



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**RESTABELECIMENTO DA BARREIRA MORFO-FUNCIONAL INTESTINAL  
ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA  
E PEPTÍDEOS EM CAMUNDONGOS COM MUCOSITE INDUZIDA POR 5-  
FLUOROURACIL**

MESTRANDO: MANUEL CARLOS SERRA AZUL MONTEIRO

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. ALDO ÂNGELO MOREIRA LIMA

FORTALEZA – CEARÁ

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

M778r Monteiro, Manuel Carlos Serra Azul  
Restabelecimento da barreira morfo-funcional intestinal através da  
suplementação com glutamina, e peptídeos em camundongos com  
mucosite induzida por 5-fluorouracil / Manuel Carlos Serra Azul  
Monteiro. – Fortaleza, 2006.  
106 f : il.  
Orientador: Professor Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade  
de Medicina, Fortaleza – Ce, 2006.  
1. Mucosite. 2. Quimioterapia. 3. Glutamina. 4. Suplementação  
alimentar. I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (orient.). II. Título  
CDD 616.994341

**MANUEL CARLOS SERRA AZUL MONTEIRO**

**RESTABELECIMENTO DA BARREIRA MORFO-FUNCIONAL INTESTINAL  
ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA  
E PEPTÍDEOS EM CAMUNDONGOS COM MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Dissertação submetida ao programa de pós graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Farmacologia.

**ORIENTADOR: PROF. DR. ALDO ÂNGELO MOREIRA LIMA**

**FORTALEZA, 31 DE JULHO DE 2006.**

MANUEL CARLOS SERRA AZUL MONTEIRO

**RESTABELECIMENTO DA BARREIRA MORFO-FUNCIONAL INTESTINAL  
ATRAVÉS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA  
E PEPTÍDEOS EM CAMUNDONGOS COM MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

APROVAÇÃO: 31/07/2006

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador-UFC)

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Vilma de Lima (UFC)

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (UFC)

*“META a gente busca.  
CAMINHO a gente acha  
DESAFIO a gente enfrenta  
DESEJO a gente mata  
VIDA a gente inventa  
SONHO... Se realiza!”*

*Autor desconhecido*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais por me permitirem estar aqui neste momento.*

*À minha esposa Sandra pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos.*

*À minha irmã pela solidariedade de toda uma vida.*

*Ao meu orientador e chefe Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pela paciência e tolerância as quais me dedicou durante a confecção deste trabalho.*

*Aos Professores Dr<sup>s</sup> Vilma de Lima e Reinaldo Barreto Oriá por se disporem a participar da banca de defesa da dissertação.*

*Aos bolsistas Manuel Bonfim Braga-Neto, Carolina Veras Aguiar e Andréa Bessa C. Braga, Alexandre Farias Monte Monteiro e os demais pela ajuda e interação.*

*Aos colegas de Pós Graduação pelas horas de companheirismo e troca de idéias.*

*Ao professor Dalgimar Meneses, pela imensa disponibilidade na análise histopatológica.*

*Ào, Bento Fc<sup>o</sup> de Oliveira, Jociê Andrade Silva, Terezinha F. França, Maria do Carmo Nunes Pinho, Conceição de M<sup>a</sup> N. Raulino, F<sup>ca</sup> Gardênia de S. Lourenço, Charliene S. Melo, Domingos B. de Oliveira, José Amadeus de Sousa, José Ivan R. de Sousa e Elisabeth Torres Rodrigues Lima pelo inestimável ajuda nos serviços de Biotério e de laboratório, que de alguma forma ajudaram no bom andamento deste trabalho.*

*Ao Manuel Barboza Jr. e Verônica O. Silva, pela ajuda no HPLC.*

*Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas e aos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; em especial à Kátia Lima Nogueira, Fabiana M<sup>a</sup>. S. do Nascimento, Aura Rhanes F. N. Yida e Sílvia M<sup>a</sup> A. Lima, e à M<sup>a</sup> Rosilene M. Ferreira, Francisco Ant<sup>o</sup> T. Nunes, Fernando R. Teixeira, Irislene F. de Assis, Joana B. de Moura e Marta Célia A. de Freitas.*

*Em especial a Roberto Hugo Limaverde Nunes pela ajuda inestimável.*

*À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, representada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Elisabete Amaral de Moraes, pela atenção dispensada à defesa desta dissertação.*

*E finalmente à FUNCAP Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, pelo apoio financeiro.*



## SUMÁRIO

<b>Item</b>	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	x
Lista de gráficos	xii
Lista de tabelas	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1- Considerações iniciais: Biologia da sistema digestório	20
1.2- Barreira morfo-funcional do intestino	23
1.3- Injúria intestinal e 5-Fluorouracil	25
1.4- Glutamina e sistema digestório	28
1.5- Migração e diferenciação celular intestinal	31
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
2.1- Geral	38
2.2- Específicos	38
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
3.1- Animais	40
3.2- Material	41
3.3- Drogas e soluções	41
3.4- Outros equipamentos	45
3.5- Avaliação metabólica, toxicológica e morfométrica da injúria induzida por 5-fluorouracil	46
3.6- Avaliação da eficácia da suplementação <i>in vivo</i> de glutamina e derivados na injúria induzida por 5-Fluorouracil.	50
3.7- Permeabilidade intestinal em camundongos suplementados com e glutamina e derivados.	53
3.8- Análise estatística	57

<b>4-RESULTADOS</b>	58
4.1- <i>Screening</i> das doses de 5-Fluorouracil para indução de injúria intestinal em camundongos.	59
4.2- A administração subcutânea de 5-Fluorouracil induz declínio ponderal em camundongos.	63
4.3- A administração subcutânea de 5-Fluorouracil reduz a ingestão de ração em camundongos.	64
4.4- Alteração da barreira morfofuncional do intestino delgado induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.	67
4.5- Restabelecimento do perfil ponderal em camundongos com mucosite intestinal e suplementados com glutamina, alanil-glutamina e peptídeos ricos em glutamina.	69
4.6- Restabelecimento da barreira morfofuncional do intestino delgado com a suplementação de glutamina, alanil-glutamina e peptídeos ricos em glutamina.	71
4.7- Restabelecimento da proliferação celular na injúria intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos.	77
4.8- A suplementação com glutamina restabelece a permeabilidade intestinal	80
<b>5-DISCUSSÃO</b>	83
<b>6-CONCLUSÕES</b>	90
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{mol}$	Micromol
Ala-Gln	Alanil-glutamina
DEP	desnutrição energético protéica
DHFR	Diidrofolato redutase
EPM	Erro padrão da média
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramma
Gli	Glicose
Gln	Glutamina
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
Hyp	Hyprol
Hyfo	Hyfoama
HPLC ( <i>High performance liquid cromathography</i> )	Cromatografia Líquida de alta precisão
IBIMED	Instituto de Biomedicina
IL	Interleucina
L/M	Razão lactulose/manitol
mg	Miligrama
ml	Mililitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
PBS ( <i>Phosphate buffer saline</i> )	Salina tamponada com fosfato
RPCH	Ração pobre em carboidrato
RPM	rotações por minuto
sc	Via subcutânea
TNF <i>Tumor necrose factor</i>	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** –1A – Principais segmentos do intestino delgado, responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes; 1B – Detalhe das vilosidades intestinais onde ocorre a absorção de nutrientes.

**FIGURA 2** - Desenho esquemático das zônulas de oclusão (*Tight junction*), desmossomos, hemidesmossomos e junções GAP. Além de detalhe de microscopias óptica e eletrônica. Efeituam as junções entre células, como as do enterócito de formas diferentes, possibilitando a permeação de íons e outras substâncias. Fonte: [www.users.rcn.com](http://www.users.rcn.com)

**FIGURA 3** –Desenho esquemático da proliferação e diferenciação celular intestinal. As células progenitoras (*stem cells*) localizam-se nas criptas na camada basal podendo se diferenciar em outros tipos celulares que não só enterócitos; as células diferenciadas ao longo dos vilos na camada funcional; e as em diferenciação ao longo do eixo cripta-vilo, na camada intermediária.

**FIGURA 4** - Representação esquemática da química da formulação capecitabine (5-fluorouracil) e de sua interconversão em falso nucleotídeo para interagir com a timidilato sintase.

**FIGURA 5-** Após injúria intestinal, o aumento da permeabilidade pode ocasionar translocação bacteriana, migração de leucócitos para o foco inflamatório e liberação de citocinas, ativando o eixo hipotálamohipofisário. Estes eventos induzem a liberação de Gln a partir do músculo esquelético e dos pulmões para a circulação. Subseqüentemente a Gln mobilizada é utilizada no reparo da barreira intestinal lesada (adaptado de SOUBA, W. W., 1994).

**FIGURA 6-** Fotografia da mucosa do intestino delgado, com detalhes de vilo (A) e cripta (B). As *stem cells* estão agrupadas no compartimento da cripta intestinal e migram ao longo do vilo diferenciando-se em células colunares (C) , mistas (MIX) ou mucosas (M), ocorrendo dispersão clonal durante a migração. Fonte: [www.biocell.org](http://www.biocell.org)

**FIGURA 7** – Fotografia de uma gaiola metabólica em inox completa. (A) Gaiolas individuais (B) para estudos metabólicos com ratos e camundongos.

**FIGURA 8** – Fotografia de um aparelho de Cromatografia líquida de alta performance (A), do conjunto integrado com computador (B) para “tratamento” dos dados utilizando o software *Peaknet* (C).

**FIGURA 9** – Delineamento experimental para avaliação metabólica de camundongos submetidos à injúria experimental com 5-Fluorouracil.

**FIGURA 10**- Delineamento experimental para avaliação morfométrica de camundongos submetidos à injúria experimental com 5-Fluorouracil.

**FIGURA 11**- Representação fotográfica da morfometria intestinal.

A, Mensuração, em microscopia óptica, de vilos (V) e criptas intestinais (C) em ocular milimetrada ( $\mu\text{m}$ ), B (40X), com coloração HE. B, Esquema fotográfico da visualização na lâmina histológica, na região da cripta intestinal para contagem das células caliciformes (A, ver setas azuis) e células de Paneth (B, ver seta azul) (Fotomicrografia, 400x, HE).

**FIGURA 12**- Representação esquemática das fases da mitose e das características celulares (fonte: Nelson & Cox, 2000).

**FIGURA 13**- Representação histológica da visualização de mitose (setas menores) com condensação do material cromossômico e apoptose (setas largas) com desaparecimento da carioteca e extravasamento do conteúdo citoplasmático, no campo da cripta de Lieberkühn (fonte: Nelson & Cox, 2000).

**FIGURA 14**- Representação esquemática da permeação dos açúcares lactulose e manitol através da mucosa intestinal, no teste de lactulose-manitol.

**FIGURA 15**- Delineamento experimental para o teste Lactulose/Manitol (L/M) com ração RHOSTER

**FIGURA 16**- Etapas para análise das amostras de urina no teste L/M.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Sobrevida de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os eventos são apresentados como dados brutos (n=10/grupo). Cada evento corresponde a 10% de ocorrência de mortalidade de cada animal. Pelo teste de Longrank, as curvas são significativamente diferentes (\*  $p < 0,0013$ ).

**Gráfico 2:** Alteração da massa corpórea durante (A) e após (B) o tratamento com 5-fluourouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

**Gráfico 3:** Alteração do comportamento alimentar de ração (A) e de água (B) o tratamento com 5-fluourouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

**Gráfico 4:** Análise morfométrica de vilos (A) e de criptas (B) no intestino delgado de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

**Gráfico 5:** Evolução da massa corpórea durante após o tratamento com 5-fluourouracil (5-FU) na dose 100 mg/kg/dia s.c. com 0,25 ml/animal de PBS (controle) ou solução contendo glutamina (GLN), alanil-glutamina (AG) e suplementos ricos em glutamina, Hyprol 4107 (HYP) e Hyfoama 77 (HYFO) . Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

**Gráfico 6:** Análise morfométrica de vilos (A) e de criptas (B) no duodeno de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 7:** Análise morfométrica de vilos (A) e de criptas (B) no jejuno de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 8:** Análise morfométrica de vilos (A) e de criptas (B) no jejuno de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 9:** Análise morfométrica de vilos (A) e de criptas (B) no jejuno de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 10:** Ocorrência de apoptose no Duodeno (A) e no Jejunó (B) em criptas de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 11:** Ocorrência de apoptose no Intestino Médio (A) e no Íleo (B) em criptas de camundongos inoculados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 12:** Taxa de recuperação urinária de lactulose/manitol (L/M) em camundongos com injúria intestinal (n=6 animais/grupo) induzida por 5-Fluorouracil (100 mg/kg/dia s.c.) Os animais foram suplementados durante três dias com alanil-glutamina (Ala-Gln) na dose de 0,6g/kg/dia s.c. A urina foi coletada após a administração via gavagem de 0,25 ml solução de lactulose/manitol, e uma alíquota foi usada para determinação em HPLC. Os valores são apresentados como média±EPM (erro padrão da média). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**Gráfico 13:** Percentual de excreção urinária de manitol (A) e de lactulose (B) em camundongos com injúria (n=6 animais/grupo), induzida por 5-FU (100 mg/kg/dia s.c.). Os camundongos foram suplementados, durante 3 dias, com glutamina (GLN) e Alanil-Glutamina (AG), na dose de 0,6 g/kg/dia s.c. A urina foi coletada 24 horas após administração via gavagem de 0,25 ml/animal de solução lactulose-manitol, e uma alíquota foi usada para determinação em HPLC. Dados apresentados como média±EPM (erro padrão da média), n=8 animais/grupo. Para diferenças estatísticas entre os grupos utilizou-se ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).



## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** - Ocorrência de diarreia e sobrevida em camundongos (n=10/grupo) inoculados com 0,25 ml de 5-Fluorouracil (50, 100 e 150 mg/kg/dia sc) ou PBS (controle). Os valores são apresentados como percentagem.

**TABELA 2** – Avaliação metabólica em camundongos (n=10/grupo) inoculados com 0,25 ml de 5-Fluorouracil (50, 100 e 150 mg/kg/dia sc) ou PBS (controle). Os valores referentes à ingestão de ração, de água e alteração ponderal são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das variações mensuradas diariamente (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

## RESUMO

**Restabelecimento da barreira morfo-funcional intestinal através da suplementação com glutamina, alanil-glutamina e peptídeos em camundongos com mucosite induzida por 5-fluorouracil.** Manuel Carlos Serra Azul Monteiro. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), como pré requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Alterações patológicas nos teciduais podem ser ocasionadas por doenças e antimetabólitos como o 5-Fluorouracil (5-FU), acometendo o sistema digestório. Para que o processo absorptivo ocorra normalmente, a barreira epitelial do intestino deve estar íntegra e com taxa de renovação celular adequada. A ação antiproliferativa do 5-FU resulta, principalmente, de apoptose, conseqüente à lesão do DNA. Propomos neste estudo que glutamina (Gln), alanil-glutamina (Ala-Gln), Hyprol 4107 e Hyfoama 77 possam agir como fatores tróficos para o epitélio intestinal. A depleção do *pool* de Gln conduz à atrofia de vilos no intestino delgado, a qual parece estar associada a uma interrupção na barreira intestinal. Objetivamos investigar a mucosite intestinal induzida por 5-FU, e a eficácia da suplementação com glutamina (Gln), alanil-glutamina (Ala-Gln), Hyprol 4107 (HYP) e hyfoama (HYFO) nesta condição clínica. Foram utilizadas as avaliações morfométricas, metabólicas e a de permeabilidade intestinal [(teste lactulose/manitol (L/M)] em camundongos (n=180)). A mucosite intestinal foi induzida por 5-FU (100 mg/kg/24h s.c., durante 3 dias) validada em camundongos, observando-se diarreia e prejuízo no estado nutricional (-1,88±0,537 g) estabelecido após o 3º dia de tratamento. A análise morfométrica demonstrou achatamento de vilos (251±6,07 µm) e hiperplasia de criptas (128,3±4,98 µm) intestinais com aumento do número de apoptoses (13,5±1,89/cripta), no duodeno e no jejuno. A taxa L/M no grupo 5-FU foi maior que no controle (0,27±0,05). A suplementação de Gln, Ala-Gln e peptídeos melhoraram o ganho ponderal e a ingestão de ração, as alterações morfológicas e a apoptose (2,25±0,63), no modelo de mucosite intestinal. Nenhuma alteração foi observada no padrão de mitoses nas criptas intestinais. A suplementação nutricional reduziu na mucosite, a elevação das taxas de L/M [de 0,86 para 0,45 (Gln)] nas vias paracelular e transcelular. Nossos resultados sugerem que, o restabelecimento da barreira morfofuncional, induzido pela suplementação, foi obtido através do fornecimento de substrato energético para o enterócito, inibição de apoptose. Então sugerimos que o uso de suplementos ricos em Gln e peptídeos pode prevenir a desnutrição e reduzir as doenças diarreicas melhorando a morfo fisiologia da barreira intestinal.  
Suporte financeiro: FUNCAP.

## ABSTRACT

Restablishment of intestinal barrier function with glutamine, alanyl-glutamine supplementation and peptides enriched on intestinal mucositis induced by 5-Fluorouracyl: Manuel Carlos Serra Azul Monteiro. Dissertation submitted as a partial fulfillment of the requirement to the title of Master in Pharmacology to the Graduation Pharmacology Course of Physiology and Pharmacology Department of the Medicine Faculty, Federal University of Ceará. Defense date: 2006, July 31. Professor: MD. PhD. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Pathological disturbances and antineoplastic drugs like 5-Fluorouracyl (5-FU) cause consequences of diarrheal diseases. Intestinal barrier must be preserved to absorptive functions. Antiproliferative action of 5-FU results of apoptosis upon DNA lesion. In order to investigate the intestinal mucositis 5-FU-induced and the efficacy of glutamine (Gln), alanyl-glutamine (Ala-Gln), hyprol 4107 (HYP), hyfoama 77 (HYFO) supplementation, on this clinical condition, we used intestinal perfusion approach in mice (n=344) and rabbits (n=72). To evaluate Gln, Ala-Gln, Hyprol 4107 and Hyfoama 77, we used morphometric, metabolic techniques and intestinal permeability test (lactulose/mannitol, L/M). Intestinal mucositis induced by 5-FU in mice was validated by diarrhea occurrence and impaired nutritional status ( $-1,88 \pm 0,537$  g) establishments, after 3<sup>th</sup> day of 5-FU treatment. Morphometric analysis of duodenum and jejunum, demonstrated a flattening villous ( $251 \pm 6,07$   $\mu$ m) and hyperplastic crypts ( $128,3 \pm 4,98$   $\mu$ m), as well as an increase in apoptosis ( $13,5 \pm 1,89$ /crypt). L/M rate was greater in 5-FU group than control group ( $0,27 \pm 0,05$ ). Gln, Ala-Gln and peptides improved weight gain and a food intake in mucositis model. Nutrients supplementation reduces morphologic alteration and the increased apoptosis ( $0,25 \pm 0,05$ ). No changes were observed at intestinal mitosis profile, upon 3<sup>th</sup> day of 5-FU treatment. This supplementation improved transcellular and paracellular routes by establishment of intestinal permeability (0.35 to 0.73) in mucositis. Our results suggest that the improvement of intestinal barrier function was induced by an increase energy substrate to enterocyte, inhibition of apoptosis in crypts. So we suggest that gln and peptides supplementation could prevent the malnutrition, reduce diarrheal diseases and ameliorate intestinal barrier function.

Financial support: FUNCAP.

# INTRODUÇÃO



## 1) Considerações iniciais

Os animais diferem entre si em tamanho, estrutura física, modo de vida e outras características. Há no mundo, uma diversidade enorme de espécies, excedendo a estimativa de 1 milhão. Apesar do grande número de diferentes animais no planeta, os processos biológicos básicos para assegurar a manutenção da vida têm semelhanças em todos eles. A composição básica celular de todos os animais é formada por membrana celular, citosol, carioteca e núcleo. Dentro deste último dá-se a integração das informações genéticas inseridas nos cromossomas de cada espécie. Daí obter-se similaridade porém não igualdade de funções biológicas em diferentes espécies ou até mesmo entre indivíduos da mesma espécie.

Os mamíferos constituem um dos grupos mais complexos do Reino Animal, e muitos possuem hábitos noturnos como os roedores. Nas pesquisas laboratoriais, alguns dos mais utilizados são o camundongo (*Mus musculus*) e o rato (*Ratus norvegicus*). O camundongo é sem dúvida o animal mais utilizado em pesquisa de laboratório. Isto se deve ao seu tamanho pequeno, maturidade sexual precoce (a partir dos 30 dias de vida), fertilidade alta, período curto de gestação e uma semelhança genômica evidente com o ser humano. Seu consumo diário de água é cerca de 2 a 3 vezes a quantidade de alimento seco ingerido; e de ração cerca de 4 a 5 gramas/dia (a suplementação é desnecessária para animais sem carências nutricionais). Em seguida o rato, que não possui vesícula biliar, o que confere ao mesmo maior sensibilidade a drogas administradas por via oral. Para ambos, rato e camundongo, a temperatura ambiental ideal é de cerca de 21° C e a iluminação de 12 a 14 horas/dia.

Resultados de estudos científicos básicos utilizando estes animais permitiram a evolução na descoberta de novos fármacos e/ou alteração de hábitos. Tais estudos são registrados em publicações científicas, de modo que se transforma a experiência acumulada e verificada em conhecimento exato (Store , 1986). A Biologia, por sua vez trata de fenômenos da natureza, e mais

especificamente, dos seres vivos, incluindo nestes, os utilizados em pesquisas experimentais. Para tais estudos, desenvolvem-se modelos experimentais que buscam reproduzir enfermidades ocorrentes em seres humanos. Tais modelos, no entanto, são limitados quanto à reprodução de todos os processos bioquímicos e fisiológicos entre animais experimentais e humanos, mesmo considerando uma homologia alta entre os respectivos cromossomas contidos no DNA (ácido desoxiribonucléico) de cada espécie. Atualmente as doenças diarréicas constituem-se como enfermidades de saúde pública, sendo estudadas com maior interesse. Para tal estudo, no entanto é necessário o conhecimento da anatomia e fisiologia do trato digestório.

### **1.1) Biologia do sistema digestório**

Através do movimento do alimento ao longo do sistema digestório, da digestão e absorção dos produtos digeridos, da circulação sanguínea para transporte e da participação dos sistemas nervoso e hormonal, ocorre um suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes ao organismo. O sistema nervoso entérico possui cerca de 100 milhões de neurônios e controla a motilidade gastrointestinal, propiciando a manutenção das condições fisiológicas.

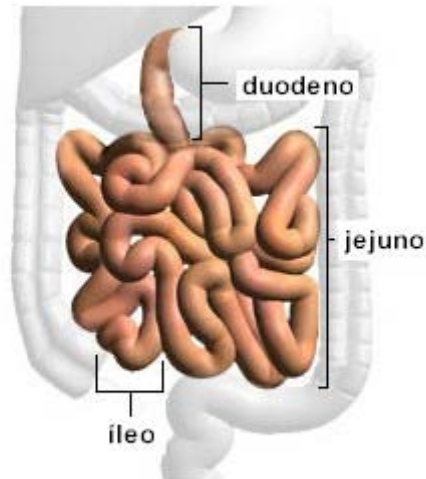
O peristaltismo intestinal não constitui uma barreira propriamente dita, mas regula a velocidade do trânsito intestinal e conseqüentemente com o conteúdo luminal (enzimas, nutrientes e microorganismos). O muco, rico em mucina, lactoferrina, lisozima e IgA, age como uma barreira física seletiva, permitindo a difusão de substâncias de baixo peso molecular, e dificultando a passagem de macromoléculas e de microorganismos. Já o glicocálix, distribuído entre as microvilosidades que estruturam a superfície apical dos enterócitos, funciona também como uma barreira física. O tecido epitelial é constituído por uma única camada de células e tem no enterócito seu constituinte principal e mais abundante. Encontram-se também células caliciformes, células de Paneth, as células M e os linfócitos intraepiteliais (NEUTRA, 2001).

Os enterócitos são células colunares, fisiologicamente responsáveis pela absorção seletiva de nutrientes, apresentando também as funções de síntese e secreção de glicoproteínas constitutivas dos glicocálix. Encontram-se conectadas umas às outras pela região apical através das zonas de oclusão, controlando a permeabilidade seletiva. Essas junções são mantidas de forma eficiente durante o processo de renovação (*turnover*) epitelial. Fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e substratos metabólicos tais como a glutamina regulam a proliferação e a diferenciação celular, a partir da cripta em direção à vilosidade. Assim as células epiteliais na cripta são indiferenciadas, e qualquer alteração no ciclo celular destas modifica a fisiologia intestinal normal (Slorach, 1999).

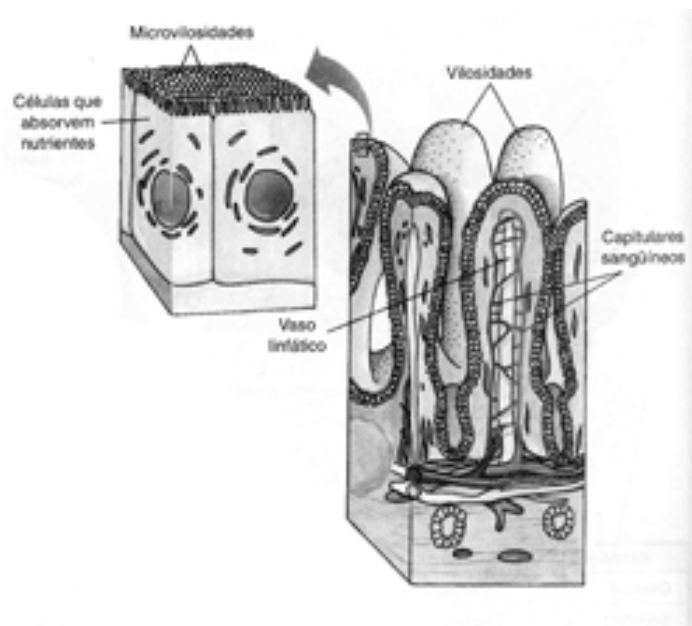
A hidrólise no sistema digestório, sobre carboidratos, proteínas e lipídeos origina frutose, galactose, glicose, aminoácidos, glicerol e ácidos graxos levando a uma absorção mais eficiente pelas vilosidades intestinais, (**figura 1 A**), e melhor transporte destes para os tecidos orgânicos.

Quanto ao local de absorção, no duodeno são absorvidos aminoácidos, vitaminas A e B, ácidos graxos, monossacarídeos e cálcio. No jejuno, além destas vitaminas são absorvidos, dipeptídeos e dissacarídeos, além de ácido fólico e ferro. E no íleo, sódio, cloreto e vitamina B<sub>12</sub> (fator intrínseco).

Alterações patológicas nos tecidos estruturais podem ser ocasionadas por doenças que acometem o sistema digestório. Tais doenças incluem as gastroenterites com ocorrência de diarreia, náuseas e vômitos. Isto reduz a absorção de nutrientes e energia, principalmente pela lesão das microvilosidades (**figura 1B**), e aumentando as necessidades teciduais dos mesmos, necessitando às vezes de suplementação. Outra condição que também pode afetar os processos de digestão e absorção intestinais é o uso de antineoplásicos. Esses agentes antimetabólitos possuem ação inespecífica na destruição das células malignas, interferindo assim na biologia de outras células que possam estar em divisão celular ativa (Kwok & Schubert, 2000).



1A



1B

FIGURA 1: **Desenhos esquemáticos do intestino delgado.** 1A –Aspectos anatômicos do duodeno, jejuno e íleo segmentos do intestino delgado, responsável pela digestão e absorção de nutrientes; 1B – Detalhe das vilosidades intestinais onde ocorre a absorção de nutrientes.



## 1.2) Barreira morfofuncional do intestino

A integridade do trato gastrointestinal possibilita uma adequada absorção de nutrientes. Macro e micronutrientes entram no organismo através do intestino, e fornecem solutos e solventes para os fluidos corporais. Cerca de 7 a 10 litros de água por dia, são permeados pelo intestino delgado. Destes apenas 2 litros são provenientes de alimentos e líquidos da dieta. O restante é originado de secreções do trato gastrointestinal (TGI), e apenas 600 ml/24h atinge o cólon, indicando uma maior absorção dos fluidos pelo intestino delgado (GUYTON,1998). Já os íons movem-se entre o lúmen e o sangue através das vias transcelulares e paracelulares, utilizando os transporte passivo e ativo, bem como a difusão simples e facilitada.

O íon  $\text{Na}^+$  é permeado através dos espaços laterais. Este movimento é regulado pelas zônulas de oclusão (*tight junctions*, **figura 2**), sendo afetado pelas forças de “Starling” e pelos gradientes eletroquímicos. As zônulas de oclusão são cerca de 2 vezes mais permeáveis ao sódio, ao potássio e ao cloreto. Os poros através dos quais ocorre a permeação, possui 70 a 80 nm para a passagem de moléculas maiores, e no íleo, cerca de 30 a 40 nm. Isto restringe o transporte passivo de solutos no intestino distal e induz, determinados solutos, a exercerem maior pressão osmótica. Entretanto, a permeabilidade reduzida faz com que o transporte mediado por carreador seja o mais importante responsável para o transporte líquido para fora do lúmen intestinal (JOHNSON, 1997).

Fatores que ocasionem a retenção osmótica de água no lúmen intestinal ou estimulem a secreção de fluido, podem induzir diarreia. Condições patológicas como deficiência de dissacaridases ou ainda o insulto por drogas citotóxicas, como o metotrexato, podem conduzir a um estado diarreico por hiperosmolaridade ou por injúria intestinal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004), respectivamente. A diarreia volumosa é ocasionada em parte, pela falência do mecanismo absorptivo. Em sua maioria, os episódios diarreicos são precedidos por alteração na permeabilidade devido às lesões no epitélio intestinal.

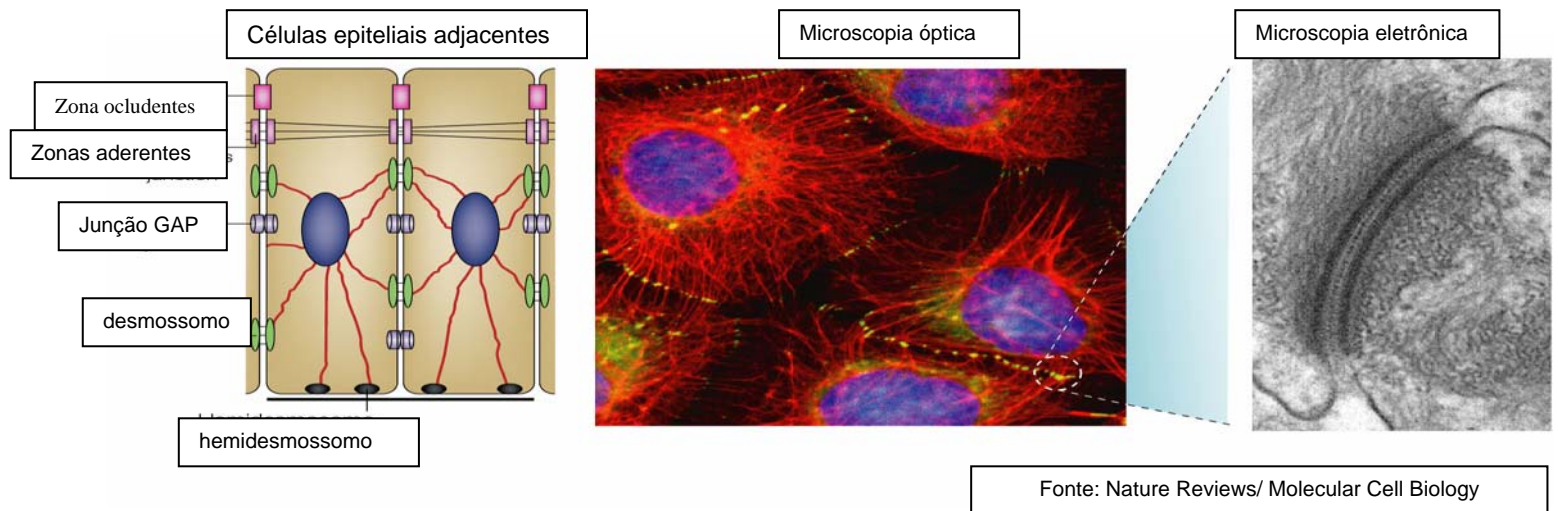


FIGURA 2: **Desenho esquemático** das zônulas de oclusão (*Tight junction*), desmossomos, hemidesmossomos e junções *GAP*. Além de detalhe de microscopias óptica e eletrônica. Efeetam as junções entre células, como as do enterócito de formas diferentes, possibilitando a permeação de íons e outras substâncias. Fonte: [www.users.rcn.com](http://www.users.rcn.com)

### 1.3) Injúria intestinal e 5-Fluorouracil

A mucosa intestinal além de ser acometida por agentes infecciosos, pode ainda ser alvo de agentes antimetabólitos, os quais alteram a morfofisiologia do sistema digestório. Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os citotóxicos, afetam o processo de divisão celular, tendo assim ação antiproliferativa. Portanto, não possuem ação sobre o poder de invasão, nem sobre a perda de diferenciação ou a tendência a sofrer metástase. A ação antiproliferativa resulta, principalmente, de uma ação durante a fase S do ciclo celular, sendo a apoptose resultante do DNA lesado. Além disso, como seu principal efeito é observado sobre a divisão celular, esses agentes irão afetar todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, tal como o intestinal. Isto produz retardo do crescimento em crianças, cicatrização deficiente de feridas e lesão do epitélio do sistema digestório. Os antimetabólitos assemelham-se estruturalmente com o ácido fólico e as bases purina e pirimidina envolvidas na síntese de DNA e RNA (ácido ribonucléico) e de determinadas enzimas, tal como a tetrahidrofolato redutase. A particularidade de cada metabólito está em seu arranjo molecular do metabólito correspondente, o qual atua como substrato falso nas reações bioquímicas, inibindo a síntese ou induzindo uma replicação celular defeituosa (Rang, Dalle, Ritter e Moore, 2004).

As vias bioquímicas mais acessíveis aos antimetabólitos são as relacionadas com a síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos. Geralmente, quando uma enzima possui um efeito importante em vias que conduzem à replicação celular, os inibidores da reação que a mesma catalisa mostram-se úteis como agentes antineoplásicos.

O fluorouracil – um análogo da uracila – interfere na síntese de DMTP (2'-desoxitimidilato). É convertido em um nucleotídeo falso, o qual interage com a timidilato sintase, porém não pode ser convertido em DMTP (**figura 3**). Como consequência, observa-se a inibição da síntese de DNA, mas não de RNA, nem das proteínas. A principal via de administração é a parenteral. Os principais efeitos colaterais são a lesão do epitélio do trato digestório (40% dos

casos) e mielotoxicidade. Enquanto o manejo de várias toxicidades relacionadas à quimioterapia tem sido contornado, especificamente a incidência de mucosites tem se elevado. Este efeito colateral apresenta-se como um processo inflamatório nas mucosas oral e intestinal, o que limita a nutrição e a resposta. Nutrientes específicos tais como aminoácidos podem favorecer a síntese de DNA inibida por antineoplásicos (Figura 5).

O fluorouracil é usualmente administrado através da via endovenosa, sob a forma de *bolus* ou como infusão contínua prolongada, durante dias ou até meses. A vantagem da infusão contínua é a sua meia vida que é curta, cerca de dez a vinte minutos. Sua atuação na fase S do ciclo celular possibilita a sobrevivência de outras células que não estejam nesta mesma fase.

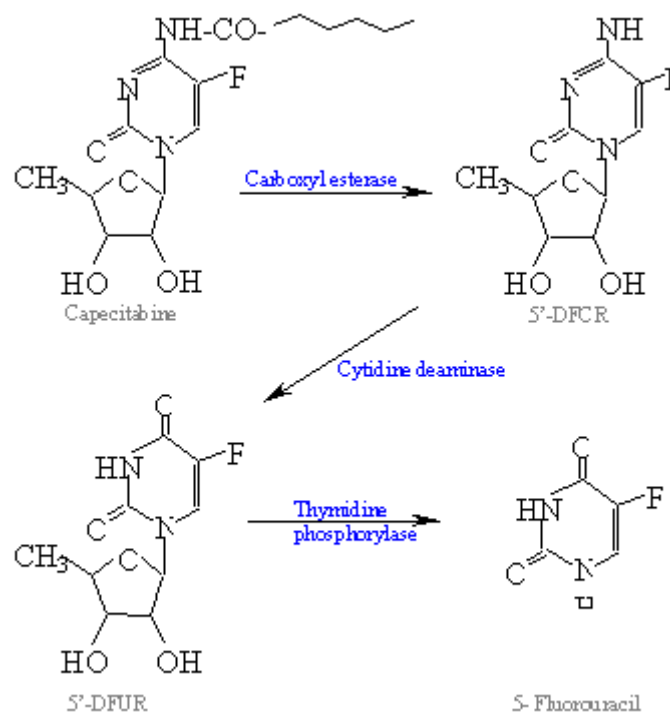


FIGURA 3: Representação esquemática da química da formulação capecitabine (5-fluorouracil) e de sua interconversão em falso nucleotídeo para interagir com a timidilato sintetase

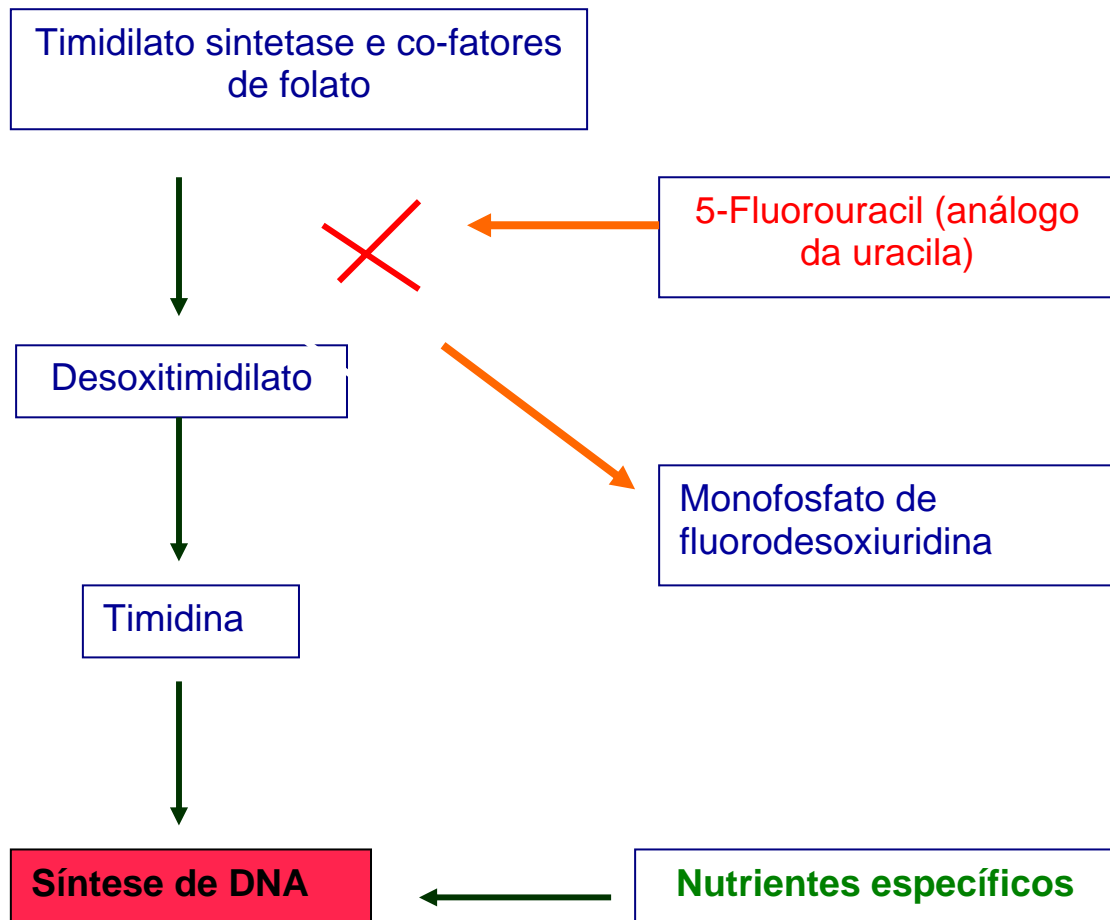


FIGURA 4: Representação esquemática da inibição de síntese de DNA pelo 5-fluorouracil e da interferência de nutrientes específicos neste processo.

#### 1.4) Glutamina e sistema digestório

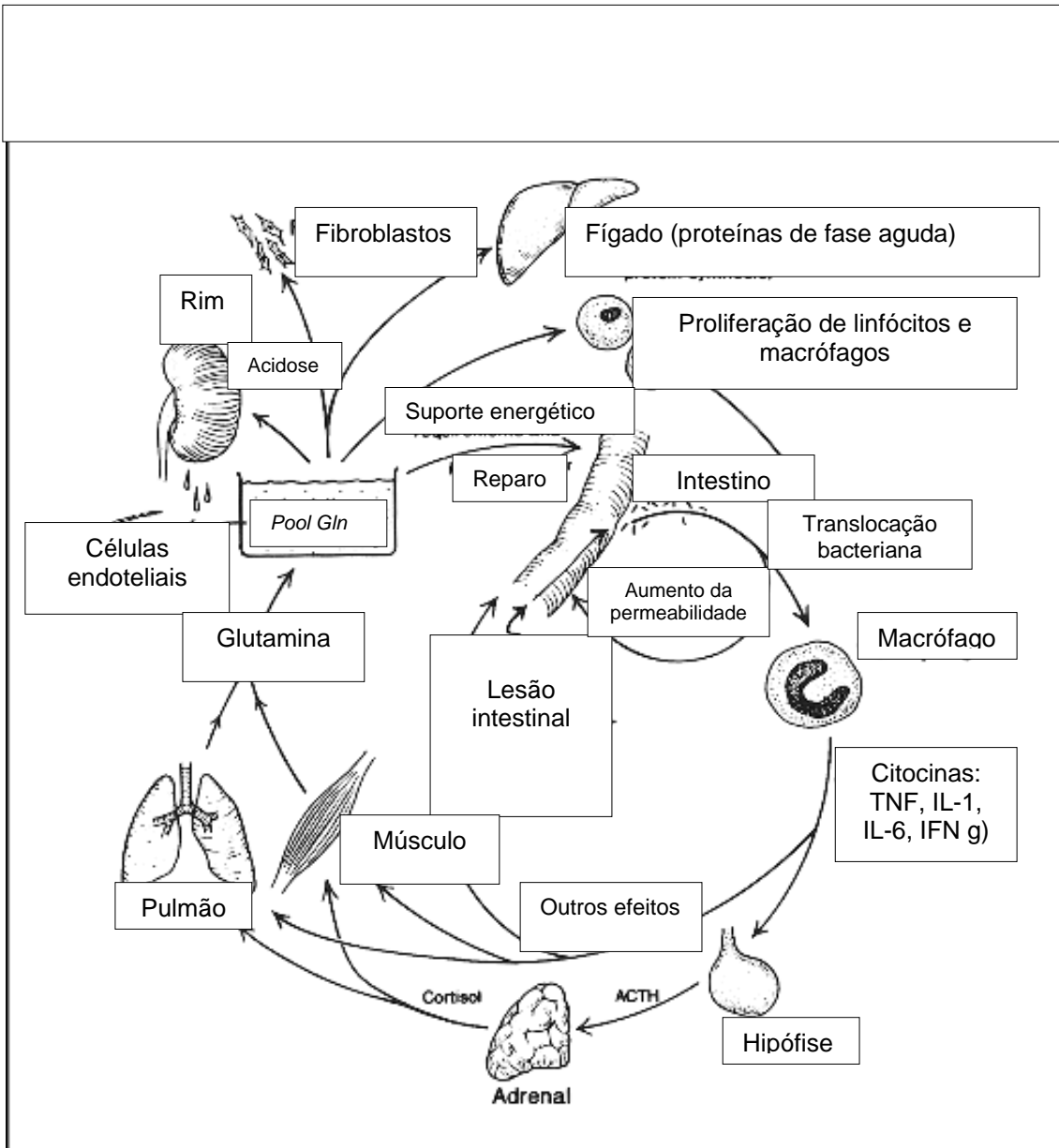
O aminoácido glutamina (Gln, **figura 5**), é condicionalmente essencial e vem tendo atenção crescente devido ao seu papel nos estados catabólicos e de estresse fisiológico. A Gln é o principal veículo de troca de nitrogênio entre os tecidos, o mais abundante aminoácido no plasma, e livre no *pool* intracelular do músculo esquelético. A glutamina é um aminoácido neutro e possui em sua estrutura dois grupos de nitrogênio. O catabolismo deste aminoácido pela ação da glutaminase resulta na formação de glutamato e amônia. Sintetiza glutationa, proteínas e nucleotídeos. É constituinte de proteínas e atua como metabólito central para as transaminações de  $\alpha$ -cetoglutarato e ácido glutâmico. Tem-se mostrado também com capacidades reguladora de células e imunomoduladora, além de promover o rápido restabelecimento intestinal após quimioterapia (ROTH *et al.*, 2002; PICCIRILLO *et al.*, 2003). A Gln é absorvida no trato gastrointestinal acoplada ao íon sódio, sendo o principal substrato metabólico para o enterócito (SILVA *et al.*, 1998). Metabolicamente a Gln é liberada pelo músculo esquelético e em menor proporção pelo pulmão, para o intestino, células sanguíneas e rins. Glutamina via glutamato, cisteína e glicina é precursor de aminoácidos, para a síntese de glutationa, a qual é encontrada intracelularmente nas formas oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH). A taxa de GSH para GSSG é o mais importante regulador do potencial redox (PICCIRILLO *et al.*, 2003).

A glutamina é considerada um fator trófico para o epitélio intestinal. A depleção do *pool* de Gln conduz à atrofia de vilos no intestino delgado, a qual parece estar associada a uma interrupção na barreira intestinal e facilitar a translocação bacteriana. Embora as razões supracitadas sejam pertinentes para a suplementação de Gln, existem no mercado poucas opções de mistura nutricionais que possuam estabilidade química para dissolução e estocagem. A Glutamina e o dipeptídeo alanil-glutamina (Ala-Gln) estimulam a proliferação celular no íleo, como também em regiões colônicas (SCHEPPACH *et al.*, 1994). Já em 1978, WINDMUELLER & SPAETH, demonstraram que células epiteliais do intestino delgado “preferem” a Gln como combustível para o metabolismo oxidativo. A disponibilidade de tal nutriente pode induzir

enterócitos e iniciarem a fase S do ciclo celular, e então, aumentar a proliferação.

Em 2003, CARNEIRO-FILHO e colaboradores preconizaram que a Gln e seus derivados estáveis são promissores no restabelecimento de lesões da mucosa intestinal induzidas por desnutrição, por agentes quimioterápicos ou ainda por agentes tóxicos e infecções, tal como a cólera. O principal fator de virulência para o Vb é a toxina da cólera, a qual induz uma cascata de eventos iniciando com a NAD-ribosilação da subunidade  $\alpha$  do receptor heterotrimérico Gs e culminando com a abertura do regulador de condutância transmembrana. O resultado é uma estimulação de secreção de cloreto pelas células das criptas intestinais e um bloqueio da absorção de sódio pelas células dos vilos, conduzindo ao aumento do efluxo de fluido para o lúmen intestinal.

Dados experimentais de nosso grupo de pesquisa (Lima, 1998) e Silva A. C. e cols, 2002), obtidos com coelhos, demonstraram que a solução de reidratação oral acrescida de L-Gln, é mais efetiva na indução de uma maior absorção de sódio e água, que a solução da Organização Mundial de Saúde (OMS) constituída de glicose, quando perfundidas no segmento ileal dos animais tratados com toxina do *Vibrio cholerae*. LIMA e colaboradores (2002), demonstraram em modelo de diarreia induzida por toxina da cólera com ratos, que uma solução de reidratação oral de reidratação enriquecida com Ala-Gln aumenta a absorção intestinal de água e eletrólitos, de maneira superior à glutamina e à glicose. Dados recentes sugerem que a diarreia causada pelo *Vibrio cholerae* (Vb) envolve a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico.



**FIGURA 5: Injúria intestinal e mobilização de glutamina.** Após injúria intestinal, o aumento da permeabilidade pode ocasionar translocação bacteriana, migração de leucócitos para o foco inflamatório e liberação de citocinas, ativando o eixo hipotálamohipofisário. Estes eventos induzem a liberação de Gln a partir do músculo esquelético e dos pulmões para a circulação. Subseqüentemente a Gln mobilizada é utilizada no reparo da barreira intestinal lesada (adaptado de SOUBA, W. W., 1994).



### **1.5) Migração e diferenciação celular intestinal**

Para que o processo absorptivo possa ser encaminhado normalmente, a barreira epitelial do intestino deve estar íntegra e com uma taxa de renovação celular adequada. O epitélio intestinal forma um sistema dinâmico e contínuo de proliferação, diferenciação e morte celular (apoptose). No compartimento das criptas, células progenitoras originam novas células epiteliais. Durante a migração estas células se diferenciam obedecendo ao sentido: base da cripta para o topo do vilos (Figura 6). Esta jornada dura cerca de 2 a 4 dias. A análise da dinâmica dos clones progenitores ( $C_1$ ,  $M_1$  e Mix) de vida curta (dias) conduz ao aparecimento de um ou dois tipos celulares mucosos ( $M_0$ ) de progenitores de vida longa (meses), e células progenitoras pluripotenciais de originar todos os tipos celulares (BJERKNES & CHENG, 1999).

Os enterócitos constituem a maior população entre as diferentes células intestinais. Estas células são capazes de expressar enzimas e proteínas transportadoras que regulam a captação de nutrientes e de fluidos de maneira orquestrada. A barreira mucosa é constituída principalmente de mucinas, as quais são glicoproteínas que são secretadas pelas células caliciformes. Já as células de Paneth, são encontradas apenas no intestino delgado estando localizadas nas bases das criptas, secretando polipeptídeos antimicrobianos no lúmen, tais como lisozima e fatores de crescimento (VERBURG e cols., 2000). A regulação da quantidade de células no tecido adulto é determinada pelo balanço entre a produção (mitose) e a morte celular (apoptose). A quantidade de apoptose no epitélio dos vilos difere ao longo dos diversos segmentos intestinais, refletindo as diferenças do influxo de substâncias nos vilos (HALL e cols., 1994).

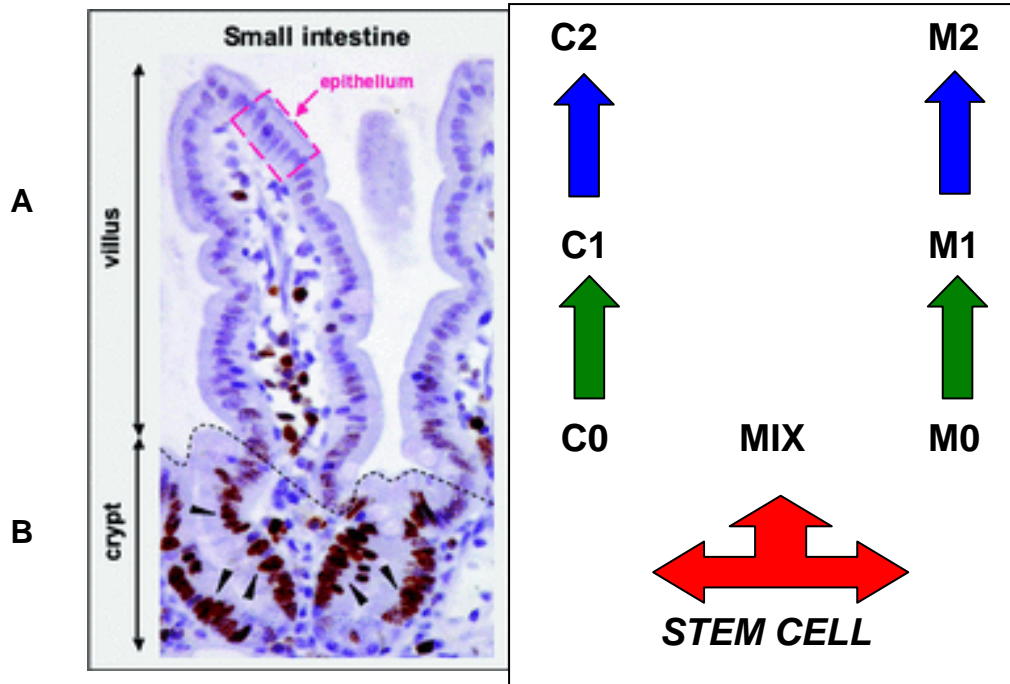


FIGURA 6: **Fotomicrografia da mucosa do intestino delgado.** Detalhes de vilo (A) e cripta (B). As *stem cells* estão agrupadas no compartimento da cripta intestinal e migram ao longo do vilo diferenciando-se em células colunares (C) , mistas (MIX) ou mucosas (M), ocorrendo dispersão clonal durante a migração.  
 Fonte: [www.biocell.org](http://www.biocell.org)

Em nosso meio, as áreas relacionadas às Ciências biológicas possuem laboratórios, estudantes e pesquisadores que utilizam modelos experimentais, “ferramentas” (drogas naturais ou sintéticas), e “instrumentos” (animais de Biotério). Dentre os laboratórios que utilizam estes modelos ressalta-se os da Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), do Instituto de Biomedicina (IBIMED), da Universidade Federal da Ceará (UFC). No entanto, estudos mais especializados (*in vitro*) vêm sendo desenvolvidos no intuito de reduzir a utilização de animais, racionalizar o uso de drogas e otimizar as respostas biológicas.

Em particular, no IBIMED, são desenvolvidos estudos de fisiologia e metabolismo intestinal e renal, através do uso de modelos que simulem o funcionamento destes órgãos. Utilizam-se testes de permeabilidade intestinal como a avaliação da taxa lactulose/manitol. A lactulose é um dissacarídeo sintético, o qual não é hidrolisado por dissacaridase humana e pode atravessar a mucosa intestinal quando a mesma encontra-se lesada ou com alteração de permeabilidade. Já o manitol difunde-se através de poros hidrofílicos da mucosa intestinal, sendo assim utilizados como medida da área de absorção intestinal, sendo assim utilizados como medida da área de absorção intestinal (Lima et al. 1997). Uma vez absorvidos, ambos, os açúcares são excretados por via renal sem alterações. Lactulose e manitol são recuperados na urina por aplicação oral, tendo sido já mensurados em roedores, gatos e humanos (Biljisma et al. 1995). *In vitro*, assume-se uma razão de fluxo próxima a 0,8 em todas essas espécies. A variação interespecífica recuperada de manitol é causada por diferenças específicas de intestinos delgados intactos *in vivo* (Biljisma et al. 1995).

Ensaio experimental (dados não mostrados) no laboratório de Doenças infecciosas (Carneiro-Filho e cols, 2004) – IBIMED - UFC demonstram que a ração padrão (FRI-LAB), utilizada por ratos nos testes de lactulose/manitol, induzia interferências no cromatograma. A partir disto definiu-se que para este teste, os animais deveriam ser alimentados por três dias com

uma ração pobre em carboidratos (RPHC), evitando-se a presença de excesso de açúcares nas amostras de urina.

O uso destes açúcares (lactulose e manitol) representa um incremento na determinação de alterações na permeabilidade, na obtenção do conhecimento acerca da fisiologia absorptiva intestinal e do comportamento biológico geral animal em gaiolas padrão e metabólica.

Em 1968, Shafirov, já utilizava gaiola metabólica para experimentos com ratos. A preocupação com a variação das respostas influenciadas pela idade do animal e com as condições ambientais constantes da gaiola metabólica, foi suscitada por Windmueller (1975), adaptando a temperatura da gaiola para coleta de informações de vias metabólicas de nutrientes e de drogas em ratos recém-nascidos. Em 1976, Ferretti e colaboradores, analisaram modelos experimentais específicas para estudos metabólicos de cálcio e fósforo em ratos adultos ambientados em gaiola metabólica. A idade compreendida entre 6 e 24 meses modifica a ingestão de comida e água e a excreção de urina em camundongos (Davies e cols.,1985).

Outros aspectos, também, além da idade dos animais e a ambientação, foram questionados por outros pesquisadores. Sipos e colaboradores (1993), reportaram que a emissão de ultra-sons por *Mus domesticus* machos induziria a presença de, pelo menos, dois quimiossinais na urina das fêmeas. Os autores detectaram que tais substâncias eram detectadas na urina fresca coletada em gaiola metabólica, apenas entre 15 e 18 horas. Num período de coleta inferior a 12 horas ou superior a 24 horas, os quimiossinais não eram encontrados na urina coletada. O tempo de coleta de diurese, então, deve ser padronizada para cada estudo experimental em questão.

Para estudos farmacocinéticos experimentais, ratos são isolados individualmente tanto em gaiolas padrão de polipropileno, quanto em gaiolas metabólicas. Entretanto, as alterações na distribuição dos fármacos induzidas pelo isolamento não são comumente consideradas (Brunner et al. 1994).

Variações nos estudos metabólicos com ratos e camundongos foram observados por grupos de pesquisa do IBIMED.

O uso de drogas citostáticas tais como o fluorouracil, em tratamentos anticâncer, pode prejudicar severamente a função intestinal, podendo ocasionar anorexia, mal-absorção, diarreia e desidratação. Em particular, o trato digestório pode ser severamente afetado ocasionando eventos multifatoriais. Pode ocorrer inflamação intensa, lesão e até ulceração. Indivíduos com este quadro clínico sentem dor, náusea e gastroenterites, sendo altamente susceptíveis a infecções. A interrupção ou perda de células progenitoras epiteliais intestinais é um estímulo para o estabelecimento desta desordem clínica. Entretanto, a disfunção presente que é manifestada pela sua severidade e duração, é altamente influenciada por outras populações de células, bem como peculiaridades biológicas de cada espécie e por respostas imunes afetando a flora intestinal (DUNCAN *et al.*, 2003).

## **-Justificativa**

Estudos experimentais e clínicos que abordam o tratamento das doenças diarréicas enfocam a importância do restabelecimento da mucosa intestinal e do estado nutricional, nas condições clínicas de diarreia aguda e de injúria induzida por drogas citotóxicas. A integridade da barreira intestinal é um pré-requisito não apenas para a adequada absorção de nutrientes e de fármacos, mas também para a modulação do sistema imune. Embora haja avanços na aplicação da genômica nutricional, pouco se conhece acerca dos fatores genéticos que determinam a susceptibilidade à diarreia e às deficiências em micronutrientes, bem como das conseqüências fisiológicas destes eventos. A ocorrência de diarreia aguda e sua correlação com a desnutrição agravam a condição orgânica do indivíduo, conduzindo-o a um maior estresse catabólico. A busca de modelos experimentais que reproduzam os sinais clínicos, auxiliam na compreensão de mecanismos fisiológicos e moleculares destes eventos. A suplementação com glutamina e peptídeos ricos em glutamina é proposta como uma promissora intervenção para se reverter este quadro. O presente trabalho propõe que os efeitos sinérgicos entre diarreia, drogas citotóxicas e a deficiência de calorias e proteínas são consideravelmente, maiores que os conhecidos atualmente. Daí a necessidade da validação de modelos experimentais que simulem as enfermidades supracitadas, e propiciem o estudo farmacológico com perspectiva de intervenção nutricional. A suplementação com micronutrientes como vitamina glutamina e peptídeos ricos neste aminoácido pode favorecer o restabelecimento da mucosa lesada e melhora da absorção intestinal. Então, esta terapia é proposta efetivamente como uma nova intervenção terapêutica para as doenças diarréicas induzidas e para suas conseqüências. Considerando então o exposto, definiu-se então, os seguintes objetivos:

## OBJETIVOS

---

---

## **2) Objetivos**

### **2.1) Objetivo Geral**

Validar os modelos de mucosite intestinal em camundongos e restabelecer a morfofisiologia do intestino delgado utilizando suplementação de glutamina, e de peptídeos ricos em glutamina.

Avaliar os efeitos da suplementação de glutamina ou de peptídeos ricos em glutamina na mucosite intestinal.

### **2.2) Objetivos específicos**

1- Estudar os possíveis efeitos do 5-FU sobre a morfofisiologia intestinal de camundongos Swiss;

2-Avaliar os efeitos da suplementação com Gln e,ou de peptídeos ricos em glutamina sobre a barreira morfofuncional, o estado nutricional e o comportamento alimentar, na injúria induzida por 5-FU em camundongos;

3-Characterizar a atividade mitótica e apoptótica na injúria intestinal induzida por 5-fluorouracil e na suplementação com nutrientes na presença desta injúria.



## MATERIAL E MÉTODOS

---

---

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss*, com massa de 35-40g (n=180), sendo estes últimos distribuídos da seguinte forma: Para os experimentos de avaliação metabólica (n=60), para os de histopatologia intestinal (n=48), e para os de permeabilidade intestinal (n=72). Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Foram mantidos em ciclo claro-escuros de 12 horas, aproximadamente, com livre acesso à água. A ração comercial *Fri Ribe* (São Paulo-SP) para ratos foi ofertada com livre acesso. Para camundongos, a ração comercial *Fri Ribe* foi ofertada em 10g/animal, quando acondicionados em gaiola de polipropileno (figura 9A) e 5g da ração em pó, pobre em carboidratos (*Rhoster*-SP) para os experimentos em gaiola metabólica (figura 9B). Tal ração foi utilizada para evitar interferências na coluna de troca aniônica do equipamento de cromatografia líquida de alta pressão HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*), Seguiram-se às recomendações éticas para a experimentação animal.

### **3.2) Material**

Além de seringas, luvas, cânulas, *beckers*, provetas, balanças analíticas, utilizaram-se gaiolas padrão (polipropileno) e metabólica ([figura 8](#)) e o aparelho de HPLC ([figura 9](#)) do Laboratório de Doenças infecciosas, que consiste em um sistema analisador de carboidrato BioLC HPLC, e que foram adicionados o módulo de bomba gradiente GPM-2, o módulo eluente de gás EDM-II e o detector pulsátil amperométrico PAD-II com eletrodos de ouro. Estes últimos foram adquiridos da Dionex (Sunnyvale, CA, EVA). A coluna de trocas aniônicas CarboPac MA-1 (250 mm x 4,0 mm I.D., *pelicular resin*) com o módulo de proteção foi também adquirida da Dionex. As injeções foram realizadas automaticamente.

### **3.3) Drogas e soluções**

5-Fuorouracil é um antineoplásico, também antimetabólico muito utilizado no tratamento do câncer, ele causa efeitos adversos como mucosite oral e intestinal. Em nosso caso utilizamos a mucosite intestinal para tentar minorá-la ou até mesmo acabar com esse efeito pernicioso.

Glutamina é um aminoácido, o qual é o principal substrato para o intestino, podendo transformar-se em ácido glutâmico, ajudar na síntese de glutathione que é uma substância antioxidante.

Alanil-glutamina é um dipeptídeo utilizado em ensaios clínicos e experimentais, sua absorção pelo intestino delgado é maior que o aminoácido glutamina.

Hyprol 4107 é uma fonte de alta qualidade de peptídeos produzidos pela digestão enzimática do glúten de trigo. O produto é rico em glutamina e outros aminoácidos, é recomendado como fonte de peptídeos solúveis em produtos dietéticos e bebidas enriquecidas em proteína para o esportista.

Hyfoama 77 é um agente espessante natural baseado na hidrólise do glúten de trigo. É um produto altamente consistente com importante aeração e propriedades espumantes, tem 77% de proteína. É especificamente recomendado para uso em sobremesas frias e preparações caseiras de misturas que simplesmente requerem garantida aeração, com pouca gordura, etc.

## Outros equipamentos

<b>MATERIAL/EQUIPAMENTOS</b>
Agitador magnético vortex AP56, série 9524, <i>Phoenix</i> , Ltda., Araquara-SP
Balança eletrônica (legibilidade de 0,1 g; capac.400g- ACCULAB)
Balança analítica com legibilidade de 0,1 mg (modelo AE 50, Mettler)
Bandeja inox
Banho maria (modelo BM-100, série HV 4103, FANEM Ltda; Guarulhos-SP.
Bomba de infusão 900, <i>Holter Roller, extracorporeal medical specialities</i> -EUA
Centrífuga c/unidade refrigerada (modelos TJ-6 e TJR, BECKMAN-EUA)
Destiladores de água, Modelo 724, FANEM Ltda; Guarulhos-SP
Espectrofotômetro UV-VIS, modelo B-382, Micronal S.A., Brasil.
Estufa de esterilização e secagem (Olidex CZ, Ribeirão Preto-Brasil)
Fotômetro de chama (modelo 9180, <i>AVL Scientific Corporation</i> , Geórgia-EUA
Gaiola metabólica em inox
Garra metálica
HPLC c/coluna de troca iônica com <i>software</i> analisador de carboidrato BioLC, (Dionex-EUA)
Manta aquecedora p/ balão volumétrico (500 mL )
Microscópio binocular c/ocular milimetrada, modelo NIKON Eclipse 200 EUA
Osmômetro de pressão a vapor
pH-metro Digital 32 (BECKMAN-EUA)
Pinças cirúrgicas em inox nº 12 (reta e curva)
Refrigerador Brastemp, 340L
Tesouras cirúrgicas nº 10 e 12 (curvas)
Tubos de Falcon (15 ml)

**A**



**B**



Figura 7: **Fotografia** de uma gaiola metabólica em inox completa (A), com gaiolas individuais (B) para estudos metabólicos com ratos e camundongos.

A



B



C

Figura 8: **Fotografia** de um aparelho de Cromatografia líquida de alta performance (A), do conjunto integrado com computador (B) para “tratamento” dos dados utilizando o software *Peaknet* (C).

### **3.5) Avaliação metabólica, toxicológica e morfométrica da injúria induzida por 5-fluorouracil**

Hipótese 1: A utilização de antimetabólitos como o 5-fluorouracil (5-FU) reduziria a síntese protéica alterando a proliferação celular, a evolução ponderal e comportamento alimentar. Desta forma, instala-se-ia o quadro clínico de injúria comprometendo a barreira morfofuncional intestinal. Seria possível, então reproduzir em camundongos *Swiss*, o modelo de injúria intestinal induzida por 5-FU?

Metodologia 1: Para estabelecer o modelo de indução de injúria intestinal em camundongos foi efetuado *screening* de três doses de 5-FU durante 3 dias. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10/grupo, com relação às doses administradas, 50; 100; e 150 mg/kg/dia s.c. e ao grupo controle, PBS); e para avaliação metabólica A via subcutânea possibilita a observação de um efeito de absorção mais lenta, além de indireto sobre a barreira morfo-funcional do intestino delgado. Os camundongos foram observados durante 10 dias para constatação de mortalidade, alteração de massa corpórea, ocorrência de diarreia e/ou cauda molhada, bem como alteração do comportamento alimentar (ver Figura 10). Para a avaliação morfométrica, foram utilizados posteriormente outros 5 grupos (n=8/grupo) para observação dos efeitos *in situ* sobre a mucosa intestinal (ver Figura 11). Para tanto, 24h após o final das injeções de 5-FU os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ainda, sob anestesia, tendo-se coletadas amostras dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, intestino médio e íleo). Posteriormente as amostras foram conservadas em formol a 10% e desidratadas em álcool, processadas, para inclusão e coloração em hematoxilina-Eosina (HE). Vilos e criptas intestinais (figura 12) foram mensuradas em microscopia óptica 400x com o auxílio de ocular milimetrada (linear de 1 mm) aleatoriamente em 10 sítios diferentes. (VANDERHOOF e cols, 1990).



## Delineamento experimental

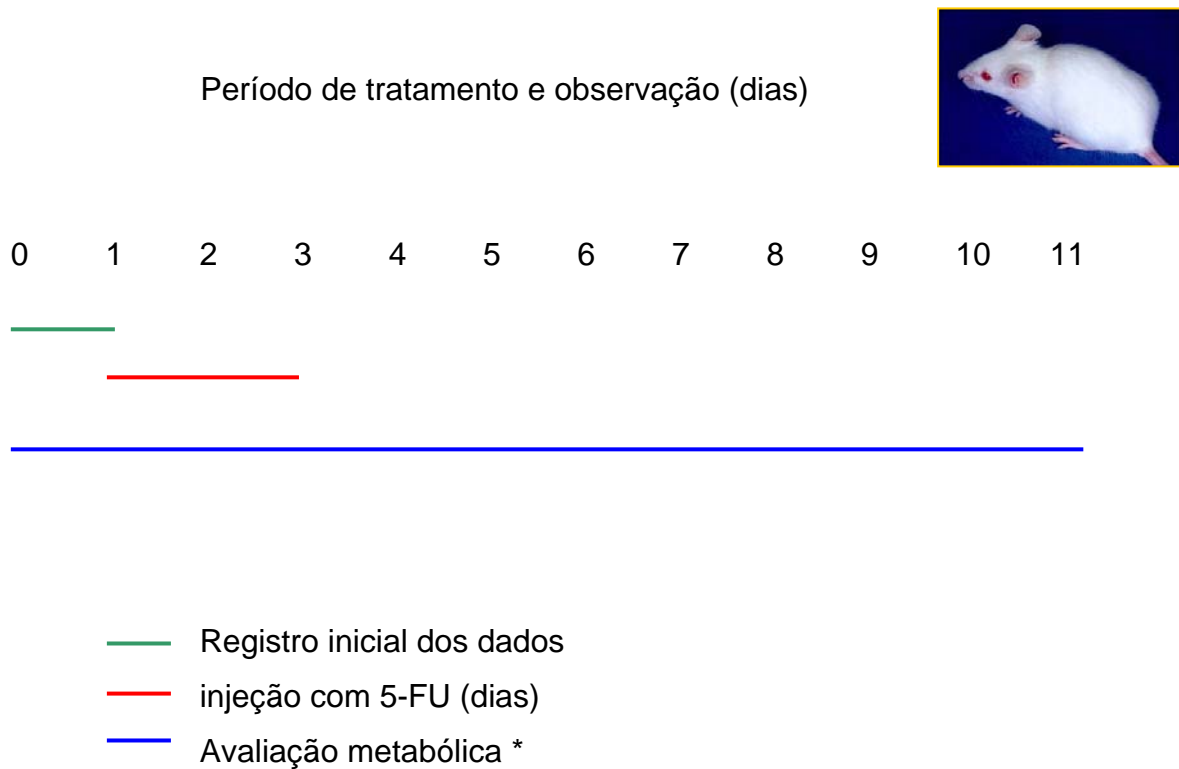


Figura 9: **Delineamento experimental** para avaliação metabólica de camundongos submetidos à injúria experimental com 5-Fluorouracil.

\* Mensuração diária de massa corpórea, ingestão hídrica e de ração, ocorrência de diarreia e mortalidade.

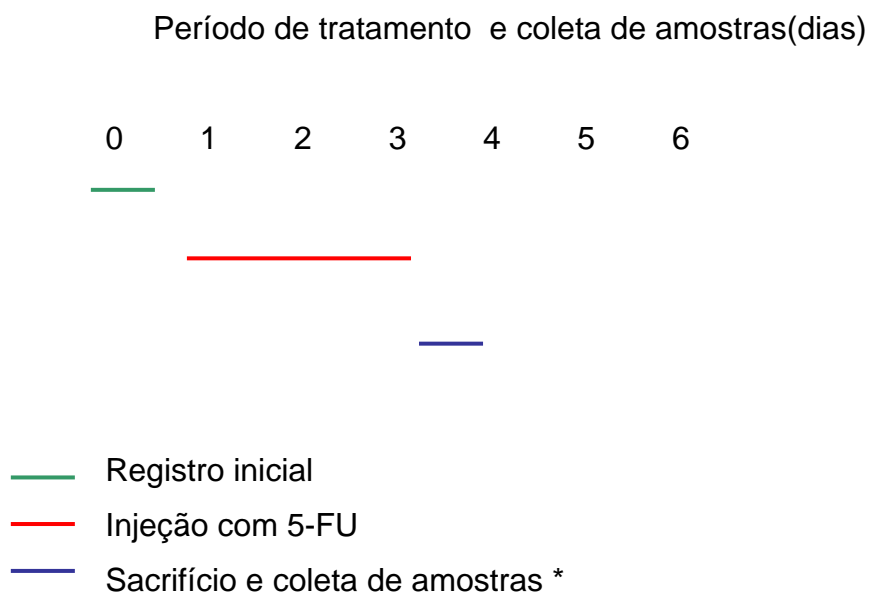
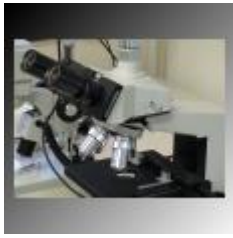


Figura 10: **Delineamento experimental** para avaliação morfométrica de camundongos submetidos à injúria experimental com 5-Fluorouracil.

\* Amostras dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, intestino médio e íleo).

A



B

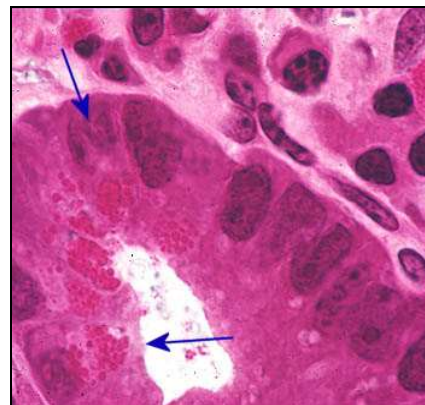
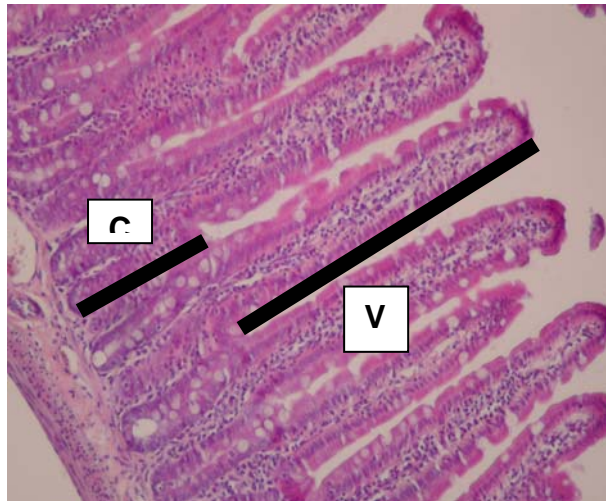


Figura 11: Representação fotográfica da morfometria intestinal.

A, Aparato, microscópico e oculares.

B, Mensuração, em microscopia óptica, de vilos (V) e criptas intestinais (C) em ocular milimetrada ( $\mu\text{m}$ ), B (40X), com coloração HE.

C, Esquema fotomicrográfico, na região da cripta intestinal para contagem das células caliciformes (A, ver setas) e células de Paneth (B, ver setas azuis) (Fotomicrografia, 400x, HE).

### **3.6) Avaliação da eficácia da suplementação *in vivo* de glutamina e derivados na injúria induzida por 5-Fluorouracil.**

Hipótese 2: O comportamento alimentar, o metabolismo e a proliferação celular poderiam estar alterados na injúria intestinal induzida por 5-FU em camundongos *Swiss*? Caso isso ocorresse, seria possível que a suplementação com Gln e, ou peptídeos venham a proteger a integridade da mucosa intestinal e minorar os efeitos do 5-FU sobre o metabolismo destes animais?

Metodologia 2: Para verificação da eficácia da suplementação com nutrientes, os animais foram divididos em 8 grupos (n=8/grupo), sendo tratados 3 dias (0,25 ml/animal/dia sc), utilizando: PBS para o grupo controle (0,25 ml/animal/dia sc); Gln, Ala-Gln, Hyprol® 4107 e Hyfoama® 77 (0,6g/kg/dia sc); Após as injeções de 5-FU, os animais foram sacrificados, sendo retiradas as amostras dos segmentos intestinais para preparação histológica e coloração em HE visando a avaliação morfológica. Para avaliação metabólica os camundongos foram divididos em 8 grupos (10 animais/grupo), seguindo-se o mesmo protocolo experimental utilizado para a avaliação morfológica, exceto quanto ao sacrifício, o qual fora efetuado ao final de 10 dias de observação dos animais (incluído o período de injeção de 5-FU). Foram consideradas as variáveis, evolução ponderal, mortalidade, ocorrência de diarreia e/ou cauda molhada, bem como alteração do comportamento alimentar (esplanadas anteriormente no texto).

Para o estudo de proliferação celular nas criptas de Lieberkühn, foi utilizada a contagem de corpos mitóticos observados em cada cripta. A contagem procedeu-se segundo o método de GASINSKA, et al. (2002) modificado. Através de escolha aleatória de 10 criptas intestinais/animal, foram contados separadamente e relacionadas com a quantidade total das demais células no mesmo campo visual (400X). Para o cálculo de corpos apoptóticos, procede-se da mesma forma que para os corpos mitóticos (criptas).

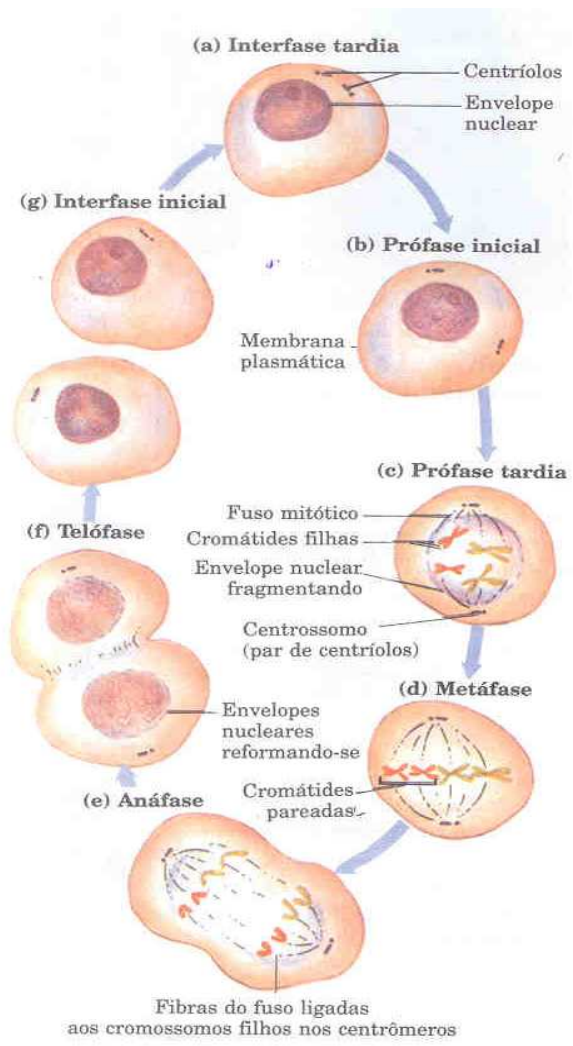


Figura 12: Representação esquemática das fases da mitose e das características celulares (fonte: Nelson & Cox, 2000).



Figura 13: **Fotomicrografia de cripta de LieberKühn:** As setas menores indicam os corpos mitóticos com condensação do material cromossômico; e as setas largas indicam os corpos apoptóticos com desaparecimento da carioteca e extravasamento do conteúdo citoplasmático (fonte: Nelson & Cox, 2000).

### **3.7) Permeabilidade intestinal em camundongos suplementados com e glutamina e derivados**

Hipótese 3: Propomos que o 5-FU afeta a síntese protéica em camundongos, modificando a morfologia do epitélio intestinal e das junções entre os enterócitos, alterando o processo absorptivo de água, eletrólitos e nutrientes. Seria possível evitar ou minorar a desintegração da barreira intestinal, através da suplementação com Gln, Ala-Gln e peptídeos ricos em glutamina?

Metodologia 3: Portanto para este estudo, a função da barreira intestinal foi examinada através da medida da área de absorção em camundongos swiss com injúria intestinal. O teste de permeabilidade intestinal utilizando a taxa lactulose e manitol (L/M) tem sido usado com segurança na prática clínica e experimental (LIMA e cols., 1998 e 2001; BIJLSMA e cols., 1995). A lactulose é um dissacarídeo sintético, o qual atravessa a mucosa intestinal quando a mesma encontra-se lesada. Já o manitol, difunde-se através dos poros hidrofílicos da mucosa intestinal **figura. 14**. Após absorção, ambos os açúcares são eliminados por via renal sem alterações, possibilitando a mensuração destes na urina. Para a obtenção da taxa de lactulose/manitol os camundongos foram acomodados em gaiola metabólica (três animais/gaiola) durante 24 h, para coleta de amostras de urina. Durante os três dias de administração do 5-FU os animais foram alimentados com ração pobre em carboidratos. No final do 3º dia, receberam uma solução contendo lactulose (250mg/l) e manitol (50mg/l), via gavagem, no volume de 0,25ml/camundongo. Após 24 h, foram coletadas amostras da diurese, e uma alíquota (50 µl) de cada foi testada através do método HPLC – PAD, para obtenção de cromatogramas e da taxa de recuperação de lactulose/manitol.

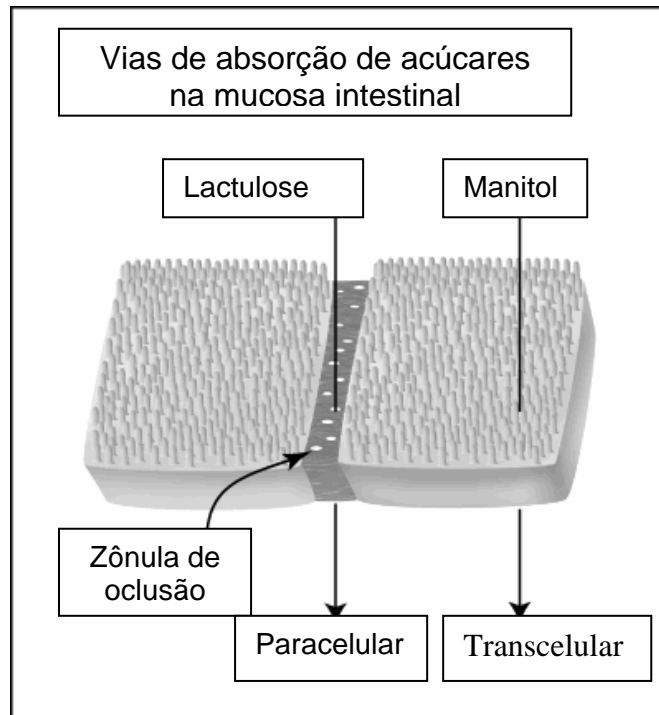
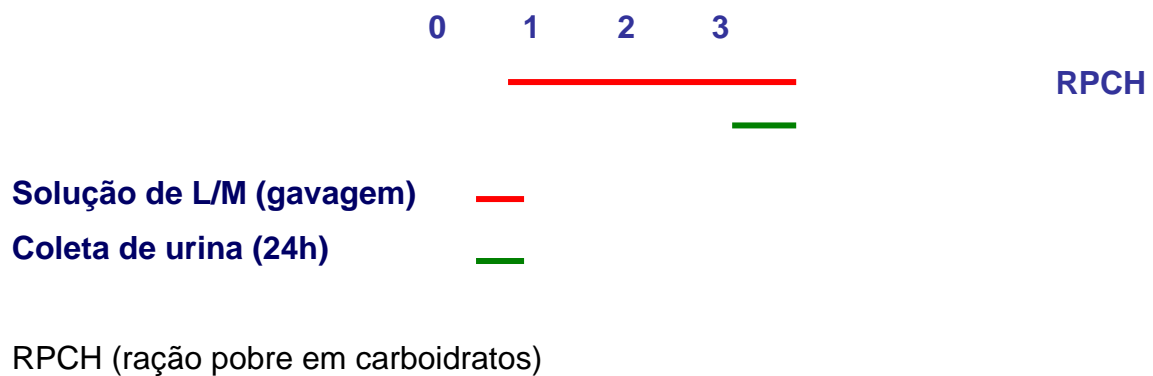


Figura 14: **Representação esquemática** da permeação dos açúcares lactulose e manitol através da mucosa intestinal, no teste de lactulose-manitol.



FIGURA 15- Delineamento experimental para o teste Lactulose/Manitol (L/M) com ração RHOSTER



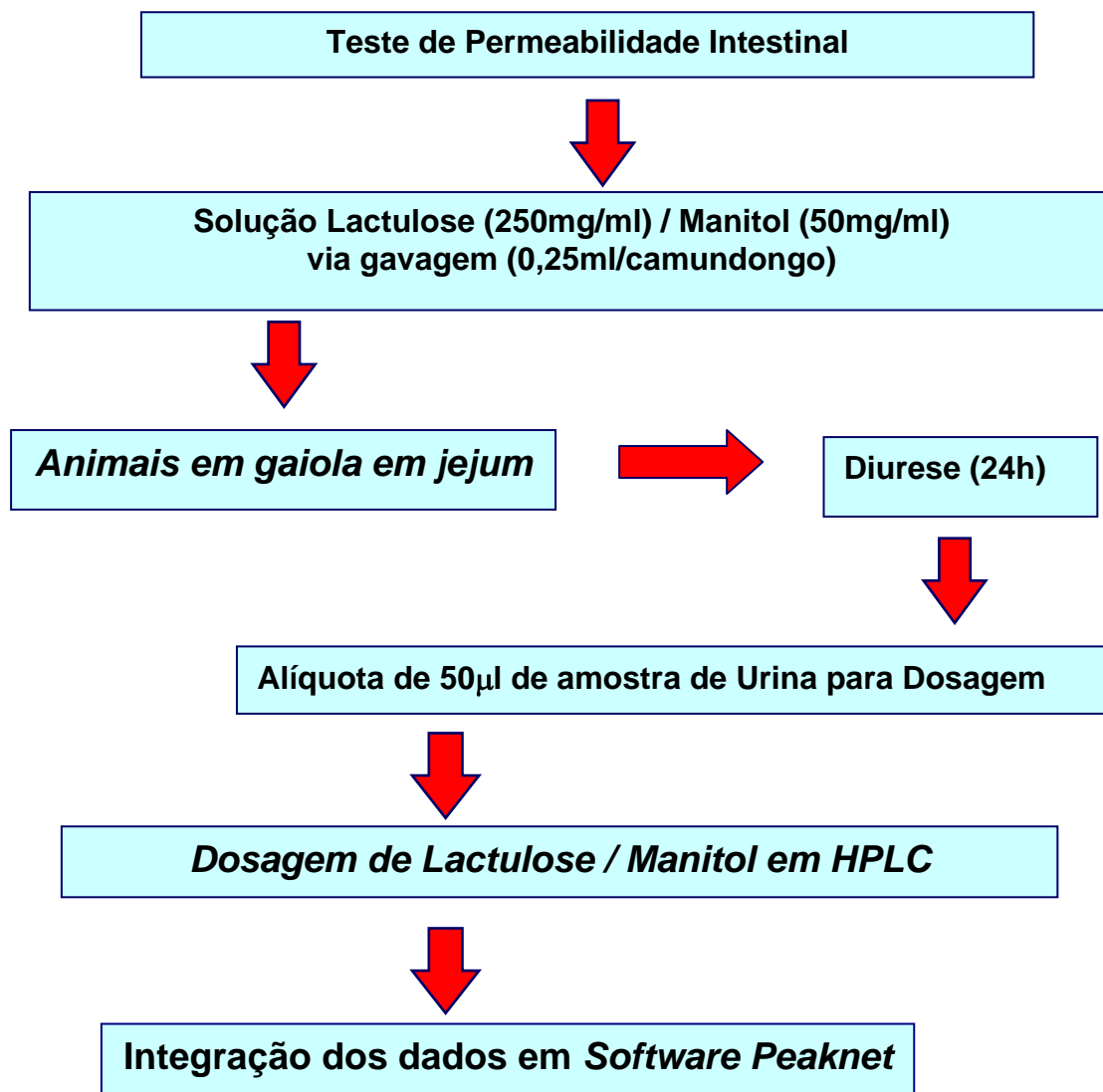


FIGURA 16: Etapas para análise das amostras de urina no teste de permeabilidade intestinal (L/M).

### **3.8)Análise estatística**

Os dados das avaliações metabólica, morfométrica, toxicológica e de permeabilidade, foram tabulados e analisados em planilhas, utilizando o *software Graph Pad 4.0*. Os dados referentes à perfusão intestinal foram tabulados em planilha do programa Excel 2000, e só posteriormente trabalhados no *Graph Pad 4.0*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos, utilizou-se teste *t* de Student pareado e não pareado quando da comparação entre dois grupos e; análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni, para comparação entre três ou mais grupos. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

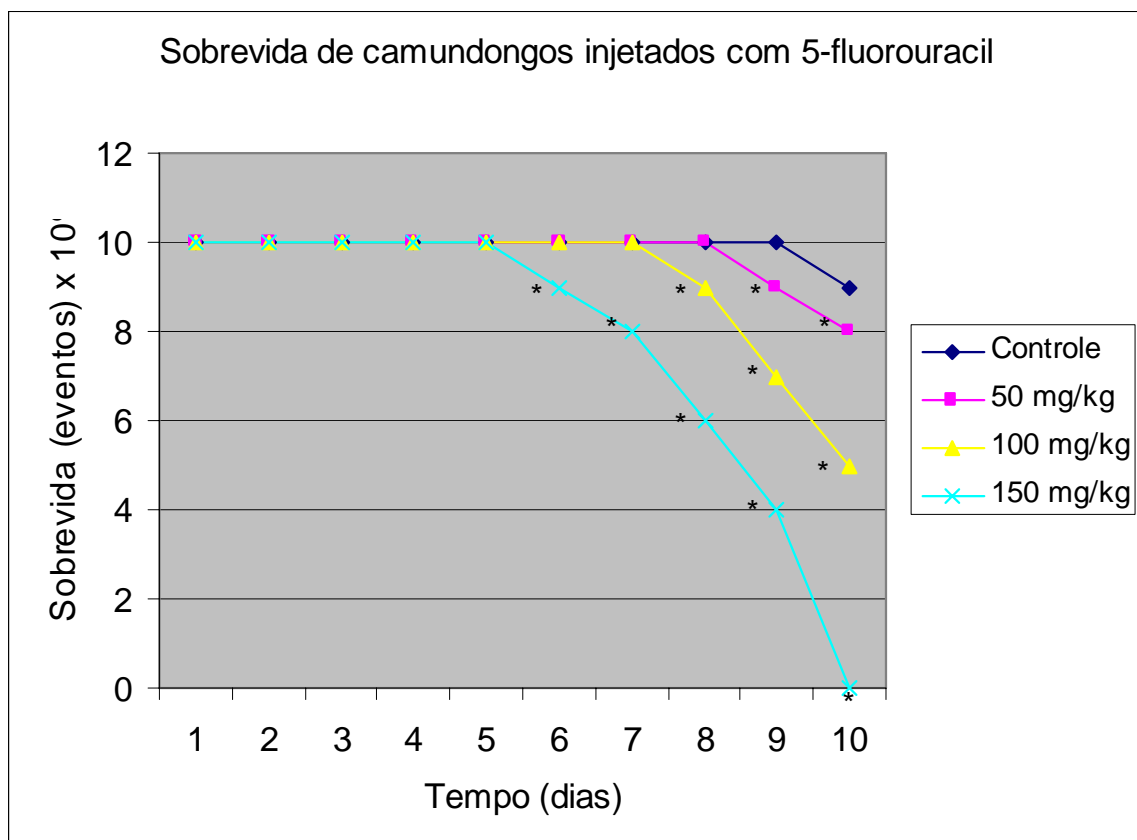
---

---

#### **4.1) *Screening* das doses de 5-Fluorouracil para indução de injúria intestinal em camundongos:**

Para validar em camundongos o modelo experimental de injúria intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU) foi efetuado *screening* de três doses deste antineoplásico: Foram utilizadas doses de 50, 100 e 150 mg/kg/dia s.c. durante três (3) dias consecutivos. Para constatar o quadro patológico efetuou-se um estudo metabólico, onde se mensurou diariamente durante 10 dias, massa corpórea (g), ingestão hídrica e de ração, ocorrência de cauda molhada, fezes amolecidas, morbidade e sobrevida.

No parâmetro dose-efeito **gráfico 1** observou-se na dose de 50 mg/kg uma sobrevida de 80%, não se evidenciando episódios diarréicos ou outra morbidade associada. Na dose de 100 mg/kg, houve sobrevida com média de 50%, sendo observado ainda quadro diarréico em 100% dos animais, não sendo, contudo uniforme esta ocorrência em cada dia. A administração de 150 mg/kg de 5-FU causou incidência de diarréia em 100% dos camundongos, entretanto 100% dos animais não obtiveram sobrevida. Nos grupos de 100 e 150 mg/kg, os animais iniciaram episódios diarréicos 96 horas (quatro dias) após a última administração. Apenas na dose de 100 mg/kg, a remissão do quadro diarréico foi observado em 50% dos camundongos constatada nas 168 horas (sete dias) após a última administração de 5-FU. Na dose de 150 mg/kg de 5-FU não houve remissão do quadro diarréico. No grupo controle houve sobrevida de 90%, e no de 50 mg/kg 80% dos animais sobreviveram após as injeções de 5-Fluorouracil.



**Gráfico 1: Sobrevida de camundongos** administrados com 5-fluorouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os eventos são apresentados como dados brutos (n=10/grupo). Cada evento corresponde a 10% de ocorrência de mortalidade de cada animal. Pelo teste de Longrank, as curvas são significativamente diferentes (\*  $p < 0,0013$ ).

**Tabela 1: Ocorrência de diarreia e sobrevida em camundongos** (n=10/grupo) injetados com 0,25 ml de 5-Fluorouracil (50, 100 e 150 mg/kg/dia sc) ou PBS (controle). Os valores são apresentados como percentagem, considerando até o último dia de observação.

	<b>PBS ou 5-Fluorouracil (mg/kg)</b>			
	PBS	50	100	150
Diarréia (%)	0	0	100	100
Sobrevida (%)	90	80	50	0

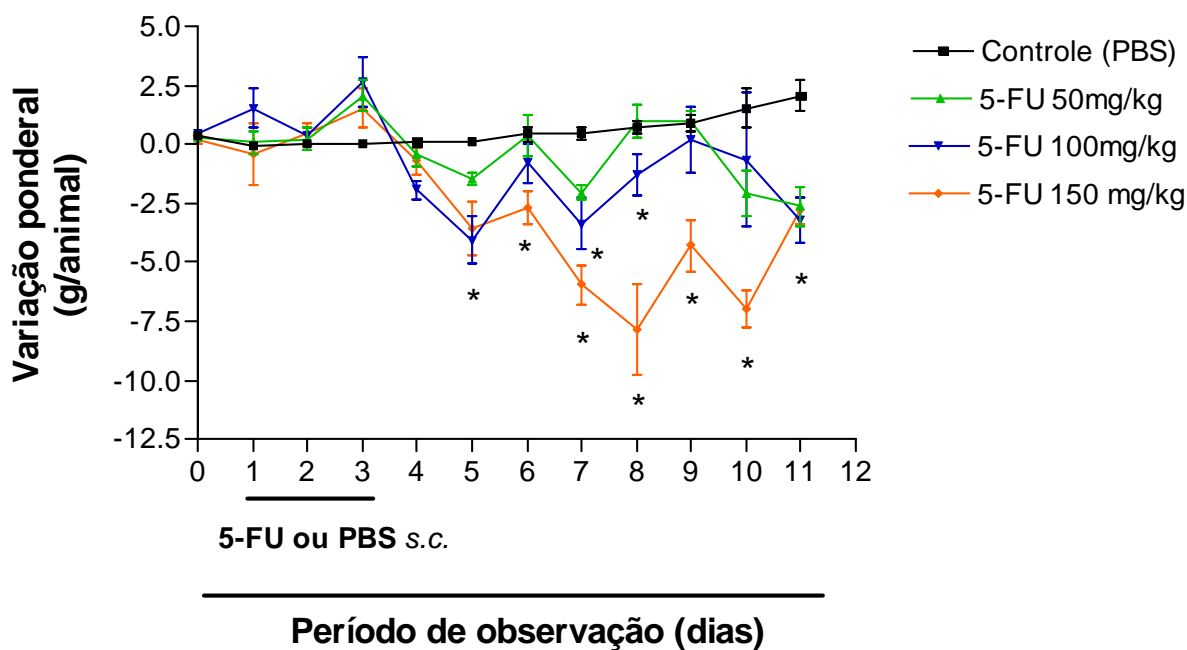
#### **4.2) A administração subcutânea de 5-Fluorouracil induz declínio ponderal em camundongos.**

Para avaliação do efeito do 5-Fluorouracil no estado ponderal dos camundongos, foi encaminhada uma avaliação metabólica para acompanhamento da evolução de massa corpórea diária **gráfico 2**. O grupo controle (PBS) revelou ganho ponderal durante o período de observação (10 dias). Em todas as doses o 5-Fluorouracil induziu redução da massa corpórea nos animais observados, obtendo-se um efeito máximo de redução nas doses de 100 e 150 mg/kg/dia sc. Durante o desafio (1º, 2º e 3º dias) com este antineoplásico, os grupos administrados com as doses de 100 e 150 mg/kg apresentaram perda de massa semelhante. No período após a administração de 5-FU **gráfico2**, do 4º ao 10º dia, o comportamento da perda ponderal foi o dobro da redução corpórea observada durante o mesmo, apenas na dose de 150 mg/kg. Nas doses de 50 e 100 mg/kg a perda de massa manteve o mesmo comportamento àquele durante o desafio.

O restabelecimento da massa corpórea em valores similares aos do grupo controle foi obtido nos animais 144 horas após a última administração de 5-fluorouracil, nas doses de 50 e 100 mg/kg. Os camundongos que receberam a dose de 150 mg/kg/dia sc, ao final do 10º dia de observação, morreram antes de atingirem o seu restabelecimento ponderal.

Ao se constatar o estabelecimento do quadro diarréico, e da perda ponderal, verificamos alteração no padrão alimentar. Verificamos ainda a ingestão de água e de ração **gráfico 3**





**Gráfico 2: Alteração da massa corpórea** durante e após o uso de 5-fluorouracil (5-FU) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

### **4.3) A administração subcutânea de 5-Fluorouracil reduz a ingestão de ração em camundongos.**

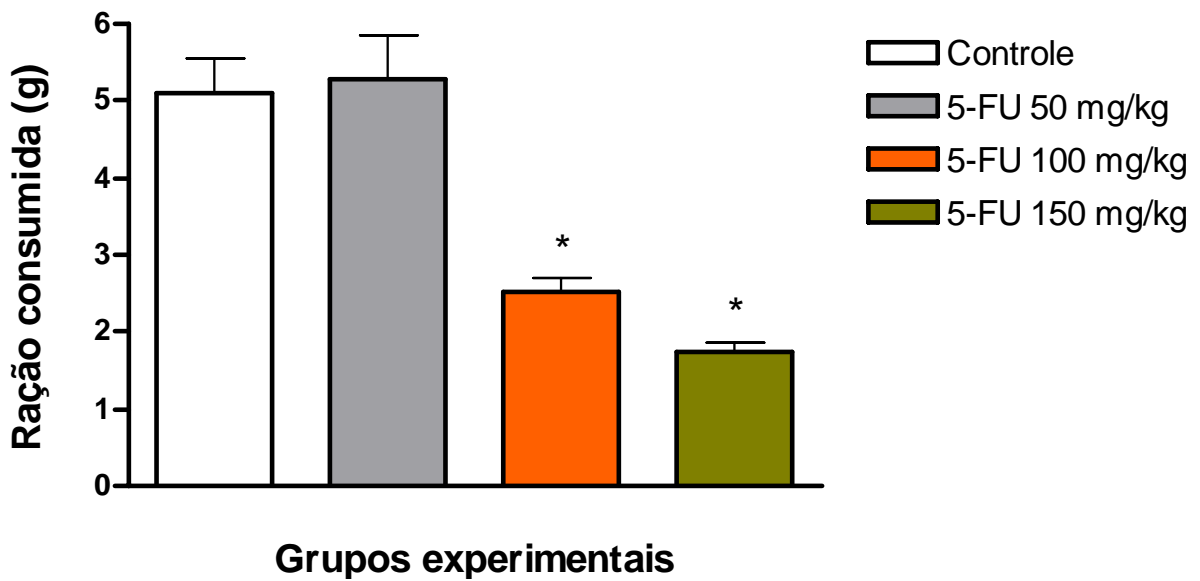
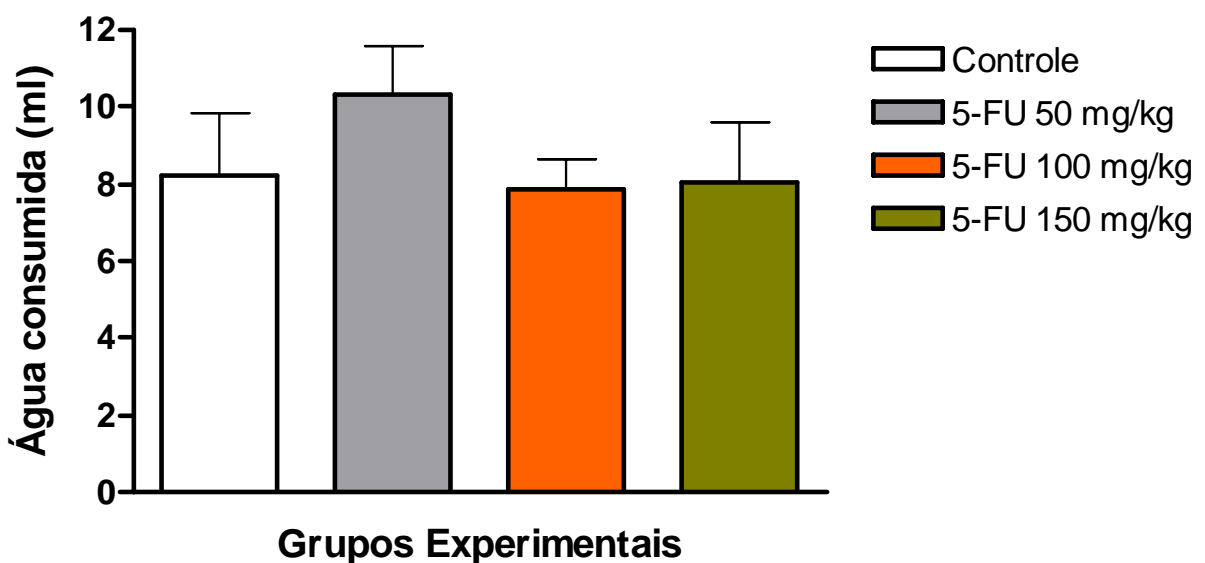
Ao serem verificadas alterações no sistema digestório e na evolução ponderal, foi constatada alteração no comportamento alimentar nos animais tratados com 5-Fluorouracil. A experimentação metabólica foi continuada através da mensuração da ingestão diária de água (ml) e de ração comercial padrão (g), durante 10 dias. O grupo controle (PBS) não apresentou alteração em seu consumo diário, conforme o preconizado para camundongos segundo o COBEA (2004). As doses de 100 e 150 mg/kg induziram redução apenas no consumo de ração. No último dia de observação (10<sup>o</sup> dia) o consumo de ração/animal aumentou no grupo de 50 mg/kg (7,13 g vs 4,8 g no 1<sup>o</sup> dia); nos grupos de 100 e 150 mg/kg houve redução na ingestão sendo de 2,8 g vs 3,58g; e 1,67 g vs 3,8 gramas, respectivamente. A ingestão de água não foi alterada nas três doses testadas.

O modelo experimental de injúria intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos foi validado através das alterações constatadas na avaliação ponderal, da redução ponderal e alteração do padrão alimentar nos camundongos tratados (**tabela 2**).

Para confirmar o efeito deletério da administração de 5-FU sobre o trato digestório, propusemos que o prejuízo ponderal poderia estar associado a uma alteração na barreira morfofuncional do intestino delgado.

**Tabela 2:** Avaliação metabólica em camundongos (n=10/grupo) injetados com 0,25 ml de 5-Fluorouracil (50, 100 e 150 mg/kg/dia sc) ou PBS (controle). Os valores referentes à ingestão de ração, de água e alteração ponderal são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das variações mensuradas diariamente durante dez dias (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

<b>GRUPOS</b>	<b>Alteração ponderal g/animal/dia</b>	<b>Ingestão de ração g/animal/dia</b>	<b>Ingestão hídrica ml/animal/dia</b>
Controle	0,9496 $\pm$ 0,3425	5,093 $\pm$ 0,472	8,253 $\pm$ 1,584
5-FU (50 mg/kg)	-0,7801 $\pm$ ,5180	5,224 $\pm$ 0,416	10,349 $\pm$ 1,222
5-FU (100 mg/kg)	-1,881 $\pm$ 0,5372 *	3,237 $\pm$ 0,441 *	7,884 $\pm$ 0,779
5-FU (150 mg/kg)	-4,358 $\pm$ 0,8553 *	2,585 $\pm$ 0,465 *	8,069 $\pm$ 1,547

**A****B**

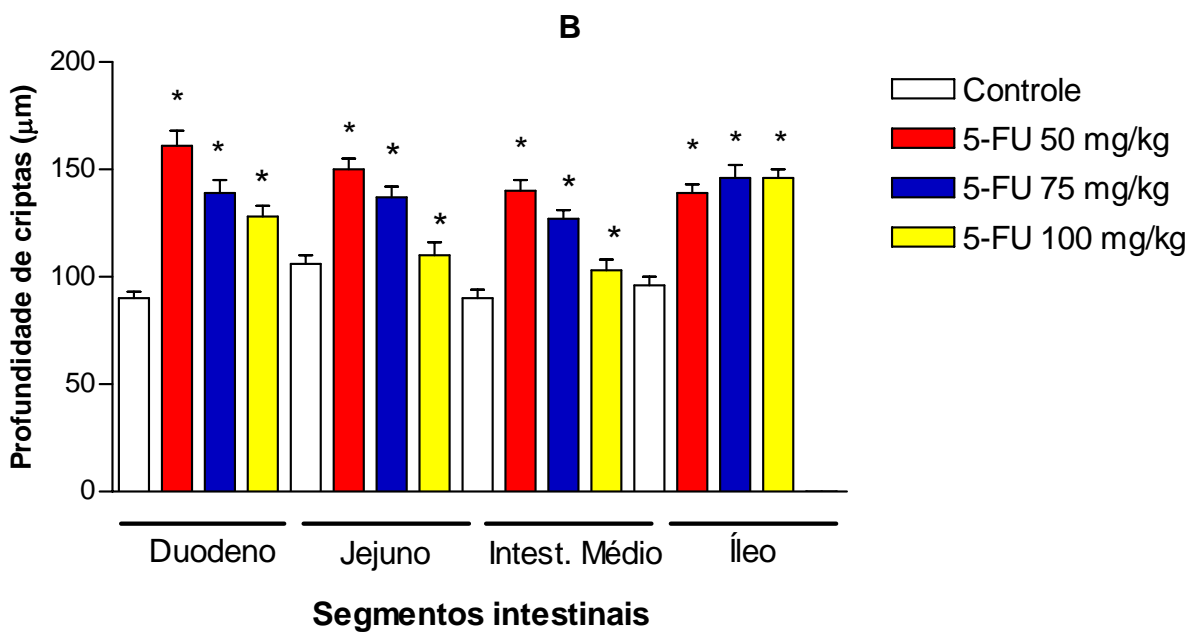
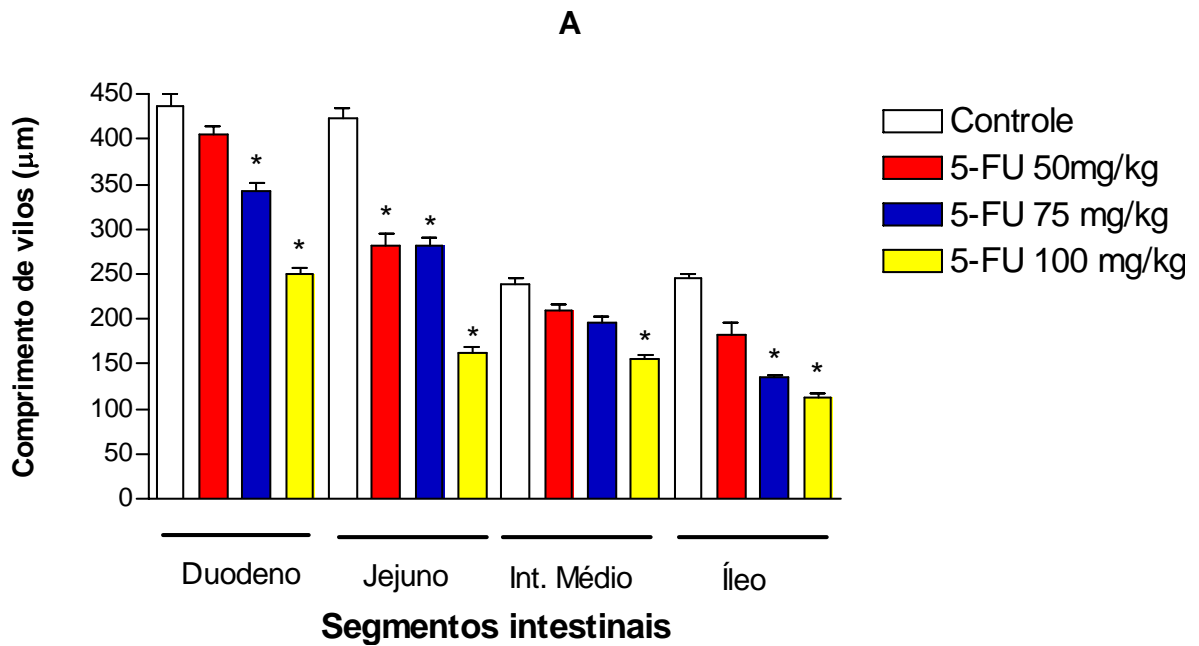
**Gráfico 3: Alteração do comportamento alimentar** de ração (A) e de água (B) o uso de 5-fluorouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml /animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais durante os dez dias (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

#### **4.4) Alteração da barreira morfofuncional do intestino delgado, induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.**

A alteração nos padrões ponderal e alimentar dos animais injetados com 5-fluorouracil (5-FU), levaram-nos à avaliação da extensão do efeito lesivo deste antimetabólito, sobre a mucosa intestinal. Para tanto, se estabeleceu um protocolo de análise morfométrica ( $\mu\text{m}$ ) de vilos e criptas em vários segmentos do intestino delgado. Foi escolhida a dose de 100 mg/kg de 5-FU, uma vez que esta foi eficaz em produzir injúria intestinal e não levar a óbito 100% dos camundongos. O estudo morfométrico para mensuração de vilos e criptas intestinais foi efetuado em microscopia óptica (400x) com auxílio de ocular milimetrada.

No **gráfico 4A** pode ser visualizada redução no comprimento de vilos em todos os segmentos intestinais na dose de 100 mg/kg. Na dose de 50 mg/kg de 5-FU, observou-se este efeito apenas o jejuno. Para avaliar se uma dose intermediária seria capaz já de induzir alterações morfométricas testamos a dose de 75 mg/kg/dia sc. Observamos que houve alterações exceto no intestino médio.

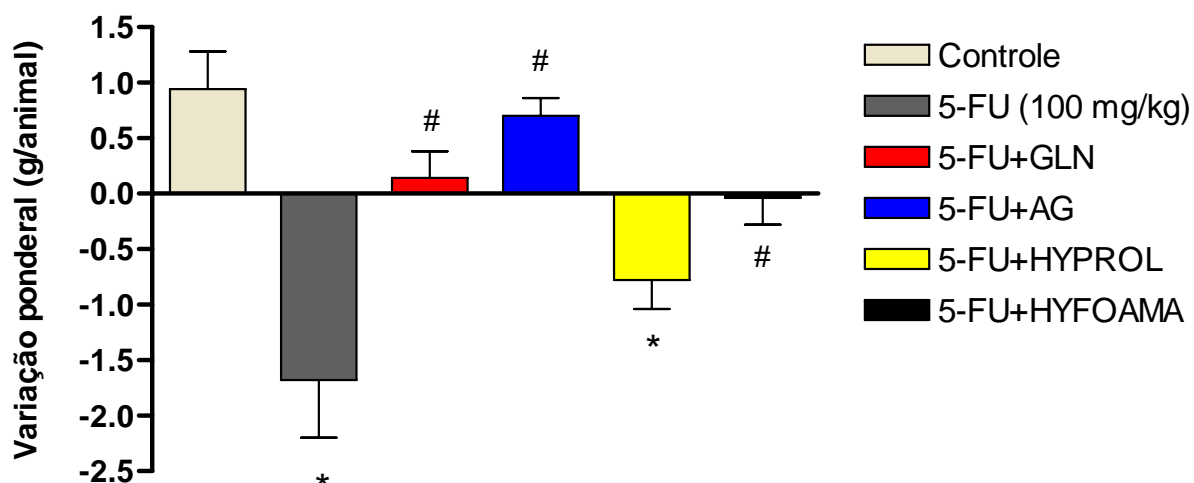
No **gráfico 4B** houve um aumento da profundidade das criptas, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg em todos os segmentos intestinais, correlacionando com o grupo controle. A partir destas observações constatamos que a dose mais adequada para reproduzir o modelo experimental de mucosite intestinal foi a de 100 mg/kg/dia sc de 5-fluorouracil, visto seu maior efeito deletério em todos os segmentos intestinais.



**Gráfico 4: Análise morfométrica** de vilos (A) e de criptas (B) no intestino delgado de camundongos injetados com 5-fluourouracil (5-FU) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).

#### **4.5) Efeito da suplementação com glutamina, alanil-glutamina e peptídeos ricos em glutamina no restabelecimento do perfil ponderal em camundongos com mucosite intestinal.**

Após, constatado o efeito injuriante do 5-fluorouracil (100 mg/kg) sobre a mucosa intestinal e sobre o metabolismo dos animais ( $-1,68 \pm 0,5145$  vs  $0,95 \pm 0,3425$  g), foi observado uma melhora no perfil ponderal nos grupos suplementados Gln, Hyfoama 77 e Ala-Gln. No **gráfico 5** o grupo suplementado com Hyprol 4107 não induziu melhora significativa no ganho de massa corpórea. Uma maior eficácia foi evidenciada com o grupo suplementado com Alanil-Glutamina ( $0,71 \pm 0,1588$  g), onde praticamente não houve perda ponderal, apenas redução no ganho de massa. Os camundongos apresentaram melhora considerável no ganho ponderal 72 horas após a última administração com 5-fluorouracil. Não foram observadas ocorrências de cauda molhada e nem de diarreia.



\*  $p < 0,05$  (grupos experimentais vs controle)  
 #  $p < 0,05$  (grupos suplementados vs 5-FU)

**Gráfico 5: Evolução da massa corpórea** durante e após a injeção de 5-fluourouracil (5-FU) na dose 100 mg/kg/dia s.c. com 0,25 ml/animal de PBS (controle) ou solução contendo glutamina (GLN), alanil-glutamina (AG) e suplementos ricos em glutamina, Hyprol 4107 (HYP) e Hyfoama 77 (HYFO). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), das variações ponderais diárias dos animais (n=10/grupo). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$ ).



#### **4.6) Restabelecimento da barreira morfofuncional do intestino delgado com a suplementação de glutamina, alanil-glutamina e peptídeos ricos em glutamina.**

A partir da constatação da alteração morfológica de vilos e de criptas intestinais em camundongos administrados com 100 mg/kg/dia sc de 5-fluorouracil, foi proposto que a suplementação com glutamina, alanil-glutamina ou peptídeos ricos em glutamina seriam capazes de restabelecer a atrofia nos vilos e a hiperplasia intestinal de criptas. Para tanto, avaliamos o efeito desta suplementação em cada segmento intestinal.

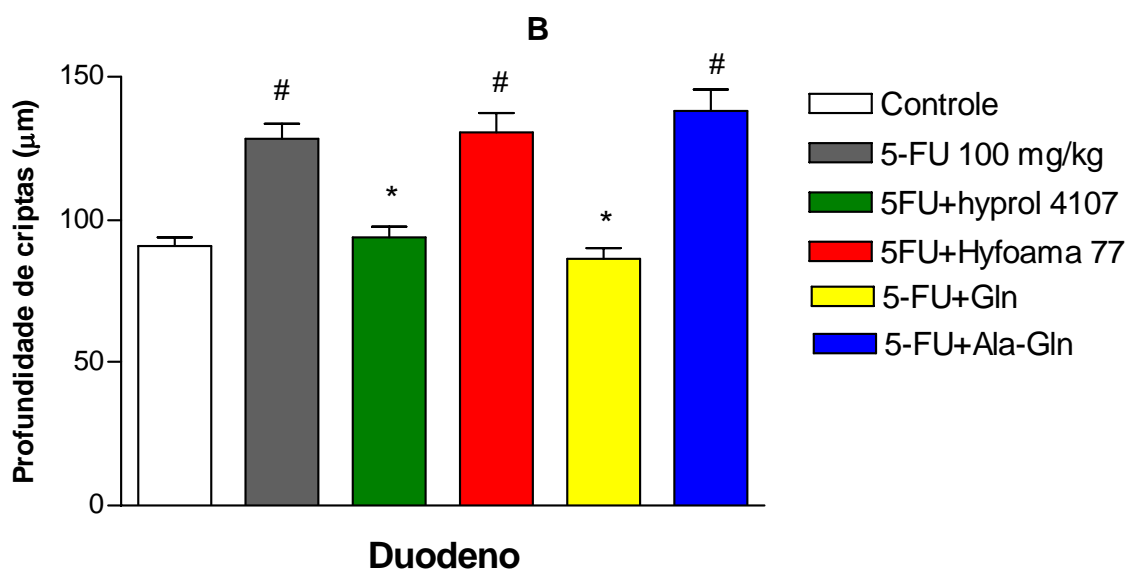
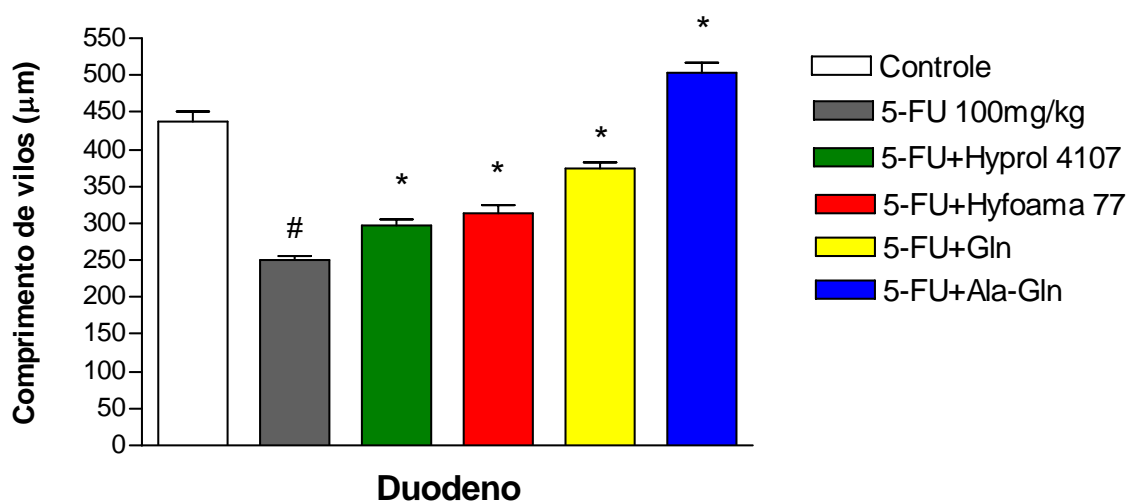
No duodeno **gráfico 6A**, todos os suplementos reverteram a atrofia de vilos ocorrida na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil ( $251 \pm 6,067 \mu\text{m}$ ). O grupo suplementado com Ala-Gln ( $504,3 \pm 13,98 \mu\text{m}$ ) apresentou um incremento no comprimento de vilos no duodeno, sendo o valor mensurado maior que o do controle ( $437 \pm 12,92 \mu\text{m}$ ). Os outros grupos aumentaram o comprimento dos vilos, porém não atingiram o valor observado no grupo controle. Nas criptas intestinais **gráfico 6B** houve uma redução da hiperplasia ( $128,3 \pm 4,98 \mu\text{m}$ ) apenas nos grupos suplementados com Hyprol 4107 e Glutamina ( $86,25 \pm 13,98 \mu\text{m}$ ), atingindo valores aos mensurados no grupo controle ( $90,5 \pm 3,118 \mu\text{m}$ ).

Quanto ao jejuno **gráfico 7A**, apenas os grupos suplementados com glutamina e alanil-glutamina ( $427 \pm 11,61 \mu\text{m}$ ), foram capazes de ter restabelecido o trofismo dos vilos intestinais alterados com o efeito deletério do 5-FU ( $162,9 \pm 15,361 \mu\text{m}$ ). Na análise morfométrica de criptas intestinais **gráfico 7B**, todos os grupos suplementados, exceto o grupo glutamina, estimularam a proliferação celular neste compartimento. Neste segmento o 5-FU não induziu hiperplasia de criptas.

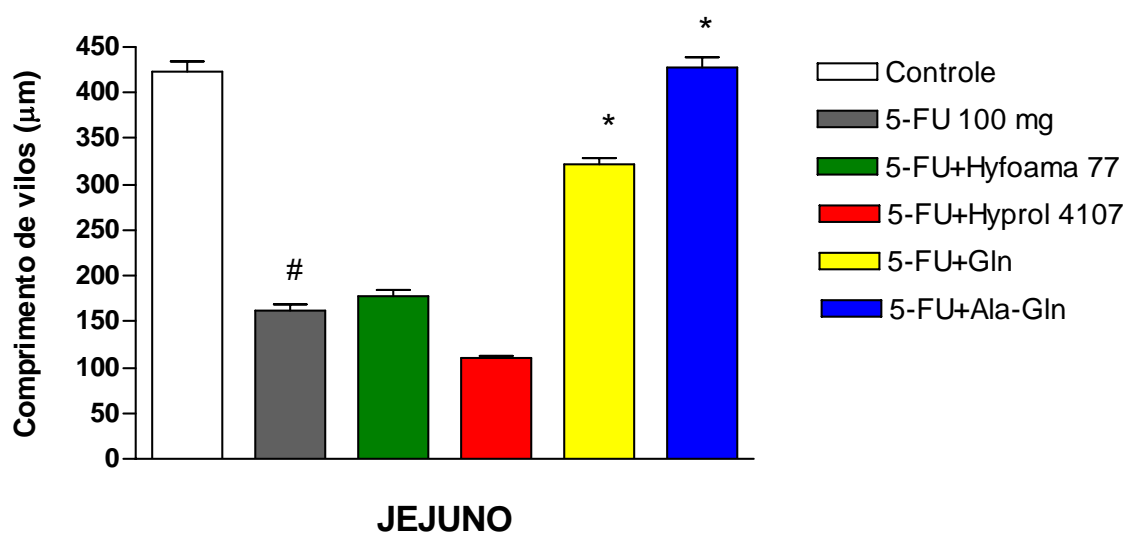
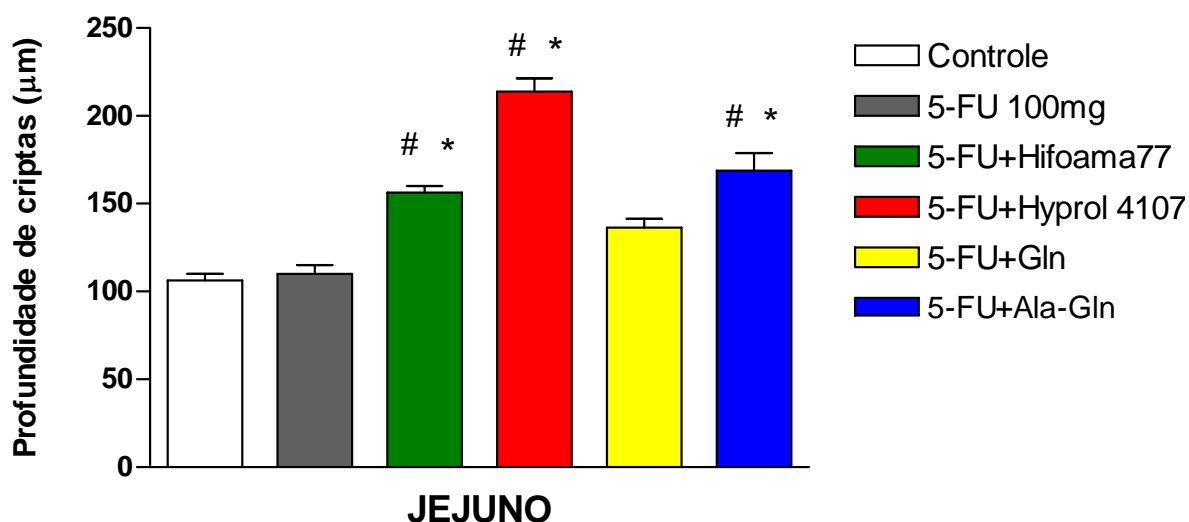
No **gráfico 8A**, observa-se que apenas Glutamina e Ala-Gln ( $262,8 \pm 9,093 \mu\text{m}$ ) foram capazes de superar a atrofia de vilos ( $155,1 \pm 5,016 \mu\text{m}$ ) comparando os valores mensurados aos do grupo controle ( $239,5 \pm 4,736 \mu\text{m}$ ). No intestino médio, apenas Hyfoama ( $171,2 \pm 6,233 \mu\text{m}$ ) estimulou a

proliferação celular além do controle ( $134,6 \pm 4,788 \mu\text{m}$ ) nas criptas intestinais **gráfico 8B**, e o grupo suplementado com hyprol manteve valores similares às criptas do grupo controle.

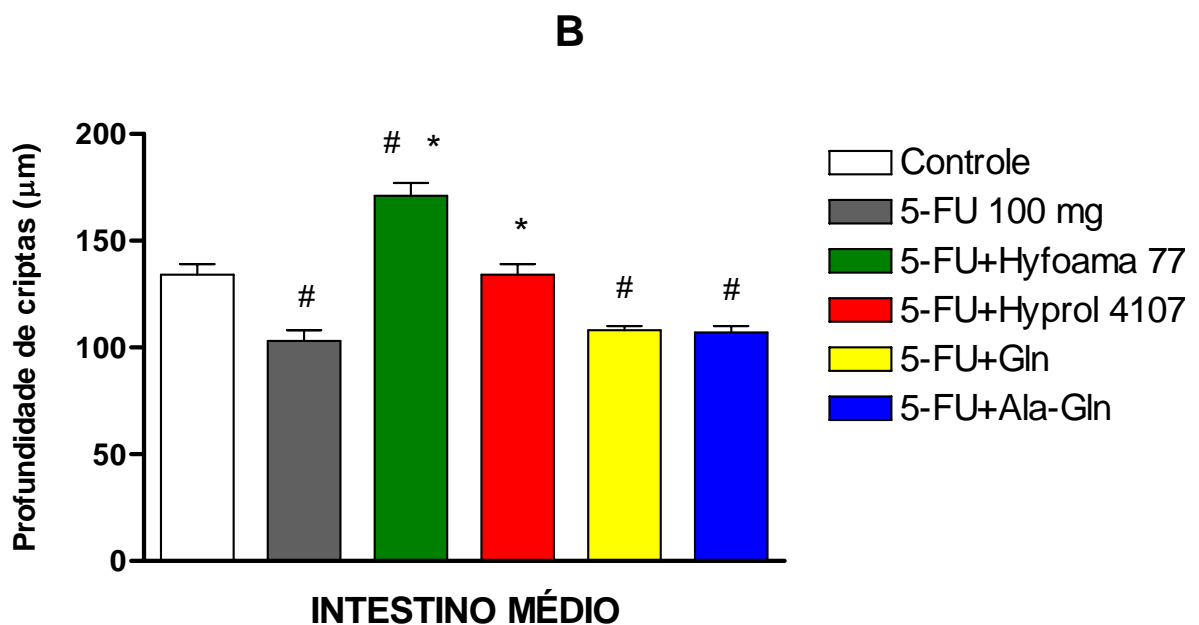
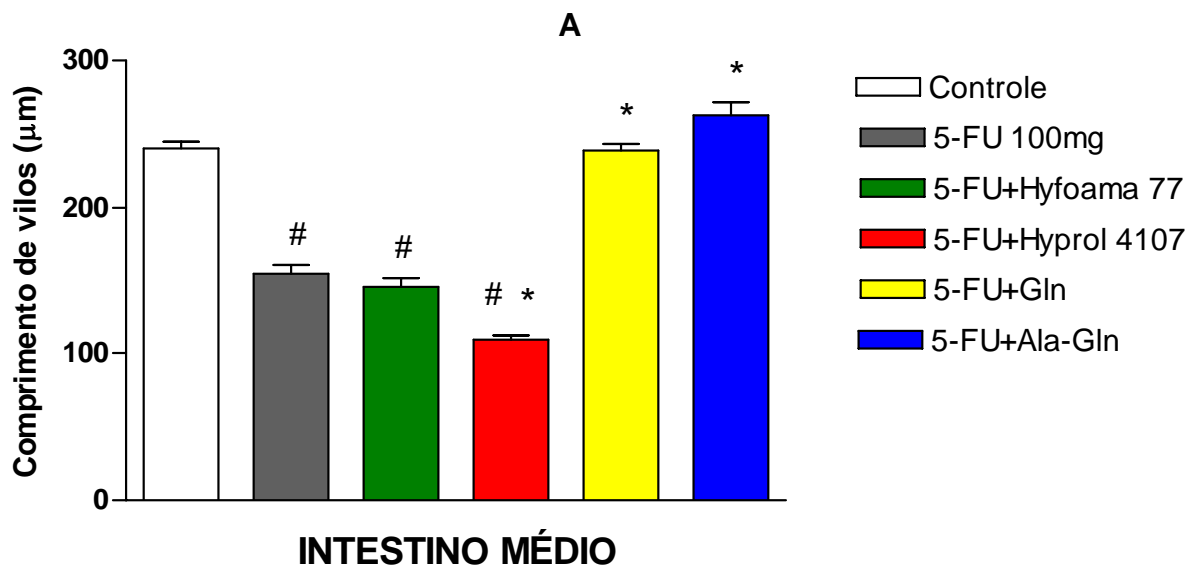
No íleo **gráfico 9A**, foi observada melhora do trofismo de vilos alterado com 5-FU ( $112,3 \pm 4,668 \mu\text{m}$ ), com os grupos suplementados com Hyfoama, Hyprol e Alanil-glutamina. Deve-se ressaltar que apenas Ala-Gln ( $229,8 \pm 9,076 \mu\text{m}$ ), foi capaz de restabelecer o comprimento dos vilos comparado ao grupo controle ( $245 \pm 4,947 \mu\text{m}$ ). A hiperplasia de criptas induzida por 5-FU ( $146 \pm 4,381 \mu\text{m}$ ), **gráfico 9B** foi reduzida por Hyprol e Ala-Gln, sendo os valores mensurados similares ao controle ( $96,5 \pm 3,424 \mu\text{m}$ ) e menores ao deste, respectivamente.

**A**

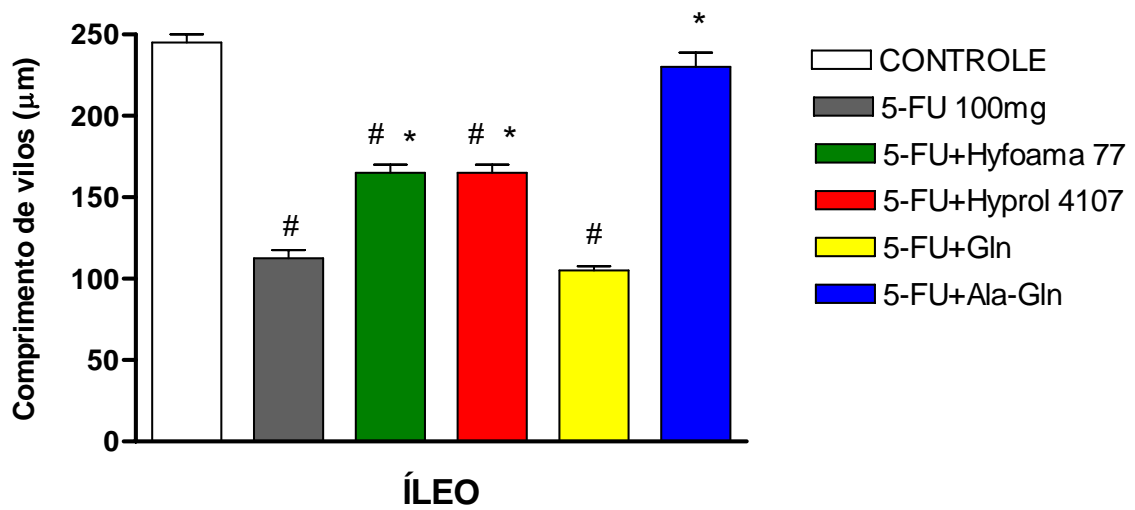
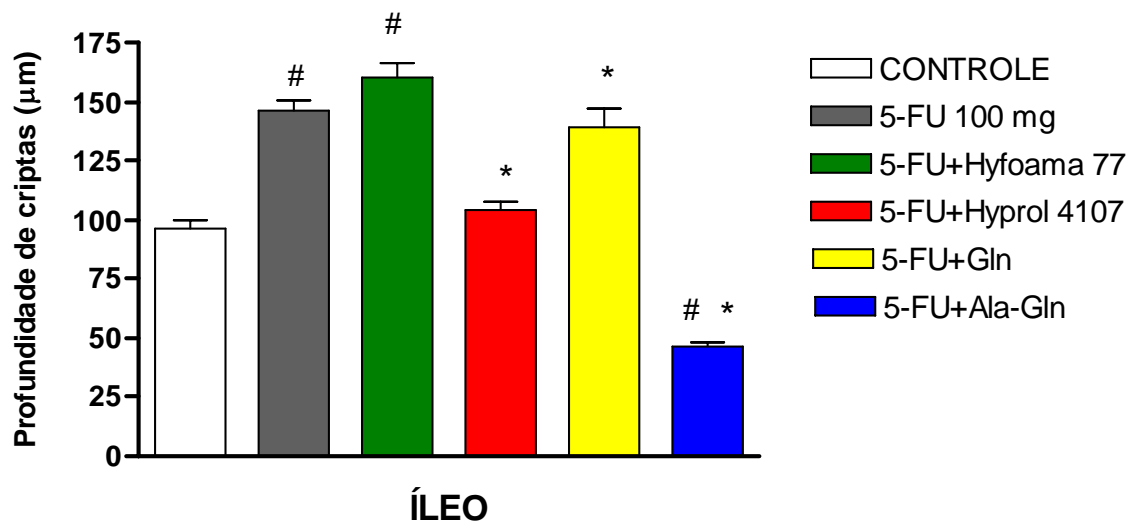
**Gráfico 6: Análise morfológica** de vilos (A) e de criptas (B) no duodeno de camundongos injetados com 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**A****B**

**Gráfico 7: Análise morfométrica** de vilos (A) e de criptas (B) no jejunum de camundongos injetados com 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).



**Gráfico 8: Análise morfométrica** de vilos (A) e de criptas (B) no jejuno de camundongos injetados com 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**A****B**

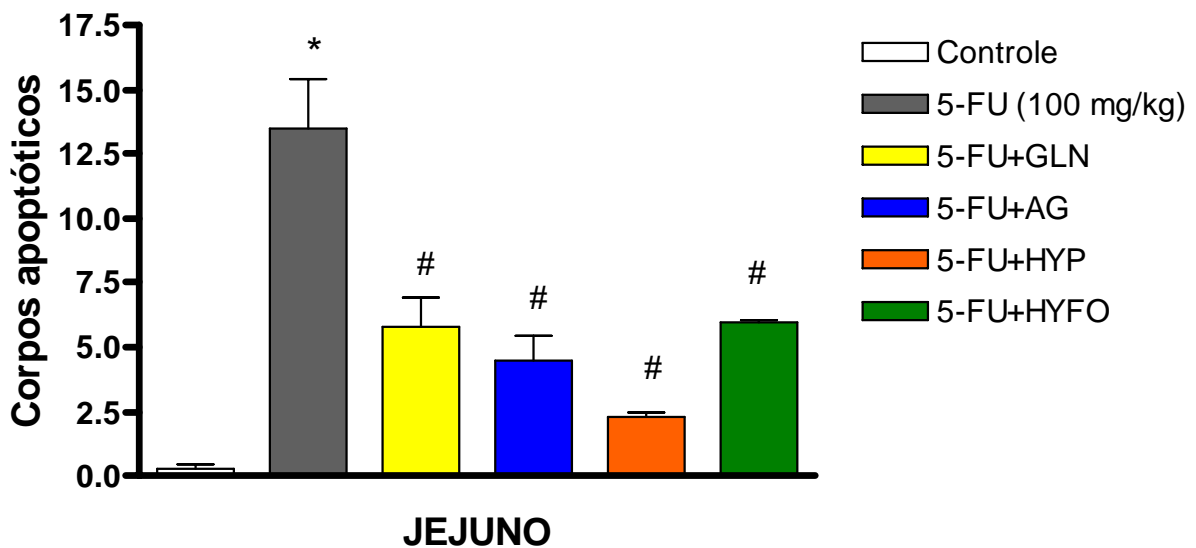
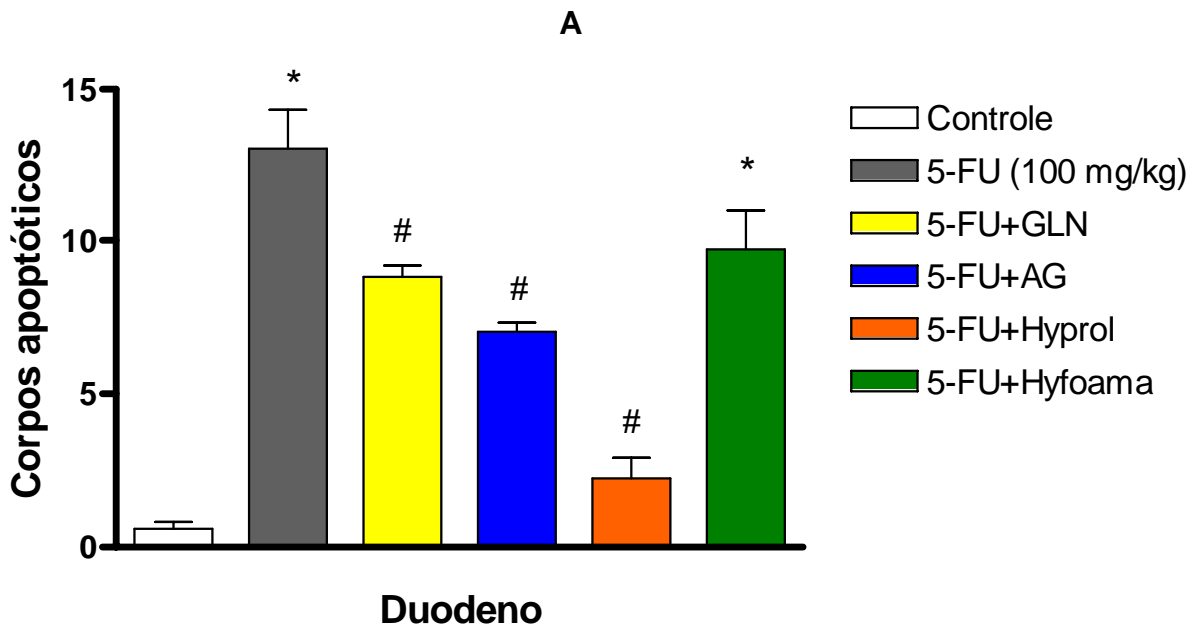
**Gráfico 9: Análise morfométrica** de vilos (A) e de criptas (B) no jejuno de camundongos injetados com 5-fluourouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

#### **4.7) Restabelecimento da proliferação celular na injúria intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos.**

A lesão da mucosa intestinal induzida pelo 5-fluorouracil foi determinada com a dose de 100 mg/kg/dia sc. O grupo 5-FU apresentou maior número de corpos apoptóticos no compartimento das criptas intestinais comparado com o controle ( $13 \pm 1,291$  vs  $0,3 \pm 0,1528$  corpos apoptóticos). As suplementações com glutamina, alanil-lutamina e principalmente com Hyprol 4107 ( $2,25 \pm 0,629$ ) reduziram a ocorrência de corpos apoptóticos no segmento duodeno **gráfico 10A**. Todos os suplementos (Gln, Ala-Gln, HYP e HYFO) induziram um declínio no número de corpos apoptóticos nas criptas induzidos pelo antimetabólito 5-fluorouracil no jejuno. Nos dois segmentos (duodeno e jejuno) nenhuma das suplementações foi capaz de expressar valores semelhantes aos do grupo controle, sendo o peptídeo Hyprol 4107 mais eficaz na redução do número de corpos apoptóticos contados nas criptas nesta injúria, nos dois segmentos.

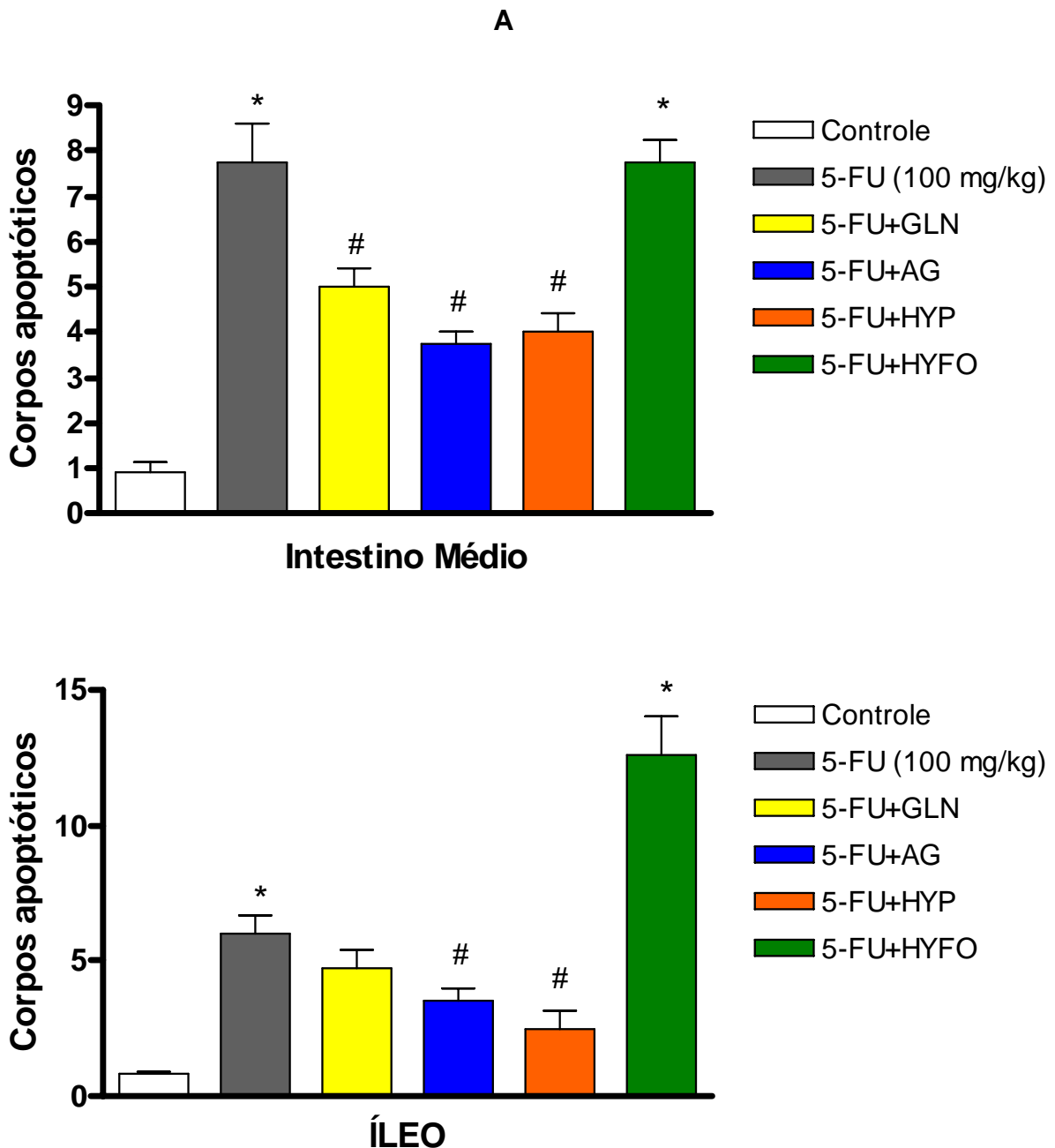
No **gráfico 11A** (intestino médio), houve diminuição da ocorrência de corpos apoptóticos com as suplementações com glutamina, alanil-glutamina, Hyprol 4107 excetuando-se a com Hyfoama 77, sem, no entanto igualar-se ao controle ( $0,3 \pm 0,528$ ). E novamente com Hyprol 4107 obteve-se uma melhor eficácia ( $2,25 \pm 0,25$  vs  $13,5 \pm 1,893$ ). OS segmentos intestinais, intestino médio e íleo **gráfico 11A e B** apresentaram as mesmas respostas quanto à suplementação assim como o duodeno.

Os segmentos duodeno e jejuno foram os que mais sofreram precipitação da morte celular por apoptose. Algumas amostras histopatológicas apresentavam-se com características teciduais de processo inflamatório: Destruição da arquitetura tecidual, presença de polimorfonucleares, tecido fibroso e em menor ocorrência, estase sanguínea. A proliferação celular observada através de figuras mitóticas não foi diferente entre os grupos controle, 5-fluorouracil e os com suplementação.



**Gráfico 10: Ocorrência de apoptose** no Duodeno (A) e no Jejuno (B) em criptas de camundongos injetados com 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

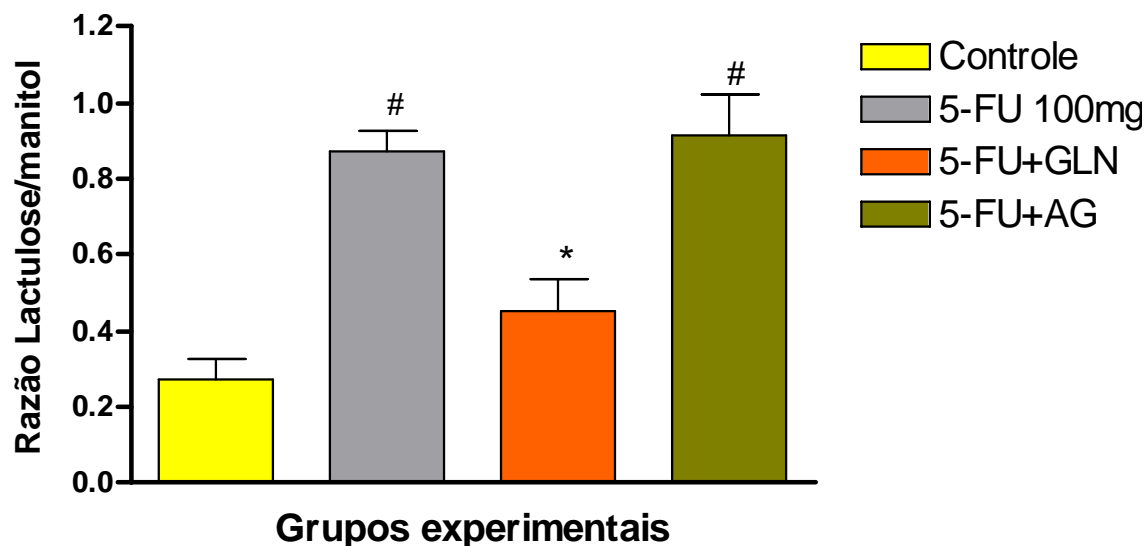




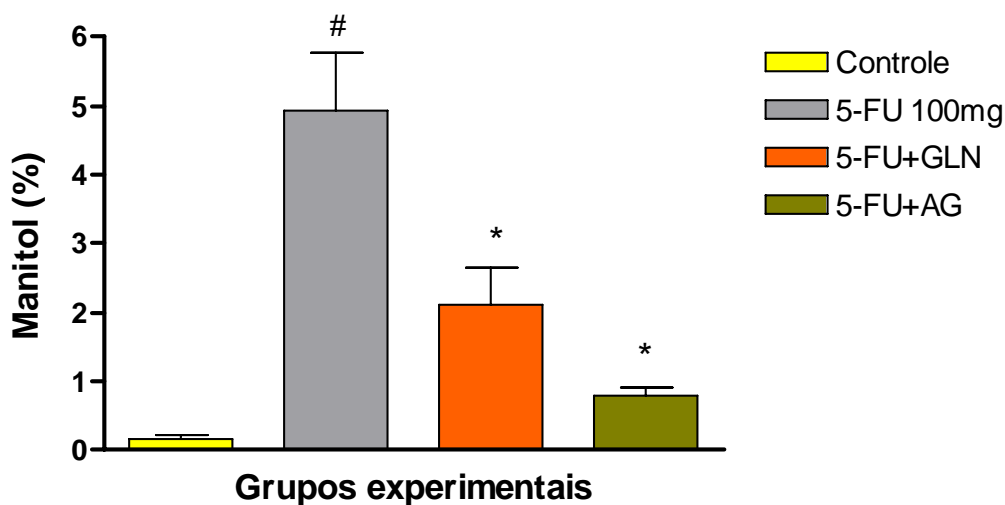
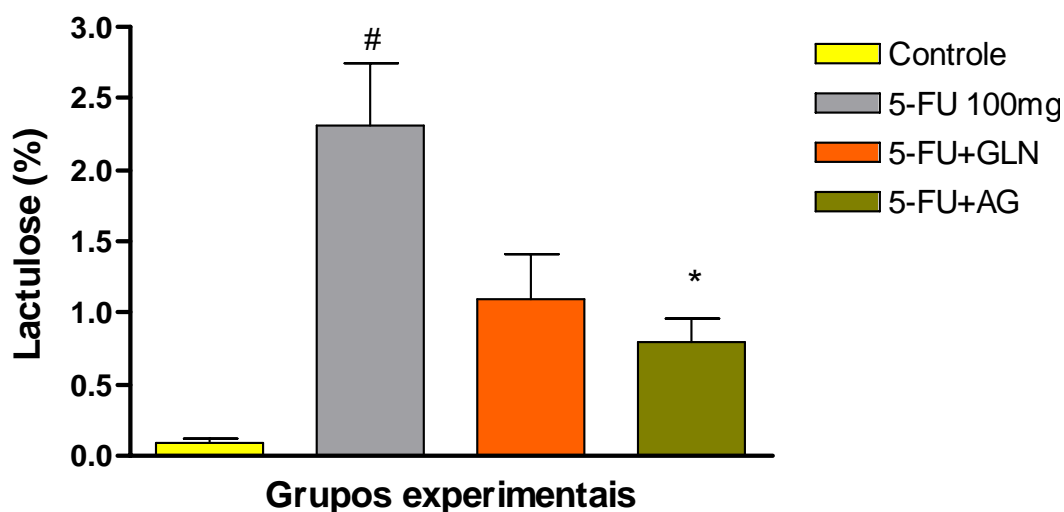
**Gráfico 11: Ocorrência de apoptose** no Intestino Médio (A) e no Íleo (B) em criptas de camundongos inoculados com 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 100 mg/kg/dia s.c. ou com 0,25 ml/animal de PBS (controle), e suplementados com 0,6 g/kg/dia s.c. de hyprol 4107, hyfoama 77, glutamina (Gln) e Alanil-glutamina (Ala-Gln). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), sendo utilizados 8 animais/grupo. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

#### **4.8) A suplementação com glutamina, restabelece a permeabilidade intestinal**

Para investigação da biologia do enterócito quanto o seu processo absorptivo, foi realizado o teste de lactulose/manitol (L/M). No **gráfico 12**, pode-se observar um aumento acentuado da razão lactulose/manitol nos animais injetados com 5-fluorouracil ( $0,8686 \pm 0,056$ ), em cerca de quatro vezes mais que a razão do grupo controle ( $0,2728 \pm 0,053$ ). Apenas a suplementação com glutamina, ( $0,4538 \pm 0,080$ ) restaurou a permeabilidade intestinal quando do uso concomitante com o 5-FU. Aparentemente não houve alteração com a suplementação com alanil-glutamina, mas no **gráfico 13A e B** nota-se que a recuperação de lactulose e de manitol individualmente foi muito menor que os outros grupos. Devido a problemas técnicos não foi possível efetuar a leitura cromatográfica das amostras referentes aos grupos hyprol 4107 e hyfoama 77.



**Gráfico 12: Taxa de recuperação urinária de lactulose/manitol (L/M)** em camundongos com injúria intestinal (n=6 animais/grupo) induzida por 5-Fluorouracil (100 mg/kg/dia s.c.) Os animais foram suplementados durante três dias com alanil-glutamina (Ala-Gln) na dose de 0,6g/kg/dia s.c. A urina foi coletada após a administração via gavagem de 0,25 ml solução de lactulose/manitol, e uma alíquota foi usada para determinação em HPLC. Os valores são apresentados como média ± EPM (erro padrão da média). Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

**A****B**

**Gráfico 13: Percentual de excreção urinária** de manitol (A) e de lactulose (B) em camundongos com injúria (n=6 animais/grupo), induzida por 5-FU (100 mg/kh/dia s.c.). Os camundongos foram suplementados, durante 3 dias, com glutamina (GLN) e Alanil-Glutamina (AG), na dose de 0,6 g/kg/dia s.c. A urina foi coletada 24 horas após administração via gavagem de 0,25 ml/animal de solução lactulose-manitol, e uma alíquota foi usada para determinação em HPLC. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), n=8 animais/grupo. Para diferenças estatísticas entre os grupos utilizou-se ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. A significância foi fixada em um intervalo de confiança de 95% (\* $p < 0,05$  vs 5-FU e #  $p < 0,05$  vs controle).

## DISCUSSÃO



## 5) DISCUSSÃO

As funções do sistema digestório são reguladas por peptídeos, derivados de aminoácidos e por uma variedade de outros mediadores. Secreção, motilidade e funções absorptivas devem estar integradas para manter a homeostase entre as refeições. Desta forma são mantidas, digestão e absorção adequadas de nutrientes através da mucosa gastrointestinal. Diversos tipos celulares são constituintes do epitélio intestinal, auxiliando no processo integrado funcional, sendo todas elas originadas a partir de uma célula totipotente comum no interior das criptas. O trajeto de maturação e de diferenciação celular intestinal segue o eixo vilo-cripta, numa jornada média de 3-4 dias (BJERKNES & CHENG, 1999). O mecanismo de sinalização para migração e diferenciação das células intestinais é mediado pela cascata da Wnt- $\beta$ -catenina.

KIM e colaboradores (2005) identificaram uma nova proteína humana, a R-spondina1, a qual é responsável pela ativação da  $\beta$ -catenina sinalizando e aumentando drasticamente a proliferação e o crescimento tecidual dos intestinos delgado e grosso em camundongos. Estes autores constataram ainda que a R-spondina1 pode abrandar os efeitos gastrointestinais adversos do 5-fluorouracil, tais como diarreia, perda ponderal e prejuízo na integridade da mucosa. Tais efeitos adversos foram reproduzidos com a injeção de 100 mg/kg/dia sc de 5-fluorouracil em camundongos Swiss. Em nosso estudo, a suplementação com glutamina, alanil-glutamina e Hyfoama 77, amenizaram a perda ponderal e mantiveram o consumo alimentar adequado para manutenção da massa corpórea.

A digestão e a absorção estão intimamente relacionadas à assimilação protéica. L-isômeros de alguns aminoácidos são absorvidos através de mecanismos mediados por carreadores similarmente à glicose (em JONHSON, 1997). A integridade funcional da barreira epitelial intestinal além de preservar o processo absorptivo, compõe uma das maiores defesas contra a invasão de patógenos. O processo de renovação (*turnover*) das células epiteliais do intestino ao ser acelerado contribui na defesa gastrointestinal.

A glutamina está presente em muitas proteínas e é o aminoácido mais abundante no plasma e nos tecidos. Em humanos, a glutamina representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres no plasma. É considerado um aminoácido semi-essencial em situações de estresse catabólico, sendo reduzida sua concentração em até 50% (EPLER, 2003). Dentre suas funções incluem-se a participação em várias vias metabólicas, na síntese protéica, e como doadora de átomos de nitrogênio durante a síntese de purinas, de pirimidinas e de aminoaçúcares. No fígado pode funcionar como importante substrato para a gliconeogênese. É avidamente consumida pelas células de rápida divisão como enterócitos, fibroblastos e células do tecido nervoso, além de neutrófilos (em CURI, 2000).

WEISS e colaboradores, em 1999, constataram que a glutamina-sintetase é uma enzima importante para a diferenciação do epitélio intestinal. O RNAm e a proteína desta enzima estão concentrados nas criptas do intestino delgado de ratos. Estudos *in vitro* demonstraram que a deficiência de Gln reduz a síntese protéica em modelo de enterócitos humanos (LE BACQUER e cols., 2001). O efeito da suplementação de glutamina em modelo de enterocolite reduz a mortalidade, melhora o ganho de massa e a morfometria intestinal em ratos. Uma dieta com polipeptídeos ricos em Gln, melhora a sobrevivência de animais e previne a atrofia da mucosa intestinal em presença de enterocolite induzida por quimioterápicos, com significativa atenuação do aumento da permeabilidade intestinal (MARKS e colaboradores, 1999).

Na doença diarréica, o organismo absorve menos nutrientes do que quando se encontra normal, além de ingerir 40% a menos de alimentos. A anorexia então presente está associada a um prejuízo na função absorptiva. Estas situações contribuem para a desnutrição, com risco a predisposição de infecções bacterianas e virais. Uma boa nutrição, antes, durante e após a diarreia, pode quebrar o ciclo diarreia-desnutrição (FONTAINE e cols., 1985; BROWN, 2003). O uso de 5-fluorouracil induziu, em camundongos a condição

clínica de injúria intestinal, caracterizada por ingestão diminuída de ração, diarreia e perda de massa corporal. Este estresse agravou o perfil metabólico e absorptivo dos animais. O sistema digestório é particularmente vulnerável nessa situação devido às altas taxas de *turnover* e de proliferação celular. Em situações de hipermetabolismo como desnutrição associada à diarreia, acontece aumento do catabolismo protéico, dos requerimentos de energia e da mobilização de aminoácidos (EPLER e cols., 2003; TORRES e cols., 2003). Já em 1980, TAMINIAU e colaboradores, demonstraram que o uso de MTX em ratos (30 mg/kg/24 i.v.), em dose única, reduz a ingestão de ração 24h após a 1ª inoculação, ocasionando anorexia mais pronunciada, entre 72 e 120 horas. No estudo destes autores, o quadro diarréico foi registrado nos dias 2, 3 e 4 após administração de MTX. Este fenômeno ocorreu também em nosso estudo com o antimetabólito 5-Fluorouracil (5-FU) no qual houve uma maior perda ponderal nas 48 e 96 horas após a última injeção de 100mg/kg de 5FU. Houve uma tentativa, intercalada, de restabelecimento da massa corpórea nas 72 e 104 horas após a última administração de 5-FU.

A severidade da lesão intestinal no compartimento da cripta, traduzida pela ocorrência de apoptose é determinada, segundo BACH e colaboradores (2006), pela distribuição regional de p53. A disponibilidade regional no intestino delgado desta proteína modula a toxicidade ao longo deste órgão. Daí os diferentes segmentos intestinais avaliados apresentarem enterotoxicidade diferentes em suas mucosas. Porém não apenas há influência do p53, mas também do p21 e gene bax, os quais exercem efeitos apoptóticos ao serem ativados (INOMATA e colaboradores, 2002).



Em pacientes com câncer intestinal, o dano da barreira morfofuncional induzido pela quimioterapia com 5-FU, foi caracterizado por um aumento da permeabilidade conferida através do teste de lactulose/manitol. Em nosso trabalho, este efeito lesivo foi reproduzido. No entanto, apenas a suplementação com glutamina restabeleceu a permeabilidade intestinal alterada. LIMA e colaboradores (2005), em ensaio clínico demonstraram ganho ponderal e melhora da permeabilidade intestinal com o uso enteral de glutamina, o que colabora com os nossos achados.

Nota-se que a recuperação de lactulose e de manitol individualmente foi muito menor que os outros grupos. o que pode significar que alanil-glutamina manteve mais íntegra a barreira morfointestinal, provavelmente pela ação antioxidante da glutatona que pode ser convertida a partir de glutamina, considerando que a taxa de lactulose/manitol (L/M) foi semelhante à do grupo com administração de 5-FU.

O aumento de zônulas de oclusão (tight junctions) nos enterócitos é encontrado no 3º dia de administração com outro antimetabólito. Assim, a injúria intestinal encontra-se relacionada com a apoptose nas criptas, precedendo a atrofia hipoplástica de vilos e a perda do comprimento de enterócitos (KEEFE e cols., 2000). A proliferação celular na cripta intestinal encontra-se severamente reduzida também no 3º dia pós-administração de 5-FU, precedendo o dano histológico. Após esta fase, a hiperproliferação da cripta precede a regeneração da mucosa, a qual acontece por volta do 5º ou 6º dia. A retroalimentação positiva para o fator de crescimento do hepatócito (HGF), coincide com esta fase de hiperproliferação na cripta intestinal, sugerindo um mecanismo de ação regulatório da proliferação celular parácrino (XIAN, e cols., 2000).

Em camundongos normais, cerca de 1.200 células epiteliais por 24h migram para o vilos. Então, uma quantidade similar deve ser perdida neste mesmo período. Entretanto, não foi visualizada uma quantidade de corpos

apoptóticos, uma vez que o corte histológico é de cerca de 3-4 mm, enquanto que a largura do vilo e das criptas varia entre 120 a 150  $\mu\text{m}$ . Além disto a quantidade de apoptoses pode variar nos diferentes segmentos intestinais (BENNEDETTI, e cols., 1990).

Em nosso trabalho, foi observado aumento da permeabilidade intestinal nas vias transcelular e paracelular, ou seja, na mucosa lesa e nas estruturas juncionais. Tal fato é justificado pelo conceito de que o epitélio intestinal constitui uma camada heteroporosa, com uma alta incidência de pequenos poros que permitem a difusão do manitol (poros hidrofílicos), enquanto excluem a de lactulose; e de uma pequena população de poros maiores que permeiam a passagem tanto de lactulose quanto de manitol. Estes últimos encontram-se localizados nas zônulas de oclusão (TAMINIAU e cols., 1980). A absorção transcelular de cátions depende de transporte ativo direcionado pela energia metabólica (MINEO e cols., 2004). As limitações metodológicas e de equipamentos para camundongos interferiram, embora discretamente, na interpretação dos dados de recuperação urinária destes açúcares nos animais estudados.

O aumento na recuperação urinária de lactulose e manitol destes açúcares em caso de lesão severa foi documentado em um artigo clássico sobre permeabilidade, publicado por BIJLSMA e colaboradores (1995). Um aumento na taxa (razão L/M) destes dois açúcares é indicativo de alteração na barreira morfofuncional do intestino delgado, o qual propicia uma maior permeabilidade a substâncias antigênicas e atrofia de vilos. Uma taxa de recuperação de L/M menor que 0,025 não é considerada para fins de comparação. Mais recentemente (2002) BIJSLMA e colaboradores constataram que o aumento da absorção de água aumenta a captação de manitol e reduz a taxa de permeabilidade *in vivo* em gatos.

Interessantemente, as taxas de recuperação urinária em roedores, podem exceder em até 10 vezes ou mais os valores preconizados para humanos. Em ratos normais, a taxa de recuperação urinária de L/M é de aproximadamente 0,56. Em nossos experimentos este valor foi de 0,2728 em

camundongos controle, e de 0,89 para os tratados com 5-FU. A lesão por 5-FU é confinada inicialmente às células da cripta intestinal, as quais apresentam, nesta situação, um aumento do fluxo unidirecional do fluxo de sódio e uma alta condutância elétrica, indicando uma permeabilidade epitelial excessiva, tanto transcelular quanto paracelular.

Todos os achados experimentais anteriormente citados corroboram com os nossos resultados e delineiam mecanismos de restabelecimento da mucosa diretos e indiretos para a injúria intestinal induzida por 5-FU. Com prejuízo estrutural e na funcionalidade ocasionado pelo estabelecimento da injúria, o processo absorptivo no TGI encontra-se prejudicado, depreciando ainda mais as funções orgânicas e as reservas de micronutrientes essenciais à manutenção da integridade da barreira morfofuncional. Entre estes micronutrientes encontram-se os aminoácidos. A suplementação destes substratos melhorou o perfil metabólico e morfofuncional dos animais estudados. KLOOSTERMAN e colaboradores (2006) demonstraram que a regulação da captação de glutamina/glutamato pode ser regulada ao nível gênico, como no estudo com *Streptococcus pneumoniae*.

Os resultados de nossos experimentos demonstram um restabelecimento da ingestão alimentar e com redução da perda ponderal e de apoptose induzidas pelo 5-Fluorouracil. A partir dos dados descritos anteriormente, pode-se especular que um melhor estado nutricional e metabólico dos animais estudados foi direcionado através de um melhor o processo de renovação (*turnover*) das células da mucosa intestinal através do fornecimento energético aos enterócitos. Isto nos leva a acreditar que a glutamina e principalmente o peptídeo Hyprol 4107 contribuíram para a não progressão da doença diarréica e fornecem substrato energético para o tecido intestinal efetuar adequada proliferação celular da mucosa lesada.

## CONCLUSÕES

---

---

## 6) CONCLUSÕES

A administração subcutânea de 5-Fluorouracil na dose de 100 mg/kg/24h é capaz de induzir injúria intestinal com doença diarréica em camundongos *Swiss*, demonstrado através do prejuízo na barreira morfofuncional.

A injúria intestinal induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) ocasiona redução ponderal e do consumo de ração nos animais estudados, com conseqüente redução da proliferação celular e aumento da morte celular por apoptose.

Os segmentos intestinais mais afetados na injúria experimental são o duodeno e o jejuno, através da perda da arquitetura tecidual do intestino delgado, da atrofia e de vilos e hiperplasia de criptas.

A permeabilidade intestinal, na injúria intestinal induzida por 5-fluorouracil, encontra-se aumentada por alteração na permeação nas vias paracelular e transcelular, em camundongos *Swiss*, ocasionada provavelmente por desarranjo estrutural e por aumento de apoptose em células maduras e em diferenciação. A suplementação com alanil-glutamina restabelece de certa forma a barreira morfofuncional intestinal

A suplementação com glutamina, alanil-glutamina e hyprol 4107 e hyfoama 77, restabelece a mucosa intestinal e melhora a evolução ponderal restabelecendo o padrão alimentar, na injúria intestinal induzida por 5-FU.

A suplementação com glutamina, alanil-glutamina e hyprol 4107 e hyfoama restabelece a morfo-fisiologia da barreira morfofuncional, no modelo de injúria intestinal, reduzindo o índice apoptótico.

A suplementação com glutamina, alanil-glutamina e hyprol 4107 é proposta como terapêutica coadjuvante no tratamento nas doenças diarréicas induzida por antineoplásicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

## 7) REFERÊNCIAS

ABRAHAN, C.; CHO, J. Inducing Intestinal Growth. *The New England J. Med.*, v. 21; p. 2297-2299; 2005.

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

AKISU, M.; BAKA, M.; HUSEYINOV, A.; KULTURSAY, N. The role of dietary supplementation with L-glutamine in inflammatory mediator release and intestinal injury in hypoxia/reoxygenation-induced experimental necrotizing enterocolitis. *Ann Nutr Metab*, v. 47, n. 6, p. 262-6, 2003.

BACH S. P.; WILLIAMSON S.E.; O'DWYER S. T.; POTTEN C. S.; WATSON A. J. Regional localisation of p-53 – independent apoptosis determines toxicity to 5-fluorouracil and pyrrolidinedithiocarbamate in the murine gut. *Br J Cancer* 3;95(1):35-41; 2006.

BAI, M.; JIANG, Z.; LIU, Y.; WANG, W.; LI, D.; WILMORE, D. W. Effects of alanyl glutamine on gut barrier function. *Nutrition*, v. 12, p. 793-796, 1996.

BECK, P.I.P.; WONG, Jf.J.; LI, Y.; SWAMINATHAN, S.; XAVIER Rj.R.; DEVANEY K.I.K.; PODOLSKI, D.K. Chemotherapy and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology*, v. 126(3), p. 796-808, 2004.

BENNEDETTI, A.; JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. A quantitative study of apoptosis in normal gastroduodenal mucosas. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 5, p. 369-374, 1990.



BIJLSMA, P. B., PETERS, R. A., GROOT, J. A., DEKKER, P.R., TAMINIAU, J. A. J. M., VAN DER MEER, R. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: A hypothesis. *Gastroenterology*, v. 108, p. 687-696, 1995.

BIJLSMA, P.B.; FIHN, B.M.; SJOQVIST, A.; GROOT, J.A., TAMINIAU, J.A.; JODAL M. Water absorption enhances the uptake of mannitol and decreases Cr-EDTA/mannitol permeability ratios in cat small intestine in situ. *Scand. J. Gastroenterology*, v. 37 (7), p. 799-806; 2002.

BJERKNES, M. & CHENG, H. Clonal Analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*, v. 116, p. 7-14, 1999.

BROWN, K.H. Diarrhea and Malnutrition. *J Nutr*, v. 133 (1), p. 328S-332S, 2003.

BRUNNER L.J.;DIPIRO J.T.;FELDMAN S. Metabolic cage isolation reduces antipyrine clearance in rats. *J Pharm Pharmacol*. V 46 (7), p 581-4, 1994.

CAMERON, I.L.; MUÑOZ, J.; BARNES, C.J.; HARDMAN W.E. High dietary levels of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell Int*, v. 3, c. 1, p. 3, 2003.

CARETHERS, J.M. Cell checkpoints and enterocyte differentiation: a recipe for sequential stages. *Amer Physiol Soc*, editorial, p. C1191-C1192, 1998.

CARNEIRO-FILHO B.A.; LIMA I.P.F.; ARAÚJO D.H.; CAVALCANTE M.C.; CARVALHO G.H.P.; BRITO G.A.C.; LIMA, V., NUNES-MONTEIRO S.M.; SANTOS F.N., RIBEIRO R.A. & LIMA A.A.M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate induced rat intestinal mucositis. *Dig Dis Science.*, v. 49, p. 65-72, 2004.

CARNEIRO-FILHO B.A.; BUSHEN O.Y.; BRITO.G.A.; GUERRANT R.L. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. *Curr Infect Dis Rep.* V 5 (2): p 114-119. 2003

CUPPARI, L. *Nutrição clínica no adulto*. 1ª edição brasileira, editora Manole Ltda./Universidade Federal de São Paulo; c. 1, p. 3-12, 2002.

CURI, R. *Glutamina : metabolismo e aplicações clínicas e no esporte*, Sprint, Rio de Janeiro-RJ, p. 199-208.

DAVIES I.; GODDARD C.; FOTHERINGHAM A. P.; MOSER B.; FARAGHER E.B. The effect of age on the control of water conservation in the laboratory mouse-metabolic studies. *Exp Gerontol.* V 20 (1): p 53-66.

DEMARCO, D.; DYESS, K.; STRAUSS, D.; WEST, C.M. & NEU, J. Inhibition of glutamine synthetase decreases proliferation of cultured rat intestinal epithelial cells. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients. Journal of Nutrition*, v. 129, p. 57, 1998.

DONNENBERG, M.S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature*, v. 406, p. 768-774. 2000.

DUFFY, H.P.; LEWIS, S.M.; MAYHUGH, M.A.; McCracken, A.; THORN, B.T.; REEVES, P.G.; BLAKELY, S.A.; CASCIANO, D.A.; FEUERS, R.J. Effect of the AIN93M purified diet and dietary restriction on survival in Sprague-Dawley rats: implications for chronic studies. *J. Nutr.*, v. 132, p. 101-107, 2002.

DUNCAN M, GRANT G. Oral and intestinal mucositis -causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 18(9), p. 853-874, 2003.

DUGGAN, C.; NURKO, S. "Feeding the gut": the scientific basis for continued enteral nutrition during acute diarrhea. *J. Pediatr*, v. 131, p. 801-808, 1997.

ELIA M. & LUNN P.G. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition*, v. 13 (7-8), p. 743-747, 1997.

EPLER, M.J.; SOUBA, W.W.; MENG, Q.; LIN C.; KARINCH A.M.; VARY, T.C.; PAN, M. Metabolic acidosis stimulates intestinal glutamine absorption. *J Gastrointest Surg*, v. 7 (8), p. 1045-1052, 2003.

FASANO, A.; BAUDRY, B.; PUMPLIN, D.W.; WASSERMAN, S.S.; TALL, B.D.; KETLEY, J.M.; KAPER, J.B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5242-6, 1991.

FASANO, A.; FIORENTINI, C.; DONELLI, G.; UZZAU, S.; KAPER, J.B.; MARGARETTEN, K.; DING, X.; GUANDALINI, S.; COMSTOCK, L.; GOLDBLUM, S.E. Zonula occludens toxin (Zot) modulates tight junctions through protein kinase C dependent actin reorganization in vitro. *J. Clin. Invest.*, 96: 710-20, 1995.

FONTAINE, O.; BEAU, J.P.; NDIAYE, A.M. Oral rehydration and nutritional rehabilitation of severely malnourished children. *Child Trop*, v. 158, p. 56-63, 1985.

GARLICK, P. Assessment of the safety of glutamines and other aminoacids. *J Nutr*, v. 131, p. 2556S-2561S, 2001.

GASINSKA A.; URBANSKI K.; GRUCHALA A.; BIESAGA B.;KOJS,Z. A ratio of apoptosis to mitosis, proliferation pattern and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Neoplasma*. V 49 (6) p 379-86.

GRONEBERG DA, DORING F, EYNOTT PR, FISCHER A, DANIEL H. Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver PhysiolSep*; v. 281(3), p. G697-704, 2001.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A. Diarrhea is a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 47, p. 28-35, 1992.

GUERRANT, D.I.; MOORE, S.R.; LIMA, A.A.M.; PATRICK, P.; SCHORLING, J.B.; GUERRANT, R.L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function 4-7 years later in a poor urban community in Northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, p. 707-13. 1999.

GUERRANT RL, CARNEIRO-FILHO BA, DILLINGHAM RA. Cholera, diarrhea, and oral rehydration therapy: triumph and indictment. *Clin Infect Dis.* v.;37(3), p. 398-405. 2003.

GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*. 6ª edição. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ. Capítulo 10, 1998.

HALL, P.A.; COATES, P.J.; ANSARI, B.; HOPWOOD, D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *Jornal of Cell Science*, v. 107, p. 3569-3577, 1994.

HUANG, F.S.; KEMP, C. J.; WILLIAMS, J.L.; ERWIN, C.R.; WARNER, B.W. Role of epidermal Growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. *Am J Physiol gastrointest liver Physiol.* , v. 282; p. G432-G442, 2002.

INOMATA, A.; HORII, I.; SUZUKI, K. 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? *Toxicol Lett.*; v. 133 (2-3); p. 231-240; 2002.

JOHNSON R.L. *Gastrointestinal Physiology*. Fifth edition, Mosby-Year Book, incorporation. St. Louis, Missouri, USA. p 113-134. 1997

KAPER, J.B., MORRIS, J.G., LEVINE, M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev., v. 8, p. 48-86, 1995.

KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Aplicada, 8ª edição, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ, p. 810-811, 2003.

KLOOSTERMAN, T.G.; HENDRIKSEN, W.T.; BIJLSMA, J.J.; BOOTSMA, H.J.; VAN HIJUM, S.A.; KOK, J.; HERMANS, P.W.; KUIPERS, O.P. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.*, em impressão, jun-2006.

KEEFE D.M., CUMMINS A.G., DALE B.M., KOTASEK D., ROBB T.A., SAGE R.E). Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. *Clinical Sciences*, v. 92 (4), p. 385-390, 1997.

KEEFE DM, BREALEY J, GOLAND GJ, CUMMINS AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*, v. 47(5), p. 632-637, 2000.

KIM K.A.; ZHAO J.; ANDARMANI S.; KAKITANI M.; OSHIMA T.; BINNERTS M.E.; ABO A.; TOMIZUKA K.; FUNK W.D. R-spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle*. V 5 (1), p 23-6. 2006.

KURIEN BT, SCOFIELD RH. Mouse collection using clear plastic wrap. *Lab Anim*; v. 33 (1), p. 83-86, 1999.

LAND, B.V.; MEIJER, H.P.; FRERICHS, J.; KOETSIER, M.; JAGER, D.; SMEETS, R.L.; RABET, L.M.; HOIJER, M. Transforming growth factor b-2 protects the small intestine during methotrexate treatment in rats possibly by reducing stem cell cycle. *British J Cancer*, v. 87, p. 113-118, 2002.

LE BACQUER O.; AZIH H.; BLOTTIERE H.; MEYNIAL-DENIS D.; LABOISSE C.; DARMAUN D. Effects of glutamine deprivation on protein synthesis in a

model of human enterocytes in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v 281 (6), p 1340-7. 2001

LEHNINGHER A.L.; NELSON D.L.; COX M.M. *Princípios de Bioquímica.* 3ª edição. Sarvier. São Paulo-SP, capítulo 2. 2000.

LIMA, A. A. M.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBURQUERQUE; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast of Brazil: Etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Pediatr. Scand, (Suppl.).* v. 381, p. 39-40, 1992.

LIMA, A. A. M.; SOARES, A. M.; FREIRE, J. E.; GUERRANT, R. L. Cotransport of sodium with glutamine alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosal. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 25, p. 637-640, 1992.

LIMA, A.A.M. Glutamina e Alanil-glutamil-glutamina: Síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal. Tese de Titular em Farmacologia, 1998.

LIMA, A. A. M.; BRITO L.F.; RIBEIRO H.B.; MARTINS M.C.; LUSTOSA A.P.; ROCHA E.M.; LIMA N.L.; MONTE C.M.; GUERRANT, R. L. Intestinal barrier Function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Jan: 40 (1):28-35

LIMA, A.A.M.; MOORE, S.R.; BARBOZA JR., M. S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P., FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and malnutrition shortfalls: A perspective cohort study in Northeast Brazilian Children. *J. Infect.Dis,* v. 181, p.1643-1651, 2000.

LOEHRY, C.A. & CREAMER, B. Three dimensional structure of the rat small intestine mucosa related to mucosal dynamics. C. 1, Mucosal structure and

dynamics in rat after the administration of methotrexate. *Gut*, v. 10, p. 112-116, 1969.

MARKS, S.L.; COOK, A.K.; READER, R., KASS, P.H.; THEON, A.P.; ROGERS, Q.R. Effects of glutamine supplementation of aminoacid-based purified diet on intestinal mucosal integrity in cats with methotrexate-induced enteritis. *Am J Vet Res*, v. 60 (6), p. 755-763, 1999.

Manual para técnicos em bioterismo. 3ª edição (revisada e ampliada), COBEA (Comissão Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), São Paulo-SP, p. 87-107, 2005.

MATA, L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v. 47, p. 16-27, 1992

MINEO, H.; AMANO, M.; CHIJI, H.; SHIGEMATSU, N.; TOMITA, F.; HARA, H. Indigestible disaccharides open tight junctions and enhanced Net calcium, magnesium and zinc absorption in isolated rat small and large intestinal epithelium. *Dig Dig Sciences*, v. 49, n. 1, p. 122-133, 2004.

MOORE, S. R.; LIMA, A. A. M.; SCHORLING, J. B.; BARBOZA JR., M. S.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L. Secular trends in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown. 1989 to 1996., *Int J. Infect. Dis*, 2000.

NAIR, G.B., BHATTACHARYA, S.K., RAMAMURTH, T., MUKHOPADHYAY, NOSE, K.; WASA, M.; OKADA, A. Gut glutamine metabolism at different stages of sepsis in rats. *Surg Today*, v. 32, p. 695-700, 2002.

NEUTRA M.R.; MANTIS N.J.; KRAEHENBUHL J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat immunol*. V 2 (11), p 1004-9. 2001.

ORTEGA M.; GOMEZ-DE SEGURA I.A.; VASQUEZ I.; LOPEZ J.M.; DE GUEVARA C.L. & DE-MIGUEL E. Effects of growth hormone plus a hyperproteic diet on methotrexate-induced injury in rats intestines. *Acta Oncology*, v. 40 (5), p. 615-621, 2001.

PICCIRILLO N.; DeMATTEIS S. LAURENTI L.; CHIUSOLO P.; SORA F.; PITTIRUTI M.; RUTELLA S.; CICCONI S.; FIORINI A.; D'ONOFRIO G.; LEONE G.; SICA S. Glutamine-enriched parenteral nutrition after autologous peripheral blood stem cell transplantation: effects on immune reconstitution and mucositis. *Haematologica*. v 88 (2) p 192-200. 2003.

QUADRO, L., GAMBLE, M. V., VOGEL, S., LIMA A. A. M., PIANTEDOSI, R., MOORE, S. R., COLANTUONI, V., GOTTESMAN, M. E., GUERRANT, R. L., BLANER, W. S. Retinol and retinol-binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. *J Infect Dis*, v. 182, Suplemento 1, p. S97-S102, 2000.

RANG, H. P; DALLE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE,; *Farmacologia*, 4ª edição, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ, p. 544-556, 2004.

REZENDE, M. A.; SIGAUD, C. H.; VERÍSSIMO, M. L.; CHIESA, A. M.; RHOADS, J. M.; KEKU, E.O.; BENNET, L. E.; QUINN, J.; LECCE, J. G. Development of l-glutamine stimulated electroneutral sodium absorption in piglet jejunum. *Am J. Physiol*, v. 259, p. G99-G107, 1990.

ROGERS EJ, MILHALIK S, ORTHIZ D, SHEA TB. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *J Nutr Health Aging*, v. 8(2), p.92-97, 2004.

ROMBEAU J.L. A review of the effects of glutamine-enriched diets on experimentally induced enterocolitis. *J Parenter Enteral Nutr*, v.14, n. 4, p. 100S-105S, 1990.



ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine-Relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 217-221, 2002.

ROY, S. K.; TOMKINS, A. M.; AKRAMUZZAMAN, S.M.; BEHRENS, R. H.; HAIDER, R.; FUCHS, G. Randomized controlled trial of zinc supplementation in malnourished Bangladesh children with acute diarrhea. *Arch. Disease in Childhood*, v. 77, p. 196202, 1997.

SACK, R.B.; RAHMAN, M.; YUNUS, M.; KHAN, E.H. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24: (Suppl 1), p. S102S105, 1997.

SATOH J, TSUJIKAWA T, FUJIYAMA Y, BANBA T. Enteral alanyl-glutamine supplement promotes intestinal adaptation in rats. *Int J Mol Med*, v. 12(4), p. 615620, 2003.

SCHEPACH W.; LOGES C.; BARTRAM P.; CHRISTI S.U.; RICHITER F.; DUSEL G.; STEHLE P.; FUERST P.; KASPER H. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology*. v 107 (2), p 429-34. 1994.

SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L.. Malnutrition is associated with increase diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. *Int. J. Epidemiol*, v. 19, p. 728-735, 1990

SHOU J, LIEBERMAN MD, HOFMANN K, LEON P, REDMOND HP, DAVIES H, DALY JM. Dietary manipulation of methotrexate-induced enterocolitis. *J Parenter Enteral Nutr*, v. 15, n. 3, p. 307-312, 1991.

SILVA A.C.; SANTOS-NETO M.S.; SOARES A.M.; FONTELES M.C.; GUERRANT R.L.; LIMA A.A.M. Efficacy of glutamine based oral rehydration in solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model

of secretory diarrhea induced by cholera toxin. J Pediatr Gastroenterol Nutr. v 26 (5) p 513-9.1998

SILVA, P. Farmacologia, 6ª edição, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ, pp. 92; 1303 2002.

SIPOS M.L.; NYBY J.G.; SERRAN M.F. Na ephemeral sex pheromone of female house mice (*Mus domesticus*): pheromone fade-out time. Physiol Behav. v 54 (1). p 171-4. 1993.

SLORACH, E.M.; CAMPBELL, F.C.; DORIN, J.R. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. J Cell Sci, v. 112, p. 3029-3038, 1999.

SOARES, A.M.; FREIRE JR, LIMA, A.A.M. Transport of glutamine, alanine and glucose by rabbit intestinal membrane. Brazilian J Med Biol Res, v. 24, p. 111-113, 1991.

SOARES, A.M.; FREIRE JUNIOR, J.E.; LIMA, A.A.M. Mathematical dose-response model for sodium cotransport with glucose and glutamine in the rabbit ileal mucosa. Braz J Med Biol Res, v. 25(11), p. 1141-1144, 1992.

SOUBA W.W. Cytokine control of nutrition and metabolism in critical illness. Curr Probl Surg. v 31 (7). p 577-643. 1994

STORE, T.I.; USSINGER, R.L.; STABBINS, R.C.; NYBAKKEN, J. W. Zoologia Geral, v 8, 6ª edição. Companhia Editora Nacional. São Paulo- SP. 1996.

SUKKAR S.G.; SCHENONE E.; FOPPIANI L. NOBILE M. T.; Experimental assessment of chemotherapy-induced early intestinal damage in colon cancer the lactulose-mannitol permeability test. Tumori. 2004 sep-oct;90(5):461-3.

TAMINIAU, J.A.J.M.; GALL, D.G.; HAMILTON, J.R. Response of the rat small intestine epithelium to methotrexate. Gut, v. 21, p. 486-492, 1980.

TCHANTCHOU F, GRAVES M, ASHLIN D, MORIN A, PIMENTA A, ORTIZ D, ROGERS E, SHEA TB. Increased transcription and activity of glutathione synthase in response to deficiencies in folate, vitamin E, and apolipoprotein E. *J Neurosci Res*, v. 15; n. 75(4), p. 508-515, 2004.

TORRES, J.M.S.; GUIMARAES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L.; MARTINS, M.C.R.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.C. Efeitos metabólicos da L-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda, seguida de reperfusão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, p. 39-44, 2003.

TRABER, MG. Vitamin E, nuclear receptors and xenobiotic metabolism. *Arch Biochem Biophys*, v. 423(1), p. 6-11, 2004.

TRIER J.S.; BROWNING, T.H. Morphologic response of the mucosa of human small intestine to x-ray exposure. *Journal of Clinical Investigation*, v. 45 (2), p. 194-204, 1966.

TROUNG-TRAN, A. Q.; HO, L. H.; CHAI, F.; AND ZALEWSKI, P. D. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J. Nutr*, v. 130, p.1459S-1466S, 2000.

UMPLEBY, A. M.; CARROL, P. V.; RUSSEL-JONES, D. L.; TREACHER, D. F.; JACKSON M. C. Glutamine supplementation and GH/IGF-I treatment in critically ill patients: Effects of glutamine metabolism and protein balance. *Nutrition*, v. 18, p.127-129, 2002.

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

VANDERHOOF, J. A.; YOUNG R.J.; MURRAY N.; KAUFMAN S.S. Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; v. 27 n.2, p.155-160, 1998.

VERBURG, M.; RENES, I. B.; MEIJER, H.P.; TAMINIAU, J.J.M.; BÜLLER, H.A.; EINERHAND, A.W.C.; DEKKER, J. Selective sparing of goblet cells and Paneth cells in the intestine of methotrexate rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 279, p. G1037-G1047, 2000.

WEISS M.D.; DeMARCO V.; SIRAUS D.M.; SAMUELSON D.A.; LANE M.E.; NEU J. Glutamine synthetase: a key enzyme for intestinal epithelial differentiation? *J Parenter Enteral Nutr.* v 23 (3) p 140-6. 1999

WINDMUELLER H.G.; SPAETH A.E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels *in vivo* for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem.* v 253 (1) p 69-76. 1978

WINDMUELLER H.G.; SPAETH A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys.* v 171 (2) p 662-72. 1975.

WISCHMEYER, P. E.; RIEHM, J.; SINGLELTON, K. D.; REN, H.; MUSCH, M. W.; KAHANA, M.; CHANG, E. B. glutamine attenuates TNF- $\alpha$  release and enhances HSP-72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition*, v. 19, p. 1-6, 2003.

XIAN C.J.; COUPER R.; HOWARTH G.S.; READ L. C.; KALLINCOS N. C. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. *Br J Cancer.* v 82 (4) p 945-52. 2000.

ZIEGLER, T.R.; EVANS, M.E.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C., JONES, D.P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr*, v. 23, p. 229-61, 2003.

[www.biocell.org](http://www.biocell.org)

[www.questintl.com](http://www.questintl.com)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)