

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE L-ARGININA EM RATOS APÓS A  
QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL**

**ELOISA ORTEGA NAZÁRIO DE ARAÚJO**

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE L-ARGININA EM RATOS APÓS A  
QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL**

**ELOISA ORTEGA NAZÁRIO DE ARAÚJO**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Luis de Souza Lima de Souza Reis

613.28  
O77e

Ortega Nazário de Araújo, Eloisa.

Efeito de diferentes doses de L-arginina em ratos após a quimioterapia com 5-Fluorouracil / Eloisa Ortega Nazário de Araújo. – Presidente Prudente, 2017.

35 f.: il.

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

Bibliografia.

Orientador: Luis Souza Lima de Souza Reis.

1. Suplementação. 2. Aminoácido. 3. Experimental. I. Efeito de diferentes doses de L-arginina em ratos após a quimioterapia com 5-Fluorouracil.

**ELOISA ORTEGA NAZÁRIO DE ARAÚJO**

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE L-ARGININA EM RATOS APÓS A  
QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 23 de Maio de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches  
Universidade de Santo Amaro – Unisa  
São Paulo - SP

---

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

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

## DEDICATÓRIA

*A Deus, presença constante em minha vida.*

*Aos meus pais e toda minha família pelo apoio e amor.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado à vida, por ter me dado força e aumentado minha fé para que eu pudesse acreditar que seria capaz de cumprir esta tarefa.*

*Aos meus pais Fabiana e Edmilso, meu padrasto José e meu noivo Julierme pelo apoio, amor e carinho dedicados durante esses anos de estudo. E a toda minha família que me incentivaram a não desistir.*

*Ao meu professor, orientador e amigo Luis Souza Lima de Souza Reis, pela orientação competente, persistência e paciência. Um adjetivo que se encaixa perfeitamente para descrevê-lo é companheirismo. Levarei comigo seu exemplo de dedicação.*

*Ao Professor Doutor Antônio Fluminhan Junior, que não mediu esforços para ajudar e pela grande atenção, principalmente por disponibilizar o Laboratório de Citogenômica e Bioinformática para toda a realização da pesquisa.*

*Aos Professores Doutores Rosa Maria Barilli Nogueira e Rogério Giuffrida pela ajuda.*

*Ao Biotério da Universidade do Oeste Paulista, em especial á Gracielle, pelo profissionalismo, colaboração e amizade.*

*A Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, principalmente á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.*

*As amigas Dayane, Denise, Andresa e Caroline por toda a ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.*

*Meus agradecimentos e carinho a todos.*

*“Rotineiramente desqualificamos testemunhos e exigimos comprovação. Isto é, estamos tão convencidos da justeza de nosso julgamento que invalidamos provas que não se ajustam a ele. Nada que mereça ser chamado de verdade pode ser alcançado por esses meios.”*

*Marilynne Robinson*

## RESUMO

### Efeito de diferentes doses de L-arginina em ratos após a quimioterapia com 5-Fluorouracil

A suplementação com L-arginina tem sido utilizada para minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia, no entanto, ainda não está totalmente elucidado seus benefícios e nem determinado uma dose ideal de suplementação que pode minimizar esses efeitos. Objetivou avaliar o efeito da suplementação com L-arginina na formação de micronúcleos em 70 ratos *Wistar* após a aplicação da 5-FU. Estes ratos foram divididos em sete lotes (10 ratos/lote):  $L_c$  ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*;  $L_{Arg2\%}$  e  $L_{Arg4\%}$  ratos alimentados com ração comercial e adicionou-se 2% e 4% de L-arginina na água *ad libitum*, respectivamente;  $L_{ciclo}$  ratos alimentados com ração comercial, água *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg;  $L_{5-FU}$  ratos alimentados com ração comercial, água *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg;  $L_{Arg2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg4\%+5-FU}$  ratos alimentados com ração comercial, adicionou-se 2% e 4% de L-arginina na água *ad libitum*, respectivamente, e aplicou-se uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg. A contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos dos ratos foi realizada 72 horas após a aplicação dos quimioterápicos. Os resultados obtidos foram analisados pela ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey a 5%. Os ratos dos lotes  $L_{Arg2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg4\%+5-FU}$  apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) na formação de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos após a quimioterapia, indicando que estas suplementações com L-arginina minimizou o efeito mutagênico da 5-FU.

**Palavras-chave:** Suplementação alimentar, micronúcleo, aminoácido, cromossomo.



## ABSTRACT

### Effect of different doses of L-arginine in rats after chemotherapy with 5-Fluorouracil

L-arginine has been used as a dietary supplement to minimize the side effects of chemotherapy, but it is not fully elucidated its actions and nor the ideal dose that can minimize the side effects. The objective of this study was to evaluate the effect of L-arginine supplementation on the formation of micronuclei in 70 Wistar rats after chemotherapy with 5-FU divided into 7 batches (10 male rats weighing 200 g/batch):  $L_C$  water *ad libitum*;  $L_{Arg2\%}$  and  $L_{Arg4\%}$  mice fed commercial feed and 2% and 4% of L-arginine in water *ad libitum*, respectively;  $L_C$  rats fed commercial feed, water *ad libitum* and a dose of 50 mg cyclophosphamide/kg;  $L_{5-FU}$  rats fed commercial feed, water *ad libitum* and a dose of 200 mg of 5-FU/kg was applied;  $L_{Arg2\%+5-FU}$  and  $L_{Arg4\%+5-FU}$  rats fed commercial feed, 2% and 4% L-arginine were added in water *ad libitum*, respectively, and a dose of 200 mg of 5-FU/Kg. The mice were sacrificed 72 hours after the application of the chemotherapeutics to evaluate the formation of micronuclei. In the data analysis, one-way ANOVA was applied and followed by the Tukey test at 5%. Mice supplemented *ad libitum* with 2% and 4% L-arginine showed a reduction ( $P < 0.05$ ) in the formation of micronuclei in bone marrow cells after chemotherapy, indicating that these supplements minimize the mutagenic effect of 5-FU.

**Keywords:** Food supplementation, micronucleus, amino acid, chromosome.

## SUMÁRIO

<b>1 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE.....</b>	<b>9</b>
<b>ANEXO 1 - INSTRUÇÕES DA REVISTA PARA OS AUTORES.....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 2 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) E COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI).....</b>	<b>34</b>

**1 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO À REVISTA *JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE***

**Efeito de diferentes doses de L-arginina em ratos após a quimioterapia com 5-Fluorouracil**

Eloisa O. N. Araújo<sup>1</sup>, Antônio F. Junior<sup>2</sup>, Dayane A. F. Silva<sup>1</sup>, Carolini G. Dundi<sup>3</sup>, Sandra C.

Genaro<sup>1</sup>, Rosa Maria N. B. Nogueira<sup>1,2</sup>, Marcelo G. M. Chacur<sup>1,2</sup>, Luis S. L. S. Reis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Citogenômica e Bioinformática, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil

<sup>3</sup>Graduação em Medicina Veterinária, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil

## RESUMO

A suplementação com L-arginina tem sido utilizada para minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia, no entanto, ainda não está totalmente elucidado seus benefícios e nem determinado uma dose ideal de suplementação que pode minimizar esses efeitos. Objetivou avaliar o efeito da suplementação com L-arginina na formação de micronúcleos em 70 ratos *Wistar* após a aplicação da 5-FU. Estes ratos foram divididos em sete lotes (10 ratos/lote): Lc ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*; L<sub>Arg2%</sub> e L<sub>Arg4%</sub> ratos alimentados com ração comercial e adicionou-se 2% e 4% de L-arginina na água *ad libitum*, respectivamente; L<sub>ciclo</sub> ratos alimentados com ração comercial, água *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg; L<sub>5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial, água *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg; L<sub>Arg2%+5-FU</sub> e L<sub>Arg4%+5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial, adicionou-se 2% e 4% de L-arginina na água *ad libitum*, respectivamente, e aplicou-se uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg. A contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos dos ratos foi realizada 72 horas após a aplicação dos quimioterápicos. Os resultados obtidos foram analisados pela ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey a 5%. Os ratos dos lotes L<sub>Arg2%+5-FU</sub> e L<sub>Arg4%+5-FU</sub> apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) na formação de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos após a quimioterapia, indicando que estas suplementações com L-arginina minimizou o efeito mutagênico da 5-FU.

**Palavras-chave:** Suplementação alimentar, micronúcleo, aminoácido, cromossomo.

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença relevante para a saúde pública, e vem aumentando a sua incidência e prevalência, assim como as taxas de mortalidade [22]. Cerca de 90% das neoplasias podem ser tratados com as drogas quimioterápicas, o que faz ser a modalidade mais utilizada dos tratamentos oncológicos [24]. Entre as alternativas de tratamento com antineoplásicos, destaca-se o emprego do 5-Fluoruracil (5-FU) que, apesar do seu longo tempo de utilização terapêutica, ainda é considerado um dos fármacos mais ativos contra o câncer [5], e tem sido empregado no tratamento dos tumores de mama, cabeça e pescoço, pâncreas, estômago, cólon, reto e da pele [19], nos últimos 40 anos [26].

A 5-FU inibe a biossíntese de um dos componentes essenciais do DNA e RNA, impedindo a multiplicação e as funções normais da célula. Atua privando a célula da tiamina, um dos precursores essenciais da síntese de DNA [7].

Na busca de minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia, como: físicos, bioquímicos e hematológicos, vem se buscando tratamentos alternativos ou de suporte, dentre eles, tem se destacado a L-arginina, um aminoácido condicionalmente essencial, que tem por ação a modulação e otimização do sistema imunológico. Por fim, resultando em maior sobrevida dos pacientes [10].

Apesar da L-arginina ser sintetizada pelo organismo, essa produção é insuficiente para atender as necessidades nutricionais, sendo necessário fazer suplementação alimentar [21]. Para uma boa ação farmacológica é indicado a suplementação acima de 1% de L-arginina [20], mas sua ação no material genético durante a quimioterapia ainda não foi totalmente elucidado. Deste modo, torna-se necessário a realização de novos estudos para obter maiores esclarecimentos da ação deste aminoácido, especialmente, como protetor da quebra de cromossomos das células sadias do organismo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de diferentes doses de L-arginina na fragmentação dos cromossomos de ratos submetidos á quimioterapia com 5-FU.

## MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Brasil sob protocolo nº 2817.

### Os animais e o desenho experimental

No experimento utilizou-se 70 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, com 60 e 70 dias idade e com peso corporal médio de  $241,5 \pm 62,3$  g que foram mantidos em gaiolas (5 ratos/gaiola) sob as mesmas condições ambientais com padrão de iluminação de claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiental de 23 °C conforme as recomendações de Merusse e Lapichik [17]. Esses ratos foram divididos randomicamente em 7 grupos experimentais (n=10/grupo) a seguir:

- Lote controle ( $L_c$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) e água filtrada *ad libitum*.

- Lote arginina 2% ( $L_{arg2\%}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) e adicionou-se 2% de L-arginina na água *ad libitum* resultando no consumo médio 295 mg de L-arginina/dia.

- Lote arginina 4% ( $L_{arg4\%}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) e adicionou-se 4% de L-arginina na água *ad libitum* resultando no consumo médio 590 mg de L-arginina/dia.

- Lote ciclofosfamida ( $L_{ciclo}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil), água filtrada *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg de peso corporal por via intraperitoneal após sete dias de adaptação dos ratos às condições experimentais, para induzir a formação de micronúcleos conforme recomendado por Nai et al. [18].

- Lote 5-FU ( $L_{5-FU}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil), água filtrada *ad libitum* e aplicou-se uma dose de 5-FU.

- Lote arginina 2%+5-FU ( $L_{arg2\%+5-FU}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) e adicionou-se 2% de L-arginina na água *ad libitum* resultando no consumo médio 295 mg de L-arginina/dia e aplicou-se uma dose de 5-FU.

- Lote arginina 4%+5-FU ( $L_{arg4\%+5-FU}$ ): os ratos foram alimentados com ração comercial (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) e adicionou-se 4% de L-arginina na água *ad libitum* resultando no consumo médio 590 mg de L-arginina/dia e aplicou-se uma dose de 5-FU.

Os primeiros sete dias de experimento foi considerado período de adaptação dos ratos as condições experimentais e a suplementação com L-arginina. Considerou-se o dia zero do experimento o dia que foi aplicado a dose de 5-FU nos ratos.

A 5-FU foi aplicada nos ratos no oitavo dia do período de adaptação na dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal conforme recomendado por Leocádio et al. [15].

A suplementação dos ratos com L-arginina foi realizada diluindo comprimidos efervescentes de aspartato de arginina (Targifor<sup>®</sup> 1,5g/L-arginina/comprimido, Sanofi-Aventis, Brasil) na água desses animais. Para o controle do consumo médio diário de L-arginina pela gaiola aferiu-se o volume de água antes de ser colocada no bebedouro e, após 12 horas (tempo de vida útil), o volume de água que sobrava no bebedouro. Subtraindo-se o volume de água da segunda aferição do volume de água da primeira aferição, era considerado o consumo médio diário de água do lote experimental. O consumo diário médio do grupo experimental foi dividido pela quantidade de ratos presente no grupo, e assim, era determinado o consumo médio diária da ingestão de água e L-arginina de cada rato.

A ração comercial balanceada (Supralab<sup>®</sup>, Alisul, Brasil) consumida pela gaiola durante o experimento era composta por (níveis de garantia/Kg de ração): umidade (máx) 12,0 %, proteína bruta (mín) 22,0%, extrato etéreo (mín) 2,5%, matéria fibrosa (máx) 6,0 %, matéria mineral (máx) 10,0%, cálcio (mín) 0,8%, Cálcio (máx) 1,2%, fósforo (mín) 0,7%, metionina (mín) 3.000 mg/kg, vitamina A (mín) 7.000 UI/kg, vitamina C (mín) 50 mg/kg, vitamina D3 (mín) 2.000 UI/kg, vitamina E (mín) 15 UI/kg, vitamina K3 (mín) 1,0 mg/kg, vitamina B1 (mín) 2,0 mg/kg, vitamina

B2 (mín) 6,0 mg/kg, vitamina B6 (mín) 3,0 mg/kg, vitamina B12 (mín) 9,0 mcg/kg, ácido fólico (mín) 1,0 mg/kg, ácido pantotênico (mín) 12,0 mg/kg, biotina (mín) 0,5 mg/kg, colina (mín) 500,0 mg/kg, niacina (mín) 20,0 mg/kg, cobre (mín) 9,0 mg/kg, ferro (mín) 40,0 mg/kg, iodo (mín) 0,7 mg/kg, manganês (mín) 90,0 mg/kg, selênio (mín) 0,4 mg/kg, zinco (mín) 50,0 mg/kg.

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

### **Colheita das células da medula óssea e teste do micronúcleo**

As medulas ósseas do fêmur dos ratos foram colhidas 72 horas após a aplicação da ciclofosfamida e da 5-FU que é o tempo necessário para ocorrer a formação dos micronúcleos em eritrócitos policromáticos conforme a recomendação de MacGregor [16]. Neste dia, os ratos foram anestesiados com 100 mg de tiopental/Kg de peso corporal e a eutanásia se deu por exanguinação conforme recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA [4]. Logo após, retirou-se o fêmur direito dos ratos e posteriormente cortou-se as epífises (proximal e distal) e procedeu a lavagem da medula óssea com 1,0 mL de soro fetal bovino (Vitrocell<sup>®</sup>, Brasil). Essas amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e realizou-se dois esfregaços das células da medula óssea em lâminas de microscopia de cada rato. Deixou-se as lâminas secarem em temperatura ambiente e procedeu a fixação com álcool metílico por 5 minutos. Após a secagem, realizou-se a coloração com o corante Giemsa 0,6% (Laborclin<sup>®</sup>, Brasil) por 30 minutos. Logo após as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Após a secagem do corante, realizou-se as leituras das lâminas em



microscópio óptico (E-200, Nikon<sup>®</sup>, Japão) contando 2.000 células viáveis para determinação da frequência de células com micronúcleos [16].

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos do consumo de água, L-arginina; ração; do peso corporal inicial, peso corporal final e da contagem dos micronúcleos apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Assim, aplicou-se a Análise de Variância *one-way* e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises aplicou-se a significância de 5% [25].

Os resultados obtidos do ganho de peso dos ratos apresentaram distribuição não normal pelo teste de Shapiro-Wilk e, portanto, aplicou-se o teste Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas pelo teste de Dunn. Em todas as análises aplicou-se a significância de 5% [25].

O coeficiente de variação de Pearson foi aplicado para avaliar a associação entre o peso corporal inicial dos ratos e formação de micronúcleos. Nesta análise aplicou-se significância de 5% [25].

## **RESULTADOS**

Os ratos dos lotes  $L_{Arg.2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg.4\%+5-FU}$  apresentaram aumento significativo ( $P > 0,05$ ) no consumo de água em relação aos lotes  $L_c$ ,  $L_{ciclo}$  e  $L_{5-FU}$  (Tabela 1). Mas não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no consumo de água entre os grupos  $L_c$ ,  $L_{ciclo}$  e  $L_{5-FU}$  (Tabela 1).

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no consumo de ração entre o  $L_c$  e os demais lotes experimentais.  $L_{ciclo}$  também diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) dos grupos  $L_c$ ,  $L_{5-FU}$ ,  $L_{Arg.2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg.4\%+5-FU}$ , enquanto entre os lotes  $L_{5-FU}$ ,  $L_{Arg.2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg.4\%+5-FU}$  não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre si (Tabela 1).

Não houve diferença significativa ( $P = 0,55$ ) no peso corporal inicial e final (72 horas após a quimioterapia) dos ratos entre os lotes experimentais (Tabela 2). Mas o peso corporal dos ratos dos lotes  $L_{5-FU}$  e  $L_{Arg2\%+5-FU}$  reduziram significativa ( $P < 0,05$ ) após a quimioterapia (Tabela 2).

Não houve correlação significativa ( $P > 0,05$ ) entre o peso corporal e ganho de peso e formação de micronúcleos (Tabela 3).

Os ratos do lote  $L_{5-FU}$  apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na formação de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos (Tabela 4). Enquanto que os ratos suplementados com 2 e 4% de L-arginina tiveram redução significativa ( $P < 0,05$ ) na contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos após a aplicação da 5-FU (Tabela 4).

A contagem de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos nos dos ratos dos lotes  $L_C$ ,  $L_{Arg2\%}$  e  $L_{Arg4\%}$  não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) (Tabela 4).

## DISCUSSÃO

Os ratos dos lotes  $L_{Arg2\%}$ ,  $L_{Arg4\%}$ ,  $L_{Arg2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg4\%+5-FU}$  tiveram maior consumo de água antes da quimioterapia por causa da palatabilidade do aminoácido adicionado (Tabela 1). Fato que também foi observado por Balmant et al. [3]. No entanto, este aumento no consumo de água pelos ratos dos lotes  $L_{Arg2\%}$ ,  $L_{Arg4\%}$ ,  $L_{Arg2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg4\%+5-FU}$  não interferiu no consumo de ração, pois os consumo de ração desses antes da quimioterapia eram semelhantes aos ratos do lote controle (Tabela 1).

Após a aplicação da 5-FU, os ratos dos lotes  $L_{5-FU}$ ,  $L_{Arg2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg4\%+5-FU}$  apresentaram redução no consumo de água e ração provavelmente devido aos efeitos colaterais da 5-FU, como a estomatite, que a suplementação com L-arginina não foi capaz de amenizar devido a semelhança na ingestão de água e ração entre eles (Tabela 1). Fato que causou a redução no ganho de peso desses ratos após a quimioterapia (Tabela 2), uma vez que não houve correlação significativa entre a formação de micronúcleos e ganho de peso e peso corporal (Tabela 3). Entretanto, Balmant et al. [3]relataram que a suplementação com L-arginina amenizou a perda de peso em ratos Wistar submetidos à quimioterapia com 5-FU. Estas diferenças ocorreram provavelmente devido as doses de suplementação com L-arginina que eram distintas. Fato, que indica que suplementação com L-

arginina pode ser dose dependente para um determinado efeito esperado, no entanto, há necessidade de novos experimentos serem realizados para o total esclarecimentos.

A formação de micronúcleos que ocorreram nos eritrócitos policromáticos dos ratos dos lotes controles  $L_C$ ,  $L_{Arg2\%}$  e  $L_{Arg4\%}$  (Tabela 4) se deu durante a divisão celular normal, devido aos erros que ocorrem nos processos de desnucleação, diferenciação e reparo de danos genéticos. Fato, que também foi observado por Hamada et al. [12] em contagem de micronúcleos em lote controle.

A aplicação da 5-FU induziu nos ratos do lote  $L_{5-FU}$  3,46 vezes mais micronúcleos do que no lote  $L_{ciclo}$  que é o lote controle positivo, mostrando que a 5-FU é mais mutagênica que a ciclofosfamida (Tabela 4) que é utilizada como droga indutora da formação de micronúcleos para comparativos de efeitos de mutagenicidade entre compostos [2]. Esta elevada formação de micronúcleos nos ratos do  $L_{5-FU}$  é indicativo que a 5-FU causou danos no DNA [8] devido ao seu mecanismo de ação, que é convertida em monofosfato de 5-fluoro-2-desoxiuridilato (FdUMP). FdUMP com TS e 5,10-metileno tetrahidrofolato e inibe competitivamente síntese de DNA [5] [23] [7]. A depleção de timidina por inibição de TS induz um desequilíbrio de pool de nucleotídeos e a má incorporação de dUTP e/ou mal mapeamento da lesão, causando rupturas no DNA [13] [9] [14] [7]. A incorporação direta de trifosfato de 5-fluoro-desoxiuridina (FdUTP) inibe a síntese de DNA. Deste modo, o metabolismo intracelular de 5-FU para FdUMP ou FdUTP conduz a efeitos citotóxicos e mutagênicos [7]. Estes danos que 5-FU causa no DNA, provavelmente, são os desencadeadores dos efeitos colaterais deste quimioterápico, tais como, leucopenia (neutropenia e eosinofilia), trombocitopenia, reduz a quantidade de hemácias, hemoglobina, hematócrito [3] e a mucosite [15].

A redução na formação de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos que ocorreu nos ratos suplementados com L-arginina  $L_{Arg.2\%+5-FU}$  e  $L_{Arg.4\%+5-FU}$  após a aplicação da 5-FU (Tabela 4), mostra que este aminoácido tem potencial para amenizar o efeito mutagênico causado pelo mecanismo de ação da 5-FU. No entanto, neste experimento não foi possível esclarecer o mecanismo antimutagênico da suplementação com a L-arginina.

A preservação da integridade do material genético é benéfica para a preservação da integridade e manutenção das funções do organismo, pois a função do DNA é carrear os genes, a informação que especifica todas as proteínas e as moléculas de RNA em um organismo, incluindo a informação sobre quando, em tipo de célula e, em qual quantidade que cada proteína deverá ser produzida [1]. Provavelmente, este efeito antimutagênico da L-arginina pode estar associado com a amenização dos efeitos colaterais causadas pela 5-FU tais como o aumento na reatividade mitogênica dos linfócitos, a citotoxicidade das células natural Killer [6], aumento a produção de IgA e redução da neutropenia, trombocitopenia [3] e mucosite [15]. Mas por outro lado, é necessário realizar novos experimentos para avaliar se este efeito antimutagênico da suplementação com L-arginina interfere ou não no crescimento do tumor e na eficiência do tratamento do tumor por meio da quimioterapia.

Os resultados obtidos permitiram concluir que as suplementações com 2% e 4% de L-arginina amenizaram o efeito mutagênico da 5-FU em ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS

1. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** DNA, Cromossomos e Genomas. In: \_\_\_\_\_. *Biologia Molecular da célula*. 5ed. pp.195-262, Porto Alegre, Artmed, 2010.
2. **Araujo-Espino DI, Zamora-Perez AL, Zúñiga-González GM, Gutiérrez-Hernández R, Morales-Velazquez G, Lazalde-Ramos BP.** Genotoxic and Cytotoxic Evaluation of *Jatropha Dioica* Sessé Ex Cerv. By the Micronucleus Test in Mouse Peripheral Blood. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017, **86**, pp. 260-264.
3. **Balmant BD, Araujo EON, Cervini CR, Yabuki D, Novais AB, Castilho ACS, Chachur MGM, Reis LSLS.** L-arginina modula ganho de peso de ratos submetidos à quimioterapia. In: VII International Conference of Nutritional Oncology (ICNO) / Congresso Brasileiro de Nutrição e câncer (CBNC) e Congresso Internacional de Nutrição, Exercício e Saúde (NEXSA), 2016, São Paulo. *Anais GANEPÃO*, 2016.

4. **Brasil, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.** Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília, Brasil, 2015. Disponível em: < [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0240/240230.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0240/240230.pdf)> . Acesso em: 31 mar. 2017.
5. **Breda MBS.** A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. *Anal Bioanal Chem* 2010, **397**, pp. 1191-1201.
6. **Brittenden J, Park KG, Heys SD, Ross C, Ashby J, Ah-See AK, Eremin O.** L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. *Surgery* 1994, **115**, pp. 205-212.
7. **Brunton LL, Goodman LS, Gilman A, Knollmann BC, Chabner B.** Análogo das pirimidinas. In: \_\_\_\_\_. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 12 ed. pp. 1695-1697, Porto Alegre: Amgh, 2012.
8. **Carvalho, CAP.** Frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes obesos. 2012, Dissertação (Doutorado em odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, São Paulo –SP.
9. **Curtin NJ, Harris AL, Aherne GW.** Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res*, 1991, **51**, pp. 2346-2352.
10. **De Souza L.P.R, De Jesus DC.** Efeitos dos imunomoduladores na oncologia: Revisão de evidências científicas. *Saúde.com* 2016, **12**, pp. 561-565.
11. **Diasio RB, Harris BE.** Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*, 1989, **16**, pp. 215-237.
12. **Hamada S, Nakajima K, Serikawa T, Hayashi M.** The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay. *Mutagenesis* 2003, **18**, 273–275.

13. **Ingraham HA, Tseng BY and Goulian M.** Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* 1982, **21**, pp. 211-216.
14. **Ladner RD.** The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci* 2001, **2**, pp. 361-370.
15. **Leocádio PC, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DC, Generoso SV, Cardoso VN, Correia MI.** L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-fu in mice. *Nutr Cancer* 2015, **67**, pp. 486-93.
16. **MacGregor JT1, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D.** Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987, **189**, pp. 103-112.
17. **Merusse JLB, Lapichick VBV.** Instalações e equipamentos. In: \_\_\_\_\_. COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (Ed). Manual para técnicos em bioterismo. 2ed. pp. 15-25, EPM, São Paulo, 1996.
18. **Nai GA, Oliveira MC, Tavares GO, Pereira LFF, Soares NDSL, Silva PG.** Avaliação da genotoxicidade induzida pela administração repetida de anestésicos locais: um estudo experimental em ratos. *Rev Bras Anesthesiol* 2015, **65**, pp. 313-315.
19. **Neto MC.** Guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia. São Paulo: Hosp. Albert Einstein, 2013.
20. **Novaes MRCG, Beal FLR.** Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. *Rev Bras Cancerol* 2004, **50**, pp. 321-325.
21. **Novaes MRCG, Pantaleão CM.** Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. *Rev C Med*, **14**, pp. 65-75.
22. **Sawada NO, Nicolussi AC, de Paula JM, Garcia-Caro MP, Marti-Garcia C, Cruz-Quintana F.** Quality of life of Brazilian and Spanish cancer patients undergoing

- chemotherapy: an integrative literature review. *Rev Lat Am Enfermagem* 2016, **24**, pp. 2688.
23. **Thomas DM, Zalberg JR.** 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998, **25**, pp. 887-895.
24. **Vilar CMC, Martins IM, Crisanto MLLP.** Abordagem terapêutica em oncologia. In: \_\_\_\_\_. *Oncologia básica*. 1ed. pp. 220-254, Teresina: Fundação Quixote, 2012.
25. **Zar J.H.** Biostatistical analysis. 4ed. pp. 663, New Jersey, Prentice-Hall, 1999.
26. **Zhang X, Sun B, Lu Z.** Evaluation of Clinical Value of Single Nucleotide Polymorphisms of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene to Predict 5-Fluorouracil Toxicity in 60 Colorectal Cancer Patients in China. *Int Journal Med Sci* 2013, **10**, pp. 894-902.

**Tabela 1-** Média ( $\pm$  desvio padrão) do consumo de água e ração de ratos suplementados ou não com L-arginina submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil e ciclofosfamida.

Lotes experimentais	Consumo médio diário			
	Água antes da quimioterapia	Água após a quimioterapia	Ração antes da quimioterapia	Ração após a quimioterapia
	(mL)	(mL)	(g)	(g)
L <sub>c</sub>	48,2 $\pm$ 6,4 <sup>Ba</sup>	47,2 $\pm$ 1,3 <sup>Ab</sup>	20,3 $\pm$ 6,7 <sup>Aa</sup>	29,6 $\pm$ 1,6 <sup>Aa</sup>
L <sub>Arg2%</sub>	60,6 $\pm$ 11,6 <sup>Aa</sup>	59,3 $\pm$ 1,2 <sup>Aa</sup>	24,9 $\pm$ 7,6 <sup>Aa</sup>	29,5 $\pm$ 1,2 <sup>Aa</sup>
L <sub>Arg4%</sub>	64,4 $\pm$ 9,1 <sup>Aa</sup>	59,6 $\pm$ 4,7 <sup>Aa</sup>	21,5 $\pm$ 10,5 <sup>Aa</sup>	29,8 $\pm$ 1,4 <sup>Aa</sup>
L <sub>ciclo</sub>		40,0 $\pm$ 8,5 <sup>AB</sup>		20,5 $\pm$ 4,9 <sup>Ab</sup>
L <sub>5-FU</sub>	45,3 $\pm$ 4,9 <sup>Ba</sup>	39,3 $\pm$ 9,5 <sup>Ba</sup>	23,4 $\pm$ 0,6 <sup>Aa</sup>	13,0 $\pm$ 1,6 <sup>Ba</sup>
L <sub>Arg,2%+5-FU</sub>	61,9 $\pm$ 12,7 <sup>Aa</sup>	38,7 $\pm$ 10,3 <sup>Bb</sup>	24,4 $\pm$ 2,3 <sup>Aa</sup>	9,0 $\pm$ 4,9 <sup>Ba</sup>
L <sub>Arg,4%+5-FU</sub>	69,3 $\pm$ 15,4 <sup>Aa</sup>	45,0 $\pm$ 1,7 <sup>ABb</sup>	26,3 $\pm$ 2,5 <sup>Aa</sup>	10,2 $\pm$ 7,9 <sup>Ba</sup>

<sup>A,B</sup> - Médias seguidas de letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no consumo de água e ração dos ratos entre os grupos experimentais.

<sup>a,b</sup> - Médias seguidas de letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o peso corporal inicial e final dentro de um mesmo grupo experimental.

L<sub>c</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*; L<sub>Arg2%</sub> e L<sub>Arg4%</sub>: ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*; L<sub>ciclo</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>5-FU</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>arg2%+5-FU</sub> e L<sub>arg4%+5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*, respectivamente, e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal.



**Tabela 2-** Média ( $\pm$  desvio padrão) do peso corporal inicial, final de água e ração de ratos suplementados ou não com L-arginina submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil e ciclofosfamida de ratos suplementados com diferentes doses de L-arginina e submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

Lotes experimentais	Peso corporal (g)		Ganho de peso (g)
	No dia da quimioterapia	72 horas após a quimioterapia	
L <sub>c</sub>	222,6 $\pm$ 72,3 <sup>Ab</sup>	271.5 $\pm$ 69.1 <sup>Aa</sup>	48.9 $\pm$ 15.9 <sup>A</sup>
L <sub>arg2%</sub>	217,6 $\pm$ 74,6 <sup>Ab</sup>	252.0 $\pm$ 63.9 <sup>Aa</sup>	34.4 $\pm$ 15.2 <sup>A</sup>
L <sub>arg4%</sub>	225,7 $\pm$ 85,3 <sup>Ab</sup>	255.5 $\pm$ 73.8 <sup>Aa</sup>	29,8 $\pm$ 14.5 <sup>A</sup>
L <sub>ciclo</sub>	245.4 $\pm$ 53.9 <sup>Ab</sup>	256.8 $\pm$ 64.8 <sup>Aa</sup>	-11.4 $\pm$ 2.4 <sup>AB</sup>
L <sub>5-FU</sub>	256.6 $\pm$ 40.2 <sup>Aa</sup>	232.3 $\pm$ 39.2 <sup>Ab</sup>	-24.3 $\pm$ 8.9 <sup>B</sup>
L <sub>Arg,2%+5-FU</sub>	263.4 $\pm$ 45.1 <sup>Aa</sup>	239.2 $\pm$ 40.1 <sup>Ab</sup>	-24.2 $\pm$ 10.6 <sup>B</sup>
L <sub>Arg,4%+5-FU</sub>	259.2 $\pm$ 50.4 <sup>Aa</sup>	244.5 $\pm$ 51.7 <sup>Aa</sup>	-14.7 $\pm$ 18.7 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> - Médias seguidas de letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no peso corporal e ganho de peso dos ratos entre os grupos experimentais.

<sup>a,b</sup> - Médias seguidas de letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o peso corporal inicial e final dentro de um mesmo grupo experimental.

L<sub>c</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*; L<sub>Arg2%</sub> e L<sub>Arg4%</sub>: ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*; L<sub>ciclo</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>5-FU</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>arg2%+5-FU</sub> e L<sub>arg4%+5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*, respectivamente, e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal.

**Tabela 3-** Coeficiente de correlação de Pearson entre o peso inicial e formação de micronúcleos de ratos suplementados com diferentes doses de L-arginina e submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

Lotes experimentais	n	Coeficiente de correlação de Pearson ( <i>r</i> )	
		Peso corporal final x formação de	Ganho de peso e formação de
		micronúcleos	micronúcleos
L <sub>c</sub>	10	-0,24	-0,23
L <sub>arg2%</sub>	10	0,47	0,47
L <sub>arg4%</sub>	10	0,27	0,27
L <sub>ciclo</sub>	10	-0,20	0,68
L <sub>5-FU</sub>	10	0,20	0,33
L <sub>Arg.2%+5-FU</sub>	10	0,33	0,18
L <sub>Arg.4%+5-FU</sub>	10	-0,09	0,10

L<sub>c</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*; L<sub>Arg2%</sub> e L<sub>Arg4%</sub>: ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*; L<sub>ciclo</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>5-FU</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>arg2%+5-FU</sub> e L<sub>arg4%+5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*, respectivamente, e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal.

**Tabela 4-** Efeito da suplementação de diferentes doses de L-arginina na formação de micronúcleos nas células da medula óssea de ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

<b>Lotes experimentais</b>	<b>Formação de micronúcleos</b>	<b>CV (%)</b>
L <sub>c</sub>	1,9 ± 0,6 <sup>D</sup>	29,9
L <sub>arg2%</sub>	1,5 ± 0,55 <sup>D</sup>	35,1
L <sub>arg4%</sub>	1,1 ± 0,3 <sup>D</sup>	28,7
L <sub>ciclo</sub>	10,4 ± 2,5 <sup>C</sup>	24,5
L <sub>5-FU</sub>	36,0 ± 8,5 <sup>A</sup>	23,5
L <sub>Arg.2%+5-FU</sub>	17,8 ± 5,1 <sup>B</sup>	28,4
L <sub>Arg.4%+5-FU</sub>	15,4 ± 5,9 <sup>BC</sup>	38,4

<sup>A,B</sup> - Médias seguidas de letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na formação de micronúcleos nos ratos entre os grupos experimentais.

L<sub>c</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum*; L<sub>Arg2%</sub> e L<sub>Arg4%</sub>: ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*; L<sub>ciclo</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 50 mg de ciclofosfamida/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>5-FU</sub>: ratos alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal; L<sub>arg2%+5-FU</sub> e L<sub>arg4%+5-FU</sub> ratos alimentados com ração comercial e foi adicionado 2% e 4% de L-arginina água *ad libitum*, respectivamente, e foi aplicado uma dose de 200 mg de 5-FU/Kg de peso corporal por via intraperitoneal.

**ANEXO 1**

**INSTRUCTIONS FOR AUTHORS – JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE**

## Manuscript Format

All materials must be written in proper and clear English. The manuscript, prepared according to "Uniform Requirements for Manuscripts" submitted to the J Vet Sci, is not returned to the corresponding author because of the incorrectness of the format.

The manuscript including tables and their footnotes, and figures legends, must be typed in double space on A4 size (21 × 28 cm) white paper, with a margin of at least 2.5 cm on each every side. Materials should be prepared with a letter quality printer using ragged right margin and standard 12 point font (Times New Roman style). Good quality photocopies are acceptable. The manuscript should be in the following sequence: abstract and keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, conflict of interest, references, tables, and figure legends. The copyright assignment form, cover letter, title page should be uploaded separate file. The abstract, references, each table and figure legend should start with a new page. All pages should be numbered consecutively starting from the title page. All tables and figures are to be numbered consecutively using Arabic numerals. Their approximate positions should be indicated in the appropriate margin of the typescript. The average size of original articles is around eight (8) printed pages including table( s), figure(s) and references (double-spaced, typewritten 16 pages). A short communication and case reports are four (4) printed pages (double-spaced, typewritten 8 pages) including the figure(s) and table(s), and there is no size limitation for reviews.

### Cover letter

The corresponding author must give written assurance that neither the submitted materials nor portions therefore have been published previously or are under consideration for publication elsewhere. When more than one related manuscript has been published or is under consideration for publication by this or other journals, authors are required to declare this in their letter and to enclose copies of those publications for an editorial perusal. Failure to do so may lead to automatic rejection of the submitted manuscript.

The corresponding author should certify that all listed authors participated meaningfully in the study and that they have seen and approved the final manuscript.

#### Title page

This should contain the title of an article, full names of author(s) and institutional affiliation(s). If several authors, and institutions are listed, they should be clearly indicated with which department and institution each author is affiliated. In separate paragraph, address for correspondence, including the name of corresponding author, address (institutional affiliation, city, zip-code and country), telephone and fax number, and e-mail address, should be given. Information concerning sources of financial support should be placed as an acknowledgment. A running title, less than ten words, should not be declarative or interrogative sentences.

1. Title: Titles should be brief but informative. It is important for literature retrieval to include the key words in the title which are necessary to identify the nature of the subject matter, including the species of the animal on which the work is done. Use of expressions such as "Studies on ....." "Observation of ....." or "Effects of ....." should be avoided, since they are not sufficiently informative. Chemical formulas or abbreviations should not be used. Titles in the form of declarative or interrogative sentences are not encouraged. Also, do not use Roman or Arabic numerals to designate that the paper is one in a series.

2. Authors and Affiliation: Authors are urged to include their full names (e.g. Michael Johns, David N. Fisher, Ana M. Fernandez Cabrera etc.). Confusion often arises in the literature when authors are identified by surname and initials only. Authors' academic degrees should not be included. The full name of institutions and subsidiary departments should be given, together with a useful address including postal code. If several authors and institutions are listed on a paper, it should be clearly indicated with which department and institution each author is affiliated. The affiliation address in each case should be indicated by superscript.

3. Running title: A brief running title should be provided, not to exceed ten words. If running title is declarative or interrogative sentences, it is not acceptable.

## Abstracts

Abstract should be concise less than 200 words for original article (100 words in case of short communication and case report) and describe in one paragraph, concisely purpose, methods, important results and describe conclusion of the study, but not repeat information already presented in the title. It should be suitable for direct inclusion in Index Medicus/Medline and CAB/ Index Veterinarius.

## Keywords

This is a list important terms relevant to the content of paper. Up to 5 keywords should be listed at the bottom of abstract to be used as index terms. For the selection of key words, please refer Medical Subject Heading (MeSH) in Index Medicus/Medline

## Introduction

This is a brief background. It is not necessary to include all of the background literature. Brief reference to the most pertinent generally is enough to inform readers with findings of others in the field. The specific questions to be addressed the study should also described. It should not contain either authors' result and conclusion.

## Materials and Methods

Experimentation of the experimental methods should be concise but sufficient for repetition by other qualified investigators. Procedures that have been published previously should not be described in detail, but merely cited with appropriate references. However, new or significant modifications of previously published procedures need full descriptions. The sources of special chemical(s), equipment(s) or preparation(s) should be given along with their company name and country. All chemicals and reagents should be used a generic name but not brand name. For animal experimentation reported in this Journal, it is expected that the "Guide for the care and use of laboratory animals" approved by the National Research Council(ILAR) in USA will have been observed. We encourage that the ethical guidelines of animal welfare committee should be cited.

Research on humans must be approved by IRB. Please refer the Declaration of Helsinki ([www.wma.net](http://www.wma.net)).

### Results

This part should be included a concise textual description of the data presented in tables and figures. Repetition of the same data in different forms should be avoided. The results should not included materials appropriate to the discussion.

### Discussion

In this section, the data should be interpreted concisely without repeating material already presented in the results section. It should be considered the results in relation to any hypotheses advanced in the introduction. This may include an evaluation of the methodology and of the relationship of new information to the knowledge in that field.

### Acknowledgments

All person who have made a genuine contribution and who endorse the data and conclusions may be included. Authors are responsible for obtaining written permission to use any copyrighted text and/or illustration

### Conflict of Interest

Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationship that inappropriately influence his/her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). All authors should disclose their conflict of interest, i.e., (1) financial relationships such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, (2) personal relationship, (3) academic competition, and (4) intellectual passion. These conflicts of interests must be included in the end of manuscript.

### References

The references section must include all relevant published works, and all listed references must be cited in the text. Arrange the references in alphabetical order by the first author's surname, and



number the entries consecutively. And the cited references in the text should be cited by their list number. Cite each listed reference in the text by number in square brackets. Journal name should be abbreviated in accordance with the style of Index Medicus/Medline ([www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html)). The number of references should be less than forty (40) for original article and fifteen (15) for short communication and case report. Follow the styles shown in the example below:

Brock TD, Madigan MT. *Biology of Microorganism*. 5th ed. pp. 42-59, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1988.

Berghoff N, Suchodolski JS, Steiner JM. Association between serum cobalamin and methylmalonic acid concentrations in dogs. *Vet J* 2012, 191, 306-311.

Palmer N, Jensen ML, Raine H. Tumors of joint. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Burke E (eds.). *Pathology of Domestic Animals*. 2nd ed. pp. 140-144, Academic Press, San Diego, 1993.

Rogers PL, Lee KJ, Skotnicki ML, Fiecher DE (eds.). *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 23. pp. 15-25, Springer-Verlag, Berlin, 1999.

Alberghina D, Amorini AM, Lazzarino G. Modulation of peripheral markers of the serotonergic system in healthy horses. *Res Vet Sci* 2010. Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.06.023.

The following types of references are not valid for listing: unpublished data, personal communication, manuscripts in preparation or submitted, pamphlets, thesis for a degree, proceedings, abstracts, patents, newsletters, website, in press and material that has not been subjected to peer review. However, article(s) that can be available in Medline/PubMed and SCOPUS can be used as reference(s).

#### Tables and Figures

Tables should be typewritten separately from the text, double spaced, and each table should include a title. Arrange the data so that columns of like material read down, not across. Figures should be included separately from the text, and ordinarily be original drawings. However, glossy

photographs of line- drawing are usually satisfactory. In each original line-drawing, letters or numbers should be left blank because they will be typed in during printing. Letters or numbers should be included in the figures contained in a submitted manuscript along with caption for figures. Figures should be submitted in final size (printed 1 : 1). They may be printed in either single column (75 mm width) or double column (165 mm width) format. The size of text in figures should be 8~10 points, except for single letter markers which may be 12 points. Numbers, letters, and symbols used in multi-paneled figures must be consistent. Authors should place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table. For footnotes use the following symbols, in sequence: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ††††....

Draw each curve with a different kind of line (solid, dashed, dotted) or with a different symbol for the plotted points dot, triangle and square in order of ○, ●, △, ▲, □, ■, ◐....

All figures should be created with applications that are capable of preparing high resolution TIFF, JPEG or PPT files acceptable for publication. Diagrams and photographs submitted in electronic format must be of the following minimum resolutions:

\*600 dpi for photographs or halftones with B/W, color or line art work as insets or lettering

\*1200 dpi for line art work and artwork with greyscale

All kinds of figures may be reduced, enlarged or trimmed for publication by the Editor. The figure numbers should be appeared directly at the lower left corner. And then symbols, arrows, or letters used in photographs could be possible to rearrange for journal format.

#### Nomenclatures, Unit, and Abbreviations

Nomenclatures for chemicals and biochemicals, microorganism, and genes should follow the guidelines in the instructions to authors of journals published by American Society for Microbiology. SI units (System International Unites) should be used whenever possible. Abbreviations should be used for those recommended by IUPA-IUB Commission on Biochemical Nomenclature and Related Documents. In addition to abbreviation to SI unit, other common

abbreviations may be used without definition. (the same abbreviations are used for plural forms):  
hour(s) = h, minute(s) = min, second(s) = sec, liter(s) = L, mililiter(s) = mL, meter(s) = m,  
centimeter(s) = cm, gram(s) = g, miligram(s) = mg, microliter(s)=  $\mu$ L, micrometer(s) =  $\mu$ m,  
micron(s) =  $\mu$ m, standard deviation = SD, standard error = SE, molar = M, mole = mol.

#### Alteration in proof

The J Vet Sci provides corresponding author with galley proofs for their correction. Corrections should be kept to minimum. The Editor retains the prerogative to question minor stylistic alterations and major alteration that might affect the scientific content of the paper. Fault found after publication is a responsibility of the authors. We urge our contributors to proofread and their accepted manuscript very carefully. The corresponding author may be contacted by Editorial Office, depending on the nature of correction in proof. If the proof is not returned to Editorial Office within 48 hours, it may be necessary to reschedule the paper for a subsequent issue. Extensive alteration in proof cause delays in publication.

Publication is usually in order of acceptance after review. For publication, authors should be charged the following fees.

**ANEXO 2**

**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) E**

**COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)**

---

# UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

---

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA NA FRAGMENTAÇÃO DOS CROMOSSOMOS EM RATTUS NOVERGICUS LINHAGEM WISTAR SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número n° 2817 e tendo como participante(s) LUÍS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS (responsável), MARCELO GEORGE MUNGAI CHACUR (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), ROGERIO GIUFFRIDA (docente), CAROLINE GIL DUNDI (discente), ELOISA ORTEGA NAZARIO DE ARAUJO (discente), SANDRA CRISTINA GENARO (discente), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 11 de Janeiro de 2016.



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



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

valide este documento em [www.unoeste.br/sgp](http://www.unoeste.br/sgp) informando o código de segurança 900bd18a60a1ff14fec452874a4fb316