significativamente menor ($P = 0,0053$) do que a contagem do grupo G_{C} (Tabela 3).

A concentração de leucócitos totais, eosinófilos, linfócitos e monócitos dos ratos dos grupos $G_{5\text{-FU}}$, $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ reduziu significativamente quando comparado ao grupo G_{C} após a quimioterapia (Tabela 4).

A contagem de neutrófilos dos ratos dos grupos $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ apresentou aumento significativo em relação ao grupo $G_{5\text{-FU}}$ após a quimioterapia (Tabela 4).

A concentração das proteínas plasmáticas totais dos ratos do grupo $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ foi significativamente maior ($P = 0,0073$) em relação aos grupos G_{C} e $G_{5\text{-FU}}$ e não diferenciou significativamente do grupo $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ após a quimioterapia (Tabela 4).

A concentração sérica de albumina dos ratos do grupo $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ foi significativamente maior ($P = 0,0008$) em relação aos grupos $G_{5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ e semelhante ao grupo G_{C} após quimioterapia (Tabela 4).

A concentração de fibrinogênio plasmático dos ratos dos grupos $G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$ não diferiu significativamente do grupo G_{C} (Tabela 4) e também era significativamente menor do que a concentração do grupo $G_{5\text{-FU}}$ após a quimioterapia (Tabela 4).

A Figura 1 mostra o grau de infiltrado inflamatório no intestino dos ratos após a quimioterapia, na qual observa-se que os ratos suplementados com L-arginina ($G_{\text{Arg}295+5\text{-FU}}$ e $G_{\text{Arg}458+5\text{-FU}}$) apresentaram menor processo inflamatório no intestino. No entanto, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na frequência dos graus de severidade do infiltrado inflamatório entre os grupos experimentais (Tabela 5).

As concentrações séricas de IgA dos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5FU}$ apresentou aumento significativo ($P = 0,01$) em relação ao grupo G_{5-FU} e também a IgA sérica dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5FU}$ era semelhante à concentração do grupo G_C após a quimioterapia (Tabela 6).

As concentrações séricas de IgG dos ratos dos grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5FU}$ apresentou redução significativa ($P = 0,0001$) em relação ao grupo G_C após a quimioterapia (Tabela 6).

As concentrações séricas de IgM dos ratos dos grupos G_C , G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5FU}$ não diferiram significativamente ($P = 0,0001$) após a quimioterapia (Tabela 6).

DISCUSSÃO

A elevada ingestão de água pelos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ antes e após a quimioterapia (Tabela 1) foi provavelmente devido ao aumento da palatabilidade que ocorreu com a adição da L-arginina na água. No entanto, este aumento na ingestão de água pelos ratos não interferiu no consumo diário da L-arginina, uma vez que a dose de arginina era ajustada constantemente em função da ingestão de água por cada grupo experimental.

Considerando os parâmetros normais para o hemograma, ferro, proteínas plasmáticas, albumina, creatinina, uréia, AST e ALT de ratos Wistar conforme preconizado por Mitruka e Rawnsley (1977) (30), Melo et al. (2012) (31) e Lima et al. (2014) (32), as concentrações obtidas nos ratos do grupo G_C se encontravam dentro da normalidade. Desta forma, este grupo foi utilizado como modelo normal para comparativo com demais grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$.

As concentrações séricas das enzimas ALT e AST têm sido utilizadas para avaliar a função hepática na prática clínica (31). A concentração sérica de ALT e AST dos ratos Wistar consideradas normal por Mitruka e Rawnsley (1977) (32), Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34) pode variar de 36 a 58 U/L e de 81 a 180 U/L, respectivamente. Esta elevada variação também foi observada na concentração de AST dos ratos levando as diferenças significativas na concentração sérica desta enzima entre os grupos experimentais (Tabela 2). No entanto, as concentrações das ALT e AST dos grupos G_C , G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ (Tabela 2) estavam dentro da variação considerada normal, portanto, considerou-se

que não houve comprometimento da função hepática dos ratos após a quimioterapia.

As concentrações séricas de creatinina e a uréia têm sido frequentemente utilizadas para avaliar a função glomerular na prática clínica (31). A concentração sérica de creatinina e uréia tem ampla variação nos valores considerados normais para ratos Wistar segundo Mitruka e Rawnsley (1977) (32), Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34) é de 0,24 a 1,2 mg/dL e 26 a 58 mg/dL, respectivamente. Fato que causou as diferenças significativas nas concentrações séricas de creatinina entre os grupos experimentais (Tabela 2), porém, as concentrações séricas de uréia e creatinina dos ratos dos grupos experimentais permaneceram dentro dos valores considerados normais e, portanto, considerou-se que a função renal dos ratos permaneceu dentro da normalidade após a aplicação da 5-FU.

A avaliação laboratorial das funções renal e hepática foi necessária para confirmação de que estes órgãos não sofreram danos após a aplicação da 5-FU (Tabela 2), pelo fato da arginina ser produzida pelo rim e armazenada no fígado (17) e, assim, o organismo dos ratos tinham potencial para produzir arginina normalmente.

As concentrações das hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM e RDW-CV dos ratos dos grupos G_C , G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ não sofreram influência das suplementações com L-arginina devido a semelhança entre os grupos experimentais (Tabela 3) e também permaneceram dentro da amplitude de variação considerada normal por Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34) indicando que esses animais não apresentaram anemia após a quimioterapia. Provavelmente, por esta alteração hematológica estar associada com a dosagem do quimioterápico, ao tempo e a frequência dos ciclos quimioterápicos (10).

As reduções que ocorreram nas concentrações de HCM e CHCM dos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ em relação ao grupo G_C (Tabela 3) não foram causados pela quimioterapia ou pela suplementação com L-arginina por terem permanecido dentro dos valores considerados normais de 17,0 a 19,5 pg para HCM e de 30,5 a 35,3 g/dL para CHCM segundo Mitruka e Rawnsley (1977) (32), Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34). Estas diferenças ocorreram provavelmente devido aos processos fisiológicos normais da eritropoiese que possui uma ampla variação nas suas concentrações.

Os valores considerados normais da contagem de plaquetas de ratos Wistar segundo Lima et al. (2014) (34) é de 727 a 1.351×10^3 plaquetas/uL de sangue. Assim, a contagem de plaquetas dos ratos do grupo G_{5-FU} estava abaixo dos valores obtidos no grupo G_C e também daquele considerado normal por Lima et al. (2014) (34) (Tabela 3), indicando que a quimioterapia com 5-FU causou plaquetopenia. Esta plaquetopenia tem sido considerada um efeito colateral e indesejável para os pacientes em quimioterapia, uma vez que, dependendo da contagem de plaquetas, pode ser necessário diminuir a dose do quimioterápico ou aumentar o intervalo entre os ciclos de quimioterapia e/ou retardar o tratamento cirúrgico do tumor devido ao risco de sangramento (34). Tais condições podem favorecer a progressão do tumor bem como a diminuição da eficácia do tratamento (8,13,14).

Entretanto, os grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ que receberam as suplementações com 295 e 458 mg de L-arginina, apresentaram aumento na contagem de plaquetas na ordem de 147,6% e 134,2%, respectivamente, em relação ao grupo G_{5-FU} e permaneceram dentro da normalidade (727 a 1.351×10^3 plaquetas/uL de sangue) descrita por Lima et al. (2014) (34) (Tabela 3), indicando que estas suplementações têm potencial para amenizar a plaquetopenia causada pela 5-FU. No entanto, neste experimento não foi possível esclarecer os processos fisiológicos que estão envolvidos neste mecanismo de ação de L-arginina, sendo necessário à realização de novos experimentos para elucidá-los.

A leucopenia total e a neutropenia apresentada pelos ratos do grupo G_{5-FU} , por apresentarem contagem de leucócitos totais e neutrófilos abaixo dos valores considerados normais dos ratos grupo G_C e também apresentados por Mitruka e Rawnsley (1977) (32), Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34) (Tabela 3), tem sido considerado um efeito colateral indesejável da 5-FU, podendo expor os pacientes às infecções por microrganismos oportunistas durante à quimioterapia, sendo necessário diminuir a dose do quimioterápico ou aumentar o intervalo entre os ciclos de quimioterapia e/ou retardar o tratamento cirúrgico do tumor devido ao risco dos pacientes adquirirem infecções secundárias, o que pode favorecer o crescimento do tumor e o aparecimento de metástases (8,13,14).

Apesar dos ratos dos grupos que foram suplementados com 295 mg e 458 mg de L-arginina ($G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$) por dia terem apresentado diminuição na contagem de leucócitos totais em relação ao grupo G_C após a

quimioterapia, esta contagem permaneceu dentro dos valores considerados normais por Lima et al. (2014) (34) (Tabela 4). Ainda mais, a contagem de neutrófilos nestes grupos experimentais era semelhante ao grupo G_C e permaneceu dentro dos valores normais segundo Melo et al. (2012) (33) e Lima et al. (2014) (34) (Tabela 4). Isto indica que a suplementação com L-arginina tem potencial para amenizar a neutropenia causada pela 5-FU e, assim, provavelmente poderá beneficiar a defesa do organismo contra a infecção bacteriana (35-37) nos pacientes submetidos à quimioterapia. No entanto, neste experimento não foi possível esclarecer os processos fisiológicos que estão envolvidos neste mecanismo de ação de L-arginina.

As suplementações testadas com L-arginina não influenciaram a contagem de eosinófilos, linfócitos e monócitos dos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ devido sua semelhança com o grupo G_C (Tabela 4).

O aumento da concentração de proteínas plasmáticas totais dos ratos do grupo $G_{arg295+5-FU}$ (Tabela 4) ocorreu, provavelmente, devido ao aumento da concentração de albumina e globulina (Tabela 4), pelo fato da proteína plasmática total ser composto pelo fibrinogênio, globulinas e albumina (38). Nos demais grupos experimentais a concentração de proteínas plasmáticas totais e albumina permaneceram dentro da normalidade segundo Thrall et al. (2006) (35) e Melo et al. (2012) (33).

A concentração plasmática de fibrinogênio aumentou nos ratos do grupo G_{5-FU} após a aplicação do quimioterápico indicando que havia um processo inflamatório instalado nestes animais como pode ser observado o infiltrado inflamatório intenso no corte histológico do intestino delgado (Figura 1A) em 100% dos ratos deste grupo experimental (Tabela 5). Fato semelhante também foi observado por Leocádio et al. (27). A concentração de fibrinogênio se eleva na corrente sanguínea, pois é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e 6) e do fator de necrose tecidual liberado pelo processo inflamatório (38,39).

Entretanto, pela concentração plasmática de fibrinogênio dos ratos dos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ serem semelhantes às concentrações do G_C e menores do que a do grupo G_{5-FU} após a aplicação da 5-FU, provavelmente, a suplementação com 458 mg de L-arginina poderá tem potencial para amenizar o processo inflamatório intestinal causado pela 5-FU, já que 57% dos ratos do $G_{Arg458+5-FU}$ apresentaram infiltrado inflamatório leve no corte histológico do intestino

delgado (Figura 1C). Leocádio et al. (27) também relatou ter observado menor mucosite em ratos suplementados com L-arginina após aplicação da 5-FU. No entanto, não houve diferença significativa entre as frequências dos graus de infiltrado inflamatório entre os grupos experimentais apresentados na Tabela 5.

A concentração sérica de IgA dos ratos nos grupos $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ que foram suplementados com 295 mg e 458 mg de L-arginina diariamente, apresentaram aumento na ordem de 68,3% e 66,5%, respectivamente, na concentração sérica de IgA em relação ao grupo G_{5-FU} (Tabela 6) e eram semelhantes ao grupo G_C (Tabela 6). Assim, estas suplementações com arginina têm potencial para beneficiar a proteção das mucosas, uma vez, que este anticorpo está predominantemente em secreções como a saliva, lágrima e nas mucosas dos tratores gastrointestinal, respiratório e geniturinário e, assim, poderá contribuir para prevenção da invasão de microrganismos através das mucosas (40).

A concentração de IgG dos grupos G_{5-FU} , $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$ permaneceu abaixo da concentração normal do grupo G_C após a quimioterapia e semelhantes entre si, mostrando que as suplementações com L-arginina testadas não foram capazes de interferir na produção dessa imunoglobulina (Tabela 6), fato que para os pacientes submetidos à quimioterapia, torna-se um fator complicador, pois a IgG é o anticorpo mais importante da resposta imune humoral secundária e possui alta afinidade para ligação antígeno-específico (41).

Apesar dos apontamentos que a suplementação L-arginina poderá beneficiar a saúde dos pacientes submetidos à quimioterapia, antes da sua recomendação para os seres humanos, torna-se necessário que sejam feitas novas pesquisas para confirmação das doses ideais de suplementação com este aminoácido e maiores esclarecimentos dos seus efeitos fisiológicos associados à quimioterapia e progressão do tumor.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a suplementação diária com 295 mg ou 458 mg de L-arginina atenua os efeitos colaterais da 5-FU como a plaquetopenia, a neutropenia e imunomodulou a produção de IgA, e a suplementação com 458 mg de L-arginina também pode atenuar o infiltrado inflamatório no intestino delgado após a quimioterapia com 5-FU.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE pelo financiamento desta pesquisa.

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Todos os autores contribuíram no planejamento, interpretação dos dados, escrita, revisão e aprovação do manuscrito. Todos os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report. World Health Organization. Lyon: IARC, 2014, 28-30.
2. Ferlay J: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, 359-386, 2015.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2016 [acesso em maio 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-24042016.pdf>.
4. Azevedo C e Bosco S: Perfil nutricional, dietético e qualidade de vida de pacientes em tratamento quimioterápico. *Conscientiae Saúde* **10**, 23-30, 2011.
5. Palumbo OM, Kavan P, Miller HW, Panasci L, Assouline S et al.: Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Front Pharmacol* **4**, 1-9. 2013.
6. Soares GMP, Junior-Lima PCR, Mota CSMJ, Justino CFP, Brito CAG et al.: Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**, 713-720, 2011.
7. Bruce AC: Quimioterapia das doenças neoplásicas: princípios gerais da quimioterapia do câncer. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12 ed. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. AMGH Editora. 2012, 1667-1676.
8. Zhang X, Sun B and Lu Z: Evaluation of Clinical Value of Single Nucleotide Polymorphisms of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene to Predict 5-Fluorouracil Toxicity in 60 Colorectal Cancer Patients in China. *Int J Med Sci* **10**, 894-902, 2013.

9. Martins CG, Wagner SC e Linden R: Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. *Rev Bras Cancerol* **59**, 271-280, 2013.
10. Neto MC. Guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia. São Paulo: Hosp. Albert Einstein. 2013.
11. Chabner BA: Quimioterapia das doenças neoplásicas: agentes citotóxicos. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12 ed. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. AMGH Editora. 2012, 1695-1698.
12. Smiderle CA e Gallon, CW. Desnutrição em oncologia. *Rev Bras Nutr Clin* **27**, 250-256, 2012.
13. Miller MM, Donald VD and Hagemann MT. Prevention and treatment of oral mucositis in children with cancer. *J Pediatr Pharmacol Ther* **17**, 340-350, 2012.
14. Gibson JR, Keefe KMD, Lalla VR, Bateman E, Blijlevens N et al.: Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer* **21**, 313-326, 2013.
15. Novaes MRCG e Melo Pantaleão C: Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. *Rev Ciênc Méd* **14**, 34-40, 2012.
16. Kang K, Shu XL, Zhong JX, Yu TT and Lei T. Effect of L-arginine on immune function: a meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* **23**, 351-359, 2014.
17. WU G: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**, 59-66, 2010.
18. Vliet MV, Harmsen H, de Bont E and Tissing W: The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. *PLoS Pathog* **6**, 1-7, 2011.
19. Lira FS, Gonçalves D, Silvério R, Zanchi NE, Nicastro H et al.: Estratégias nutricionais no tratamento da síndrome da caquexia associada ao câncer. *Inova Saúde* **1**, 146-65, 2012.
20. Novaes MRCG e Melo Pantaleão C: Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. *Rev Ciênc Méd* **14**, 65-75, 2005.
21. Ellinger S: Micronutrients, Arginine, and Glutamine: Does Supplementation Provide an Efficient Tool for Prevention and Treatment of Different Kinds of Wounds? *Adv Wound Care* **3**, 691-707, 2014.

22. Cruzat V, Krause M and Newsholme P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *J Int Soc Sports Nutr* **11**, 20-28, 2014.
23. Badurdeen S, Mulongo M and Berkley J: Arginine depletion increases susceptibility to serious infections in preterm newborns. *Pediatr Res* **77**, 290-297, 2014.
24. Mcrae MP. Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses. *J Chiropr Med* **15**, 184-189, 2016.
25. Giacomelli FRB, Natali MRM: A utilização de ratos em modelo experimental de carências nutricionais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar* **3**, 239-249, 1999.
26. Merusse JLB e Lapchick VBV. Instalações e equipamentos. Manual para técnicos em bioterismo. Comissão de ensino do colégio brasileiro de experimentação animal. EPM, São Paulo, 1996, 15-25.
27. Leocádio P, Antunes M, Teixeira L, Leonel A, Alvarez-Leite J et al.: L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. *Nutr Cancer* **67**, 486-493, 2015.
28. Massone F: Técnicas anestésicas em animais de laboratório. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas: texto e atlas colorido. 6 ed. Massone F. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 104-109.
29. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Freitas Neto AG: Manual de Histologia Normal e Patológica. 2 ed. São Paulo, Manole, 2003.
30. Zar JH: Biostatistical analysis. 5th ed. Prentice Hall, 2009.
31. Cubas ZS, Joppert AM: Terapêutica dos animais selvagens. Manual de terapêutica veterinária. 2 ed. Andrade SF. São Paulo: Roca. 2008, 727-745.
32. Mitruka BM, Rawnsley HM: Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. 1 ed. New York, Masson Publishing, 1981, 271-280.
33. Melo MGDD, Dória GAA, Serafini MR e Araújo AADS: Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena* **8**, 1-6, 2012.
34. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Doria GAA, Leite BLS et al.: Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem

- Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* **10**, 1-9, 2014.
35. Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell TW: Hematology of common non-domestic mammals. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2 ed. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins. 2012, 221-224.
 36. Kobuchi S, Ito Y, Hayakawa T, Kuwano S, Baba A et al.: Semi-physiological pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation of 5-fluorouracil for the whole time course of alterations in leukocyte, neutrophil and lymphocyte counts in rats. *Xenobiotica* **44**, 804-18, 2014.
 37. Ferreira AL, Rocha CP, Vieira LM, Dusse LMSA, Rezende D et al.: Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. *Rev Bras Farm* **94**, 94-101, 2013.
 38. Netto MB, Santos JL, Montenegro MR: Perturbações circulatórias. *Patologia: processos gerais*. 6 ed. Franco M. São Paulo, Atheneu, 2015, 97-99.
 39. Montenegro MR, Fecchio D: Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. *Patologia: processos gerais*. 6 ed. Franco M. São Paulo, Atheneu, 2015, 109-128.
 40. Sanches FL, Nitsch TM, Vilela, MMS and Sgarbieri VC. Comparison of biochemical and immunological profile of pediatric patients with acute myeloid leukemia in relation to healthy individuals. *J Pediatr* **91**, 478-484, 2015.
 41. Gershwin LJ: Clinical veterinary immunology. *Clinical biochemistry of domestic animals*. *Patologia: processos gerais*. 6 ed. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Franco M. São Paulo, Atheneu, Burlington: Academic Press. 2015, 157-172.

TABELAS

TABELA 1

Ingestão média (\pm desvio padrão) de água e ração ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Grupos	Consumo de ração (g/dia)		Consumo de água (mL/dia)	
	Antes da quimioterapia	Depois da quimioterapia	Antes da quimioterapia	Depois da quimioterapia
G _C	66,3 \pm 3,7 ^{Aa}	62,3 \pm 3,7 ^{Aa}	33,5 \pm 0,3 ^{Ca}	33,4 \pm 0,5 ^{Ca}
G _{5-FU}	66,1 \pm 2,4 ^{Aa}	61,2 \pm 4,1 ^{Ab}	36,4 \pm 0,6 ^{Ba}	31,3 \pm 3,1 ^{Cb}
G _{Arg295+5-FU}	67,8 \pm 0,8 ^{Aa}	61,5 \pm 0,5 ^{Ab}	54,3 \pm 0,8 ^{Aa}	42,6 \pm 0,3 ^{Bb}
G _{Arg458 5-FU}	62,9 \pm 0,5 ^{Ba}	58,2 \pm 0,3 ^{Bb}	58,8 \pm 1,1 ^{Aa}	48,1 \pm 0,3 ^{Ab}

A,B,C,D – Nas colunas, médias seguidas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais.

a,b - Nas linhas, médias seguidas de letras minúsculas distintas apresentam diferença significativa ($P < 0,05$), dentro de um mesmo grupo experimental, entre os momentos experimentais, ante e depois da quimioterapia.

G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

TABELA 2

Concentrações séricas médias (\pm desvio padrão) de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), creatinina e uréia de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Grupos	Concentração sérica das enzimas hepática		Concentração sérica dos marcadores da função renal	
	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
G _C	22,0 \pm 5,7 ^A	87,0 \pm 7,1 ^C	0,59 \pm 0,01 ^{AB}	36,3 \pm 5,8 ^A
G _{5-FU}	16,5 \pm 5,2 ^A	105,4 \pm 66,9 ^{BC}	0,62 \pm 0,02 ^A	35,9 \pm 11,7 ^A
G _{Arg295+5-FU}	18,5 \pm 9,0 ^A	169,0 \pm 24,9 ^A	0,58 \pm 0,03 ^B	40,8 \pm 5,3 ^A
G _{Arg458+5-FU}	17,0 \pm 8,7 ^A	154,1 \pm 23,9 ^{AB}	0,60 \pm 0,02 ^{AB}	46,6 \pm 10,5 ^A
Valor de P	0,12	0,0006	0,009	0,07

^{A,B} – Nas colunas, médias acompanhadas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre os tratamentos. G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

TABELA 3

Valores médios (\pm desvio padrão) do eritrograma e concentração sérica de ferro de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Parâmetros	Grupos				Valor de <i>P</i>
	G _C	G _{5-FU}	G _{Arg295+5-FU}	G _{Arg458+5-FU}	
Hemácias (x10 ³ /μL)	7,7 ± 0,4 ^A	7,5 ± 0,8 ^A	8,2 ± 1,0 ^A	8,4 ± 1,3 ^A	0,20
Hemoglobina (g/dL)	16,1 ± 0,7 ^A	14,9 ± 1,0 ^A	16,1 ± 1,8 ^A	15,9 ± 2,3 ^A	0,35
Hematócrito (%)	41,8 ± 4,7 ^A	41,8 ± 4,9 ^A	47,3 ± 5,5 ^A	47,4 ± 6,7 ^A	0,11
VGM (fl)	57,0 ± 1,2 ^A	55,7 ± 1,2 ^A	57,9 ± 1,5 ^A	56,9 ± 1,3 ^A	0,06
HGM (pg)	29,1 ± 0,7 ^A	20,1 ± 0,9 ^{AB}	19,7 ± 0,7 ^B	19,1 ± 0,6 ^B	0,0005
CHGM (g/dL)	36,6 ± 0,6 ^A	36,9 ± 1,7 ^{AB}	34,2 ± 0,7 ^B	33,3 ± 0,5 ^B	0,0008
RDW-CV (%)	11,3 ± 0,3 ^A	12,6 ± 1,4 ^A	11,4 ± 0,7 ^A	12,5 ± 1,4 ^A	0,07
Plaquetas (x10 ³ /μL)	1.214 ± 163 ^A	310,8 ± 297,9 ^B	767,5 ± 58,71 ^{AB}	726,0 ± 142,4 ^B	0,0053
Fe (mg/dL)	38,9 ± 2,0 ^A	37,9 ± 2,4 ^A	37,8 ± 5,6 ^A	38,3 ± 3,8 ^A	0,71

^{A,B} – Nas linhas, médias ou medianas acompanhadas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre os tratamentos. G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água. VGM: volume globular médio. HGM: hemoglobina globular média. CHGM: Concentração de hemoglobina globular média.

TABELA 4

Valores médios (\pm desvio padrão) do leucograma, proteínas totais, fibrinogênio e albumina de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Parâmetros	Grupos				Valor de <i>P</i>
	G _C	G _{5-FU}	G _{Arg295+5-FU}	G _{Arg458+5-FU}	
Leucócitos totais (μ L)	10.037 \pm 2.327 ^A	2.576 \pm 918 ^B	3.532 \pm 1.729 ^B	3.540 \pm 1.735 ^B	0,0001
Neutrófilos (μ L)	1.556 \pm 308 ^A	79 \pm 46 ^B	1.214 \pm 269 ^A	967 \pm 1.046 ^A	0,0002
Eosinófilos (u/L)	219 \pm 130 ^A	38 \pm 3 ^B	34 \pm 9 ^B	41 \pm 9 ^B	0,0002
Linfócitos (μ L)	7.540 \pm 1.905 ^A	2.232 \pm 850 ^B	2.065 \pm 1.369 ^B	2.194 \pm 1.507 ^B	0,0001
Monócitos (μ L)	707 \pm 385 ^A	134 \pm 2,1 ^B	83 \pm 3,2 ^B	93 \pm 2,4 ^B	0,0001
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	6,7 \pm 0,4 ^B	6,7 \pm 0,6 ^B	7,4 \pm 0,5 ^A	6,9 \pm 0,2 ^{AB}	0,0073
Albumina (g/dL)	4,5 \pm 0,2 ^{AB}	4,5 \pm 0,2 ^B	4,8 \pm 0,3 ^A	4,3 \pm 0,3 ^B	0,0008
Fibrinogênio (mg/dL)	275 \pm 103 ^{BC}	525 \pm 103 ^A	225 \pm 70 ^C	375 \pm 116 ^B	0,0001

^{A,B} – Nas linhas, médias ou medianas acompanhadas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre os tratamentos. G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

TABELA 5

Frequência da intensidade do infiltrado inflamatório no intestino delgado de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Grupos	Intensidade do Infiltrado Inflamatório			
	Ausente	Discreta	Moderado	Severo
G _C	0 %	17%	0	0 %
G _{5-FU}	0 %	0	100%	0 %
G _{Arg295+5-FU}	0 %	25%	75%	0 %
G _{Arg458+5-FU}	0 %	57%	43%	0 %

G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

TABELA 6

Concentrações séricas médias (\pm desvio padrão) das imunoglobulinas (Ig) A, G e M de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil.

Ig	Grupos				Valor de P
	G _C	G _{5-FU}	G _{Arg295+5-FU}	G _{Arg458+5-FU}	
IgA (mg/dL)	3,49 \pm 1,09 ^{AB}	2,84 \pm 1,10 ^B	4,78 \pm 1,69 ^A	4,73 \pm 1,39 ^A	0,01
IgG (mg/dL)	244,84 \pm 33,19 ^A	154,23 \pm 34,42 ^B	153,03 \pm 27,19 ^B	158,02 \pm 43,69 ^B	0,0001
IgM (mg/dL)	12,03 \pm 2,14 ^A	13,28 \pm 2,93 ^A	16,55 \pm 6,43 ^A	13,21 \pm 2,93 ^A	0,31

^{A,B} – Nas linhas, médias ou medianas acompanhadas de letras maiúsculas distintas apresentam diferença significativa entre os tratamentos. G_C = grupo controle, em que os ratos receberam somente ração comercial balanceada e água *ad libitum*. G_{5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e sem adição de L-arginina. G_{Arg295+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 295 mg de L-arginina na água. G_{Arg458+5-FU} = os ratos foram alimentados *ad libitum* com ração basal, aplicou-se uma dose de 5-FU e adicionou-se 458 mg de L-arginina na água.

FIGURAS

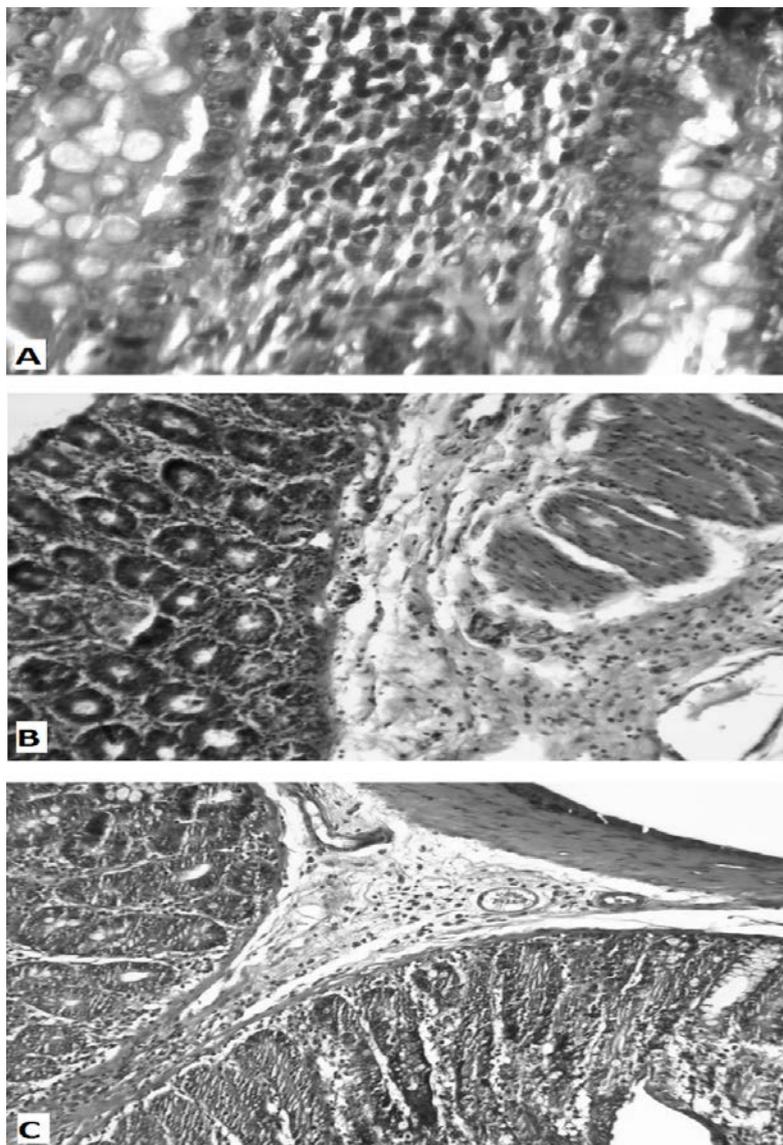


FIG. 1. Fotomicrografia mostrando o infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa do intestino delgado de ratos Wistar suplementados ou não com L-arginina após a aplicação da 5-Fluorouracil. (A). Moderado infiltrado inflamatório mononuclear dos ratos do grupo G_{5-Fu} (HE - 400x). (B) e (C). Discreto infiltrado inflamatório mononuclear dos ratos do grupo $G_{Arg295+5-FU}$ e $G_{Arg458+5-FU}$, respectivamente (HE - 100x).

2.1 Instruções para Autores: *Nutrition and Cancer Journal*

Nutrition and Cancer: An International Journal uses an online submission and review system, ScholarOne, through which authors submit manuscripts and track their progress up until acceptance for publication. Authors will enter pertinent information into the system and submit the following files: (a) cover letter file (including verification that the article has not been submitted concurrently to any other journals); (b) manuscript file (Word or WordPerfect format [PC compatible]) containing the entire text of the article, including title page, abstract, all text, references, footnotes, and appendixes; (c) figures and tables, which should be submitted as separate files. Please log on to <http://mc.manuscriptcentral.com/nc/> for information and instructions regarding registration and manuscript submission.

All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. The manuscript should be organized in the following manner: title page, abstract, text, acknowledgments and notes, references, appendixes, tables, and figure captions (figures and tables should be submitted as separate files). Consecutive numbering of all pages is requested, with the title page as page one. Title page should provide the name of author and co-authors. The first author's last name plus the page number belong in the upper right corner of each page.

Authors are urged to include their full names, complete with first and middle initials, to avoid confusion, which often arises when authors are identified by surname and initials only. Authors' academic degrees should not be included. The full names of institutions and subsidiary laboratories should be given, along with a mailing address (including postal number). If several authors (maximum 10 authors) and institutions are listed, it should be clearly indicated with which institution each author is affiliated. For text style, authors should follow Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers (6th edition, 1994) in matters of spelling, capitalization, punctuation, hyphenation, and general style; Current Procedural Terminology and International Classification of Diseases for terms relating to diseases, operations, and procedures; IUPAC-IAB Combined Commission on Biochemical Nomenclature for chemical and biochemical terms and abbreviations; and Index Medicus for journal abbreviations in references. Metric equivalents are preferred.

The hospital or academic institution and city where the work was done, the source of financial support, an acknowledgment (if desired) of those who aided in research and preparation of the manuscript, and a mailing address for reprints (if available) should appear at the end of the text (before references). All trade names of drugs should be referenced with the generic name and the name, city, and state of the manufacture.

Each manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. Please consult our guidance on keywords here.

References:

The list of references should be typed double-spaced and numbered consecutively as they appear. List only five authors before et al. Authors are responsible for accuracy and must check every reference in the manuscript and proofread again in page proofs.

Journal references should be given in the following order: author, article, title, journal abbreviation, volume number in Arabic numerals, inclusive pages, and year. If the paper has been seen only in abstract form, this should be indicated at the end of the original reference by the addition of the abbreviation (abstr), followed by the abstracting source (including volume, page, and year). The order for book references is as follows: author, title, edition number (if other than the first), city, publisher, year, and volume (if more than one). If the reference is a chapter in a book, the order changes as follows: author of the chapter, title of the chapter, book title, edition, editor(s), city, publisher, year, and inclusive pages of the chapter.

Illustrations:

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) submitted should be digital files following these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page

- EPS, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. The charge for the first page with color is \$900.00. The next three pages with color are \$450.00 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Good-quality color prints should be provided in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable. Authors may be asked to resubmit artwork for production purposes if the digital files are of too low a resolution.

Checklist:

Several stylistic items are commonly overlooked by authors, thus entailing wasted time and expense at the processing and publication stages. Authors may find it helpful to refer to the following checklist before transmitting manuscripts to our office: 1) grant information, if appropriate; 2) exact affiliation of each author given; 3) abstract included (200 words maximum); 4) all nonstandard abbreviations defined in text; 5) exact location (city and state or country) supplied for sources of special chemicals or preparations; 6) all references listed in order of appearance and typed double-spaced.

Please include 3-5 "key words" after the abstract, including words such as 'experimental', 'clinical', and 'epidemiological' to aid in searches.

Proofs and Reprints:

Page proofs are sent to the designated author using Taylor & Francis' Central Article Tracking System (CATS). They must be carefully checked and returned within 48 hours of receipt. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Authors for whom we receive a valid e-mail address will be provided an opportunity to purchase reprints of individual articles, or copies of the complete print issue. These authors will also be given complimentary access to their final article on *Taylor & Francis Online*.

NIH Policy:

In compliance with National Institute of Health (NIH) policy, Routledge Journals will deposit manuscripts funded by the NIH to PubMed Central on behalf of authors who report such funding to Routledge Journals staff at time of article proof review. The NIH's Public Access Policy mandates NIH-funded authors to submit their peer-reviewed author manuscripts to PubMed Central, at the point of acceptance, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Routledge Journals will deliver to PMC the final peer-reviewed manuscript. Routledge Journals will also authorize the manuscript's public access posting 12 months after final publication in print or electronic form. Following the deposit by Routledge Journals, authors will receive further communications from NIH with respect to the submission.

Authors have the right to post their version of the submitted manuscript (pre-print), or their version of the final published article (post-print) on their personal or institutional web site. Post-print web postings are subject to an embargo of 12 months. In line with Routledge Journals author publication agreements, authors should not post manuscripts directly to PMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (such as to a listserv or database connected to a public access server).

ANEXO

Parecer final do Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI) e da Comissão de Ética uso de Animais (CEUA)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

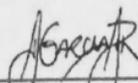
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

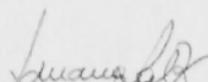
Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NO ERITROGRAMA, LEUCOGRAMA E NA PRODUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS DE RATTUS NOVERGICUS DA LINHAGEM WISTAR SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2755 e tendo como participante(s) LUÍS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS (responsável), CECILIA BRAGA LAPOSY (docente), MARCELO GEORGE MUNGAI CHACUR (docente), ROGERIO GIUFFRIDA (docente), AMANDA BEATRIZ NOVAIS (discente), BIANCA DEPIERI BALMANT (discente), SANDRA CRISTINA GENARO (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 25 de Janeiro de 2016.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq



Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE