



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUIZ GUSTAVO PERON MARTINS

**AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO PRÉVIA DE VITAMINA C E L-ARGININA EM
RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL:
ASPECTOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS NOS TESTÍCULOS**

Presidente Prudente - SP
2023



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUIZ GUSTAVO PERON MARTINS

**AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO PRÉVIA DE VITAMINA C E L-ARGININA EM
RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL:
ASPECTOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS NOS TESTÍCULOS**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Orientador: Profa. Dra. Ines Cristina Giometti

Presidente Prudente - SP
2023

636.089
M386a

Martins, Luiz Gustavo Peron.

Ação da suplementação prévia de vitamina c e L-arginina em ratos wistar submetidos ao quimioterápico 5-fluorouracil: aspectos moleculares e morfológicos nos testículos / Luiz Gustavo Peron Martins – Presidente Prudente, 2023.

90 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti.

1. Ácido ascórbico. 2. Apoptose 3. Estresse oxidativo. 4. Expressão. 5. Túbulos seminíferos. I. Título.

LUIZ GUSTAVO PERON MARTINS

**AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO PRÉVIA DE VITAMINA C E L-ARGININA EM
RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL:
ASPECTOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS NOS TESTÍCULOS**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 20 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina-PR

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. José Burgos Ponce
Faculdades de Dracena - Unifadra
Dracena-SP

DEDICATÓRIA

A minha esposa Cláudia pela dedicação e apoio mesmo diante de todas as dificuldades e por acreditar em meus sonhos.

Aos meus filhos Matheus, Murilo e Mariana, vidas de minha vida, pelo amor, paciência e compreensão no decorrer deste trabalho.

A minha mãe Eunny pelo incentivo e orações nesta caminhada.

Ao meu pai Arnaldo (in memoriam) que do céu sempre olhou por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é vida e luz no meu caminho, por ter me dado força e aumentado a minha fé para que eu pudesse acreditar que seria capaz de cumprir esta tarefa.

A minha orientadora Profa. Dra. Ines Cristina Giometti, pela orientação competente, dedicação, persistência, paciência e pela ajuda e companheirismo que foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal e, principalmente por acreditar em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Luís Souza Lima de Souza Reis e à Marcela de Andrade Bernal Fagiani por nos cederem gentilmente o material da pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Burgos Ponce, que foi o principal incentivador nas etapas iniciais desta caminhada, sem a sua ajuda nada disso seria possível.

A Profa. Dra. Iara Buriola Trevisan que me ajudou a refletir sobre os caminhos a seguir e como ser cada vez mais perfeccionista.

A Profa. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira e a Maria Eduarda pelo auxílio com o Western Blotting e a Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes e a Letícia pelo auxílio com a morfologia testicular.

Aos Professores Doutores, Cecília Laposy Santarém e Anthony César de Souza Castilho pela ajuda.

As minhas amigas Aline de Oliveira Santos e Lauren Chrys Soato Marin por toda a ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos Professores do Doutorado em Ciência Animal, das mais diversas áreas de pesquisa, com os quais tive contato, pelos conhecimentos, sabedoria e

experiências compartilhadas, pois estas foram enriquecedoras e possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço aos alunos de iniciação científica que ajudaram na execução laboratorial deste experimento.

Aos amigos e professores da Unifadra por fazerem a minha caminhada neste trabalho se tornar mais leve e prazerosa.

A Universidade do Oeste Paulista - Unoeste pela oportunidade e acolhimento neste curso de Pós-graduação em Fisiopatologia e Saúde Animal.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos funcionários da Unoeste, em especial a secretária Keid, pela atenção dispensada e auxílio em momentos tão importantes.

E por fim, obrigada a todos que fizeram deste projeto uma realidade!

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago

RESUMO

Ação da suplementação prévia de vitamina c e L-arginina em ratos Wistar submetidos ao quimioterápico 5-fluorouracil: aspectos moleculares e morfológicos nos testículos

O quimioterápico citotóxico 5-fluorouracil (5-FU) é comumente administrado para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias. Uma das limitações importantes do uso de 5-FU é a sua toxicidade em células saudáveis em proliferação, como as células do sistema reprodutor masculino. Alguns suplementos podem ser utilizados para atenuar os efeitos tóxicos do 5-FU, como a L-arginina e a vitamina C. Essa tese foi dividida em dois capítulos. O Capítulo I é uma revisão de literatura sobre o quimioterápico 5-FU e sua toxicidade para órgãos reprodutivos masculinos, além de apresentar a Vitamina C e de L-arginina como possíveis suplementos prévios à quimioterapia com a intenção de reduzir os efeitos deletérios do 5-FU para os órgãos reprodutivos. O Capítulo II é uma pesquisa científica que descreve o experimento realizado com a aplicação de 5-FU e suplementação de L-arginina e/ou vitamina C em ratos Wistar. O objetivo do Capítulo I foi revisar os principais efeitos tóxicos do quimioterápico 5-FU em células não cancerígenas, dando ênfase aos órgãos reprodutivos e também apresentar o que se conhece sobre a ação antioxidante da vitamina C e da L-arginina que justifica o estudo desses suplementos alimentares como alternativas para reduzir os danos do 5-FU. O objetivo do Capítulo II foi verificar os efeitos da suplementação de L-arginina e da vitamina C isoladamente ou em associação na morfologia testicular e espermática, na expressão gênica de mediadores relacionados ao estresse oxidativo e inflamação (*Tnfa*, *Cat* e *Gss*), na expressão de proteínas ligadas à apoptose (Caspase 3, BAX e BCL2) de células testiculares de ratos submetidos ao quimioterápico 5-FU. O experimento do Capítulo II foi realizado utilizando 40 ratos Wistar que foram divididos em 5 grupos com 8 animais cada grupo: Grupo controle (Gc): os ratos receberam água e ração comercial ad libitum até o 7º dia e aplicação de solução fisiológica no 8º dia do experimento; Grupo 5-FU (G5-FU): os ratos receberam água e ração ad libitum até o 7º dia, no 8º dia do experimento receberam aplicação intraperitoneal de dose única de 5-FU (50 mg/ Kg de peso corporal); Grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg): os ratos receberam 213 mg de L-

arginina/dia adicionada à água filtrada ad libitum até o 7º dia e no 8º dia do experimento receberam aplicação intraperitoneal de dose única de 5-FU (50 mg/ Kg de peso corporal); Grupo 5-FU + Vitamina C (G5-FU+VitC): os ratos receberam 5,71 mg de ácido ascórbico/ dia adicionado à água filtrada ad libitum até o 7º dia e no 8º dia do experimento receberam aplicação intraperitoneal de dose única de 5-FU (50 mg/ Kg de peso corporal); Grupo 5-FU + L-arginina + Ácido Ascórbico (vitamina C) (G 5-FU+Arg+VitC): os ratos receberam 213 mg de L-arginina e 5,71 mg de ácido ascórbico/dia adicionados à água filtrada ad libitum até o 7º dia e aplicação, no 8º dia do experimento receberam aplicação intraperitoneal de dose única de 5-FU (50 mg/ Kg de peso corporal). A eutanásia foi realizada 72 horas após a aplicação do 5-FU. Após a eutanásia dos animais, os espermatozoides foram utilizados para morfologia espermática e os testículos foram utilizados para morfologia e morfometria testicular, expressão gênica de mediadores relacionados ao estresse oxidativo e expressão de proteínas ligadas à apoptose de celular. Houve uma redução na contagem dos túbulos seminíferos sem alterações morfológicas nos grupos G5-FU e G5-FU+Arg+VitC, acompanhada de um aumento de vacúolos nos túbulos seminíferos; os grupos G-5FU+Arg e G5-FU+VitC não diferiram do Gc nesses parâmetros ($P < 0,05$). O grupo G5-FU+Arg+VitC apresentou maior degeneração testicular que os demais grupos ($P < 0,05$). Houve redução significativa na altura do epitélio seminífero nos grupos G-5FU+Arg e G5-FU+Arg+VitC. Não houve diferença significativa na morfologia espermática. O G5-FU apresentou maior expressão de BAX nos testículos de ratos Wistar que o Gc, e G5-FU+VitC não diferiu do grupo controle ($P < 0,05$). A aplicação de uma única dose de 5-FU leva a um aumento de alterações morfológicas testiculares e a suplementação preventiva de vitamina C, sem a associação da L-arginina, reduz os efeitos deletérios do 5-FU nos testículos de ratos Wistar.

Palavras-chave: ácido ascórbico, apoptose, estresse oxidativo, túbulos seminíferos.

ABSTRACT

Action of previous supplementation of vitamin C and L-arginine in Wistar rats submitted to 5-fluorouracil chemotherapy: molecular and morphological aspects in the testes

The cytotoxic chemotherapy drug 5-fluorouracil (5-FU) is commonly administered for the treatment of different types of neoplasms. One of the important limitations of using 5-FU is its toxicity to healthy proliferating cells, such as cells of the male reproductive system. Some supplements can be used to mitigate the toxic effects of 5-FU, such as L-arginine and vitamin C. This thesis was divided into two chapters. Chapter I is a literature review on the chemotherapy drug 5-FU and its toxicity to male reproductive organs, in addition the review presents Vitamin C and L-arginine as possible supplements prior to chemotherapy with the intention of reducing the deleterious effects of 5-FU to the reproductive organs. Chapter II is a scientific research that describes the experiment carried out with the application of 5-FU and supplementation of L-arginine and vitamin C in Wistar rats. The objective of Chapter I was to review the main toxic effects of 5-FU chemotherapy in non-cancer cells, with emphasis on reproductive organs, and also to present what is known about the antioxidant action of vitamin C and L-arginine, which justifies the study of these dietary supplements as alternatives to reduce 5-FU damage. The aim of Chapter II was to verify the effects of L-arginine and vitamin C supplementation, alone or in combination, on testicular and sperm morphology, on the gene expression of mediators related to oxidative stress and inflammation (*Tnfa*, *Cat* e *Gss*), on the expression of proteins linked to apoptosis (Caspase 3, BAX and BCL2) from testicular cells of rats submitted to 5-FU chemotherapy. The experiment in Chapter II was carried out using 40 Wistar rats that were divided into 5 groups with 8 animals each: Control group (Gc): rats received water and commercial feed ad libitum until the 7th day and application of saline solution on the 8th day of experiment; 5-FU Group (G5-FU): the rats received water and food ad libitum until the 7th day, on the 8th day of the experiment they received intraperitoneal application of a single dose of 5-FU (50 mg/Kg of body weight); 5-FU + L-arginine group (G5-FU+Arg): the rats received 213 mg of L-arginine/day added to filtered water ad libitum until the 7th day of the experiment, and on the 8th day of the experiment they received a single

intraperitoneal application of 5-FU (50 mg/Kg of body weight); 5-FU + Vitamin C group (G5-FU+VitC): the rats received 5.71 mg of ascorbic acid/day added to filtered water ad libitum until the 7th day of the experiment, and on the 8th day of the experiment they received a single intraperitoneal application of 5-FU (50 mg/Kg of body weight); 5-FU + L-arginine + Vitamin C Group (G 5-FU+Arg+VitC): rats received 213 mg of L-arginine and 5.71 mg of ascorbic acid/day added to filtered water ad libitum until the 7th day and they received intraperitoneal application of a single dose of 5-FU (50 mg/Kg of body weight) on the 8th day of the experiment. Euthanasia was performed 72 hours after 5-FU application. After the euthanasia of the animals, the spermatozoa were used for sperm morphology and the testes were used for testicular morphology and morphometry, gene expression of mediators related to oxidative stress, expression of proteins linked to cellular apoptosis. There was a reduction of seminiferous tubules without morphological alterations in the G5-FU and G5-FU+Arg+VitC groups, accompanied by an increase in vacuoles in the seminiferous tubules; the G-5FU+Arg and G5-FU+VitC groups did not differ from the Gc in these parameters ($P<0.05$). The G5-FU+Arg+VitC group showed greater testicular degeneration than the other groups ($P<0.05$). There was a significant reduction in the height of the seminiferous epithelium in the G-5FU+Arg and G5-FU+Arg+VitC groups. There was no significant difference in sperm morphology. G5-FU showed greater BAX expression in the testes of Wistar rats than Gc, and G5-FU+VitC did not differ from the control group ($P<0.05$). The application of a single dose of 5-FU leads to an increase in testicular pathologies and the preventive supplementation of vitamin C, without the association of L-arginine, reduces the deleterious effects of 5-FU on the testicles of Wistar rats.

Keywords: ascorbic acid, apoptosis, oxidative stress, seminiferous tubules.

LISTA DE SIGLAS

ADC - L-arginina descarboxilase
ANOVA – Análise de variância
ARE - Elementos de resposta antioxidante
ASC - Ascorbato
ATP - Adenosina trifosfato
BAK - Antagonista homólogo de BCL2
BAX - Proteína X associada a BCL2
BCL2 – linfoma de células B2
BID - Agonista de morte de domínio de interação de BH3
CAD - Complexo formado por carbamoil-fosfato sintetase 2, aspartato transcarbamilase e diidroorotase
CAT - Catalase
cGMP - Guanosina Monofosfato cíclico
COX-2 - Ciclooxygenase-2
Cyt C - Citocromo C mitocondrial
DHA - Ácido deidroascórbico
DHFU - Dihidrofluorouracil
DISC – Complexo de sinalização de indução de morte
DED - Domínios efetores de morte celular
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DPD - Dihidropirimidina desidrogenase
dNTP – Desoxinucleotídeos trifosfato
dTTP - Desoxitimidina trifostato
dUMP - Desoxiuridina monofosfato
dUDP - Desoxiuridina difosfato
dUTP - Desoxiuridina trifosfato
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
EO – Estresse oxidativo
ERK - Quinase regulada por sinal extracelular
FADD – Domínio de morte associado ao FAS
FASL – Ligante FAS
FASR – Receptor de FAS
FBAL - α -fluoro- β -alanina

FdUR - Fluorodesoxiuridina
5-FU – 5-fluorouracil
FUDP - Fluorouridina difosfato
FUMP - Fluorouridina monofosfato
FUPA - Ácido α -fluoro- β -ureido-propionico
FUR - Fluorouridina
FUTP - Fluorouridina trifosfato
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G5-FU - Grupo 5-FU
G5-FU+Arg - Grupo 5-FU + Arginina
G5-FU+Arg+VitC - Grupo 5-FU + Arginina + Vitamina C
G5-FU+VitC - Grupo 5-FU + Vitamina C
Gc – Grupo controle
GLUT - Transportador de glicose
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
GPx - Glutaciona peroxidase
GSH - Glutaciona reduzida
GSS - Glutaciona sintetase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HOBr - Ácido hipobromoso
HOCl - Ácido hipocloroso
HPRT1 - hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
HSD - hidroxisteroide desidrogenase
IKK - Inibidor kB quinase
IL – Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
JNK - C-Jun N-terminal quinase
Keap1 - Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
LH - Hormônio luteinizante
LPO - Peroxidação lipídica
LPS - Lipopolissacarídeo
MAPK - Quinase ativada por mitógenos
MDA - Malondialdeído
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B - Fator nuclear kappa B

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
NRF2 - Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
 $^1\text{O}_2$ - Oxigênio molecular singlete
 $\text{O}_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido
 O_3 - Ozônio
 $\cdot\text{OH}$ - Radical hidroxila
ONOO $^-$ - Peroxinitrito
OPRT - Orotato fosforilase
PRPP - Fosforribosil transferase
qPCR - PCR quantitativa ou em tempo real
RAS - Proteína codificada pelo oncogene do vírus do sarcoma murino de Harvey
RNA - Ácido ribonucleico
RNR - Ribonucleotideo redutase
 $\text{RO}\cdot$ - Radical alcóxila
 $\text{ROO}\cdot$ - Radical peróxil
ROOH - Hidroperóxidos orgânicos
ROS – Espécies reativas do oxigênio
RPS18 - Proteína ribossomal S18
rRNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RT - Transcrição reversa
sGC - Guanilato ciclase solúvel
SOD - Superóxido dismutase
SVCT - Transportador de vitamina C dependente de sódio
tBID – BID em uma forma truncada
TK - Timidina quinase
 $\text{TNF}\alpha$ – Fator de necrose de tumor alfa
TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral
TP - Timidina fosforilase
TRADD – domínio de morte associado ao TNFR
TS – Timidilato sintase
UK - Uridina quinase
UP - Uridina fosforilase
UTP - Uridina trifosfato

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	17
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Câncer e quimioterapia.....	19
2.2	Ação e toxicidade do 5-Fluorouracil no tratamento de cânceres.....	20
2.3	Espermatogênese e estresse oxidativo.....	24
2.4	Quimioterapia e reprodução masculina.....	28
2.5	Vitamina C.....	31
2.6	L-arginina.....	35
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	CAPÍTULO II.....	50
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NUTRITION AND CANCER.....	83

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação celular desenfreada com capacidade de metástase em vários tecidos e órgãos, causando alterações sistêmicas graves. É uma das principais causas de morte em todo o mundo tendo o número de mortes por câncer dobrado em mulheres e triplicado em homens nos últimos 40 anos (LEWANDOWSKA *et al.*, 2020).

A quimioterapia é o tratamento de eleição para vários tipos de câncer porque bloqueia o crescimento e divisão de células tumorais (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016). Um dos quimioterápicos amplamente utilizados é o 5-fluorouracil (5-FU) com capacidade de alterar os ácidos nucleicos da célula e a mitose celular (SCHULZE, 2007).

Os quimioterápicos não atuam somente nas células cancerígenas, levando a efeitos colaterais em diversos tecidos que sofrem intensa proliferação celular (BARATEIRO *et al.*, 2020). A ação tóxica do 5-FU é dependente da dose e do tempo, varia de paciente para paciente e é capaz de provocar efeitos colaterais graves que podem levar à interrupção da terapia (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016).

Um dos sistemas afetados pelo tratamento do 5-FU é o sistema reprodutor, e mesmo em pequenas doses foi considerado gonadotóxico em ratos albinos machos que receberam dose única de 5-FU (10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e observados em 1, 3, 15 e 30 dias após a exposição (NARAYANA *et al.*, 2000). A proliferação celular faz parte da fisiologia reprodutiva e diversas alterações morfológicas testiculares e endócrinas foram observadas em ratos machos tratados com 5-FU (0, 20, 30 mg/kg/dia) por via oral (volume de administração de 10ml/kg) por um período de 2 ou 4 semanas (TAKIZAWA; HORII, 2002).

Na literatura científica foram observadas evidências da ação pró-oxidativa e inflamatória do 5-FU. Em ratos, o 5-FU causou nefrotoxicidade, com aumento do estresse oxidativo e redução das eximas antioxidantes que diminuiriam a capacidade

de defesa antioxidante da célula, além de inflamação renal e apoptose (FAMUREWA *et al.*, 2019).

Alguns suplementos com ação antioxidante podem auxiliar na redução dos efeitos colaterais do 5-FU para células não cancerígenas, que apresentam intensa proliferação celular, como as células gonadais. Nesse sentido, L-arginina e vitamina C são possíveis candidatos para reduzir o estresse oxidativo tecidual e diminuir os danos celulares (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016; ZHANG *et al.*, 2020).

Alguns suplementos ou compostos com potencial antioxidante e anti-inflamatório podem reduzir os efeitos colaterais associados ao 5-FU para células não cancerígenas com intensa proliferação celular (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016). Nesse sentido, a vitamina C por processo de doação/transferência de elétrons é um potente antioxidante capaz de reduzir as espécies reativas de oxigênio (ROS) e neutralizar o estresse oxidativo (EO) consequentemente (CARITÁ *et al.*, 2020). A L-arginina por sua vez possui capacidade antioxidante ao eliminar o radical superóxido, suprimir o processo de oxidação e aumentar as enzimas antioxidantes séricas (ZHANG *et al.*, 2020).

A presente revisão de literatura teve como objetivo revisar os principais efeitos tóxicos do quimioterápico 5-FU em células não cancerígenas, dando ênfase aos órgãos reprodutivos e também apresentar o que se conhece sobre a ação antioxidante da vitamina C e da L-arginina que justifica o estudo desses suplementos alimentares como alternativas para reduzir os danos do 5-FU.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer e quimioterapia

O câncer é um importante problema de saúde pública em todo o mundo e que, ao longo de décadas, tem apresentado maiores taxas de incidência e mortalidade (FONSECA *et al.*, 2021). Acredita-se que se tornará a principal causa de morte em todos os países do mundo no século XXI, isso devido ao desenvolvimento social e econômico e ao envelhecimento da população (XIA *et al.*, 2018; XUE; ZHOU; QIU, 2020). Essa doença é a responsável pela morte de aproximadamente 9,6 milhões de pessoas por ano no mundo todo, com aproximadamente 18 milhões de novos casos anualmente (BRAY *et al.*, 2018; MENTELLA *et al.*, 2019).

O câncer é uma condição crônico-degenerativa que envolve o crescimento anormal de células com potencial de se espalharem ou invadirem outras partes do corpo (FONSECA *et al.*, 2021; XIA *et al.*, 2018). Os cânceres de maior incidência no mundo são os de pulmão (11,6%) e de mama (11,6%), seguidos pelos de próstata (7,1%) e colorretais (6,1%) e os de maior mortalidade são os de pulmão (18,4%), seguidos pelos colorretais (9,2%), de estômago (8,2%), de fígado (8,2%) e de mama (6,6%) (BRAY *et al.*, 2018).

A quimioterapia é uma das medidas mais comumente usadas para tratar várias formas de câncer e que resulta em grandes investimentos financeiros acarretando encargos institucionais e sociais em diversos países (FONSECA *et al.*, 2021).

O 5-FU por ser um agente antineoplásico de baixo custo (BALMANT *et al.*, 2018) é um dos medicamentos mais utilizados e foi considerado o tratamento padrão de agente único para o câncer colorretal (JOULIA *et al.*, 1999). Pode ser usado separadamente ou em combinação com outras quimioterapias para tratar muitos tipos de câncer (FAHMY *et al.*, 2020). É o fármaco de escolha para o tratamento, em regimes quimioterápicos aceitos, de uma variedade de tumores sólidos como câncer de mama, cabeça e pescoço, tumores de pele, cânceres colorretais e outros cânceres do trato gastrointestinal (GOIRAND *et al.*, 2018).

2.2 Ação e toxicidade do 5-Fluorouracil no tratamento de câncer

O quimioterápico/antimetabólito citotóxico, 5-FU, é um análogo de pirimidina por apresentar um átomo de flúor estável na posição 5 do anel uracila, atua como um falso substrato para os ácidos nucleicos (GOIRAND *et al.*, 2018), interferindo no processo de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA), exercendo a citotoxicidade pela incorporação incorreta de fluoronucleotídeos em ácido ribonucleico (RNA) e DNA (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003) e por meio da inibição de timidilato sintase (TS), enzima responsável pela síntese da timidina monofosfato a partir da uridina monofosfato (FAHMY *et al.*, 2020). O 5-FU entra na célula usando o mesmo mecanismo de transporte da uracila (VODENKOVA *et al.*, 2020) que é um sistema transporte mediado por carreadores (EL-ALFY *et al.*, 2013).

A fluoropirimidina, 5-FU, é metabolizada por duas rotas competitivas: a rota catabólica e a rota anabólica. A rota catabólica envolve a conversão de 5-FU em dihidrofluorouracil (DHFU) pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD) levando a formação de ácido α -fluoro- β -ureido-propiónico (FUPA) e α -fluoro- β -alanina (FBAL) que é excretado pelos rins (SETHY; KUNDU, 2021). A DPD é responsável por transformar a maior parte do 5-FU (>80%) em componentes inativos e sua deficiência afeta amplamente a farmacocinética do 5-FU (GOIRAND *et al.*, 2018), levando a toxicidades graves, como neutropenia e diarreia (GOIRAND *et al.*, 2018; VODENKOVA *et al.*, 2020).

A rota anabólica é responsável pelo efeito anticâncer do 5-FU, ou seja, ao entrar nas células, o 5-FU é fosforilado por várias reações enzimáticas responsáveis por sua ativação metabólica (GOIRAND *et al.*, 2018), resultando principalmente na formação de três metabólitos ativos: fluorouridina monofosfato (FUMP), fluorouridina difosfato (FUDP) e fluorodesoxiuridina trifosfato (FUTP) (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016), responsáveis por bloquear a ação da TS (VODENKOVA *et al.*, 2020).

O 5-FU é metabolizado a FUMP por via direta usando orotato fosforilase (OPRT), na presença do cofator fosforribosil transferase (PRPP) ou indiretamente por meio da uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (UK) via fluorouridina (FUR) (SETHY; KUNDU, 2021). Ocorre então a fosforilação do FUMP em FUDP, que é

então fosforilado no metabólito ativo FUTP ou FUDP pela ribonucleotídeo redutase (RNR) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003b; SETHY; KUNDU, 2021).

A inibição da TS pelo FUMP restringe a síntese de desoxitimidina monofosfato (dTMP), que é crucial para a replicação e reparo do DNA (GELEN *et al.*, 2021), provoca a depleção de dTTP, perturba os níveis de outros desoxinucleotídeos (VODENKOVA *et al.*, 2020), leva ao acúmulo de desoxiuridina monofosfato (dUMP) podendo aumentar os níveis de desoxiuridina trifosfato (dUTP) e trifosfato de fluorodesoxiuridina (FUTP) (DERISSEN *et al.*, 2016).

Assim, o aumento de dUTP/dTTP e FUTP/dTTP causa incorporação incorreta de dUTP e FUTP no DNA (SETHY; KUNDU, 2021). A menor concentração de dTMP ocasiona toxicidade celular, danos ao DNA (FAMUREWA *et al.*, 2019), desestabiliza a sua estrutura, pois é crucial para a replicação e o reparo do DNA e, eventualmente, leva a quebras na fita dupla de DNA das células afetadas, podendo causar apoptose (LAMBOURAS *et al.*, 2018). O 5-FU também pode ser convertido em FUMP por um mecanismo indireto envolvendo uma ação sequencial da timidina fosforilase (TP), catalisando a conversão de 5-FU em fluorodesoxiuridina (FdUR). O FdUR é ainda convertido por fosforilação pela timidina quinase (TK) ou via redução de FUDP por RNR (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003a; VODENKOVA *et al.*, 2020). Em alguns tipos de células, esse tipo de formação de FUMP predomina em comparação com sua produção por TP/TK e serve como um substrato para a síntese de FUTP (VODENKOVA *et al.*, 2020).

Os efeitos biológicos tóxicos observados com o uso do 5-FU, como neutropenia febril, náusea/vômito, diarreia, mucosite, toxicidade hepatorenal, mielossupressão, cardiotoxicidade, dermatites, toxicidade para órgãos genitais e aumento do risco de mortalidade estão relacionados à concentração do 5-FU (AL-ASMARI *et al.*, 2016; LEE; BEUMER; CHU, 2016). A eficácia anticancerígena do 5-FU aumentou com a dose, levando a produção de níveis inaceitáveis de citotoxicidade em células normais, o que deve ser superado pela combinação do 5-FU com outros medicamentos anticancerígenos com diferentes mecanismos de ação (CHANG *et al.*, 2021).

Existem variações entre os protocolos de tratamento com 5-FU em humanos, no entanto, um dos mais utilizados envolve uma dose inicial de bolus

intravenoso de 5-FU entre 400 e 600mg/m² e é subsequentemente administrado repetidamente ao longo de vários meses em combinação com outros medicamentos (STRINGER *et al.*, 2018). A oscilação das concentrações de 5-FU no plasma torna difícil o ajuste de dose durante o monitoramento da droga, entretanto, quando o limite tóxico de uma determinada dose é observado, sua redução ou descontinuação se faz necessária, o que leva ao fracasso do tratamento (KOBUCHI; ITO, 2020).

O EO é induzido pelo 5-FU, que ao inibir a incorporação de ácido timidílico na estrutura do DNA causa danos a sua estrutura (FAMUREWA *et al.*, 2019). A toxicidade induzida por 5-FU, é um fenômeno complexo de várias etapas, inclui produção excessiva de ROS (RAPA *et al.*, 2021), alteração de várias vias de sinalização, superexpressão de mediadores inflamatórios como fator nuclear kappa-B (NF-kB), ciclooxigenase-2 (COX-2) (FAMUREWA *et al.*, 2019), que desencadeiam mecanismos patológicos de dano celular, alterando os parâmetros fisiológicos normais das células (RAPA *et al.*, 2021).

Estudos evidenciaram que após a administração de 5-FU, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, NF-kB, fator de necrose tumoral α (TNF α) que é a via de ativação das interleucinas (IL6 e IL1) estavam aumentadas em ratos mesmo antes da evidência histológica de dano tecidual (VYAS; LAPUT; VYAS, 2014). No estudo de Famurewa *et al.*, (2019), relacionando a nefrotoxicidade por 5-FU, a injeção do quimioterápico aumentou consideravelmente os níveis renais de IL1 β , IL6, TNF α e de óxido nítrico (NO), bem como uma superexpressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NF-kB, que foram confirmadas por alterações estruturais relacionadas à inflamação na histologia renal. Nesse mesmo estudo, evidências mostraram que o EO é o principal gatilho de respostas inflamatórias por meio da ativação de fatores de transcrição NF-kB que é translocado para o núcleo (FAMUREWA *et al.*, 2019), induzindo a regulação positiva de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias e pela apoptose relacionada ao dano no DNA (GELEN *et al.*, 2021).

O NF-kB tem sua ativação impulsionada pela quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e as quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo MAPK p38, c-Jun N-terminal quinase (JNK), contribuem para a regulação positiva de citocinas e mecanismos de apoptose (ARAB; SALAMA; MAGHRABI, 2018). A

apoptose causada por 5-FU foi previamente relatada como um processo dependente de caspases, grupo de proteases de cisteína reconhecidas como principais efetoras da morte celular por apoptose, está relacionada ao aumento do estresse oxidativo e a superexpressão de citocinas (FAMUREWA *et al.*, 2019).

A caspase-3 é uma cisteína-protease com especificidade para aspartato, sua ação de desencadear apoptose é bem conhecida e seu aumento fornece fortes evidências de morte celular por apoptose (FAMUREWA *et al.*, 2019). A Caspase-3 é o intermediário chave das vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas (TIGU *et al.*, 2020).

Na via intrínseca, mitocondrial ou regulada pela família de proteínas conhecidas por linfoma de células B2 (BCL-2) (SHALINI *et al.*, 2015), a ativação da Caspase-3 envolve ativação previa dos efetores pró-apoptóticos: BID (agonista de morte de domínio de interação de BH3), BAX (proteína X associada a BCL-2) e BAK (antagonista/assassino homólogo BCL-2) (SHALINI *et al.*, 2015; TIGU *et al.*, 2020), que induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial e liberação de Cyt c (SHALINI *et al.*, 2015). Nessa via, o BAX funciona como um ativador apoptótico, com liberação de Cyt c e ativação da caspase-9 iniciadora, que irá ativar a caspase-3 efetora e a BCL-2, uma proteína anti-apoptótica, que regula as vias apoptóticas e protege contra a morte celular, ligando-se às proteínas pró-apoptóticas como a BAX (ZHANG *et al.*, 2020).

Já na via extrínseca ou via do receptor de morte, a apoptose é ativada pela ligação de proteínas ligantes (como TNF α e FASL) aos seus respectivos receptores transmembrânicos (TNFR e FASR), que expõe os domínios efetores de morte celular (DED) e provoca o recrutamento das proteínas adaptadoras de transdução de sinal formando o domínio de morte associado ao TNFR (TRADD) ou o domínio de morte associado ao FASR (FADD) que reúnem procaspases-8 iniciadoras formando o complexo de sinalização de indução de morte (DISC) que cliva e dimeriza as procaspases-8 formando a caspase-8 ativa, que é uma caspase iniciadora (SHALINI *et al.*, 2015). Uma vez que as caspases iniciadoras são ativadas através as vias de apoptose extrínseca ou intrínseca, elas medeiam ativação de caspases 3 efetoras que participam das duas vias (SHALINI *et al.*, 2015). A caspase-8 também cliva BID em uma forma truncada (tBID), que envolve a via mitocondrial, mecanismo da via

intrínseca, amplificando a resposta apoptótica (TIGU *et al.*, 2020).

Além disso, em estudo avaliando a nefrotoxicidade induzida por 5-fluorouracil em ratos albino machos adultos a toxicidade por 5-FU foi relacionada à alta expressão de iNOS, formação de peroxinitrito oxidante altamente reativo (ONOO⁻), migração de células imunes concomitante com a produção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias que levou a danos no DNA, necrose e danos no parênquima renal (ABD EL-SALAM ABD EL-WAHAB; ABD EL-MAJID AHMED; MOHAMED ABD EL-GALIL, 2020).

Portanto, a toxicidade induzida por 5-FU, inclui produção excessiva de ROS (RAPA *et al.*, 2021), alteração de várias vias de sinalização, superexpressão de mediadores inflamatórios, como NF-κB e ciclooxigenase-2 (COX-2) (FAMUREWA *et al.*, 2019), prejudica a proliferação celular normal, o seu metabolismo e a viabilidade das células (NAREN *et al.*, 2021). As complicações comuns são gastrointestinais, cardíacas, renais, hepáticas, diarreia, mielossupressão, dermatite e anomalias do sistema reprodutor (NAREN *et al.*, 2021).

2.3 Espermatogênese e estresse oxidativo

Os testículos desempenham duas funções importantes que são, a síntese e secreção de testosterona e outros hormônios através do processo de esteroidogênese; e a produção de um número suficiente de espermatozoides competentes através do processo de espermatogênese para atingir a fertilidade (ANGULO *et al.*, 2011).

As espermatogônias são responsáveis pelo início do processo de espermatogênese e pode ser dividida em dois tipos diferentes, A e B, onde o tipo B possui maior quantidade de heterocromatina, indicando uma célula em diferenciação, precursoras dos espermatócitos (MENDES *et al.*, 2022). Os espermatócitos primários cruzam a barreira hemato-testicular, passam pela meiose, dando origem aos espermatócitos secundários no final da meiose I. na segunda fase da meiose, são formadas quatro espermátides haploides. Ao final da meiose, as espermátides passam pela espermiogênese, diferenciando-se em espermatozóides

maduros, que são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (RABAÇA *et al.*, 2015).

A espermatogênese, é um evento crítico de desenvolvimento pós-meiótico que ocorre nos testículos e dura cerca de 70 dias dependendo da espécie (em ratos a espermatogênese completa dura de 52 a 53 dias), é responsável pela produção dos espermatozoides e é altamente suscetível à inflamação testicular, estresse oxidativo e apoptose. No epidídimo, o espermatozoide atinge a capacidade de fertilização, motilidade e maturação completa (DE LUCA *et al.*, 2021; FAHMY *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2022).

Durante a espermatogênese, os espermatozoides são fisiologicamente expostos às ROS, que em concentrações controladas, podem estar envolvidas na condensação da cromatina espermática, na indução da apoptose para ajustar o número de células germinativa ou proliferação de espermatogônias (MENDES *et al.*, 2022).

As ROS referem-se a qualquer composto capaz de oxidar substratos biológicos como gorduras, proteínas e DNA, por possuírem elétrons desemparelhados, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$), o radical peróxil ($ROO\bullet$), radical alcóxila ($RO\bullet$) (AITKEN; BROMFIELD; GIBB, 2022). Além disso, há moléculas não radicais derivadas de oxigênio incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), oxigênio molecular singleto (1O_2), ozônio (O_3), ácido hipocloroso (HOCl) e ácido hipobromoso (HOBr) (KHAN *et al.*, 2021).

No plasma seminal, as principais ROS, são os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila. Ocorreu uma correlação positiva entre o EO e os espermatozoides anormais, onde as quimioterapias citotóxicas podem ativar o NF- κ B através da inflamação e dano testicular (AITKEN, 2020; FAHMY *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2021). A produção endógena de ROS ocorre a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidase) ligadas à membrana e das mitocôndrias, enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, citocromo P450 microsomal ou por xantina oxidase. Nas mitocôndrias o $O_2^{\bullet-}$ é rapidamente produzido e convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 e SOD2, respectivamente) (KHAN *et al.*, 2021). As ROS durante a maturação dos

espermatozoides humanos, podem ser produzidas em níveis diferentes pela NADPH oxidase da membrana plasmática e pela oxidoredutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeos mitocondrial, sendo menor em células germinativas imaturas e espermatozoides maduros e maior em espermatozoides imaturos com morfologia anormal da cabeça (MENDES *et al.*, 2022). A inibição da via das pentoses fosfato reduz a produção de NADPH como um equivalente de redução no esperma (BARATI; NIKZAD; KARIMIAN, 2020).

Na capacitação espermática, as ROS atuam em cascatas de reações celulares que permite a ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito e na reação acrossômica, com liberação de enzimas proteolíticas; processos necessários para uma fertilização eficiente e que requerem altos níveis de energia fornecidos por vias metabólicas como glicólise ou fosforilação oxidativa (DE LUCA *et al.*, 2021).

Existem numerosas enzimas responsáveis pela preservação das condições redox celulares. O EO ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação. Esta condição incita várias reações oxidativas que podem levar a danos celulares e morte como consequência do aumento na produção de ROS ou na redução da defesa antioxidante (RABAÇA, 2015). Quando a geração de ROS por uma determinada célula, tecido ou fluido excede a capacidade protetora dos mecanismos antioxidantes intrínsecos é criado o estresse oxidativo (AITKEN, 2020).

O aumento no nível de ROS, em condições patológicas reduzem os antioxidantes (KHAN *et al.*, 2021), pela incapacidade endógena das mitocôndrias testiculares, microsomas e citosol em eliminar H_2O_2 (PAVITHRA *et al.*, 2020), resultando em homeostase distorcida ou EO (KHAN *et al.*, 2021).

O dano inflamatório provocado por ROS nas gônadas masculinas gera aumento no nível de $TNF\alpha$ no sêmen (FAHMY *et al.*, 2020), aumento das alterações morfológicas, rompimento da integridade funcional das organelas celulares, danos à integridade do DNA no núcleo do espermatozoide, que aceleram o processo de apoptose das células germinativas com declínio na função, contagem e motilidade dos espermatozoides (PAVITHRA *et al.*, 2020). O dano provocado no DNA pode não impedir a fertilização, mas pode levar a anormalidades fetais que só ficarão aparentes mais tarde, após o nascimento (AKMAL *et al.*, 2006).

Os espermatozoides são formados por membranas plasmáticas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e citoplasma com baixa concentração de enzimas antioxidantes, tornando-os altamente vulneráveis às ROS (BARDWEEL *et al.*, 2018; PAVITHRA *et al.*, 2020). O aumento na peroxidação lipídica (LPO) leva à depleção do ATP intracelular, causando dano axonemal, baixa viabilidade espermática e aumento de defeitos na estrutura do espermatozoide (BARDWEEL *et al.*, 2018). O malondialdeído (MDA) é considerado uma medida do dano da peroxidação aos espermatozoides em testes laboratoriais, o que indica que a membrana plasmática dos espermatozoides, rica em PUFAs, é um alvo preferencial para as ROS. No estudo de Moretti *et al.* (2017) a comparação de parâmetros espermáticos com o nível de MDA como um fator para medir a peroxidação lipídica, indica que a qualidade do esperma diminui no grupo infértil, enquanto que os níveis de NO, glutathiona reduzida (GSH) e ácido ascórbico aumentam, provavelmente para prevenir a peroxidação lipídica e para lidar com os efeitos nocivos das ROS (BARATI; NIKZAD; KARIMIAN, 2020).

As células saudáveis normais desenvolveram mecanismos antioxidantes, que retardam ou impedem a oxidação, por um sistema de eliminação de radicais livres que compreende catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e GSH (MENDES *et al.*, 2022). A CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água, ativa a capacitação das células espermáticas, induzidas pelo NO, peróxido de hidrogênio e SOD. Essa enzima foi encontrada nos espermatozoides de humanos e ratos, bem como no plasma seminal, sendo a próstata sua fonte (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013). As SOD são metaloenzimas que catalisam reações de dismutação do ânion superóxido. Estão presentes nas formas intra (SOD-1 e SOD-2) e extracelular (SOD-3). A SOD demonstra alta atividade no plasma seminal com 75% de sua atividade relacionada à atividade da SOD–1 e os 25% restantes à SOD–3 (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013). Outra enzima do sistema antioxidante no sêmen é a glutathiona peroxidase (GPX), que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos, incluindo os peróxidos de fosfolipídios. A GPX espermática está localizada principalmente na matriz mitocondrial, sendo encontrada uma forma nuclear que protege o DNA do esperma do dano oxidativo e participa do

processo de condensação da cromatina (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013).

Uma diminuição significativa no nível de GSH leva a maior sensibilização celular, com conseqüente ataque de ROS em SOD, CAT e GPX, ocasionando desequilíbrio no mecanismo antioxidante celular e apoptose das células germinativas (PAVITHRA *et al.*, 2020). Alterações nas funções gonadais podem prejudicar a fertilidade masculina, pois os testículos são altamente vulneráveis à toxicidade da quimioterapia (RABAÇA *et al.*, 2015).

2.4 Quimioterapia e reprodução masculina

Os quimioterápicos podem infiltrar a barreira hemato-testicular, atingir facilmente o epitélio proliferativo dos túbulos seminíferos e prejudicar os estádios posteriores de diferenciação das células germinativas, que são mais suscetíveis aos agentes citotóxicos que tem como alvo, principalmente, as células em divisão (RABAÇA *et al.*, 2015).

Devido a sua constante produção e desenvolvimento, os espermatozoides são considerados o principal alvo da quimioterapia (GAD EL- HAK; MOAWAD; HAFEZ, 2017). Esses agentes são altamente prejudiciais para a espermatogênese masculina (RABAÇA *et al.*, 2015), danificam o epitélio, com descamação do epitélio seminífero em diferentes doses, provocam atrofia tubular seminífera, formação de células gigantes multinucleadas, dano espermatogonial e interrupção do desenvolvimento da espermátide (PAVITHRA *et al.*, 2020), que diminuem a qualidade dos espermatozoides e têm como alvo preferencial o ciclo celular (RABAÇA *et al.*, 2015).

Em todos os mamíferos, devido à precisão nas etapas da espermatogênese é possível identificar o estágio de diferenciação no qual os espermatozoides foram expostos a uma iminente ação genotóxica. A duração dos estádios espermatogênicos apesar de diferirem em ratos, camundongos e humanos, apresentam similaridade quanto aos estádios celulares considerados mais sensíveis aos efeitos mutagênicos (MEISTRICH, 2020). As anomalias cromossômicas em células germinativas em níveis modestos de mutações foram detectadas em

espermatócitos e espermátides de camundongos após o tratamento com 5-FU A (FAHMY *et al.*, 2020). O metabólito ativo do 5-FU tem uma meia-vida intracelular de 7 a 9 dias e, por isso, espermatogônias (células mais jovens) podem ser afetadas pelo 5-FU enquanto a droga ainda está ativa (GAD EL- HAK; MOAWAD; HAFEZ, 2017). Em humanos, qualquer espermatozoide no ejaculado com mais de 67 dias, teria sido exposto ao agente genotóxico na fase de espermatogônia do tipo A (MEISTRICH, 2020).

Uma das limitações importantes do uso de 5-FU é a sua toxicidade em células normais em proliferação, sendo muito prejudiciais para a espermatogênese masculina (AL-ASMARI *et al.*, 2016; NAREN *et al.*, 2021). As mutações induzidas por esta droga na espermatogônia interrompe o curso completo da espermatogênese, afetando os espermatozoides. Espermatozoides deformados de camundongos raramente fertilizam oócitos *in vivo* ou *in vitro* (MEISTRICH, 2020; RABAÇA *et al.*, 2015). Em homens, foi demonstrado que a ação do 5-FU em dose única está associado com a toxicidade reprodutiva, resultando no esgotamento de células germinativas e danos ao aparelho reprodutor (STRINGER *et al.*, 2018).

No estudo de Narayana *et al.* (2000) o 5-FU induziu, ratos albinos machos, a descamação do epitélio seminífero nas doses de 10, 50 e 100mg/kg i.p., e na maior dose ocorreu a formação de células gigantes (GAD EL- HAK; MOAWAD; HAFEZ, 2017). Ratos SD-Slc machos tratados com 5-FU (20 e 30mg/kg/dia) por 14 dias, apresentaram no exame histopatológico degeneração do epitélio seminífero nos testículos, restos celulares descamados nos ductos do epidídimo e no grupo 20mg/kg/dia vacuolização das células de Sertoli após 14 dias (TAKIZAWA; HORII, 2002).

D'Souza (2003) demonstrou que após a aplicação do 5-FU (30mg/kg), há uma queda na contagem de espermatozoides no 14º dia com aumento na toxicidade do 5-FU ao longo do tempo, o que aponta, para a possibilidade das células expostas nesta fase, pertencerem a população de células espermatogoniais, que são a maioria sensíveis à exposição a 5-FU.

Como a citotoxicidade do 5-FU está relacionada à indução da parada do ciclo celular na fase S (LAMBOURAS *et al.*, 2018), pela inibição da TS e incorporação incorreta de seus metabólitos fluoronucleotídeos na síntese de RNA e DNA (FAHMY

et al., 2020; GAD EL- HAK; MOAWAD; HAFEZ, 2017), causando lesão testicular por descamação epitelial e indução de danos e morte celular associados aos seus numerosos efeitos tóxicos (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2021).

O 5-FU causa danos nos cromossomos de espermátides de camundongos, com 90% das alterações na univalência do X e Y, provavelmente pela incapacidade do pareamento dos cromossomos sexuais homólogos, levando a uma parada meiótica das células germinativas e provável infertilidade (FAHMY *et al.*, 2020). Embora possa haver um efeito do 5-FU resultando em aberrações cromossômicas em embriões, a exposição de espermátides ou espermatócitos ao 5-FU mostrou baixo risco, com níveis modestos de mutações (MEISTRICH, 2020).

Após o uso do 5-FU (20mg/kg) em ratos Wistar, 6 a 7 semanas de idade, por 14 dias, foram observadas alterações morfológicas espermáticas que levaram à diminuição da motilidade, viabilidade e anormalidades em espermatozoides de camundongos (PAVITHRA *et al.*, 2020). Em outro estudo com camundongos albinos machos (*Mus musculus*) com idade entre 7 a 10 semanas e peso entre 20 e 30g, que receberam 5-FU nas dosagens de 5, 10 e 15 mg/kg por cinco dias consecutivos em intervalos de 24 horas, foi observada a presença de espermatozoides com cabeça grosseira, com cabeça amorfa, decorrente da ação do 5-FU sobre os genes responsáveis pela expressão das características dos acrossomos, além de espermatozoide intermediário angular e espermatozoide com cauda enrolada (GAD EL- HAK; MOAWAD; HAFEZ, 2017). A parada completa do movimento dos espermatozoides pode ser decorrente de anormalidades significativas na morfologia flagelar prejudicando a motilidade e conseqüentemente a função dos espermatozoides (FAHMY *et al.*, 2020).

Estudos em camundongos demonstraram que o 5-FU provocou aumento na toxicidade reprodutiva pela diminuição da função das células de Sertoli, dos efeitos diretos nas células germinativas e da diminuição dos níveis séricos de prolactina e testosterona (TAKIZAWA; HORII, 2002). Esses efeitos provavelmente foram mediados pelo desequilíbrio hormonal no soro, pelo qual os níveis de GnRH e pró-alfa C foram notavelmente aumentados, enquanto os níveis de testosterona, activina A, prolactina e inibina B foram significativamente diminuídos. A testosterona em ratos foi diminuída devido ao declínio da função das células de Sertoli (GHAFOURI-

FARD *et al.*, 2021; TAKIZAWA; HORII, 2002).

Além disso, o 5-FU promoveu a formação de células gigantes, induziu alterações morfológicas das células de Sertoli e descamação do epitélio, reduziu o peso de órgãos reprodutivos, incluindo o testículo, a próstata e a vesícula seminal (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2021; TAKIZAWA; HORII, 2002). Portanto, o uso de agentes ou componentes com potencial antioxidante e anti-inflamatório foi sugerida para modular os efeitos tóxicos associados ao 5-FU, sem comprometer os seus efeitos antineoplásicos (FAMUREWA *et al.*, 2019).

2.5 Vitamina C

Os agentes quimioterápicos podem ser tóxicos para as células por aumentar o EO nas células (ILGHAMI *et al.*, 2020). A vitamina C atua como suporte na manutenção do equilíbrio redox e protege contra danos ao DNA e às membranas celulares, especialmente contra a peroxidação lipídica em tecidos como o cérebro e células reprodutivas (WASILEWSKA; WASILEWSKI; ZWIERZ, 2019). A vitamina C apresenta importância como adjuvante na quimioterapia por prevenir danos celulares reagindo e eliminar moléculas oxidantes (SINGH *et al.*, 2018), sendo assim, um possível candidato para reduzir os efeitos colaterais do 5-FU. Essa vitamina pertence à classe das vitaminas essenciais solúveis em água (KOVINA *et al.*, 2020).

Os humanos e outros mamíferos, não possuem a capacidade de sintetizar vitamina C à partir da glicose, devido a mutações no gene que codifica a enzima L-gulonono- γ -lactona oxidase (gulonolactona oxidase) (PAWLOWSKA; SZCZEPANSKA; BLASIAK, 2019; ZASOWSKA-NOWAK; NOWAK; CIALKOWSKA-RYSZ, 2021), enzima que catalisa o último estágio da via de biossíntese, devendo esta ser obtida pela dieta ou como suplemento (ZASOWSKA-NOWAK; NOWAK; CIALKOWSKA-RYSZ, 2021).

A vitamina C, *in vivo* e em condições fisiológicas, apresenta-se sob duas formas, a forma reduzida ASC (ascorbato), que é a forma predominante e a forma oxidada DHA (ácido deidroascórbico) (LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2019), que surgem pela atividade redutora da vitamina C, ou seja, sua capacidade em doar

elétrons (ZASOWSKA-NOWAK; NOWAK; CIAŁKOWSKA-RYSZ, 2021). No plasma sanguíneo, a forma reduzida de ASC predomina, enquanto a concentração de DHA é muito baixa (KOVINA *et al.*, 2020).

O ASC, que é relativamente estável e não reativo, forma-se pela doação do primeiro elétron à partir da vitamina C, é transportado para os tecidos por meio da corrente sanguínea e ativamente absorvido pelos transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT) 1 e 2 (ZASOWSKA-NOWAK; NOWAK; CIAŁKOWSKA-RYSZ, 2021), que são diferencialmente expressos em diferentes tecidos o que possibilita atingir concentrações intracelulares várias vezes superiores aos níveis plasmáticos (KOVINA *et al.*, 2020). Ao perder o segundo elétron, durante a segunda oxidação, a vitamina C é convertida em DHA, instável em pH neutro (VISSERS; DAS, 2018; KOVINA *et al.*, 2020) e que utilizando transportadores de glicose GLUT1-4, GLUT8 e GLUT14, por transporte facilitado (ECK, 2018), o DHA pode ser captado pela célula, ser rapidamente reduzido a ASC pela reação com GSH e liberado (KOVINA *et al.*, 2020). A conversão do DHA em ASC pela maioria dos tipos celulares (LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2019) é um processo de reciclagem intracelular eficiente (VISSERS; DAS, 2018), que reflete sua capacidade de sofrer oxidação e a concentração total de vitamina C disponível é considerada como o conjunto combinado de ASC e DHA (LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2019).

A vitamina C quando aplicada em concentrações baixas/fisiológicas, o ASC pode atuar como antioxidante e melhorar o efeito do tratamento quimioterápico e diminuir os efeitos adversos (BLASZCZAK *et al.*, 2019). Interessante observar que a maior absorção do ácido ascórbico é observada em uma dose mais baixa e é ativamente transportada através das membranas celulares (KAZMIERCZAK-BARANSKA *et al.*, 2020).

Estudos *in vitro* evidenciaram que as concentrações de ascorbato (concentração plasmática em milimolares), apenas atingíveis após a administração intravenosa de vitamina C, são citotóxicas para células tumorais de crescimento rápido, como foi demonstrado em outros estudos em que injeções de altas doses de vitamina C, que prolongaram a sobrevivência dos animais de laboratório ao inibir o

crescimento de células malignas (ZASOWSKA-NOWAK; NOWAK; CIALKOWSKA-RYSZ, 2021).

A manutenção do equilíbrio redox seminal pelo sistema antioxidante endógeno, está diretamente relacionada à produção excessiva de ROS frente a sua capacidade antioxidante, necessária para a manutenção de processos fisiológicos como a regulação da reprodução masculina (DUTTA *et al.*, 2022). A eficácia na prevenção ao dano oxidativo de lipídeos, proteínas e DNA é feita pela vitamina C por aumentar a concentração de GSH, a atividade de enzimas antioxidantes testiculares como a CAT e a SOD, essenciais para a sobrevivência dos espermatozoides, e por reduzir as lesões decorrentes do EO, a partir do ânion superóxido, oxigênio singlete e radicais hidroxila (DUTTA *et al.*, 2022; WASILEWSKA; WASILEWSKI; ZWIERZ, 2019)

Os efeitos protetores da vitamina C contra citotoxicidade e genotoxicidade foram observados em camundongos e são responsáveis por até 65% da atividade antioxidante no sêmen, estando no testículo associada à fertilidade, por prevenir a aglutinação e melhorar a motilidade dos espermatozoides (HAJJAR; SOLEYMANI; VATANCHIAN, 2020; LEITE *et al.*, 2019).

Os níveis reduzidos ou a deficiência de vitamina C no plasma seminal de homens foram relacionados ao aumento da ROS e a fragmentação do DNA, sua suplementação foi relacionada à integridade do DNA espermático (CHAMBIAL *et al.*, 2013; DUTTA *et al.*, 2022) e em homens inférteis, a vitamina C pode melhorar aspectos relacionados à contagem, morfologia e motilidade dos espermatozoides (WASILEWSKA; WASILEWSKI; ZWIERZ, 2019). Além disso, a suplementação de vitamina C melhora a diferenciação completa das células testiculares, indicando ser benéfica para o sistema genital masculino (órgãos e células) em diferentes etapas da espermatogênese (IQBAL *et al.*, 2022), estando positivamente correlacionada à porcentagem de espermatozoides com morfologia normal em homens férteis e inférteis (CHAMBIAL *et al.*, 2013).

Para Akmal *et al.* (2006) a suplementação com vitamina C em homens inférteis pode servir como suplemento para melhorar a qualidade do sêmen até a concepção, quanto a sua contagem, motilidade dos espermatozoides e a morfologia dos espermatozoides.

A concentração de vitamina C deve ser adequada para proteger os testículos e a espermatogênese do EO (IQBAL *et al.*, 2022). Em humanos nas concentrações abaixo de 1.000 μM , observou-se aumento da motilidade espermática e diminuição peroxidação lipídica, aumento do EO e danos ao DNA (HENKEL; SANDHU; AGARWAL, 2019), enquanto que em concentrações acima de 1.000 μM , observou-se o efeito oposto. A completa imobilidade foi observada em concentrações acima de 4.000 μM (DUTTA *et al.*, 2022; HENKEL; SANDHU; AGARWAL, 2019). Um estudo prospectivo, sem grupo placebo, realizado por Akmal *et al.* (2006), observou que em homens inférteis com oligozoospermia idiopática, a suplementação de vitamina C 2g/dia, induziu um aumento significativo na motilidade e contagem de espermatozoides, bem como um aumento na porcentagem de espermatozoides normais (ALAHMAR, 2018).

A vitamina C atua como co-transmissor na regulação da expressão dos receptores do hormônio luteinizante (LH), levando ao seu aumentando nas células de Leydig (IQBAL *et al.*, 2022) e estímulo das enzimas esteroideogênicas testiculares 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) (LEITE *et al.*, 2019) que por sua vez, aumentam a produção de testosterona podendo aumentar o número de células espermatogênicas (SADEGHZADEH; MEHRANJANI; MAHMOODI, 2019).

Em pacientes submetidos a um regime contínuo de infusão, a quimioterapia produz maior nível de EO pela peroxidação lipídica, como consequência da redução dos níveis séricos de vitaminas antioxidantes, como a vitamina C (SINGH *et al.*, 2018). O EO produzido pelo 5-FU, provoca um estado de peroxidação lipídica superior à capacidade de reparo do dano oxidativo, levando a mutações no DNA seguidas de parada do ciclo celular, morte celular ou senescência (OBEID; ELSHARKAWY; EL-KAMMAR, 2021). A vitamina C por ser instável em meio alcalino e não deve ser administrada juntamente com o 5-FU, pois este aumenta a alcalinidade do sangue, o que pode permitir o funcionamento inadequado da vitamina C (OBEID; ELSHARKAWY; EL-KAMMAR, 2021).

As quimioterapias citotóxicas podem ativar o fator nuclear- κB (NF κB) ocasionando inflamação e dano testicular (FAHMY *et al.*, 2020). A capacidade

antioxidante e anti-inflamatória da vitamina C pode ser atribuída à sua capacidade de inibir a translocação do NF- κ B ao DNA nuclear, impedindo a ativação de uma variedade de genes inflamatórios como iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α (EL KOTB; EL-GHAZOULY; AMEEN, 2020).

A manutenção do metabolismo e do equilíbrio redox é realizado de maneira crítica pela via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, composta por três componentes celulares: proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap1), fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2) e elementos de resposta antioxidante (ARE) (ZHANG *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas normais, Keap1, também chamado de um inibidor de Nrf2 (INrf2), está associado a Nrf2. O EO pode ativar Nrf2 via modificação conformacional de seu supressor KEAP1, resultando na translocação de Nrf2 do citosol para dentro do núcleo (AL-ASMARI; KHAN; AL-MASRI, 2016; ZHANG *et al.*, 2016). O Nrf2 regula a expressão de vários genes dependentes do ARE, minimizando os efeitos adversos da exposição ao oxidante (SENGUPTA *et al.*, 2022). A ação moduladora de vitamina C em NF κ B pode ser devido ao seu efeito de eliminação de ROS e, portanto, a inibição da ativação do inibidor κ B quinase (IKK) que leva à dissociação de inibidor de κ B (I κ B) (AL-ASMARI *et al.*, 2015).

Outro suplemento candidato para ser usado com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos do 5-FU é o aminoácido L-arginina (BALMANT *et al.*, 2018).

2.6 L-arginina

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, que em condições fisiológicas, como infância, crescimento, gravidez, apresenta síntese endógena suficiente para atender às necessidades do organismo, não sendo necessária nenhuma suplementação adicional da dieta (KESHET; EREZ, 2018), em algumas condições patológicas provocadas pelo estresse fisiológico, como queimaduras ou outras lesões inflamatórias ou doenças, como infecções e câncer (ZOU *et al.*, 2019), a L-arginina deve ser suplementada, pois é produzida em quantidades insuficientes (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

Para manter a quantidade de nucleotídeos e a capacidade de reparo do DNA é preciso uma quantidade suficiente de L-arginina, que embora não esteja

diretamente envolvida na síntese de nucleotídeos, a arginina aumenta a transcrição de genes envolvidos na síntese de purinas e pirimidinas (CHEN *et al.*, 2021). Assim, a homeostase da L-arginina é obtida por: (1) suplemento nutricional enriquecido com L-arginina ou ingestão dietética (ex.: frango, lombo de porco, sementes de abóbora, amendoim, soja), (2) síntese endógena a partir de citrulina (15% da produção total de L-arginina), (3) catabolismo de proteínas, através de aminoácidos reciclados liberados pela degradação de proteínas (aproximadamente 80% da L-arginina circulante) e (4) eficiência de transporte de L-arginina através das membranas celulares (CHEN *et al.*, 2021; SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

Nos mamíferos, a biossíntese endógena da L-arginina ocorre principalmente pelo eixo intestinal-renal, que tem a citrulina como principal precursor sintético. (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019; ZOU *et al.*, 2019). A citrulina é proveniente da ornitina, prolina, glutamina ou glutamato e da degradação da arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). No intestino delgado, as células epiteliais produzem a citrulina que é transportada para os rins (ZOU *et al.*, 2019). As células renais, na porção proximal dos seus túbulos renais, em condições fisiológicas sintetizam L-arginina, a partir da citrulina e aspartato, via argininosuccinato sintase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL), através do ciclo da ornitina (ciclo da ureia) (CHEN *et al.*, 2021). A arginina também poderia gerar guanidina através da arginina descarboxilase (ADC) e então participar da via de sinalização celular. A guanina pode ser produzida sob a ação da arginina desaminase (ADI) ou do óxido nítrico sintetase. Além disso, a arginina poderia ser sintetizada novamente através da arginina succinato sintetase (ASS1) e da arginina succinato liase (ASL) (DU.; HAN, *et al.*, 2021). Além disso, a arginina promove a fosforilação e oligomerização do complexo CAD (carbamoil-fosfato sintetase 2, aspartato transcarbamilase e diidroorotase) para aumentar a síntese de pirimidina, por ativar a via mTOR/S6K. Por outro lado, o aspartato participa das vias de síntese de arginina e de pirimidina gerando uma competição entre elas (CHEN *et al.*, 2021).

A L-arginina por não ser permeável à dupla camada lipídica das células, requer para seu transporte celular, o envolvimento de um sistema transportador localizado nas membranas plasmática e mitocondrial (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). Para as funções metabólicas, além das fontes alimentares e

da síntese endógena, a disponibilidade de L-arginina é determinada pela ação dos transportadores catiônicos localizados nas membranas. A deficiência desses transportadores limita o transporte da L-arginina do plasma para as células (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). O sistema transportador catiônico é o principal sistema para o transporte de L-arginina na atividade celular (ZOU *et al.*, 2019) e, é constituído por sistema transportador de aminoácido catiônico-1 (CAT-1), que ocorre constitutivamente em todas as células, exceto nos hepatócitos; CAT-2 que ocorre nos hepatócitos; CAT-2B, que é um transportador induzido por citocinas e o CAT-3, que está envolvido no desenvolvimento embrionário. Os transportadores de L-arginina têm sua atividade aumentada por citocinas, interferon e TNF α (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

A catálise da L-arginina ocorre por quatro enzimas: arginase, NOS, L-arginina descarboxilase e L-arginina glicina amidinotransferase (ZOU *et al.*, 2019). A L-arginina é metabolizada pela NOS, em NO e citrulina; pela arginase, em ornitina e ureia e pela L-arginina descarboxilase (ADC) em agmatina (CHEN *et al.*, 2021). Moléculas importantes, são provenientes da degradação da L-arginina, incluindo ornitina, NO, glutamato, poliaminas, creatina prolina (ZOU *et al.*, 2019).

A ornitina e a agmatina são os precursores da putrescina que é essencial para a síntese de poliaminas (CHEN *et al.*, 2021). Os produtos mais importantes da L-arginina são NO e poliaminas geradas pela NOS e arginase, respectivamente (JAHANI *et al.*, 2019).

A putrescina, espermidina e espermina, são poliaminas que estimulam a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas nas células, ao interagirem com DNA, RNA, proteínas e fosfolipídeos, responsáveis pelo crescimento, proliferação e diferenciação celular; e a concentração das poliaminas é fundamental para a atividade nos processos de replicação, transcrição e tradução (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

A arginase, em mamíferos, apresenta-se em duas isoformas que diferem na sua distribuição tecidual e localização. A arginase 1 é uma proteína citoplasmática, expressa em células hepáticas e catalisa a última etapa do ciclo da ureia. A arginase 2 é uma proteína mitocondrial que compete com a NOS pela L-arginina (KESHET; EREZ, 2018; SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019; ZOU *et al.*, 2019). É

expressa no fígado e apresenta baixa expressão em células extra-hepáticas, como neurônios, néfrons, células musculares e células vasculares (ZOU *et al.*, 2019).

A NOS é uma enzima de vital importância que apresenta uma variedade de funções na atividade celular. Sua três isoformas são NOS1, NOS2 e NOS3 que desempenham papéis diferentes em diferentes órgãos (ZOU *et al.*, 2019). Nos mamíferos, a NOS é codificada por três genes distintos em três isoformas: nNOS (NOS neuronal; codificado por NOS1 e expressa principalmente em neurônios), iNOS codificada por NOS2 e expressa principalmente em células imunes (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

A iNOS é expressa em macrófagos e outras células imunes em resposta aos estímulos pró-inflamatórios desencadeados principalmente por TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 ou por produtos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) (KESHET; EREZ, 2018) e eNOS (NOS endotelial; codificado por NOS3 e expressa principalmente em células endoteliais). A NOS tem sua atividade aumentada por citocinas (Th1), interferon e TNF α . As citocinas Th1 regulam positivamente a iNOS, que é uma enzima chave para a via de síntese de NO (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

O NO, produzido endogenamente pela NOS, é uma molécula gasosa de curta duração, caracterizada por regular várias vias de sinalização em uma série de processos fisiológicos (KESHET; EREZ, 2018) e patológicos que são dependentes de fatores como: tipo celular, microambiente, tempo de exposição e concentração (ZOU *et al.*, 2019). Em baixas concentrações, o NO pode inibir a apoptose (SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019), aumentar a capacitação do esperma humano e estimular a proliferação de células endoteliais (DE LUCA *et al.*, 2021) que é favorável ao crescimento tumoral (KESHET; EREZ, 2018). Em altas concentrações, o NO pode interromper o ciclo celular, estimular a apoptose e o envelhecimento celular, ocasionados pela citotoxicidade, como resultado de danos ao DNA pela via da proteína P53 e da condensação de grupos tiol e/ou amino (DE LUCA *et al.*, 2021; SZEFEŁ; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

. O NO pode desencadear a apoptose através do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial ao fator indutor de apoptose (AIF) e liberação do Cyt C para o citoplasma ativando eventos dependentes de caspases (ZOU *et al.*, 2019).

As principais vias de sinalização do NO são a dependente de cGMP (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019) e a independente, por modificação pós-traducional (PTM) por S-nitrosilação, também chamada de via de oxidação do NO (KESHET; EREZ, 2018). A via de sinalização dependente do NO envolve a guanilato ciclase solúvel (sGC) que ao ser ativada pelo NO leva a formação de cGMP (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019), que ativa quinases dependentes de cGMP responsáveis pela fosforilação de proteínas e transdução de múltiplos eventos de sinalização (KESHET; EREZ, 2018). A via independente de cGMP, apresenta cinética de reação mais lenta que a via dependente de cGMP e requer maior concentração de NO, envolve modificações pós-traducionais levando a formação de proteínas por S-nitrosilação de resíduos de cisteína (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019). A S-nitrosilação modifica as proteínas de ligação do DNA, alterando a afinidade dos sítios de ligação contendo cisteína (KESHET; EREZ, 2018), resultando em perda da capacidade do fator de transcrição NFκB em se ligar ao DNA (SZEFEL; DANIELAK; KRUSZEWSKI, 2019).

Múltiplas funções são reguladas pela L-arginina, como resposta inflamatória e imune, citotoxicidade, estresse redox, metabolismo da glicose, neurogênese (ZHANG *et al.*, 2020) e manutenção e renovação da mucosa gastrointestinal (DE ANDRADE BERNAL FAGIANI *et al.*, 2019). A L-arginina possui capacidade antioxidante por eliminar o radical superóxido e suprimir o processo de oxidação. O aumento das enzimas antioxidantes séricas, como a glutathiona peroxidase, a partir de suplementos de L-arginina pode melhorar o estado de EO (ZHANG *et al.*, 2020). A L-arginina também estimula a produção do TNFα, de IL-1, IL-2, IL-6 e do receptor da IL-2 (BALMANT *et al.*, 2018).

Além disso, muitas vias metabólicas importantes para a reprodução, desenvolvimento e saúde são regulados pela L-arginina (WU *et al.*, 2009). Esse aminoácido é frequentemente prescrito durante a gravidez para proteger a saúde do feto e da mãe (CHEN *et al.*, 2016). A L-arginina também é capaz de reduzir expressão de Bax e caspase 3 e prevenir a apoptose em células de Leydig submetidas à toxina T2 (ZHANG *et al.*, 2020).

A administração de 5-FU mostrou uma tendência a reduzir o nível de L-arginina (SATO *et al.*, 2020). Em seu estudo de Jahani *et al.* (2017), o 5-FU inibiu

a atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) aumentando os níveis de NO e ROS. Em seu estudo Temel (2021) verificou que a atividade de G6PD é significativamente reduzida em células MCF-7 pela L-arginina e pelo 5-FU utilizados isoladamente ou em combinação.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como o 5-FU é utilizado no tratamento de câncer associado a outros medicamentos e possui efeitos deletérios para a reprodução masculina, verifica-se a necessidade de maior conhecimento sobre o potencial tóxico do 5-FU para as células reprodutivas e mais estudos de como minimizar seus efeitos deletérios com a associação de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, como a Vitamina C e a L-arginina.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM ABD EL-WAHAB, W.; ABD EL-MAJID AHMED, A.; MOHAMED ABD EL-GALIL, M. Grape seed extract versus captopril in ameliorating 5-Fluorouracil-induced nephrotoxicity in adult male albino rats: biochemical, histological and immunohistochemical study. **Al-Azhar Medical Journal**, v. 49, n. 2, p. 585–610, 1 abr. 2020.
- AITKEN, R. J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v. 159, n. 4, p. R189–R201, abr. 2020.
- AITKEN, R. J.; BROMFIELD, E. G.; GIBB, Z. Oxidative stress and reproductive function: The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization. **Reproduction**, v. 164, n. 6, p. F79–F94, 1 dez. 2022.
- AKMAL, M. et al. Improvement in Human Semen Quality After Oral Supplementation of Vitamin C. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 3, p. 440–442, set. 2006.
- AL-ASMARI, A. et al. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 10–20, 27 jan. 2016.
- AL-ASMARI, A. K. et al. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 908–916, 2015.
- AL-ASMARI, A.; KHAN, A.; AL-MASRI, N. Mitigation of 5-fluorouracil-induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox-sensitive transcription factors. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1203–1213, 11 nov. 2016.
- ALAHMAR, A. T. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 45, n. 2, p. 57–66, 30 jun. 2018.
- ANGULO, C. et al. Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. **Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 169–180, 2011.
- ARAB, H. H.; SALAMA, S. A.; MAGHRABI, I. A. Camel Milk Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Renal Injury in Rats: Targeting MAPKs, NF- κ B and PI3K/Akt/eNOS Pathways. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 1628–1642, 2018.
- BALMANT, B. D. et al. Effects of L-Arginine Supplementation on Leukogram, Inflammatory Bowel Infiltrates and Immunoglobulins with 5-FU Use in Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 70, n. 2, p. 249–256, 17 fev. 2018.
- BARATEIRO, L. G. R. P. et al. **Impactos da exposição ao quimioterápico 5-FU**

sobre a morfologia da próstata de ratos wistar. (UEM, Ed.)29º Encontro Anual de Iniciação Científica. **Anais...**Maringá: UEM, 2020

BARATI, E.; NIKZAD, H.; KARIMIAN, M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 1, p. 93–113, 3 jan. 2020.

BARDAWEEL, S. K. et al. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193–201, 16 nov. 2018.

BLASZCZAK, W. et al. Vitamin C as a Modulator of the Response to Cancer Therapy. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 453, 28 jan. 2019.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

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

CHAMBIAL, S. et al. **Vitamin C in disease prevention and cure: An overview***Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2013.

CHANG, G.-R. et al. Anti-Cancer Effects of Zotarolimus Combined with 5-Fluorouracil Treatment in HCT-116 Colorectal Cancer-Bearing BALB/c Nude Mice. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4683, 2 ago. 2021.

CHEN, C.-L. et al. Arginine Signaling and Cancer Metabolism. **Cancers**, v. 13, n. 14, p. 3541, 15 jul. 2021.

CHEN, J. et al. Effect of L-arginine and sildenafil citrate on intrauterine growth restriction fetuses: A meta-analysis. **BMC Pregnancy and Childbirth**, 2016.

D'SOUZA, U. J. A. Toxic effects of 5-fluorouracil on sperm count in Wistar rats. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 43–45, 2003.

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

DE LUCA, M. N. et al. Oxidative Stress and Male Fertility: Role of Antioxidants and Inositols. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1283, 13 ago. 2021.

DERISSEN, E. J. B. et al. Exploring the intracellular pharmacokinetics of the 5-fluorouracil nucleotides during capecitabine treatment. **British Journal of Clinical**

Pharmacology, v. 81, n. 5, p. 949–957, maio 2016.

DU, T.; HAN, J. Arginine Metabolism and Its Potential in Treatment of Colorectal Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 20 maio 2021.

DUTTA, S. et al. Antioxidant Paradox in Male Infertility: 'A Blind Eye' on Inflammation. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 167, 16 jan. 2022.

ECK, P. Nutrigenomics of vitamin C absorption and transport. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 100–104, abr. 2018.

EL-ALFY, N. Z. et al. Assessment the protective role of vitamin C on the genotoxicity of 5-Fluorouracil in male albino mice. **Life Science Journal**, v. 10, n. 2, p. 1445–1459, 2013.

EL KOTB, S. M.; EL-GHAZOULY, D. E.; AMEEN, O. The potential cytoprotective effect of Vitamin C and Vitamin E on monosodium glutamate-induced testicular toxicity in rats. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 56, n. 1, p. 134–147, 1 jan. 2020.

FAHMY, M. A. et al. Genotoxicity and sperm defects induced by 5-FU in male mice and the possible protective role of *Pentas lanceolata*-iridoids. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 850–851, p. 503145, fev. 2020.

FAMUREWA, A. C. et al. *Moringa oleifera* seed oil modulates redox imbalance and iNOS/NF- κ B/caspase-3 signaling pathway to exert antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic mechanisms against anticancer drug 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in rats. **South African Journal of Botany**, v. 127, p. 96–103, dez. 2019.

FONSECA, K. M. et al. Anti-inflammatory effect of L-cysteine (a semi-essential amino acid) on 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. **Amino Acids**, v. 53, n. 9, p. 1415–1430, 19 set. 2021.

GAD EL- HAK, H.; MOAWAD, T.; HAFEZ, G. Effects of 5-Fluorouracil on Testes Histology and Sperm Morphology Assay in Mice. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 1 jun. 2017.

GELEN, V. et al. The protective effects of hesperidin and curcumin on 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in mice. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 34, p. 47046–47055, 22 set. 2021.

GHAFOURI-FARD, S. et al. Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112040, out. 2021.

GOIRAND, F. et al. How can we best monitor 5-FU administration to maximize benefit to risk ratio? **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 14, n.

12, p. 1303–1313, 2 dez. 2018.

HAJJAR, T.; SOLEYMANI, F.; VATANCHIAN, M. Protective Effect of Vitamin C and Zinc as an Antioxidant Against Chemotherapy-Induced Male Reproductive Toxicity. **Journal of Medicine and Life**, v. 13, n. 2, p. 138–143, abr. 2020.

HENKEL, R.; SANDHU, I. S.; AGARWAL, A. The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? **Andrologia**, v. 51, n. 1, p. e13162, fev. 2019.

ILGHAMI, R. et al. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. **Nutrition Reviews**, v. 78, n. 1, p. 65–76, 1 jan. 2020.

IQBAL, S. et al. Effect of Ascorbic Acid on Methylphenidate Induced Decreased Spermatogenesis in Albino Rats. **Annals of AbbasiShaheed Hospital and Karachi Medical and Dental College**, v. 27, n. 1, p. 40–45, 2022.

JAHANI, M. et al. L-arginine alters the effect of 5-fluorouracil on breast cancer cells in favor of apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 114–123, abr. 2017.

JAHANI, M. et al. L-arginine/5-fluorouracil combination treatment approaches cells selectively: Rescuing endothelial cells while killing MDA-MB-468 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 399–411, jan. 2019.

JOULIA, J. . et al. Plasma and salivary pharmacokinetics of 5-fluorouracil (5-FU) in patients with metastatic colorectal cancer receiving 5-FU bolus plus continuous infusion with high-dose folinic acid. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 296–301, fev. 1999.

KAZMIERCZAK-BARANSKA, J. et al. Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1501, 21 maio 2020.

KESHET, R.; EREZ, A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2018.

KHAN, A. Q. et al. Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112142, nov. 2021.

KOBUCHI, S.; ITO, Y. Application of Pharmacometrics of 5-Fluorouracil to Personalized Medicine: A Tool for Predicting Pharmacokinetic–Pharmacodynamic/Toxicodynamic Responses. **Anticancer Research**, v. 40, n. 12, p. 6585–6597, dez. 2020.

KOVINA, A. P. et al. L-Ascorbic Acid in the Epigenetic Regulation of Cancer Development and Stem Cell Reprogramming. **Acta Naturae**, v. 12, n. 4, p. 5–14, 22 dez. 2020.

- LAMBOURAS, M. et al. Examination of the ovotoxicity of 5-fluorouracil in mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 6, p. 1053–1060, 27 jun. 2018.
- LEE, J. J.; BEUMER, J. H.; CHU, E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 447–464, 23 set. 2016.
- LEITE, G. A. A. et al. Ascorbic acid supplementation ameliorates testicular hormonal signaling, sperm production and oxidative stress in male rats exposed to rosuvastatin during pre-puberty. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 305–321, fev. 2019.
- LEWANDOWSKA, A. et al. The Problems and Needs of Patients Diagnosed with Cancer and Their Caregivers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 87, 24 dez. 2020.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003a.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, maio 2003b.
- LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2412, 9 out. 2019.
- MEISTRICH, M. L. Risks of genetic damage in offspring conceived using spermatozoa produced during chemotherapy or radiotherapy. **Andrology**, v. 8, n. 3, p. 545–558, 25 maio 2020.
- MENDES, S. et al. The Role of ROS as a Double-Edged Sword in (In)Fertility: The Impact of Cancer Treatment. **Cancers**, v. 14, n. 6, p. 1585, 21 mar. 2022.
- MENTELLA et al. Cancer and Mediterranean Diet: A Review. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2059, 2 set. 2019.
- MISRA, S.; CHOUDHURY, R. C. Vitamin C Modulation of Cisplatin-Induced Cytogenotoxicity in Bone Marrow, Spermatogonia and its Transmission in the Male Germline of Swiss Mice. **Journal of Chemotherapy**, v. 18, n. 2, p. 182–187, 18 abr. 2006.
- NARAYANA, K. et al. 5-fluorouracil (5-FU) induces the formation of giant cells and sloughing of seminiferous epithelium in the rat testis. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 317–22, jul. 2000.
- NAREN, G. et al. The reversible reproductive toxicity of 5-fluorouracil in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 101, p. 1–8, abr. 2021.

OBEID, R.; ELSHARKAWY, R.; EL-KAMMAR, H. Effect of Vitamin C Administration 24 Hours After 5-Fluorouracil Versus its Concomitant Administration on Cellular Proliferation, Cell Death and Lipid Peroxidation in WI-38 Human Fibroblast Cell Line. **Egyptian Journal of Histology**, v. 44, n. 3, p. 700–709, 17 set. 2021.

PAVITHRA, S. et al. Role of fractionated pectin powder capped zinc oxide nanoparticle in 5-fluorouracil induced testicular oxidative stress in rats. **The Pharma Innovation Journal**, v. 9, n. 11, p. 400–403, 2020.

PAWLOWSKA, E.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–18, 24 dez. 2019.

RABAÇA, A. et al. Novel Drug Therapies for Fertility Preservation in Men Undergoing Chemotherapy: Clinical Relevance of Protector Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 29, p. 3347–3369, 30 set. 2015.

RAPA, S. F. et al. Protective Effect of Pomegranate on Oxidative Stress and Inflammatory Response Induced by 5-Fluorouracil in Human Keratinocytes. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 203, 30 jan. 2021.

SADEGHZADEH, F.; MEHRANJANI, M.; MAHMOODI, M. Vitamin C ameliorates the adverse effects of dexamethasone on sperm motility, testosterone level, and spermatogenesis indexes in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 409–418, 9 abr. 2019.

SATOH, Y. et al. Supplementation of L-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer chemoimmunotherapy. **Cancer Science**, v. 111, n. 7, p. 2248–2258, 12 jul. 2020.

SCHULZE, M. M. Chemotherapy Treatment in Cancer Patients. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, v. 4, n. 2, p. 17–23, 2007.

SENGUPTA, P. et al. COVID-19, Oxidative Stress and Male Reproduction: Possible Role of Antioxidants. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 548, 14 mar. 2022.

SETHY, C.; KUNDU, C. N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, maio 2021.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 526–539, 19 abr. 2015.

SINGH, K. et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 177–190, fev. 2018.

STRINGER, J. M. et al. Multidose 5-Fluorouracil is Highly Toxic to Growing Ovarian Follicles in Mice. **Toxicological Sciences**, v. 166, n. 1, p. 97–107, 1 nov. 2018.

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

TAKIZAWA, S.; HORII, I. Endocrinological assesment of toxic effects on the male reproductive system in rats treated with 5-fluorouracil for 2 or 4 weeks. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 49–56, 2002.

TEMEL, Y. The in vitro effect of 5-FU and Tamoxifen Chemotherapeutics on pentose phosphate pathway enzymes. **Cumhuriyet Science Journal**, v. 42, n. 2, p. 245–251, 30 jun. 2021.

TIGU, A. B. et al. The Synergistic Antitumor Effect of 5-Fluorouracil Combined with Allicin against Lung and Colorectal Carcinoma Cells. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1947, 22 abr. 2020.

VISSERS, M. C. M.; DAS, A. B. Potential Mechanisms of Action for Vitamin C in Cancer: Reviewing the Evidence. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 809, 3 jul. 2018.

VODENKOVA, S. et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 206, p. 107447, fev. 2020.

VYAS, D.; LAPUT, G.; VYAS, A. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. **OncoTargets and Therapy**, p. 1015, jun. 2014.

WALCZAK–JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSKI, J. K.; SLOWIKOWSKA–HILCZER, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology**, v. 65, p. 60–67, 2013.

WASILEWSKA, J.; WASILEWSKI, T.; ZWIERZ, K. Epigenetic and nutrigenetic aspects of vitamin C in clinical practice including pregnancy. **Advances in Hygiene & Experimental Medicine**, v. 73, p. 809–823, 2019.

WU, G. et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 153–168, 23 maio 2009.

XIA, L. et al. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 2063–2073, abr. 2018.

XUE, D.; ZHOU, X.; QIU, J. Emerging role of NRF2 in ROS-mediated tumor chemoresistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110676, nov. 2020.

ZASOWSKA-NOWAK, A.; NOWAK, P. J.; CIAŁKOWSKA-RYSZ, A. High-Dose

Vitamin C in Advanced-Stage Cancer Patients. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 735, 26 fev. 2021.

ZHANG, B. et al. Smad4 sensitizes colorectal cancer to 5-fluorouracil through cell cycle arrest by inhibiting the PI3K/Akt/CDC2/survivin cascade. **Oncology Reports**, v. 35, n. 3, p. 1807–1815, mar. 2016.

ZHANG, Y. F. et al. L-Arginine protects mouse Leydig cells against T-2 toxin-induced apoptosis in vitro. **Toxicology and Industrial Health**, v. 36, n. 12, p. 1031–1038, 20 dez. 2020.

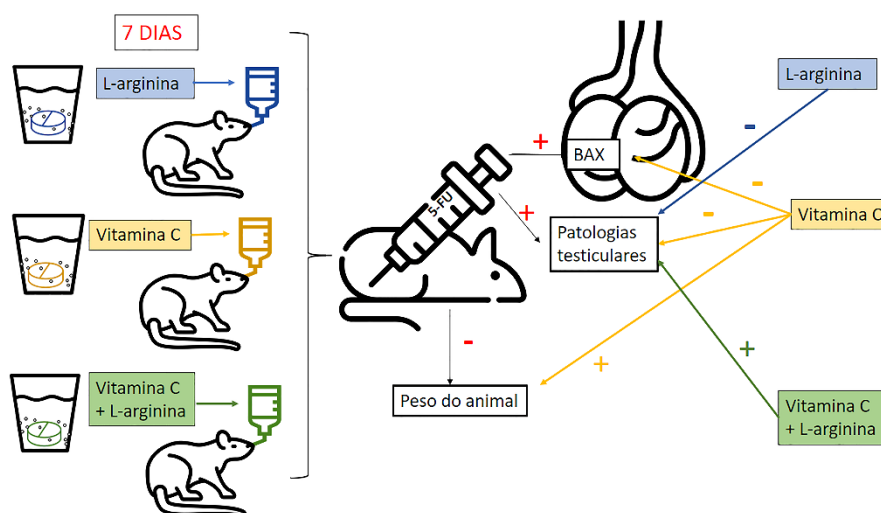
ZOU, S. et al. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109210, out. 2019.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA NUTRITION RESEARCH
 FATOR DE IMPACTO 3,876
 QUALIS CAPES A2

AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO PRÉVIA DE VITAMINA C E L-ARGININA EM
 RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL:
 ASPECTOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS NOS TESTÍCULOS

Legenda do Graphical Abstract: O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) é usado na terapia sistêmica combinada para vários tipos de câncer, apesar de apresentar efeitos colaterais nos testículos. O objetivo deste estudo foi testar o efeito da suplementação prévia de L-arginina e Vitamina C na morfofisiologia dos testículos de ratos submetidos a dose única de 5-FU. A vitamina C reduziu a expressão de mediador apoptótico e as patologias testiculares provocados pelo 5-FU. Porém, associada à L-arginina potencializou a degeneração testicular.

**Highlights:**

Vitamina C atenua efeitos deletérios de 5-Fluorouracil (5-FU) aos testículos
 Suplementação de L-arginina e Vitamina C aumenta a degeneração testicular pelo 5-FU
 Aumento da expressão de Bax testicular induzida por 5-Fluorouracil é atenuado por vitamina C

Title Page

SUPLEMENTAÇÃO PRÉVIA DE VITAMINA C SOZINHA, SEM ASSOCIAÇÃO COM
L-ARGININA, REDUZ EFEITOS DELETÉRIOS DO QUIMIOTERÁPICO 5-
FLUOROURACIL NOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR

PREVIOUS SUPPLEMENTATION OF VITAMIN C ALONE, WITHOUT ASSOCIATION
WITH L-ARGININE, REDUCES DELETERIOUS EFFECTS OF CHEMOTHERAPY 5-
FLUOROURACIL ON THE TESTICLES OF WISTAR RATS

Luiz Gustavo Peron Martins¹, Aline de Oliveira Santos¹, Maria Eduarda Almeida Tavares²,
Giovana Rampazzo Teixeira², Leticia Pazin Bomfim³, Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes³, Heloisa Barboza Gregório¹, Luis de Souza Lima de Souza Reis³, Marcela de
Andrade Bernal Fagiani¹, Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo¹, Caliê Castilho¹, Ines
Cristina Giometti¹

1 Laboratório de Genética Molecular e Experimentação em Reprodução Animal, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

2. Laboratório Experimental de Biologia do Exercício - LEBioEX., Universidade Estadual Paulista – UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

3. Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Brazil.

Autor de correspondência: Profa Ines Cristina Giometti, e-mail:inesgiometti@yahoo.com.br
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há qualquer conflito de interesse.

Número de figuras: 6

RESUMO

O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) é comumente administrado para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias, porém apresenta toxicidade para células normais em proliferação, como as do sistema reprodutor masculino. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação prévia de L-arginina e de ácido ascórbico (vitamina C) em parâmetros morfológicos e moleculares de testículos de ratos saudáveis submetidos ao 5-FU. A suplementação na água de L-arginina (231 mg/dia) e de vitamina C (5,71 mg/dia) por 7 dias foi anterior à aplicação de 5-FU. A aplicação de uma dose de 5-FU (50 mg/ Kg) foi realizada no oitavo dia do experimento e, após 72 horas, os ratos foram eutanasiados e os órgãos colhidos. Houve uma redução de túbulos seminíferos dos animais que receberam 5-FU, mas isso não ocorreu nos animais que receberam a suplementação de um dos dois: L-arginina ou vitamina C ($P<0,05$). A suplementação da associação de L-arginina e vitamina C aumentou a degeneração do epitélio germinativo testicular ($P<0,05$). Houve redução na altura do epitélio seminífero nos animais submetidos ao 5-FU e à suplementação com L-arginina sozinha ou associada à vitamina C. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais na morfologia espermática. O 5-FU e a Arg aumentaram a expressão de BAX nos testículos dos ratos, e a suplementação com vitamina C normalizou parcialmente essa expressão ($P<0,05$). A aplicação de uma única dose de 5-FU leva ao aumento de patologias testiculares e a suplementação preventiva de vitamina C, sem a associação da L-arginina, reduz os efeitos deletérios do 5-FU nos testículos de ratos Wistar. Assim, conclui-se que a L-arginina parece não ser adequada para esse modelo de estudo

Palavras-Chave: ácido ascórbico, apoptose, estresse oxidativo, expressão, túbulos seminíferos.

ABSTRACT

The chemotherapy drug 5-fluorouracil (5-FU) is commonly administered for the treatment of different types of neoplasms, but it is toxic to normal cells in proliferation, such as those of the male reproductive system. The aim of this study was to verify the effects of L-arginine and ascorbic acid (vitamin C) supplementation on morphological and molecular analyzes of rat testes submitted to 5-FU. Supplementation of L-arginine (231 mg/day) and vitamin C (5.71 mg/day) in water for 7 days was prior to 5-FU application. The application of a dose of 5-FU (50 mg/Kg) was performed on the eighth day of the experiment and, after 72 hours, the rats were euthanized and the organs harvested. There was a reduction of seminiferous tubules without pathologies in the animals that received 5-FU, but this did not occur in the animals that received the supplementation of one of the two: L-arginine or vitamin C ($P < 0.05$). Supplementation of the combination of L-arginine and vitamin C increased testicular degeneration ($P < 0.05$). There was a reduction in the height of the seminiferous epithelium in animals submitted to 5-FU and supplementation with L-arginine alone or associated with vitamin C. There was no significant difference between groups in sperm morphology. 5-FU increased BAX expression in the testes of rats, and vitamin C supplementation reduced this expression ($P < 0.05$). The application of a single dose of 5-FU leads to an increase in testicular pathologies and the preventive supplementation of vitamin C, without the association of L-arginine, reduces the deleterious effects of 5-FU on the testicles of Wistar rats.

Key words: ascorbic acid, apoptosis, expression, oxidative stress, seminiferous tubules.

1. Introdução

O 5-FU, por ser um agente antineoplásico de baixo custo, é um dos medicamentos mais utilizados na quimioterapia combinada sistêmica para o tratamento de uma variedade de tipos de câncer por alterar os ácidos nucleicos da célula e a mitose celular [1,2].

A citotoxicidade do 5-FU está relacionada à indução da parada do ciclo celular na fase S, devido inibição da timidilato sintase (TS) e incorporação incorreta de seus metabólitos fluoronucleotídeos na síntese de RNA e DNA tanto em células cancerígenas como não cancerígena [3,4]. Outros mecanismos envolvem o estresse oxidativo, pró-inflamação via superexpressão de óxido nítrico sintase, do fator nuclear indutível renal κ B (NF κ B), citocinas e ativação da via apoptótica pela suprarregulação da caspase-3 [5].

Um dos sistemas afetados pelo tratamento do 5-FU é o sistema reprodutor, uma vez que a proliferação celular faz parte da fisiologia reprodutiva. Diversas alterações morfológicas testiculares, prostáticas e endócrinas foram observadas em ratos submetidos ao 5-FU [5,6]. Alterações morfológicas prostáticas também são observadas em ratos com o uso do 5-FU [7].

Alterações morfológicas espermáticas também são observadas com o uso do 5-FU como a presença de defeitos grosseiros de cabeça, espermatozoide com cabeça amorfa, decorrente da ação do 5-FU sobre os genes responsáveis pela expressão das características dos acrossomos, espermatozoide intermediário angular e espermatozoide com cauda enrolada [3,8]. Em camundongos, foi observada diminuição da motilidade, viabilidade e anormalidades em espermatozoides de camundongos submetidos ao 5-FU [8,9].

Por outro lado, alguns suplementos com ação antioxidativa podem auxiliar na prevenção dos efeitos colaterais do 5-FU para células não cancerígenas com intensa proliferação celular, como as células gonadais. Nesse sentido, L-arginina e vitamina C que

são agentes antioxidantes são possíveis candidatos para reduzir o estresse oxidativo tecidual e diminuir os danos celulares [10,11].

A hipótese do presente estudo é que a suplementação com vitamina C e L-arginina pode prevenir os efeitos deletérios provocados pelo quimioterápico 5-FU nos testículos de ratos Wistar.

2. Materiais e métodos

Todos os protocolos experimentais que foram utilizados estavam em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” [12]. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), número de protocolo 6753.

2.1 Animais

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com 12 semanas de idade, peso corporal médio de $354,7 \pm 49,6$ g, mantidos em gaiolas, sob as mesmas condições ambientais com padrão de fotoperíodo de 12/12 horas, e com temperatura controlada em $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os animais foram alimentados com ração comercial balanceada (Primor® MP 77, Pró-biotério, Brasil) e receberam filtrada água *ad libitum*.

2.2 Delineamento experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente por meio de sorteio nos 5 grupos experimentais e nas gaiolas, cada grupo contendo 8 ratos com 4 animais/gaiola. Após a

randomização aleatória, os animais foram pesados, e não houve diferença entre os pesos dos animais nos diferentes grupos. Os grupos foram: Grupo controle (Gc); Grupo 5-FU (G5-FU); Grupo 5-FU + Arginina (G5-FU+Arg); Grupo 5-FU + Vitamina C (G5-FU+VitC); e Grupo 5-FU + Arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC), conforme a figura 1.

A administração de L-arginina e a vitamina C foi por 7 dias, anterior à aplicação de 5-FU, por meio de um comprimido efervescente em água filtrada disponibilizada *ad libitum* e o controle de consumo foi verificado diariamente. A L-arginina utilizada foi Tagifor® (Sanofi-Aventis, Brasil) na dose de 213 mg/dia e o ácido ascórbico (Vitamina C) utilizado foi o Redoxon® (Bayer, Brasil) na dose de 5,71 mg/dia. Para o grupo que recebeu tanto vitamina C quanto L-arginina foi utilizado Targifor C® Sanofi-Avent.

Os ratos dos grupos 5-FU receberam aplicação única de uma injeção intraperitoneal na dose de 50 mg/ Kg de peso corporal, conforme recomendado por Leocádio et al. [13] no oitavo dia do experimento. Os ratos do Gc receberam aplicação de 0,9% de solução fisiológica via intraperitoneal no mesmo volume.

As doses ideais de administração do quimioterápico 5-FU, L-arginina e ácido ascórbico foram extrapoladas alometricamente conforme recomendado por Cubas e Joppert [14]. A dose de 5-FU foi adaptada da dose preconizada que é de 1000 mg/ m²/ dia em infusão contínua. A dose de L-arginina, foi suplementada conforme o recomendado pela Dietary Reference Intakes (Institute of Medicine, 2005) [15], que é de 4,2 g/ dia e a vitamina C, extrapolada conforme recomendado pela Dietary Reference Intakes (Institute of Medicine, 2000) [16], que é de 90 mg/ dia.

2.3 Peso dos animais e colheita de órgãos

Após 72 horas da aplicação de 5-FU, os ratos Wistar foram pesados e então eutanasiados, utilizando uma dose de 100 mg de tiopental/Kg de peso corporal por via intraperitoneal. Os testículos, epidídimos e adrenais direitos foram colhidos e pesados logo após a morte dos animais. Os ductos deferentes foram colhidos para a obtenção de espermatozoides para a morfologia espermática. Os testículos direitos foram mergulhados em solução fixadora de Methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético). Os testículos esquerdos dos animais foram imediatamente dissecados, cortados e congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise de expressão gênica e proteica.

2.4 Análises morfológicas e morfométricas testiculares

Os testículos fixados em Methacarn foram lavados após 24 horas e a solução foi substituída por álcool 70%, onde as peças permaneceram até o processamento. Então, o material foi incluso em Paraplast para a obtenção de cortes com 3 µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina, para avaliação histopatológica em microscópio óptico binocular, em aumento de 400X. Foram analisados qualitativamente 100 seções transversais e aleatórias de túbulos seminíferos por animal, para detectar a presença de anomalias nos túbulos, como degeneração tubular, células germinativas imaturas no lúmen, células acidófilas, células multinucleadas, infiltrados e vacúolos [17]. Foi verificado o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio germinativo usando BELView software (versão para WindowsTM). Foram realizadas 4 aferições por túbulo em 10 seções transversais aleatórias de túbulos no estágio IX do ciclo seminífero por animal. As médias das 4 aferições por túbulo foram calculadas e usadas para calcular a média de todos os túbulos para cada animal [17].

2.5 Morfologia espermática

Para análise da morfologia espermática, os espermatozoides foram colhidos do ducto deferente direito com auxílio de uma agulha com seringa contendo 1,0 mL de formol salina a 10%. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas histológicas e deixadas a secar ao ar livre por 90 minutos e então observadas em microscópio em aumento de 400X [18].

Foram analisados 200 espermatozoides por animal e as anormalidades morfológicas encontradas foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete, ou isolada); e b) anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada) [19].

2.6 Análise de expressão gênica de *Tnfa*, *Catalase* e *Gss*

Os testículos congelados em freezer -80°C foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol™ (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., Carlsbad, California, EUA) de extração total. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Fischer Scientific™, ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA). Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa (RT) seguida de PCR em tempo real (qPCR), conforme as instruções do protocolo DNase I Amplification Grade (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Foster City, Califórnia, EUA).

A RT foi realizada utilizando o protocolo da High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lituânia), seguindo protocolo do fabricante com oligonucleotídeos iniciadores randômicos do próprio Kit.

A qPCR foi realizada termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA) para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. Todos os oligonucleotídeos iniciadores e as sondas foram obtidos a partir de ensaios FAM-MGB TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), já padronizados. Os seguintes ensaios TaqMan® foram utilizados para os genes-alvo de proteínas relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo: fator de necrose tumoral alfa (*Tnfα*): Rn01525859_g1, produto: 92 pb; catalase (*Cat*): Rn00560930_m1 produto: 107 pb; e glutationa sintetase (*Gss*): Rn00564188_m1, produto: 67 pb.

Como controle interno das reações de qPCR foram testados 3 genes referência para os seguintes ensaios TaqMan®: proteína ribossomal S18 (*Rps18*): Rn01428913_gH, Produto: 62 pb; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapddh*): Rn017775763_g1, produto: 174 pb; e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1(*Hprt1*): Rn01527840_m1, produto: 64 pb. O gene referência escolhido foi o mais estável utilizando o programa NormFinder™ Software (<https://moma.dk/normfinder-software>, MOMA, Dinamarca).

As PCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação em relação à combinação de genes endógenos mais estável. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl [20].

2.7 Expressão de proteínas ligadas à apoptose celular

A técnica de Western Blotting foi utilizada para verificar a expressão de proteínas ligadas à apoptose celular. As amostras de testículos congelados para cada grupo experimental foram homogeneizadas com tampão RIPA com 10% de inibidor de protease e centrifugas a 14.000 rpm a 4°C por 20 minutos. A análise da expressão proteica foi realizada usando o método Bradford e analisado por ELISA. A eletroforese com gel de SDS-poliacrilamida

(SDS-PAGE) foi realizada com 30 mg da proteína total, depois foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose. A eficácia da transferência foi verificada usando o corante vermelho de Ponceau. Após isso, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário para as proteínas Caspase 3 (sc-56053), proteína X associada ao BCL2 (BAX) que é pró-apoptótica (sc-7480), proteína de linfoma de células B2 (BCL2) que é anti-apoptótica (sc-7382) e também para β -actina (sc-47778), como controle. E então incubadas com o anticorpo secundário m-IgG (BP-HRP, sc-516102, HRP conjugado) e reveladas com Cytiva Amersham™ ECL™ Prime with C-Digit - Digital Western Blot Imaging. A expressão das bandas proteicas (animais/grupo) foi quantificada por ImajeJ software. Os valores para cada proteína foram normalizados pelos valores da beta-actina respectiva de cada amostra.

2.8 Análise dos dados

Cada animal foi considerado como uma unidade para o número por grupo dos cálculos estatísticos de todas as análises, independentemente do número de aferições. Para os resultados que passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk, as variáveis foram submetidas ao teste análise de variância (ANOVA) para comparar as médias dos grupos, seguida do teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. O nível de significância adotado para todas as comparações foi de 5%. O programa estatístico foi o GraphPad Prism (versão 5.0).

3. Resultados

3.1 Pesos dos ratos e dos órgãos

Houve diferença ($P < 0,0001$) entre os grupos no peso dos animais (figura 2A). Os ratos submetidos ao quimioterápico 5-FU tiveram menor peso corporal em relação ao Gc, exceto no grupo que recebeu 5-FU e foi suplementado com vitamina C. No grupo suplementado com vitamina C e arginina (G5-FU+Arg+VitC) houve menor ganho peso corporal diferindo de todos-os outros grupos (figura 2A). O peso do testículo e do epidídimo, também foi menor neste grupo. Somente o G5-FU+Arg+VitC diferiu do Gc no peso do testículo ($P = 0,0165$) e do epidídimo ($P = 0,0037$), com menores pesos que o Gc (figura 2B, 2C).

3.2 Histopatologia e Morfometria testicular

Na histopatologia testicular, houve uma maior diferença ($P < 0,0001$) na porcentagem de túbulos normais ($P < 0,0001$). Os ratos submetidos 5-FU tiveram menor porcentagem de túbulos normais em relação ao Gc, exceto no grupo que recebeu 5-FU e foi suplementado com vitamina C (Tabela 1). Foram encontrados mais túbulos degenerados no G5-FU+Arg+VitC. No grupo que além da vitamina C recebeu arginina (G5-FU+Arg+VitC) houve menor porcentagem de túbulos normais, diferindo de todos os outros grupos ($P = 0,0002$). Maior porcentagem de vacúolos foram encontrados nos grupos G5-FU e G5-FU+Arg+VitC comparados ao grupo controle ($P = 0,0001$). O G5-FU+ VitC apresentou mais células germinativas imaturas no lúmen ($P = 0,0055$) que o Gc e o G5-FU (Tabela 1).

Não houve diferença significativa entre os grupos no diâmetro tubular, porém houve diferença na altura do epitélio germinativo, os grupos G5-FU+Arg e G5-FU+Arg+VitC apresentaram menor altura do epitélio germinativo em comparação ao Gc, não diferindo dos demais grupos ($P = 0,0032$) (figura 3).

3.3 Morfologia espermática

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para os parâmetros de morfologia espermática (figura 4): porcentagem de espermatozoides normais ($P = 0,5670$), porcentagem de espermatozoides com defeitos de cabeça ($P = 0,5280$) e porcentagem de espermatozoides com defeitos de cauda ($P = 0,0698$).

3.4 Expressão gênica

Entre os genes endógenos testados, o normalizador mais estável foi a combinação do *Hprt1* e o *Gapdh* (0,130) e essa combinação foi a utilizada para as análises dos resultados. Porém, todos os endógenos poderiam ser utilizados nesse modelo experimental, pois todos ficaram abaixo de 0,5 de variação: *Gapdh* = 0,166; *Rps18* = 0,264 e *Hprt1* = 0,153. Não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão gênica relativa de *Tnfa*, *Cat* e *Gss* e (figura 5), $P = 0,5574$, $P = 0,1774$ e $P = 0,2500$, respectivamente.

3.4 Expressão proteica

Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na expressão proteica de caspase 3 e BAX, mas não de BCL2 (figura 6), $P = 0,0022$, $P = 0,0002$ e $P = 0,1894$, respectivamente. O Gc apresentou menor expressão proteica de BAX nos testículos do que G5-FU e G5-FU+Arg. O único grupo que diferiu do Gc, apresentando maior expressão proteica de caspase 3 foi o G5-FU+Arg.

4. Discussão

O presente estudo foi pioneiro na investigação da suplementação de vitamina C e de L-arginina como possíveis adjuvantes na redução dos efeitos deletérios testiculares do

quimioterápico 5-FU no tratamento de cânceres, o que denota sua relevância para a clínica oncológica.

No presente estudo foi verificado que a suplementação de Vitamina C no tratamento de 5-FU minimizou os efeitos deletérios nos testículos, como o aumento da proteína pró-apoptótica BAX, o aumento de patologias testiculares e a redução do peso corporal, provocados por uma única aplicação de 5-FU. Embora a hipótese de que a suplementação de vitamina C diminuiria os efeitos adversos provocados pelo 5-FU foi confirmada, a hipótese de que a suplementação da L-arginina sozinha ou em associação com a vitamina C também diminuiria os efeitos colaterais do 5-FU não foi confirmada. A suplementação somente com L-arginina embora tenha aumentado a porcentagem de túbulos seminíferos normais, não reduziu as proteínas pró-apoptóticas, não normalizou o peso corporal dos animais e reduziu a altura do epitélio germinativo. Quando a suplementação de L-arginina foi associada à vitamina C todos os parâmetros avaliados foram prejudicados, inclusive aumento na degeneração testicular.

Assim, foi verificado que os ratos que receberam o 5-FU tiveram menor peso corporal em comparação aos que não receberam o quimioterápico. Realmente o 5-FU provoca redução de peso nos animais [21,22], pois provoca vômito, dor abdominal, náuseas e mucosite [21]. A perda de peso é observada mesmo antes do 5-FU causar diarreia, devido a um mal funcionamento do trato gastrointestinal [21]. Porém, quando a vitamina C foi suplementada por 7 dias antes da aplicação de 5-FU, observa-se que não houve prejuízo no peso dos animais. É conhecido que a vitamina C é capaz de reduzir as injúrias do intestino delgado provocadas pelo 5-FU, como inflamação das mucosas, atrofia das vilosidades intestinais e desorganização das criptas [22,23], o que justificaria esse maior peso corporal nos animais que ingeriram vitamina C, uma vez que o intestino delgado é o principal responsável pela

absorção dos alimentos. Assim há piora considerável no peso dos animais com a suplementação de L-arginina associada à vitamina C.

Somente o G5-FU+Arg+VitC reduziu o peso dos testículos e epidídimos em relação ao grupo controle. Isso condiz com os resultados encontrados na histopatologia testicular, em que foi observada degeneração testicular apenas nesse grupo, acompanhada da redução na altura do epitélio germinativo. Pode-se presumir que a degeneração testicular causou uma redução na produção espermática que levou à redução da altura do epitélio germinativo e do peso epididimário e testicular. Observa-se que a associação de L-arginina e vitamina C na suplementação prévia ao 5-FU não foi benéfica para as gônadas masculinas.

Um dos mecanismos de ação sugeridos para a associação da suplementação da vitamina C com a L-arginina no tratamento de câncer é que a vitamina C pode potencializar a oxidação da L-arginina em óxido nítrico, aumentando a tetraidrobiopterina intracelular que é um cofator da síntese de óxido nítrico (NO) [24,25]. A óxido nítrico sintase (NOS) acoplada ao seu cofator faz a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO [24]. Isso pode ser a causa dessa associação ter sido deletéria para os testículos quando associada ao 5-FU. O NO produzido pelas células de Sertoli tem importante função fisiológica de controlar a abertura e fechamento dos complexos juncionais da barreira hematopoiética e da migração dos espermatócitos da barreira basal para a adluminal nos testículos durante a espermatogênese, tanto o aumento quanto a redução de NO podem ser prejudiciais para os testículos [26,27]. O aumento de NO proporciona a abertura dos complexos juncionais e o deslocamento de aglomerados de células do epitélio seminífero para o lúmen do túbulo [27]. O aumento de NO nos testículos desorganiza o epitélio seminífero, causa degeneração das células germinativas, provoca atrofia e degeneração dos túbulos seminíferos [27], aspectos semelhantes aos

encontrados no nosso estudo com o uso da suplementação de vitamina C associada à L-arginina no tratamento com 5-FU.

Uma única dose do 5-FU sem suplementação prévia não alterou o peso dos testículos, epidídimos ou das adrenais dos ratos. Nesse grupo também não houve redução do diâmetro do túbulo ou da altura do epitélio seminífero. Isso contradiz um o estudo de D'Sousa e Narayana [28], que também utilizou a dose única de 50mg.kg^{-1} e observou diminuição do peso testicular, do diâmetro do túbulo e da altura do epitélio seminífero 3 dias após a aplicação. Porém, assim como no nosso estudo, o estudo de D'Sousa e Narayana [28] também verificou um maior número de alterações histopatológicas nos túbulos seminíferos com o tratamento de 5-FU.

Em nosso estudo, a patologia encontrada no G5-FU foi principalmente vacuolização, seguida de células germinativas imaturas encontradas no lúmen. Nos testículos, as principais células afetadas pelos agentes anticancerígenos são as espermatogônias [29]. As células-tronco são espermatogônias do tipo A não diferenciadas, elas sofrem divisões mitóticas até se tornarem espermatócitos. As espermatogônias não diferenciadas são mais sensíveis aos agentes tóxicos do que os espermatócitos, espermátides e espermatozoides [29]. A presença de vacúolos pode estar associada à vacuolização citoplasmática, com dilatação do retículo endoplasmático ou edema mitocondrial das células de Sertoli ou pode ser vacúolos maiores remanescentes de vacúolos fagocíticos da digestão de células germinativas mortas [29]. A vacuolização em qualquer um dos casos leva a uma perda de contato entre as células germinativas que provoca a esfoliação prematura e descamação das células [29]. Vacuolização de células de Sertoli e descamação de células foi observada em outros estudos com aplicação de 5-FU [5,6,8].

A morfologia espermática não foi alterada pela aplicação de 5-FU e, portanto, nenhum efeito foi observado nos grupos suplementados com L-arginina ou vitamina C. O processo completo de espermatogênese no rato tem duração de 52-56 dias [30], tempo superior ao que foi utilizado neste experimento. Com um maior tempo de aplicação de 5-FU, alterações espermáticas podem ocorrer [3,8,9]. Sabe-se que o tratamento com 5-Fu é citotóxico para as espermatogônias, dificulta a maturação celular, formando espermátides anormais com defeitos acrossomais e de cabeça [28,31] e defeitos na morfologia espermática, tanto de cabeça quanto de cauda [3]. Além disso, ratos tratados com 5-Fu tem uma redução na contagem epididimária de espermatozoides [32].

Não houve alteração na expressão gênica de *Tnfa* nos testículos, que é um importante fator indicador de inflamação tecidual. Em outros tecidos, o 5-FU causa inflamação com elevação de níveis de citocinas pró-inflamatórias, NF-kB, TNF α e interleucinas, antes da evidência histológica de dano tecidual [33–35].

No presente estudo, nenhuma alteração na expressão dos genes antioxidantes (*Cat* e *Gss*) estudados em testículos foi verificada nos grupos experimentais submetidos ao 5-FU. O 5-FU causa estresse oxidativo em muitos órgãos, como medula óssea [36], no intestino [37], no fígado [38], coração [39], em consequência da redução na expressão de enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, superóxido-desmutase) [36,38]. Porém apesar de não ter sido encontrado aumento na expressão dessas enzimas, isso não descarta o envolvimento do estresse oxidativo nos efeitos deletérios do 5-FU aos testículos. Porém, o estresse oxidativo não é o único mecanismo da toxicidade do 5-FU para os testículos [28], o 5-FU causa inibição da timidilato sintase, causando desequilíbrio nos desoxinucleotídeos e dano no DNA, com mudanças morfológicas como degeneração do epitélio seminífero e vacuolização das células de Sertoli [40].

Houve um aumento de BAX nos testículos com a aplicação de 5-FU, enquanto nenhuma alteração foi verificada na quantidade de BCL2. A BCL2 é antiapoptótica, enquanto a BAX é pró-apoptótica e está envolvida no caminho intrínseco da apoptose celular [41]. É importante notar que a suplementação de vitamina C causou uma redução de BAX nos testículos e o G5-FU+VitC não diferiu do controle. O 5-FU pode ativar o programa de morte celular no testículo por meio do aumento de BAX, porém seu efeito pode ser minimizado pela suplementação de vitamina C. O ácido ascórbico ou vitamina C apresenta proteção contra vários tipos de agentes tóxicos, pois tem forte potencial antioxidante e anti-inflamatório [10]. O G5-FU+Arg+VitC também não diferiu do controle na quantificação proteica, provavelmente pelo aspecto avançado de degeneração testicular, já não está mais expressando as proteínas mediadoras de apoptose celular.

A quantificação de caspase 3 foi muito similar à do BAX, e o grupo que teve maior expressão de BAX e caspase 3 foi o G5-FU+Arg. O BAX pode ativar a caspase 3 no processo de apoptose [11]. As caspases são proteases diretamente associadas à apoptose, possuem resíduo de cisteína em seu sítio ativo e clivam seus substratos proteicos, geralmente nos resíduos de ácido aspártico. A caspase 3 está relacionada à fragmentação do material genético [42] e pode ser induzida por quimioterápicos [43,44]. Porém, estudos indicam que a apoptose pode ocorrer por novas formas de morte celular independentes de caspases, e que apresentam características mistas de apoptose, necrose e outras formas de degeneração celular [45].

5. Conclusão

A aplicação de uma única dose de 5-FU leva um aumento de patologias testiculares e a suplementação preventiva de vitamina C, sem a associação da L-arginina, reduz os efeitos deletérios do 5-FU nos testículos de ratos Wistar. A associação da suplementação de Vitamina

C e L-arginina prévia à aplicação de 5-FU é prejudicial para os testículos e para a espermatogênese. A vitamina C isoladamente é promissora como adjuvante na quimioterapia com 5-FU para os tratamentos de câncer visando minimizar os danos à fertilidade masculina.

6. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecimentos também à UNOESTE pelo apoio financeiro.

7. Referências

- [1] Balmant BD, Araújo EON, Yabuki D, Novais AB, Genaro SC, Laposy CB, et al. Effects of L-Arginine Supplementation on Leukogram, Inflammatory Bowel Infiltrates and Immunoglobulins with 5-FU Use in Rats. *Nutrition and Cancer* 2018;70:249–56. doi:10.1080/01635581.2018.1424346.
- [2] Schulze MM. Chemotherapy Treatment in Cancer Patients. *Rev Bras Oncologia Clínica* 2007;4:17–23.
- [3] Fahmy MA, Abd-Alla HI, Hassan EE, Hassan ZM, Sweelam HM. Genotoxicity and sperm defects induced by 5-FU in male mice and the possible protective role of *Pentas lanceolata*-iridoids. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2020;850–851:503145. doi:10.1016/j.mrgentox.2020.503145.
- [4] Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Abak A, Seify M, Mohaqiq M, Keshmir F, et al. Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021;142:112040. doi:10.1016/j.biopha.2021.112040.
- [5] Takizawa S, Horii I. Endocrinological assesment of toxic effects on the male reproductive system in rats treated with 5-fluorouracil for 2 or 4 weeks. *The Journal of Toxicological Sciences* 2002;27:49–56. doi:10.2131/jts.27.49.
- [6] Narayana K, D’Souza UJ, Sanyal AK, Rao KP. 5-fluorouracil (5-FU) induces the formation of giant cells and sloughing of seminiferous epithelium in the rat testis. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 2000;44:317–22.
- [7] Barateiro LGRP, Rinaldi J de C, Freitas PLZ, Fabiano LC, Buttow NC, Mello EV de SL. Impactos da exposição ao quimioterápico 5-FU sobre a morfologia da próstata de ratos wistar. In: UEM, editor. 29º Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá:

- UEM; 2020.
- [8] Gad El- Hak H, Moawad T, Hafez G. Effects of 5-Fluorouracil on Testes Histology and Sperm Morphology Assay in Mice. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D Histology & Histochemistry* 2017;9:1–9. doi:10.21608/eajbsd.2017.14040.
- [9] Pavithra S, Preetha S, Karthikeyan M, Thangapandiyan A. Role of fractionated pectin powder capped zinc oxide nanoparticle in 5-fluorouracil induced testicular oxidative stress in rats. *The Pharma Innovation Journal* 2020;9:400–3.
- [10] Al-Asmari A, Khan A, Al-Masri N. Mitigation of 5-fluorouracil–induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox–sensitive transcription factors. *Human & Experimental Toxicology* 2016;35:1203–13. doi:10.1177/0960327115626583.
- [11] Zhang YF, Yang JY, Meng XP, Nie N, Tang MC, Yang XL. L-Arginine protects mouse Leydig cells against T-2 toxin-induced apoptosis in vitro. *Toxicology and Industrial Health* 2020;36:1031–8. doi:10.1177/0748233720964312.
- [12] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. doi:10.17226/12910.
- [13] Leocádio PCL, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DCC, et al. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. *Nutrition and Cancer* 2015;67:486–93. doi:10.1080/01635581.2015.1004730.
- [14] Cubas ZS, Joppert AM. Terapêutica de animais selvagens. In: Andrade SF, editor. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3th ed., Editora Roca Ltda; 2008, p. 664–7.
- [15] *Medicine I de. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2005. doi:10.17226/10490.
- [16] *Medicine I of, editor. Dietary Reference Intakes*. Washington, D.C.: National

- Academies Press; 2000. doi:10.17226/9956.
- [17] Dutra Gonçalves G, Antunes Vieira N, Rodrigues Vieira H, Dias Valério A, Elóisa Munhoz de Lion Siervo G, Fernanda Felipe Pinheiro P, et al. Role of resistance physical exercise in preventing testicular damage caused by chronic ethanol consumption in UChB rats. *Microscopy Research and Technique* 2017;80:378–86. doi:10.1002/jemt.22806.
- [18] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, NY) 1996;10:237–44.
- [19] Filler R. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. *Male Reproductive Toxicology*, Elsevier; 1993, p. 334–43. doi:10.1016/B978-0-12-461207-5.50025-0.
- [20] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001;29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- [21] Song M-K, Park M-Y, Sung M-K. 5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice. *Journal of Cancer Prevention* 2013;18:322–9. doi:10.15430/JCP.2013.18.4.322.
- [22] Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Imori M, Matsumoto K, Utsumi D, et al. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *British Journal of Pharmacology* 2013;168:1388–400. doi:10.1111/bph.12019.
- [23] Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Qasim AM, Al-Yousef Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by

- modulating the expression of inflammatory mediators. *Toxicology Reports* 2015;2:908–16. doi:10.1016/j.toxrep.2015.06.006.
- [24] Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell* 2022;185:2853–78. doi:10.1016/j.cell.2022.06.010.
- [25] Tosato M, Calvani R, Picca A, Ciciarello F, Galluzzo V, Coelho-Júnior HJ, et al. Effects of L-Arginine Plus Vitamin C Supplementation on Physical Performance, Endothelial Function, and Persistent Fatigue in Adults with Long COVID: A Single-Blind Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 2022;14:4984. doi:10.3390/nu14234984.
- [26] Lee NPY, Mruk DD, Wong C, Cheng CY. Regulation of Sertoli-Germ Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis Via the Nitric Oxide Synthase (NOS)/cGMP/Protein Kinase G (PRKG)/ β -Catenin (CATNB) Signaling Pathway: An In Vitro and In Vivo Study. *Biology of Reproduction* 2005;73:458–71. doi:10.1095/biolreprod.105.040766.
- [27] Gilio JM, Borella MI, Martins de Camargo AC, da Silva CA. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. *ConScientiae Saúde* 2008;7:69–76.
- [28] D'Souza UJ, Narayana K. Induction of seminiferous tubular atrophy by single dose of 5-fluorouracil (5-FU) in Wistar rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 2001;45:87–94.
- [29] Nolte T, Harleman JH, Jahn W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1995;47:267–86. doi:10.1016/S0940-2993(11)80260-5.
- [30] Altıntaş Aykan D. The effects of sacubitril/valsartan and ramipril on the male fertility in hypertensive rats. *Northern Clinics of Istanbul* 2020;7:425–432.

- doi:10.14744/nci.2020.30906.
- [31] Russell LD, Russell JA. Short-term Morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *American Journal of Anatomy* 1991;192:142–68. doi:10.1002/aja.1001920205.
- [32] D'Souza UJA. Toxic effects of 5-fluorouracil on sperm count in Wistar rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 2003;10:43–5.
- [33] Gelen V, Şengül E, Yıldırım S, Atila G. The protective effects of naringin against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2018;21:404–10. doi:10.22038/IJBMS.2018.27510.6714.
- [34] Rapa SF, Magliocca G, Pepe G, Amodio G, Autore G, Campiglia P, et al. Protective Effect of Pomegranate on Oxidative Stress and Inflammatory Response Induced by 5-Fluorouracil in Human Keratinocytes. *Antioxidants* 2021;10:203. doi:10.3390/antiox10020203.
- [35] Vyas D, Laput G, Vyas A. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets and Therapy* 2014:1015. doi:10.2147/OTT.S60114.
- [36] Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, et al. Possible Involvement of Oxidative Stress in 5-Fluorouracil-Mediated Myelosuppression in Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011;108:40–5. doi:10.1111/j.1742-7843.2010.00621.x.
- [37] Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2018;28:262–7. doi:10.1080/15376516.2017.1402976.

- [38] Zeng D, Wang Y, Chen Y, Li D, Li G, Xiao H, et al. Angelica Polysaccharide Antagonizes 5-FU-Induced Oxidative Stress Injury to Reduce Apoptosis in the Liver Through Nrf2 Pathway. *Frontiers in Oncology* 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.720620.
- [39] Lamberti M, Porto S, Marra M, Zappavigna S, Grimaldi A, Feola D, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2012;31:60. doi:10.1186/1756-9966-31-60.
- [40] Al-Asmari A, Al-Zahrani A, Khan A, Al-Shahrani H, Ali Al Amri M. Taurine ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis, hepatorenal and reproductive organ damage in Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology* 2016;35:10–20. doi:10.1177/0960327115573597.
- [41] Solano-Gálvez S, Abadi-Chiriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández D-A, et al. Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. *Medical Sciences* 2018;6:54. doi:10.3390/medsci6030054.
- [42] Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. *Cell* 1997;89:175–84. doi:10.1016/S0092-8674(00)80197-X.
- [43] Adachi Y, Taketani S, Oyaizu H, Ikebukuro K, Tokunaga R, Ikehara S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma induced by 5-FU and/or IFN-gamma through caspase 3 and caspase 8. *International Journal of Oncology* 1999;15:1191–6. doi:10.3892/ijo.15.6.1191.
- [44] Gomes MJ, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Czezko NG, Ribas CAPM, Nassif PAN, et al. Avaliação da expressão da caspase-3 no adenocarcinoma colorretal através de um

- sistema computadorizado de análise de imagem. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo) 2008;21:33–7. doi:10.1590/S0102-67202008000100007.
- [45] Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001;2:589–98. doi:10.1038/35085008.

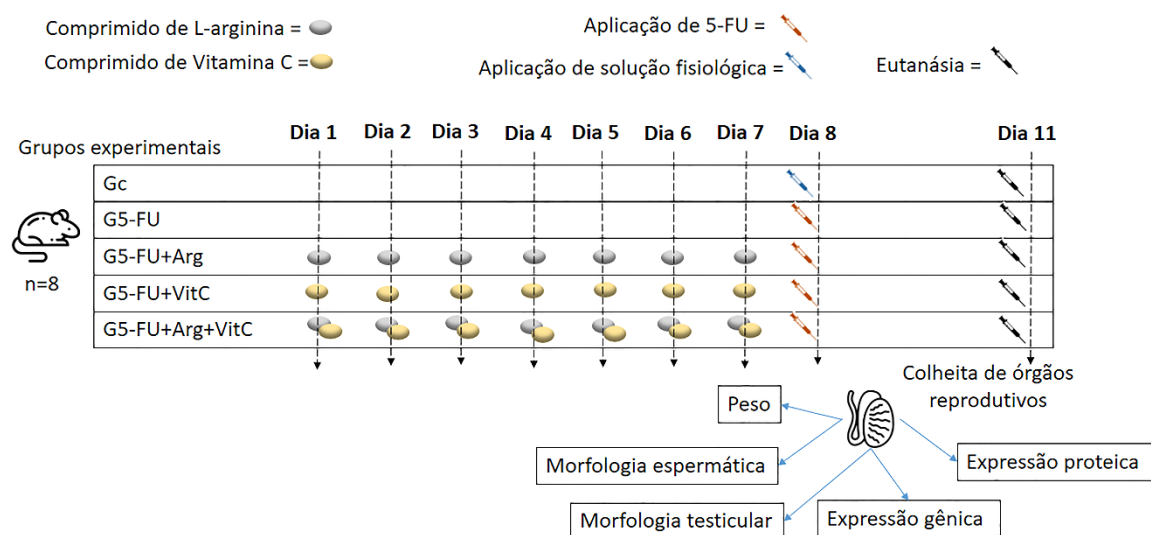


Figura 1. Delineamento experimental: os 40 ratos Wistar foram divididos em 5 grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). Os comprimidos efervescentes de L-arginina e de vitamina C foram fornecidos diluídos em água na dosagem de 213 mg/dia e 5,71 mg/dia, respectivamente, por 7 dias consecutivos. Os ratos que receberam 5-FU receberam uma injeção via intraperitoneal de 50 mg/ Kg de peso corporal no dia 8 do experimento, os ratos do Gc receberam injeção de solução fisiológica a 0,9%. A eutanásia foi realizada 72 horas após a aplicação de 5-FU e os órgãos foram colhidos para análises histológicas e moleculares.

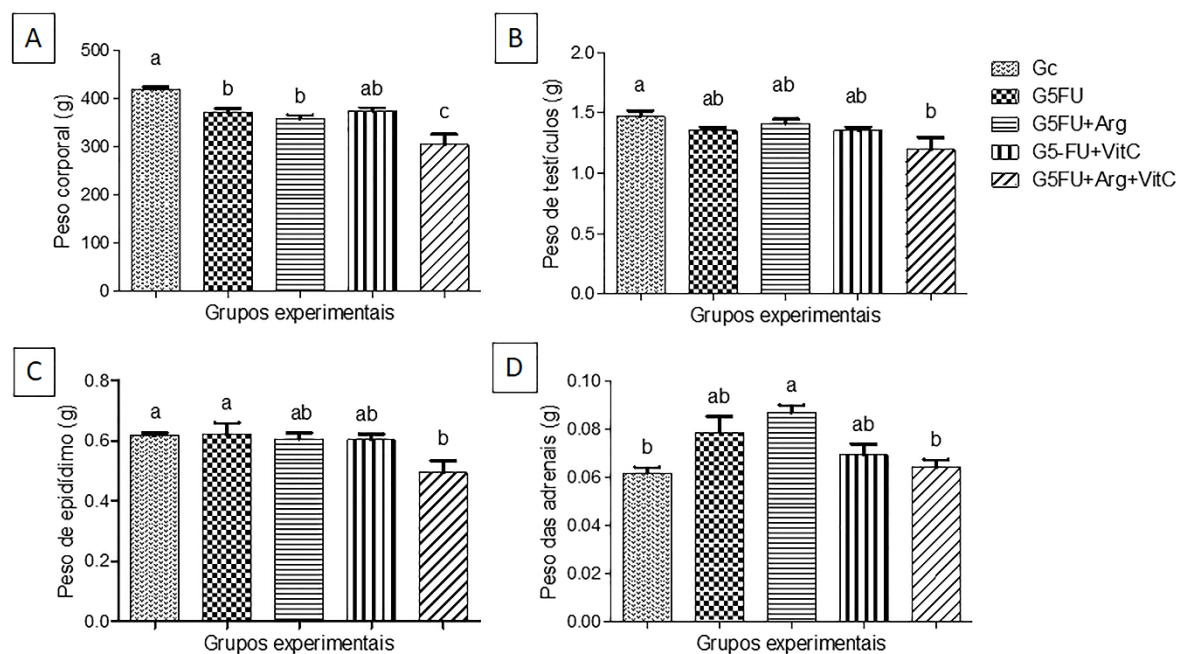


Figura 2. Peso dos animais (2A), peso dos testículos (2B), peso dos epidídimos (2C) e peso das adrenais (2D) dos ratos Wistar dos diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos. ANOVA seguido de Tukey.

Tabela 1. Histopatologia testicular (porcentagem de túbulos normais e com patologias) dos ratos Wistar de diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). Letras diferentes representam

Túbulos (%)	Grupos experimentais				
	Gc	G5-FU	G5-FU +Arg	G5-FU +Vitc	G5-FU +Arg+VitC
Normais	97,63±0,50 ^a	92,38±0,96 ^b	94,00±0,27 ^{ab}	93,75±0,86 ^{ab}	77,34±3,38 ^b
Degenerados	0,25±0,25 ^b	0,00±0,00 ^b	0,13±0,13 ^b	0,00±0,00 ^b	12,34±2,19 ^a
Vacuolização	1,86±0,38 ^b	6,86±0,88 ^a	5,43±0,35 ^{ab}	5,00±0,71 ^{ab}	9,00±0,58 ^a
Células no Lúmen	0,13±0,13 ^b	0,25±0,16 ^b	0,50±0,27 ^{ab}	1,50±0,27 ^a	1,00±1,00 ^{ab}

diferenças significativas entre os grupos. Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

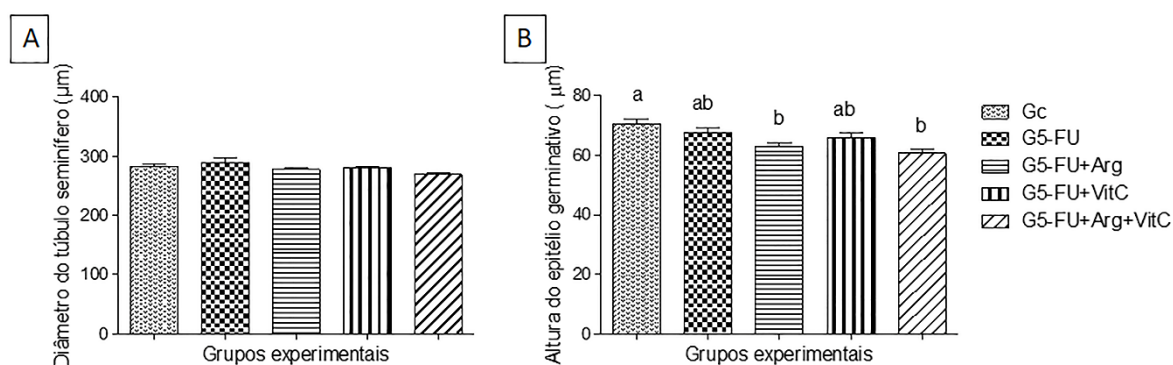


Figura 3. Morfometria testicular: diâmetro do túbulo seminífero (3A) e altura do epitélio germinativo (3B) dos ratos Wistar dos diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos. ANOVA seguida de Tukey.

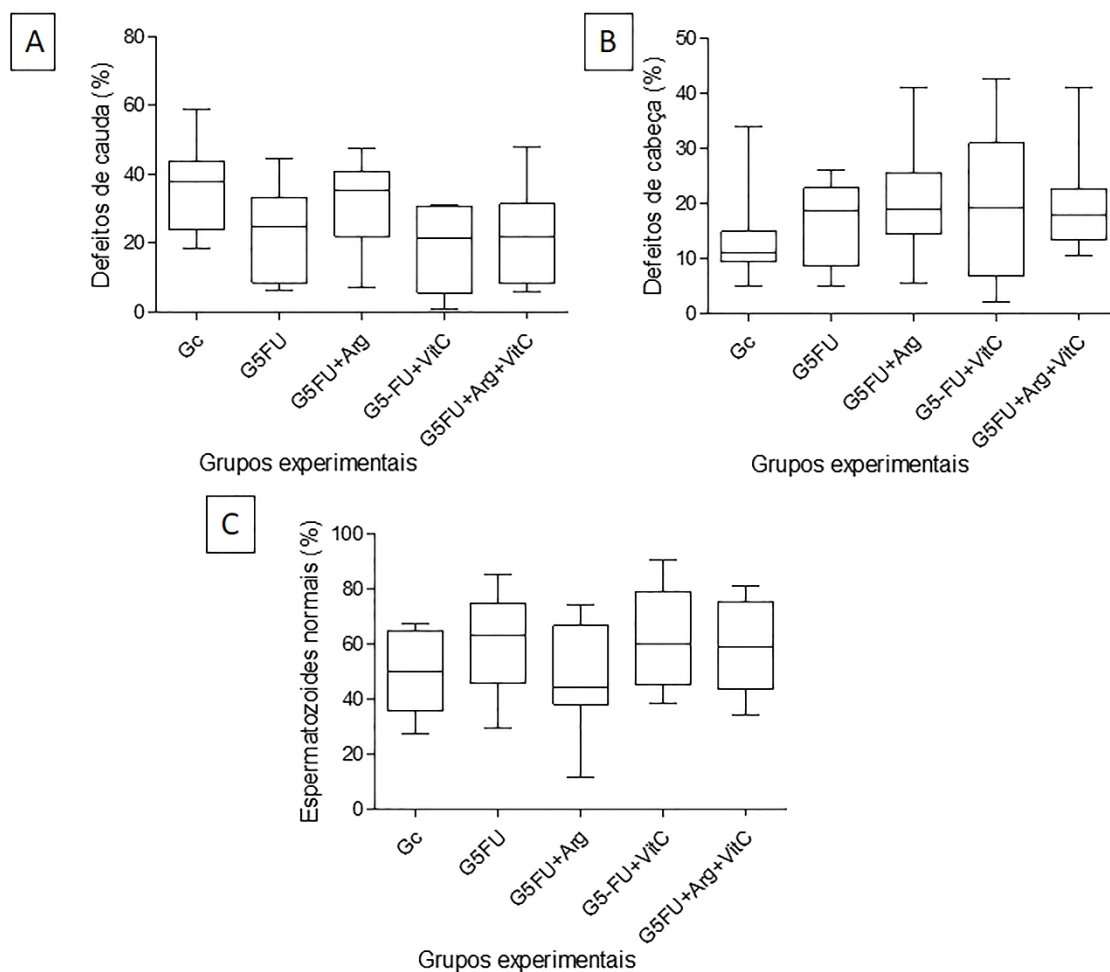


Figura 4. Morfologia espermática dos ratos: porcentagem de espermatozoides normais (3A), porcentagem de espermatozoides com defeitos de cauda (3B) e porcentagem de espermatozoides com defeitos de cabeça (3C) dos ratos Wistar dos diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). Não houve diferença significativa entre os grupos, teste de Kruskal-Wallis.

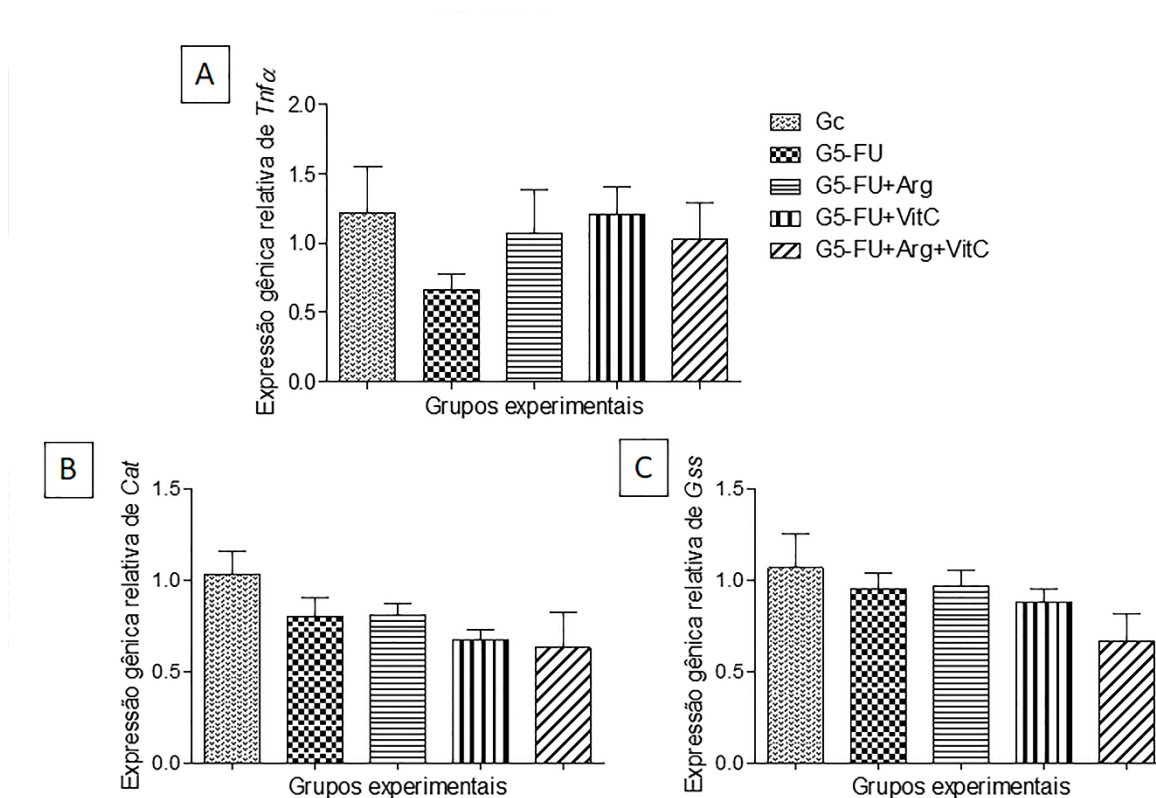


Figura 5. Expressão gênica relativa de *Tnfa* (4A), *Cat* (4B) e *Gss* (4C) em testículos de ratos Wistar dos diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). *Gapdh* e *Hprt1* foram usados em combinação para controle da reação. Não houve diferença significativa entre os grupos, ANOVA.

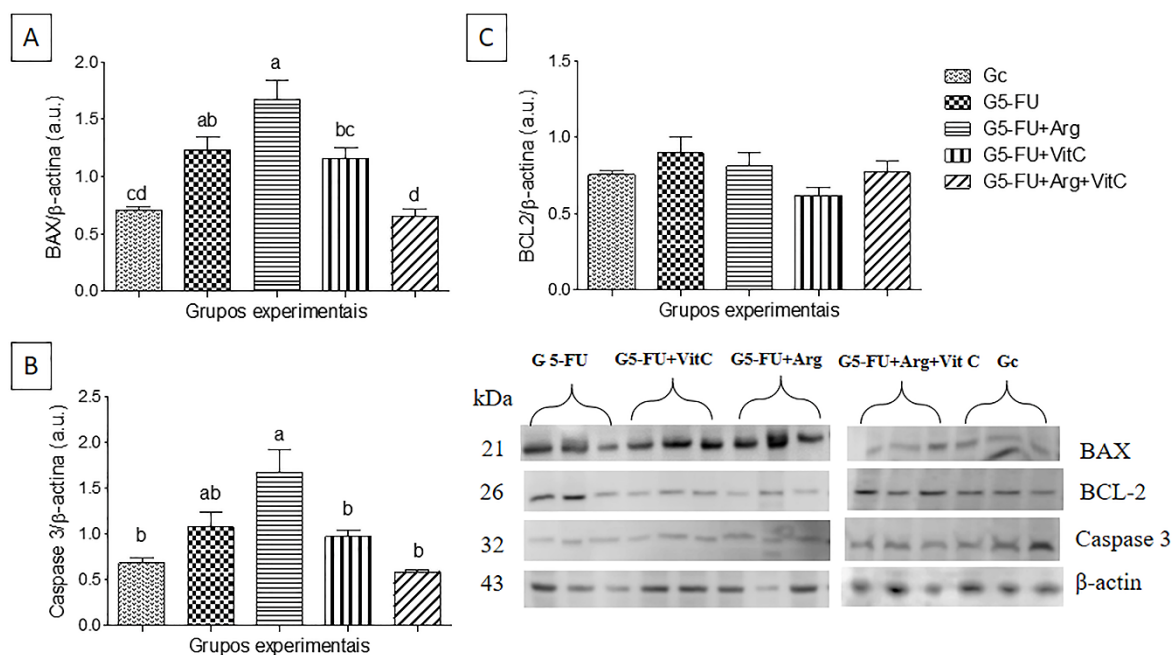


Figura 6. Expressão proteica de Caspase 3 (5A), BAX (5B) e BCL2 (5C) em testículos de ratos Wistar dos diferentes grupos experimentais: grupo controle (Gc); grupo 5-Fluorouracil (G5-FU); grupo 5-FU + L-arginina (G5-FU+Arg); grupo 5-FU + vitamina C (G5-FU+VitC); grupo 5-FU + L-arginina + Vitamina C (G5-FU+Arg+VitC). *Gapdh* e *Hprt1* foram usados em combinação para controle da reação. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os grupos, ANOVA seguida de Tukey.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NUTRITION AND CANCER

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.

Author Services

For general guidance on every stage of the publication process, please visit our Author Services website.

Editing Services

For editing support, including translation and language polishing, explore our [Editing Services website](#)

About the Journal

Nutrition and Cancer is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Nutrition and Cancer accepts the following types of article: Original articles, Letters to the Editor, Reviews, Brief reports, Announcements of future meetings.

Open Access

You have the option to publish open access in this journal via our Open Select publishing program. Publishing open access means that your article will be free to access online immediately on publication, increasing the visibility, readership and impact of your research. Articles published Open Select with Taylor & Francis typically receive 95% more citations* and over 7 times as many downloads** compared to those that are not published Open Select.

Your research funder or your institution may require you to publish your article open access. Visit our [Author Services website](#) to find out more about open access policies and how you can comply with these.

You will be asked to pay an article publishing charge (APC) to make your article open access and this cost can often be covered by your institution or funder. Use our [APC finder](#) to view the APC for this journal.

Please visit our [Author Services website](#) if you would like more information about our Open Select Program.

*Citations received up to 9th June 2021 for articles published in 2016-2020 in journals listed in Web of Science®. Data obtained on 9th June 2021, from Digital Science's Dimensions platform, available at <https://app.dimensions.ai>

**Usage in 2018-2020 for articles published in 2016-2020.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees, each delivering at least one report. If you have shared an earlier version of your Author's Original Manuscript on a preprint server, please be aware that anonymity cannot be guaranteed. Further information on our preprints policy and citation requirements can be found on our [Preprints Author Services page](#). Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where "a quotation is 'within' a quotation".

Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Please do not submit your paper as a PDF. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

Word templates are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

Figures and tables should be saved separately from the text, with files numbered to indicate the order the figures/tables appear in the manuscript. The name of figure/table files should include this number, and whether it is a main figure/table, or a supplementary figure/table. Please ensure that all figures/tables are also accompanied by a corresponding caption.

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. Please ensure all listed authors meet the [Taylor & Francis authorship criteria](#). All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation

- during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain an unstructured abstract of 200 words. Read tips on [writing your abstract](#).
 3. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
 4. **Between 3 and 5 keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
 5. **Funding details**. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

<i>For</i>	<i>single</i>	<i>agency</i>	<i>grants</i>
This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].			
<i>For</i>	<i>multiple</i>	<i>agency</i>	<i>grants</i>
This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].			
 6. **Disclosure statement**. This is to acknowledge any financial or non-financial interest that has arisen from the direct applications of your research. If there are no relevant competing interests to declare please state this within the article, for example: *The authors report there are no competing interests to declare*. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
 7. **Data availability statement**. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
 8. **Data deposition**. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-preserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
 9. **Supplemental online material**. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).
 10. **Figures**. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for color, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
 11. **Tables**. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about mathematical symbols and equations.

13. **Units.** Please use SI units (non-italicized).

Using Third-Party Material

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on requesting permission to reproduce work(s) under copyright.

Disclosure Statement

Please include a disclosure statement, using the subheading “Disclosure of interest.” If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report there are no competing interests to declare*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. Read more on declaring conflicts of interest.

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository, ideally at the beginning of the research process (prior to participant recruitment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. Clinical trials should be registered prospectively – i.e. before participant recruitment. However, for clinical trials that have not been registered prospectively, Taylor & Francis journals requires retrospective registration to ensure the transparent and complete dissemination of all clinical trial results which ultimately impact human health. Authors of retrospectively registered trials must be prepared to provide further information to the journal editorial office if requested. The clinical trial registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the ICMJE guidelines.

Complying with Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All original research papers involving humans, animals, plants, biological material, protected or non-public datasets, collections or sites, must include a written statement in the Methods section, confirming ethical approval has been obtained from the appropriate local ethics committee or Institutional Review Board and that where relevant, informed consent has been obtained. For animal studies, approval must have been obtained from the local or institutional animal use and care committee. All research studies on humans (individuals, samples, or data) must have been performed in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki. In settings where ethics approval for non-interventional studies (e.g. surveys) is not required, authors must include a statement to explain this. In settings where there are no ethics committees in place to provide ethical approval, authors are advised to contact the Editor to discuss further. Detailed guidance on ethics considerations and mandatory declarations can be found in our Editorial Policies section on Research Ethics.

Consent

All authors are required to follow the ICMJE requirements and Taylor & Francis Editorial Policies on privacy and informed consent from patients and study participants. Authors must include a statement to confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any type of qualitative or quantitative research, has given informed consent to participate in the research. For submissions where patients or participants can be potentially identified (e.g. a clinical case report detailing their medical history, identifiable images or media content, etc), authors must include a statement to confirm that they have obtained written informed consent to publish the details from the affected individual (or their parents/guardians if the participant is not an adult or unable to give informed consent; or next of kin if the participant is deceased). The process of obtaining consent to publish should include sharing the article with the individual (or whoever is consenting on their behalf), so that they are fully aware of the content of the article before it is published. Authors should familiarize themselves with our policy on participant/patient privacy and informed consent. They may also use the Consent to Publish Form, which can be downloaded from the same Author Services page.

Health and Safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied within the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare and Guidelines for the Treatment of Animals in

Behavioural Research and Teaching. When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting Your Paper

This journal uses Taylor & Francis' Submission Portal to manage the submission process. The Submission Portal allows you to see your submissions across Taylor & Francis' journal portfolio in one place. To submit your manuscript please click here.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Nutrition and Cancer* uses Crossref™ to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Nutrition and Cancer* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about sharing your work.

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis Basic Data Sharing Policy. Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see this information regarding repositories.

Authors are further encouraged to cite any data sets referenced in the article and provide a Data Availability Statement.

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer-reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Color figures will be reproduced in color in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in color in the print version, a charge will apply.

Charges for color figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 color figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Queries

If you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).