



PRISCILLA MIRIAN DE SOUZA SILVA

**ATIVIDADE DE β -GLUCANO E GLUTAMINA
NA INTEGRIDADE DE MUCOSA E TROFISMO
INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB/C**

LAVRAS – MG

2012

PRISCILLA MIRIAN DE SOUZA SILVA

**ATIVIDADE DE β -GLUCANO E GLUTAMINA NA INTEGRIDADE DE
MUCOSA E TROFISMO INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Priscilla Mirian de Souza.

Atividade de β -glucano e glutamina na integridade de mucosa e trofismo intestinal em camundongos Balb/C / Priscilla Mirian de Souza Silva. – Lavras : UFLA, 2012.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Raimundo Vicente de Sousa.

Bibliografia.

1. Camundongos. 2. Quimioterápico. 3. Saúde intestinal. 4. Imunonutriente. 5. Mucosite. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.089537

PRISCILLA MIRIAN DE SOUZA SILVA

**ATIVIDADE DE β -GLUCANO E GLUTAMINA NA INTEGRIDADE DE
MUCOSA E TROFISMO INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de agosto de 2012.

Dra. Ana Paula Peconnick UFLA

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dr. Hunaldo Oliveira Silva IFS

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

LAVRAS – MG

2012

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação;

Agradeço grandemente à minha família por todo o apoio durante a residência e em especial à minha mãe, Maria Marta de Souza Silva, pela confiança e compreensão durante este período;

Ao meu prezado orientador por todos os ensinamentos, disponibilidade e principalmente pela compreensão e paciência;

Aos membros da banca, pela disponibilidade em ajudar e compartilhar suas experiências. Certamente estarão contribuindo em muito para engrandecer este trabalho e em especial à professora Silvana e a professora Ana Paula, com as quais tive maior convívio, pela prontidão em ajudar e orientar sempre que necessitei;

A todos aqueles que desde o início ajudaram a moldar todo o plano de trabalho e em seu decorrer ajudaram a executá-lo, sempre com muita dedicação, em especial meus amigos Alaor, Cynthia, Rayana, Raquel e Alaine. Vocês foram essenciais!

Ao meu colega e amigo, pelas incansáveis orientações e por nunca medir esforços para ajudar a vencer desafios, não só no meio acadêmico;

À Willian Cortez, pela infinita paciência e disposição para nos auxiliar e ensinar sobre os vários aspectos da vida prática de laboratório e criação dos animais. Obrigada pela amizade;

Enfim, a todos que me ajudaram e apoiaram e que ainda o fazem, fazendo-me acreditar que tudo valeu a pena e me fazem cada vez mais ter a certeza de que, se fosse possível, faria tudo de novo.

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

O objetivo com este estudo foi verificar os efeitos do β -glucano proveniente de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizando um produto comercial (Macrogard[®] – Biorigin), na integridade intestinal bem como os efeitos tróficos da Glutamina na mucosa intestinal de camundongos, mediante a indução de lesão intestinal pela administração do Ara-C. No experimento foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C, que foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade, recebendo ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Os animais receberam o tratamento prévio com o β -glucano (80 mg/Kg) e/ou a glutamina (150 mg/Kg), ou ambos em associação, diariamente durante 21 dias. Nos dois últimos dias deste período, foi administrado Ara-C (15 mg/Kg), por via intraperitoneal, a cada 12 horas. Foram feitas análises para se avaliar a toxicidade em leucócitos através de leucograma e local do tecido linfóide associado ao intestino por análises histopatológicas e mensuração de enzimas. O trofismo intestinal foi avaliado por morfometria e índice mitótico da mucosa. Foi avaliada também a capacidade do β -glucano, associado ou não à glutamina de reduzir a toxicidade do Ara-C em leucócitos sanguíneos pelo teste do cometa. O tratamento com o β -glucano foi capaz de inibir a genotoxicidade induzida pelo Ara-C, manter os parâmetros de morfologia intestinal, causando também leve hiperplasia das placas de Peyer e melhorando o aspecto geral da arquitetura tecidual do intestino. A glutamina isoladamente permitiu a manutenção a altura das vilosidades e o índice mitótico das criptas intestinais e em associação com o β -glucano foi capaz de reverter a leucopenia. Concluindo, o uso do β -glucano e da glutamina isoladamente reflete efeitos benéficos no trofismo intestinal, mas seus efeitos em associação ainda precisam ser melhor esclarecidos e o β -glucano mostrou-se eficaz em reverter alguns dos efeitos tóxicos induzidos pelo Ara-C.

Palavras-chave: Saúde intestinal. Imunonutriente. Quimioterápico. Mucosite. Camundongos.

GENERAL ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of β -glucan from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on mucosal integrity, using a commercial product (Macrogard[®] - Biorigin) and the trophic effects of glutamine in the intestines of mice by inducing injury in intestinal tissue by administration of Ara-C. In the experiment we used Balb /C mice that were kept under controlled conditions of temperature and luminosity, receiving commercial food and filtered water ad libitum. The animals were divided into 8 groups and received treatment with the β -glucan (80 mg/kg) and / or glutamine (150 mg/kg), or both in combination, daily for a period of 21 days. In the last two days of this period, Ara-C was administered at a dose of 15 mg/kg intraperitoneally every 12 hours. Analyzes were performed to evaluate the systemic toxicity on white cells blood and local gut-associated lymphoid tissue through histopathological analysis and measurement of enzymes. The intestinal tropism was assessed by morphometry and mitotic index of the intestinal mucosa. We also evaluate the ability of β -glucan, with or without glutamine to reduce the toxicity of Ara-C on the mucosa by DNA test comet. Treatment with β -glucan was able to reverse the genotoxicity induced by Ara-C, to recover the parameters of intestinal structure, causing also mild hyperplasia of Peyer's patches and improving the general appearance of the tissue architecture of the intestine. Glutamine alone regained the height of the villi and the mitotic index of intestinal crypts and in combination with β -glucan was able to reverse the leukopenia. In conclusion, the use of β -glucan and glutamine alone reflects beneficial effects on intestinal trophism, but its effects in combination have yet to be clarified and β -glucan was effective in reversing some of the toxic effects induced by Ara-C.

Key words: Intestinal Health. Imunonutriente. Chemotherapy. Mucositis. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estrutura de um β -glucano de origem fúngica	14
Figura 2	Estrutura química do Ara-C (citosina arabinosídeo)	26
Figura 1	Frequência de células com a presença de Cometa, distribuídos nos diferentes tratamentos representados pelas unidades arbitrárias dos animais tratados com β -glucano e/ou glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C	47
Figura 2	Diferentes classes de cometas e seus respectivos níveis de danos (<5%: Classe 0; 5-20%: Classe 1; 20-40%: Classe 2; 40-85%: Classe 3 e >85%: Classe 4)	48
Figura 3	Imagens obtidas das lâminas histopatológicas do intestino delgado representativas de cada tratamento	51
Figura 4	Índice Mitótico (%) das criptas intestinais para os diferentes tratamentos	53
Figura 5	Leucócitos totais (cel/mm^3) sanguíneos para os diferentes tratamentos	55
Figura 6	Porcentagem de linfócitos sanguíneos periféricos para os diferentes tratamentos.....	56
Figura 7	Porcentagem de linfócitos sanguíneos periféricos para os diferentes tratamentos.....	56
Figura 8	Altura das vilosidades no duodeno (μm) para os diferentes tratamentos	59
Figura 9	Altura das vilosidades no jenuno (μm) para os diferentes tratamentos	59
Figura 10	Altura das vilosidades no íleo (μm) para os diferentes tratamentos	60

Figura 11 Profundidade de criptas no duodeno intestinal (μm) para os diferentes tratamentos.....	62
Figura 12 Profundidade de criptas no jejuno intestinal (μm) para os diferentes tratamentos.....	62
Figura 13 Profundidade de criptas no íleo intestinal (μm) para os diferentes tratamentos	63
Figura 14 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos.....	65
Figura 15 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos.....	65
Figura 16 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Protocolo dos tratamentos realizados em cada grupo experimental.....	40
---	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	β-Glucanos	13
2.1.1	Caracterização e estrutura	13
2.1.2	Ações dos β-glucanos no sistema imune	15
2.2	Glutamina	17
2.3	Barreira Intestinal	20
2.4	Citarabina (Ara-C)	25
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	36
	ARTIGO 1 Atividade de β-glucano e glutamina na integridade de mucosa e trofismo intestinal de camundongos BALB/C	36
1	INTRODUÇÃO	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Animais	39
2.2	Delineamento experimental	39
2.3	Eutanásia e coleta das amostras de sangue e tecidos	41
2.4	Análises realizadas	41
2.4.1	Ensaio Cometa	42
2.4.2	Leucograma	43
2.4.3	Análises histopatológicas	43
2.4.4	Morfometria intestinal	44
2.4.5	Índice mitótico das criptas intestinais	44
2.4.6	Avaliação do infiltrado inflamatório no intestino	45
2.4.7	Análise estatística	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Ensaio cometa	47
3.2	Análises histopatológicas	49
3.3	Índice mitótico das criptas intestinais	53
3.4	Leucograma	55
3.5	Morfometria Intestinal	58
3.6	Avaliação da infiltração inflamatória no intestino pela mensuração da atividade da NAG, MPO e EPO	64
4	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	73

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Na produção animal, o controle e prevenção de doenças infecciosas é de grande interesse econômico. Nesse sentido a promoção da saúde intestinal tem sido foco de estudos por refletir a saúde geral, tanto nesses animais, quanto em outras espécies incluindo a humana.

Durante anos, os antibióticos tem sido utilizados como agentes profiláticos de doenças e como promotores de crescimento para melhorar os parâmetros produtivos dos animais de produção de uma maneira geral. Porém, há uma tendência mundial atual para que não se utilizem mais esses agentes, pelos seus inúmeros efeitos negativos, entre eles a seleção de microorganismos resistentes nos indivíduos que consomem produtos de origem animal, além do risco de se apresentarem na forma de resíduos, se tornando uma questão importante de saúde pública.

Há uma crescente demanda por alternativas que possibilitem a promoção da saúde intestinal dos animais para que a produção se torne capaz de ser competitivamente viável. Estudos tem sido intensificados no sentido de se testar possíveis substitutos dos antibióticos como promotores de crescimento na produção animal de maneira geral.

Como forma de reduzir o uso de medicamentos, os chamados “imunonutrientes” vem então ganhando grande atenção por promoverem incrementos na produção e na promoção da saúde intestinal. Compreendem um grupo de componentes biológicos e sintéticos, capazes de conferir resistência a determinadas doenças e promoverem melhora nos mecanismos de defesa, tanto celular quanto humoral de mamíferos e aves. Em geral, estes imunonutrientes são fornecidos aos animais com o objetivo de estimular e conferir proteção

contra uma gama de doenças, bem como com a finalidade de incrementar o crescimento animal, melhorar o metabolismo, auxiliar nos processos digestivos e saúde intestinal.

Os β -glucanos provenientes da parede celular de fungos e leveduras têm-se mostrado promissores na melhora de várias funções orgânicas e por décadas têm sido estudados pelos seus efeitos benéficos.

A glutamina também tem tido grande enfoque no sentido de apresentar vantagens na utilização como aditivo na alimentação animal e humana promovendo efeitos benéficos sobre várias células no organismo, principalmente sob condições adversas.

Dada à vasta gama de espécies às quais esses imunonutrientes beneficiam, o camundongo se apresenta como um modelo experimental que se mostra ideal para a avaliação de muitas condições fisiológicas e patológicas, refletindo de forma bastante semelhante o que ocorre com outros animais incluindo humanos. Além disso, sendo um animal pequeno e com curto ciclo reprodutivo, seu manejo e manutenção se tornam mais fáceis, possuindo características desejáveis para um organismo modelo.

Dada a esta crescente demanda pela promoção da saúde e integridade intestinal de humanos e outros animais, objetivou com o presente trabalho avaliar a ação imunomoduladora e trófica do β -glucano de ligação β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 6) e da glutamina isoladamente ou em associação, na mucosa intestinal de camundongos jovens após a indução de lesão nos tecidos gastrintestinais, para se inferir sobre seus benefícios como suplementação em animais de produção .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 β -Glucanos

Uma alternativa promissora ao uso dos antibióticos, tanto em animais quanto em humanos, é o uso dos β -glucanos, como promotores da saúde intestinal (SONCK et al., 2010), sendo tradicionalmente tidos como imunomoduladores (VETVICKA, 2011).

2.1.1 Caracterização e estrutura

Os β -glucanos são uma das formas mais abundantes de polissacarídeos encontradas no interior da parede celular de bactérias e fungos e algumas gramíneas (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Também cereais, tais como a cevada, aveia e trigo, contém β -glucanos como parte de suas paredes celulares (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Por décadas vêm sendo estudados por seus efeitos biológicos favoráveis nos mamíferos (AKRAMIANÈ et al., 2007). São polímeros de glicose ligados entre si por uma ligação linear do tipo β (1 \rightarrow 3) numa cadeia principal β -glicosídica e podem se diferenciar pelo seu comprimento e ramificações (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Dependendo da fonte, há claras diferenças na estrutura macromolecular de β -glucanos (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008). Seu modo de atuação é dependente da massa molecular, conformação, solubilidade e também do grau e posicionamento de suas ramificações (CHAN; CHAN; SZE, 2009). Em geral, os originários de plantas são primariamente lineares e possuem ramificações com ligações do tipo β (1 \rightarrow 4), enquanto que os provenientes da parede celular de fungos e leveduras consistem de um esqueleto conservado de unidades de β (1 \rightarrow 3)-D-glucopiranosil com ramificações do tipo β (1 \rightarrow 6) de diferentes

tamanhos e posições (Figura 1) (SONCK et al., 2010; XIAO; TRINCADO; MURTAUGH, 2004).

Em geral, sugere-se que os β -glucanos de grande peso molecular (a maioria deles) podem ativar diretamente os leucócitos, estimulando suas funções fagocítica, citotóxica e antimicrobiana. Os β -glucanos de peso molecular intermediário possuem atividade biológica *in vivo*, mas seus efeitos celulares são menos evidentes. Os de baixo peso molecular são geralmente considerados não imunogênicos (AKRAMIENÉ et al., 2007).

Os β -glucanos provenientes da parede celular de uma variedade de fungos e leveduras têm se mostrado como moduladores da resposta imune tanto específica quanto não específica (como adjuvantes de vacinas) e incrementado a performance de crescimento em animais de produção (DRITZ et al., 1995), em humanos e em ratos (LEBLANC; ALBINA; REICHNER, 2006).

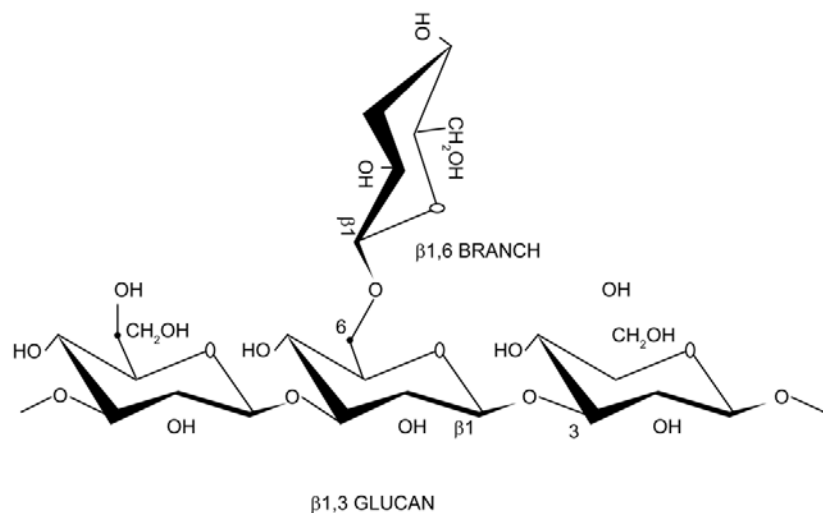


Figura 1 Representação da estrutura de um β -glucano de origem fúngica

Nota: É composto por uma cadeia glicosídica de β -D-glucoses ligadas umas as outras por ligações do tipo 1 \rightarrow 3, com ramificações glicosídicas do tipo 1 \rightarrow 6. O comprimento e ramificações do β -glucano de vários fungos também são amplamente diferentes.

Fonte: Chan et al., 2009.

Estes compostos têm sido extensivamente usados para auxiliar na proteção contra infecções. Em vários modelos experimentais, tem sido responsáveis pela proteção tanto contra infecções por bactérias quanto por protozoários além de conferirem uma melhora da eficiência de antimicrobianos em infecções por bactérias resistentes. O efeito protetor dos β -glucanos foi também demonstrado em infecções experimentais por *Leishmania major* e *L. donovani*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus suis*, *Plasmodium berghei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi*, *Eimeria vermiformis* e *Bacillus anthracis* (VETVICKA, 2011).

2.1.2 Ações dos β -glucanos no sistema imune

O principal receptor de β -glucano é o Dectin-1 que foi recentemente identificado em suínos. Mas também outros receptores foram relacionados ao seu reconhecimento como receptor de complemento 3 (CR3), receptor *toll-like 2* (TLR2) e os lactosilceramida 2 e 6 (SONCK et al., 2009). Vários desses receptores que reconhecem e se ligam aos β -glucanos foram encontrados nos macrófagos (SCHEPETKIN et al., 2005), assim tendo a propriedade de ativar estas células (VETVICKA, 2011).

De maneira geral, polissacarídeos dietéticos podem atuar sobre o microambiente intestinal. A partir da ingestão oral, glucanos ou fragmentos destes já foram detectados em tecidos e órgãos do corpo humano. É possível que esses fragmentos parcialmente hidrolizados por bactérias do lúmen intestinal liguem-se ao epitélio exercendo efeito local ou possam ser absorvidos pela corrente sanguínea, onde exercerão seus efeitos sistêmicos (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010). Segundo Volmam et al. (2008), após sua administração oral, os β -glucanos afetam a resposta imune na mucosa a partir do

contato com as células das placas de Peyer e de linfócitos intestinais intraepiteliais e, não sendo compostos presentes em mamíferos, podem ser reconhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelo sistema imune inato dos mamíferos (SATO et al., 2006).

Os β -glucanos estimulam a fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Além disso, têm a habilidade de estimular neutrófilos e monócitos, melhorando inespecificamente a resposta imune (RUBIN-BEJERANO et al., 2007; VETVICKA, 2011).

Além de mostrar um efeito protetor contra agentes químicos diversos, os β -glucanos de diferentes origens têm demonstrado ser potentes anti-oxidantes e evitar danos pelo peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio (ANGELI et al., 2006). Este efeito protetor pode ser atribuído à capacidade do β -glucano de interceptar os radicais livres produzidos durante a biotransformação de certos medicamentos. Estudos têm demonstrado que os β -glucanos podem então atuar como agentes quimiopreventivos (TOHAMY et al., 2003).

Stuyven et al. (2009), trabalhando com suínos, relataram que os β -glucanos são capazes de estimular o sistema imune inato e assim de melhorar as barreiras de defesa promovendo proteção contra infecções, demonstrando também que esses compostos são capazes de ativar monócitos, macrófagos e células *Natural Killers* (NK). Indiretamente, ressalta-se a estimulação de linfócitos T e B via citocinas (AKRAMIENÉ et al., 2007; SCHEPETKIN et al., 2005). Nessa mesma linha, Xiao, Trincado e Murtaugh (2004) observaram que β -glucanos solúveis têm o potencial de estimular a resposta imune inata que pode induzir uma imunidade mais forte contra a infecção pelo vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) aumentando a produção de importantes citocinas como o interferon-gama (INF- γ).

Segundo Gopalakannan e Arul (2006), experimentalmente, há uma forte evidência de que a suplementação com glucanos pode modificar alguns

componentes da imunidade inata e aumentar a resistência contra doenças também em várias espécies de peixes.

Sandvik et al. (2007), em um estudo com ratos, demonstraram pela primeira vez que o tratamento profilático pela administração oral de β -glucano provenientes de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, produziu um efeito benéfico sobre a hemodinâmica e atenuou lesões críticas de órgãos, frente a um desafio com lipopolissacarídeos (LPS). Além disso, demonstraram que, apesar de apenas uma pequena fração fornecida oralmente de β -glucano ser absorvida pelo trato gastrintestinal, sua administração por via oral teve um efeito mais pronunciado que por via subcutânea.

Também trabalhando com ratos, Araújo Filho et al. (2006) observaram que a estimulação do sistema retículo endotelial pelo β -glucano solúvel modulou a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias após a indução de isquemia e reperfusão intestinal, além disso minimizou os efeitos da translocação bacteriana.

2.2 Glutamina

Alguns nutrientes da dieta podem influenciar de forma positiva a capacidade de absorção da mucosa intestinal, pois modificam sua estrutura e metabolismo, resultando em melhora da capacidade de digestão e absorção dos nutrientes. Estas substâncias são consideradas agentes tróficos, que segundo Maiorka et al. (2000), são capazes de estimular o processo mitótico e, como consequência, aumentar o número de células intestinais e o tamanho das vilosidades (LOPES, 2008).

Estudos clínicos e experimentais descrevem os benefícios da ingestão de imunonutrientes, como por exemplo a glutamina (MATHESON et al., 2008).

A glutamina é um dos aminoácidos mais importantes e mais abundantes no organismo (DEMIRKAN; SAVASX; MELLI, 2010; FUKATSU et al., 2011; LI et al., 2010) e está intimamente relacionada com a promoção da proliferação de células, como as células da mucosa intestinal, linfócitos e fibroblastos (LI et al., 2010). É um importante substrato energético (DEMIRKAN; SAVASX; MELLI, 2010; VICARIO et al., 2007) e de produção de nucleotídeos para enterócitos, hepatócitos, macrófagos, linfócitos e tecido linfoide associado ao intestino. Normalmente não é considerado um aminoácido essencial. No entanto, durante uma situação de estresse prolongado, a produção tecidual não atende as demandas sistêmicas e a glutamina se torna condicionalmente essencial (FUKATSU et al., 2011). Trata-se de um aminoácido neutro, que apresenta em sua estrutura dois grupos nitrogenados facilmente metabolizáveis. Sua síntese ocorre a partir do glutamato pela enzima glutamato-sintase, e a hidrólise pela ação da enzima glutaminase, levando à formação de glutamato e amônia (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). As células dos rins, fígado, intestino delgado e do sistema imune são suas mais importantes consumidoras (CETINBAS; YELKEN; GULBAS, 2010).

As células no sistema imune proliferam muito rapidamente. A glutamina facilita este processo, funcionando como um precursor biossintético e como uma fonte de energia. Também preserva o sistema, provavelmente por proteção antioxidante, por promover maior eficácia da função da barreira intestinal, bem como por promover a proliferação de linfócitos e de melhorar a ação de neutrófilos e macrófagos (CETINBAS; YELKEN; GULBAS, 2010).

A suplementação com o aminoácido tem sido estudada (UENIS; CARRAZA; IRIYA, 2000) em situações clínicas e experimentais, nas quais se observam redução da capacidade de absorção e regeneração da mucosa intestinal. Dentre os efeitos benéficos da sua utilização em pacientes em condições catabólicas, como estresse pós-operatório e tratamentos com

imunossupressores, foram observadas a preservação da integridade da mucosa intestinal e a prevenção da translocação de bactérias e toxinas (RIBEIRO et al., 2004). Em estudos com ratos, a suplementação parenteral com a glutamina foi capaz de proteger a mucosa contra injúrias morfológicas e funcionais e melhorar a sobrevida dos animais após isquemia intestinal (DEMIRKAN; SAVASX; MELLI, 2010; FUKATSU et al., 2011).

O efeito da glutamina sobre a reconstituição da mucosa intestinal tem sido investigado, devido ao fato desse aminoácido ser o principal metabólito que nutre os enterócitos (PADOVESE, 2000) e, em altas concentrações, ser precursor para a formação dos ácidos nucleicos, permitindo resposta imediata para a proliferação das células sem entrar em outras rotas do metabolismo (ZAVARIZE et al., 2010).

A suplementação de glutamina também melhora a imunidade da mucosa através do aumento do número de linfócitos nas placas de Peyer e na lâmina própria, normalização parcial dos níveis teciduais de citocinas de resposta imune do tipo Th2, e por melhora nos níveis de IgA nas mucosas respiratória e intestinal (FUKATSU et al., 2011).

A glutamina exerce funções muito importantes para o corpo, como a regulação do sistema imunológico, equilíbrio do balanço ácido/básico durante estado de acidose, regulação da síntese e degradação de proteínas, controle do volume celular, desintoxicação corporal do nitrogênio e da amônia e fonte de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos (NASCIMENTO, 2010).

Vasconcelos (2012) cita várias funções da glutamina e considera o papel deste aminoácido fundamental na terapia nutricional devido às suas múltiplas funções: necessária para o crescimento e diferenciação celular, serve como veículo para o transporte de nitrogênio e cadeia carbônica entre órgãos; é o maior substrato da síntese de amônia renal; regula a síntese de proteína e glicogênio; fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno;

constitui substrato para as células da mucosa intestinal (enterócitos), túbulo renal e endoteliais; melhora o trofismo do trato gastrointestinal; aumenta a capacidade de defesa do organismo; fonte de energia para células de rápida proliferação, entre outras.

A glutamina administrada de um modo profilático pode ser utilizada de forma eficiente para a produção de energia para manter os processos de reparação e para fornecer nitrogênio para a síntese de nucleótídeos. De acordo com Wilmore et al. (2001), o nitrogênio do grupo amida da glutamina pode aumentar o número de nucleótídeos disponíveis livres e acelerar o processo de reparação do DNA. Outro possível mecanismo pelo qual a glutamina pode exercer um efeito quimiopreventivo é atuando como um agente direto, impedindo os danos produzidos por espécies reativas de oxigênio formados durante a quimioterapia. A glutamina é um precursor importante para a síntese do antioxidante glutatona, um importante protetor contra a toxicidade induzida pela quimioterapia (CAO et al., 1998). O pré-tratamento com glutamina pode aumentar o conteúdo intracelular de glutatona, intensificando assim a proteção contra os danos induzidos por radicais livres, que podem reagir com o DNA e produzir aberrações cromossômicas.

2.3 Barreira Intestinal

A saúde intestinal está relacionada ao desenvolvimento e integridade da mucosa, à composição da microbiota e atuação do sistema imunológico intestinal (BANDEIRA; FONTES; SOUZA, 2007). A chamada barreira intestinal constitui-se de barreiras físicas, fisiológicas, enzimáticas e imunológicas, as quais estão sob o controle neuro-hormonal (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001).

Como primeira linha de defesa contra bactérias e toxinas tem-se a barreira física que as separa da circulação sistêmica. O epitélio intestinal consiste de uma única camada de células colunares começando na junção gastro-esofágica e se estendendo até o epitélio escamoso do canal anal. Esta barreira física é seletivamente permeável e capaz de prevenir a transmigração de substâncias patológicas luminais do ambiente externo, isto é, do lúmen, para o ambiente interno (FUKATSU et al., 2011). A camada de células epiteliais contínua, interligadas por *tigh junctions*, restringe tanto permeabilidade transcelular e paracelular de moléculas, constituindo assim o principal componente da barreira intestinal (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001).

A renovação celular ocorre de uma forma ordenada aproximadamente a cada 5 a 7 dias sob o controle de vários fatores, incluindo o factor de crescimento epidérmico. O mucosa é coberta por microproteínas sob a forma de mucina, que reveste a sua superfície para também compor barreira física às bactérias (FUKATSU et al., 2011). A mucina contém elevadas concentrações de defensinas e outras moléculas antibacterianas tais como lactoferrina, lisozimas, entre outras. Sob as condições de grave estresse e com alterações na ingestão oral normal, ocorrem reduções na camada de mucina decréscimos dos peptídeos antimicrobianos, e aumentos da permeabilidade da mucosa para enfraquecer essa defesa intrínseca e torná-la vulnerável à invasão bacteriana (FUKATSU et al., 2011).

O epitélio exerce ainda uma defesa fisiológica importante na secreção de fluido e muco, juntamente com IgA secretória, para dentro do lúmen para neutralizar substâncias nocivas (SÖDERHOLM; PERDUE, 2001). Caracteriza-se por uma população celular dinâmica. Assim, as células epiteliais encontradas na cripta são imaturas e se tornam cada vez mais diferenciadas à medida que se deslocam no sentido apical da vilosidade. Deste modo, existem nas paredes ascendentes das criptas, células epiteliais em diferentes estágios de maturação. A

partir da transição cripta-vilosidade, até o topo da vilosidade, encontram-se apenas células maduras e diferenciadas (GU et al., 2001). Este *turn over* ocorre constantemente sem qualquer risco à integridade da barreira mucosa, mas requer regulação precisa da proliferação e diferenciação celular. Para tal, torna-se necessário a presença de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, substratos metabólicos, prostaglandinas e estímulos imunológicos (PODOLSKY, 2002).

Dos fatores de crescimento, destacam-se o TGF- α e TGF- β (*transforming growth factor-alpha e beta*) que regulam o *turn over* das células epiteliais a partir da cripta para a vilosidade, através do controle da proliferação das células indiferenciadas da cripta que migram no sentido da vilosidade (PODOLSKY, 2002).

Uma função de barreira de mucosa defeituosa, causada por defeitos intrínsecos ou como consequência secundária de inflamação, pode conduzir a uma recaptção antigênica indiscriminada pelo lúmen, o que deprime os mecanismos de defesa do hospedeiro via respostas imunes de mucosa (GARDINER et al., 1995). Portanto, reparo intestinal eficiente é o componente essencial na resolução da inflamação intestinal (HAN et al., 2000).

A quebra da barreira de defesa intestinal mostrou aumentar a invasão por antígenos, levando à contínua ativação do sistema imune. Essa falha parece ser importante na patogênese e manifestações sistêmicas de doenças intestinais, portanto, a melhoria na integridade da mucosa pode contribuir para uma redução na inflamação intestinal (VICARIO et al., 2007).

A barreira imunológica é representada pelo tecido linfoide associado ao intestino, composto de numerosas células do sistema imunológico e moléculas espalhadas por toda a lâmina própria e epitélio e também tecidos linfáticos organizados, tais como as placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos mesentéricos e folículos linfoides isolados. As PPs são agregados linfoides que se estendem

através da mucosa e submucosa do intestino delgado e agem como os sítios primários indutivos de imunidade da mucosa (FAN et al., 2009).

Na mucosa intestinal normal, principalmente na lâmina própria e PP, existe uma grande população de macrófagos, os quais são a principal população de células apresentadoras de antígenos capazes de determinar o tipo de resposta celular mediadas por células T para antígenos luminais. Além dos macrófagos, os neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos também podem ter um importante papel na promoção de inflamação intestinal. Entretanto, o papel de cada uma dessas células ainda não foi completamente elucidado (KUCHARZIK et al., 2001).

Os órgãos linfoides associados à mucosa intestinal, as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos, estão intimamente relacionados a resposta imune do intestino. Os linfócitos e as células dendríticas que são ativadas na placa de Peyer migram para os linfonodos mesentéricos e se dirigem para a corrente sanguínea através do ducto torácico, migrando subsequentemente, para a mucosa intestinal.

Inflamação intestinal é um mecanismo não específico. Normalmente o tecido intestinal mostra o estado que poderia ser chamado de “inflamação fisiológica”, já que sempre estão presentes numa grande quantidade de leucócitos nos tecidos subepiteliais, inclusive entre as células epiteliais. Essa resposta fisiológica do sistema imune se torna necessária na presença de antígenos provenientes dos componentes da dieta ou provenientes das bactérias do lúmen intestinal (SANTOS, 2011).

Denomina-se mucosite uma condição clínica que envolve a ocorrência de um processo inflamatório não fisiológico acompanhado por lesões ulcerativas em qualquer segmento do trato gastrointestinal (KEEFE, 2007; LALLA et al., 2006). É um dos efeitos colaterais mais debilitantes decorrentes do tratamento quimioterápico ou radioterápico (VLIET et al., 2010).

Na mucosa intestinal, juntamente aos neutrófilos, os macrófagos constituem uma das primeiras linhas de defesa do organismo. Eles são fagócitos que promovem a internalização de partículas estranhas ou antígenos, liberando citocinas e ativando outras células imunes para seu combate e eliminação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; PARSLOW et al., 2004).

Para avaliar a infiltração de células mononucleares em um determinado tecido, especialmente de macrófagos, é possível avaliar a atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Esta enzima está presente no lisossomo dessas células quando ativadas, e pode ser facilmente quantificada conforme proposto por Bailey (1988). A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína encontrada especialmente em neutrófilos, apesar de também poder ser observada, em pequenas quantidades, em outros tipos de leucócitos (O'BRIEN, 2000) e sua atividade pode ser mensurada de forma semelhante à NAG. De acordo com Rothenberg e Hogan (2006) os eosinófilos podem ser encontrados em níveis aumentados devido a reações alérgicas desencadeadas por medicamentos ou em processos patológicos como infecções parasitárias por helmintos, asma e distúrbios do trato gastrointestinal.

Durante a resposta inflamatória, os eosinófilos podem induzir danos e disfunções teciduais, devido à intensa liberação de grânulos ou proteínas granulares tóxicas e outros mediadores. Seus grânulos contêm um núcleo cristalóide composto de MBP-1 e MBP-2 (proteína básica majoritária 1 e 2) e uma matriz constituída por ECP (proteína catiônica de eosinófilo), EDN (neurotoxina derivada de eosinófilo) e EPO (peroxidase de eosinófilos), sendo essa última a mais abundante nestas células. Essas proteínas são capazes de promover a eliminação de patógenos como parasitas (especialmente helmintos), bactérias e fungos, desencadeando simultaneamente a indução de danos teciduais e disfunção endotelial (PARSLOW et al., 2004). A EPO é bastante

empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

2.4 Citarabina (Ara-C)

A citarabina (citosina arabinosídeo ou Ara-C) é um análogo do nucleosídeo de arabinosídeo da desoxicitidina. Considerada específica para a fase S (replicação do DNA) do ciclo celular, e portanto, ativa somente em células em divisão. Tem sido usada por muitos anos no tratamento de pacientes humanos com leucemia e linfoma (KANNO et al., 2004). É o antimetabólito mais importante usado para induzir a remissão da leucemia aguda em crianças e adultos. O Ara-C (Figura 2) na célula, é fosforilado a Ara-CTP e é incorporado no DNA, onde atua como um terminador de cadeia. A inibição da replicação do DNA pelo Ara-C resulta na indução de apoptose, através da geração de intermediários reativos de oxigênio (KANNO et al., 2004; POURQUIER et al., 2001). Angeli et al. (2006) também propuseram a atuação do Ara-C como um inibidor da DNA polimerase.

Após a exposição ao Ara-C, as células alvo desencadeiam uma sequência de eventos, que incluem aumento da produção de radicais livres, aumento inicial seguido por declínio na glutatona e, finalmente, perda de integridade das membranas (ANGELI et al., 2006). Do mesmo modo, tem sido demonstrado que a apoptose induzida pelo Ara-C é mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) e, antioxidantes podem proteger as células contra os danos ao DNA que o Ara-C promove, eventualmente mediante a neutralização dos efeitos tóxicos desses radicais (KANNO et al., 2004).

As células epiteliais ao longo do intestino delgado apresentam um alto *turn over* (processo de renovação e reposição celular), o que as torna bastante sensíveis a medicamentos citostáticos utilizados na quimioterapia contra o

câncer (ELLI et al., 2009). Assim, o tratamento quimioterápico ou radioterápico reflete em alguns efeitos colaterais debilitantes, como a indução de lesões gastrintestinais (VLIET et al., 2010).

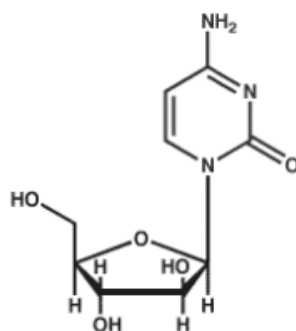


Figura 2 Estrutura química do Ara-C (citosina arabinosídeo).

Fonte: Soares et al., 2008.

Soares et al. (2008) descreve ainda lesões intestinais classificadas como leves e caracterizadas por regiões com congestão vascular na camada mucosa e edema na camada submucosa, presença de discreto infiltrado inflamatório na base dos vilos e grande concentração de células caliciformes em toda a extensão da mucosa intestinal.

Pacientes submetidos à quimioterapia com este fármaco sofrem vários efeitos colaterais expressos no trato gastrintestinal, tais como náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, ulceração, estomatite, febre e mucosite. A inflamação da mucosa induzida pelo Ara-C pode ser bastante grave (DIAS 2005; ELLI et al., 2009; LUK et al., 1981).

Alguns destes efeitos colaterais já foram claramente demonstrados em camundongos e ratos, e também observados em ensaios com humanos (LUK et al., 1981). Algumas lesões foram observadas em camundongos tratados por este

fármaco, tais como, danos à arquitetura jejunal com atrofia de vilosidades, redução do número de enterócitos e infiltração inflamatória e, menos comumente, ulceração epitelial variando de superficial à formação de hematoma intramural e perfuração (ELLI et al., 2009).

Em estudo com camundongos, dosagens terapêuticas ótimas de Arac-C, administradas intraperitonealmente (IP) de 15 mg/kg, a cada 3 horas, durante 24 horas, causaram lesões das células epiteliais da mucosa intestinal. A lesão é mais grave nas primeiras 4 horas que seguem as aplicações, recuperando-se completamente em 72 horas. A manutenção das doses por mais de 24 horas causa lesões progressivas da mucosa intestinal e mudanças no tecido hematopoiético, chegando até a aplasia de medula óssea quando a dose letal (360 mg/kg em 72 horas) é atingida ou ultrapassada (LEACH et al., 1969).

Ramos et al. (1999), trabalhando com Ara-C para estudar a ação de ácidos graxos voláteis na regeneração da mucosa, observaram que o quimioterápico induziu graves lesões intestinais, como encurtamento de vilosidades, redução do número de enterócitos, infiltração inflamatória e necrose.

Luk et al. (1981), observaram que Ara-C produziu injúrias às células proliferativas das criptas intestinais de ratos e, dosando a diamino oxidase (DAO) – uma enzima encontrada em alta atividade na mucosa intestinal de mamíferos, incluindo o homem e que nos ratos está associada primariamente aos ápices das vilosidades, servindo como um marcador plasmático de lesões intestinais – observaram um decréscimo de sua atividade à medida que se aumentavam as injúrias teciduais causadas pelo Ara-C.

Existe um grande número de agentes que têm sido estudados para a prevenção e/ou manejo das mucosites induzidas pela quimioterapia do câncer. As abordagens terapêuticas ou preventivas dos efeitos intestinais das mucosites tem incluído o uso de citocinas, prostaglandinas, vitaminas, medicamentos anti-

inflamatórios, glutamina e outras que forneçam condições substanciais à reepitelização e à proliferação celular, tão necessárias à homeostasia das mucosas (HERRSTEDT, 2000).

A agressão à mucosa intestinal por quimioterápicos, como a citarabina ou outros fármacos, pode ser avaliada por diversos parâmetros, dentre eles os aspectos histológicos e a morfometria das vilosidades intestinais. Podem ser estudadas a presença de macrófagos e neutrófilos na superfície basal do epitélio, a hiper celularidade das criptas, o conteúdo protéico e de DNA das células da mucosa, a ruptura da membrana basal e a diminuição da altura das vilosidades intestinais (RAMOS, 2003).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há uma crescente demanda por se encontrar alternativas que melhorem os mecanismos inespecíficos de defesa dos animais e do homem. O β -glucano e a glutamina se mostram bastante promissores como forma de maximizar as defesas do organismos frente a inúmeros desafios, promovendo saúde geral dos indivíduos e melhorando parâmetros produtivos, mesmo sob normais.

Um outro aspecto positivo dessas substâncias é o efeito protetor que elas promovem frente aos efeitos indesejáveis e potencialmente tóxicos do uso de certos fármacos.

REFERÊNCIAS

- AKRAMIENÉ, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, Kaunas, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.
- ANGELI, J. P. F. et al. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 22, p. 285-291, 2006.
- ARAÚJO FILHO, I. et al. Prevention of bacterial translocation using b-(1-3)-D-glucan in small bowel ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 74-79, 2006.
- BANDEIRA, C. M.; FONTES, D. O.; SOUZA, L. P. O. Saúde intestinal dos leitões: um conceito novo e abrangente. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 54, p. 74-97, 2007.
- CAO, Y. et al. Glutamine enhances gut glutathione production. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Silver Spring, v. 22, p. 224–227, 1998.
- CETINBAS, F.; YELKEN, B.; GULBAS, Z. Role of glutamine administration on cellular immunity after total parenteral nutrition enriched with glutamine in patients with systemic inflammatory response syndrome. **Journal of Critical Care**, Orlando, v. 25, p. 661-666, 2010.
- CHAN, G. C. F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, London, v. 2, n. 25, p. 1-11, 2009.
- DEMIRKAN, A.; SAVASX, B.; MELLI, M. Endotoxin level in ischemia–reperfusion injury in rats: Effect of glutamine pretreatment on endotoxin levels and gut morphology. **Nutrition**, New York, v. 26, p. 106–111, 2010.
- DIAS, M. C. G. Câncer. In: SCHIR, N. (Ed.). **Nutrição: nutrição clínica no adulto**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2005. p. 243-256.

DRITZ, S. S. et al. Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 3341-3350, 1995.

ELLI, M. et al. Protective effect of vitamin A on ARA-C induced intestinal damage in mice. **Tumori**, Milano, v. 95, p. 87-90, 2009.

FAN, J. et al. Effects of enteral nutrition supplemented with glutamine on intestinal mucosal immunity in burned mice. **Nutrition**, New York, n. 25, p. 233-239, 2009.

FUKATSU, K.; KUDSK, K. A. Nutrition and gut immunity. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, n. 91, p. 755-770, 2011.

GARDINER, K. R. et al. Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. **Gut**, London, v. 37, p. 530-535, 1995.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, hitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.

GU, Y. et al. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. **Clinical Nutrition**, Saint Louis, v. 20, n. 2, p. 159-166, 2001.

HAN, D. S. et al. Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 279, p. 1011-1022, 2000.

HERRSTEDT, J. Prevention and management of mucositis in patients with cancer. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oviedo, v. 16, p. 161-163, 2000.

KANNO, S. et al. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. **Life Sciences**, Beijing, v. 75, p. 353-365, 2004.

KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinions in Oncology**, London, v. 19, p. 323-327, 2007.

KUCHARZIK, T. et al. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 159, n. 6, p. 2001-2009, 2001.

LALLA, R. V. et al. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. **Supportive Care Cancer**, Berlin, v. 14, p. 558-565, 2006.

LEACH, W. B. et al. Toxicity studies in mice treated with 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine (Ara-C). **Cancer Research**, Baltimore, v. 29, p. 529-535, 1969.

LEBLANC, B. W.; ALBINA, J. E.; REICHNER, J. S. The effect of PGG₂-betaglukan on neutrophil chemotaxis *in vivo*. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 79, p. 667-675, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LI, Y. et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats. **The American Journal of Surgery**, Birmingham, v. 199, p. 35-42, 2010.

LOPES, K. L. A. M. **Suplementação de glutamina em dietas iniciais para frangos de corte**. 2008. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

LUK, G. D. et al. Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 2334-2337, 1981.

MAIORKA, A. et al. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52 n. 5, p. 487-490, 2000.

MATHESON, P. J. et al. Enteral glutamine supplementation impairs intestinal blood flow in rats. **The American Journal of Surgery**, Birmingham, v. 196, p. 293–299, 2008.

NASCIMENTO, G. M. **Suplementação da l-glutamina em ração sem agente anticoccidiano para frangos: desempenho e desenvolvimento da mucosa intestinal**. 2010. 40 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PADOVESE, R. Aplicações clínicas da glutamina. **Revista Brasileira de Ciência Farmacológica**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 23-25, 2000.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 347, n. 6, p. 417-429, 2002.

POURQUIER, P. et al. Topoisomerase I-mediated Cytotoxicity of *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine: Trapping of Topoisomerase I by the *O*⁶-Methylguanine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 61, p. 53-58, 2001.

RAMBERG, J. E.; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal**, London, v. 9, n. 54, p. 1-22, 2010.

RAMOS, M. G. **Associação de AGCC com agentes quimioterápicos: papel no trofismo intestinal e apoptose**. 2003. 157 p. Tese (Doutorado em Bioquímica-Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

RAMOS, M.G. et al. Protection by Short-chain fatty acids against 1-β-D arabinofuranosylcytosine-induced intestinal lesions in germ free mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 13. n. 4, p. 950-953, 1999.

RIBEIRO, S. R. et al. Weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. influence of a glutamine-enriched diet. **Revista do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina**, São Paulo, v. 59, n. 6, p. 349-356, 2004.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The Eosinophil. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 24, p. 147-174, 2006.

RUBIN-BEJERANO, I. et al. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 2, p. 55-67, 2007.

SANDVIK, A. et al. Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 148, p. 168-177, 2007.

SANTOS, L. C. **Efeito do quimioterápico 5-fluorouracil no perfil do tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes do receptor de ldl (LDLr^{-/-})**. 2011. 131 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SATO, T. et al. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived β -1,6-long glycoside side-chain-branched β -glucan. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 80, n. 1, p. 204-211, 2006.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 5, n. 13-14, p. 1783-99, 2005.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 63, p. 91-98, 2008.

SÖDERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and intestinal barrier function. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 1, p. 7-13, 2001.

SONCK, E.; STUYVEN, E.; GODDEERIS, B.; COX, E. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 135, p. 199-207, 2010.

TOHAMY, A.A. et al. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 541, p. 45-53, 2003.

UENIS, T.; CARRAZA, F. R.; IRIYA, K. The effects of glutamine-supplemented diet on the intestinal mucosa of the malnourished growing rat. **Revista do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina**, S. Paulo, v. 55, n. 3, p. 87-92, 2000.

VASCONCELOS, M. I. L. A glutamina aplicada à nutrição clínica, parental e enteral. Disponível em: <http://www.saudenarede.com.br/?p=av&id=A_GLUTAMINA_aplicada_a_Nutricao>. Acesso em: 12 jun. 2012.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, Hong Kong, v. 2, n. 2, p. 115-119, 2011.

VLIET, M. J. V. et al. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. 1-7, 2010.

VOLMAN, J. J.; RAMAKERS, J. D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 94, p. 276-284, 2008.

WILMORE, D. W. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 31, n. 9, p. 2543-2549, 2001.

XIAO, Z.; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. β -Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, p. 315-320, 2004.

ZAVARIZE, K. C. et al. Utilização de glutamina na nutrição de monogástricos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 109, p. 573-576, 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Atividade de β -glucano e glutamina na integridade de mucosa e trofismo intestinal de camundongos BALB/C

RESUMO

Objetivou-se com este estudo foi verificar os efeitos do β -glucano proveniente de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizando um produto comercial (Macrogard[®] – Biorigin), na integridade intestinal bem como os efeitos tróficos da glutamina na mucosa intestinal de camundongos, mediante a indução de lesão intestinal pela administração do quimioterápico Ara-C. No experimento foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C com aproximadamente 70 dias de vida, que foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade, recebendo ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram divididos em 8 grupos e receberam o tratamento prévio com o β -glucano (80 mg/Kg) e/ou a glutamina (150 mg/Kg), ou ambos em associação, diariamente num período de 21 dias. Nos dois últimos dias deste período, foi administrado Ara-C, na dose de 1,8 mg/animal, por via intraperitoneal, a cada 12 horas. Foram feitas análises para se avaliar inibição da toxicidade induzida pelo Ara-C em leucócitos através de leucograma e histopatologia do tecido linfóide associado ao intestino assim como mensuração das enzimas NAG, MPO e EPO. O trofismo intestinal foi avaliado por morfometria e índice mitótico da mucosa. Foi avaliada também a capacidade do β -glucano, associado ou não à glutamina de reduzir a toxicidade do Ara-C sobre o DNA de leucócitos sanguíneos pelo teste do cometa. O tratamento com o β -glucano foi capaz de proteger contra a genotoxicidade induzida pelo Ara-C, manter os parâmetros de morfologia intestinal, causando também leve hiperplasia das placas de Peyer e melhorando o aspecto geral da arquitetura tecidual do intestino. A glutamina isoladamente permitiu a manutenção a altura das vilosidades e o índice mitótico das criptas intestinais e em associação com o β -glucano foi capaz de reverter a leucopenia. Assim, o uso do β -glucano e da glutamina isoladamente reflete efeitos benéficos no trofismo intestinal, mas seus efeitos em associação ainda precisam ser melhor esclarecidos.

Palavras-chave: Saúde intestinal. Imunonutriente. Quimioterápico. Mucosite. Camundongos.

1 INTRODUÇÃO

Em animais de produção, assim como em outras espécies, a saúde intestinal tem sido foco de grande interesse em estudos relacionados com a saúde geral e ganhos econômicos. Antibióticos foram usados por muitos anos, tanto como agentes profiláticos de doenças, quanto como promotores de crescimento (SONCK et al., 2010) para beneficiar a produção animal em termos de ganho de peso e eficiência alimentar (AL-BEITAWI; EL-GHOUSEIN; NOFAL, 2009; SONCK et al., 2010). Os antibióticos tiveram um importante papel no controle de doenças no passado, porém tem sido amplamente criticados pelos impactos negativos atuais (DRITZ et al., 1995; LI et al., 2008). Além disso, os antibióticos estão sendo banidos dos sistemas de criação pelo propósito de prevenir o aumento da seleção de microorganismos patogênicos resistentes à antibióticos, além do risco de se apresentarem sob a forma de resíduos eliminados nos produtos de origem animal (AL-BEITAWI; EL-GHOUSEIN; NOFAL, 2009; ŠTUKELJ et al., 2010). Por causa do banimento de seu uso, a necessidade de controlar a saúde animal para preservar a competitividade da produção tem demandado alternativas ao seu uso (SONCK et al., 2010). Em consequência desta tendência, muitos pesquisadores têm, extensivamente, revisado e comparado diferentes compostos que são considerados como substitutos dos antibióticos na produção animal (AL-BEITAWI; EL-GHOUSEIN; NOFAL, 2009).

Uma alternativa ao uso destes fármacos é a substituição dos mesmos por aditivos não nutrientes como imunomoduladores e promotores da saúde intestinal, que compreendem um grupo de componentes biológicos e sintéticos. Esses aditivos conferem resistência à doenças nos animais promovendo melhoras nos mecanismos de defesa, tanto celular quanto humoral (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006; LI et al., 2008). Os aditivos são fornecidos com o objetivo de

estimular e construir uma proteção contra uma variedade de doenças, bem como com a finalidade de incrementar o crescimento animal, melhorar o metabolismo, auxiliar nos processos digestivos e biodisponibilidade de nutrientes (LI et al., 2008). Os imunomoduladores também tem a capacidade de incrementar a resistência a infecções virais, bacterianas e fúngicas (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006). Com este trabalho objetivou-se avaliar a função imunomoduladora e trófica do β -glucano e da glutamina, frente a um desafio com o Ara-C, avaliando-se vários parâmetros que indicam a saúde geral da mucosa do trato gastrintestinal e alguns parâmetros sistêmicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos de aproximadamente 70 dias de vida, da linhagem Balb/C provenientes do Biotério do Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas e em ambiente controlado, com 12 horas claro/12 horas escuro à temperatura de 20 a 22 °C durante todo o período do ensaio. Foram alimentados com dieta comercial padrão e ingeriram água filtrada sem qualquer restrição, durante todo o período experimental.

2.2 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com arranjo fatorial 2 x 2 x 2. O experimento foi realizado em duas etapas, a um intervalo de 7 dias, sendo que em cada uma delas foram utilizados 24 animais, tendo uma duração de 21 dias. Em cada etapa, os animais foram divididos em 8 grupos experimentais com 3 animais em cada grupo como representados no quadro 1:

Todos os animais receberam gavagem, incluindo os dos grupos controle. O β -glucano utilizado foi o extrato da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente do produto comercial Macrogard[®] (Biorigin, Lençóis Paulista), em doses diárias de 80 mg/kg administradas por gavagem. A glutamina (L-Glutamine, Sigma-Aldrich[®]) foi utilizada também em doses diárias de 150 mg/kg por via oral. O Ara-C (Cytosine β -D-arabinofuranoside, Sigma-Aldrich[®]) foi administrado nos dois últimos dias de

experimentação em quatro doses, na dosagem de 15 mg/animal, por via intraperitoneal, a cada 12 horas.

Tratamentos	Procedimentos Experimentais				
	Substância	Dose	Intervalo	Via	Dias
Controle sem Ara-C	<u>Salina</u>	0,1 mL	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Salina</u>	0,1 mL	12 h	IP	20° e 21°
Controle com Ara-C	<u>Salina</u>	0,1 mL	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Ara-C</u>	15 mg/Kg	12 h	IP	20° e 21°
β -Glucano sem Ara-C	<u>β-glucano</u>	80 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Salina</u>	0,1 mL	12 h	IP	20° e 21°
Glutamina sem Ara-C	<u>Glutamina</u>	150 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Salina</u>	0,1 mL	12 h	IP	20° e 21°
β -Glucano + Glutamina sem Ara-C	<u>β-glucano</u>	80 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Glutamina</u>	150 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Salina</u>	0,1 mL	12 h	IP	20° e 21°
β -Glucano com Ara-C	<u>β-glucano</u>	80 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Ara-C</u>	15 mg/Kg	12 h	IP	20° e 21°
Glutamina com Ara-C	<u>Glutamina</u>	150 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Ara-C</u>	15 mg/Kg	12 h	IP	20° e 21°
β -Glucano + Glutamina com Ara-C	<u>β-glucano</u>	80 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Glutamina</u>	150 mg/Kg	24 h	VO	1° - 21°
	<u>Ara-C</u>	15 mg/Kg	12 h	IP	20° e 21°

Quadro 1 Protocolo dos tratamentos realizados em cada grupo experimental

Ara-C: citarabina; VO : via oral; IP: via intraperitoneal.

2.3 Eutanásia e coleta das amostras de sangue e tecidos

Após os 21 dias de experimento, foi realizada a eutanásia dos animais por meio da exsanguinação sob anestesia. Para isso, os animais foram submetidos a um período de jejum de 08 horas. Em seguida, eles foram anestesiados com Tiopental sódico® (40 mg/kg), administrado por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por meio de punção cardíaca (aproximadamente 0,8 mL de cada animal), o qual foi utilizado para a realização do leucograma e do ensaio cometa. Logo após, coletou-se fragmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), fígado, baço e linfonodos mesentéricos, tendo sido fixados em solução de formalina a 10% tamponada.

O projeto foi submetido à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (protocolo nº 45/2011).

2.4 Análises realizadas

Foram realizadas as análises leucograma, histopatologia e mensuração da atividade das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO). Foi feito também um teste de genotoxicidade sistêmica chamado de ensaio cometa, que avalia o possível efeito protetor nos leucócitos, tanto do β -glucano, quanto da glutamina. Para avaliação do trofismo dos agentes foi realizada a morfometria intestinal e índice mitótico das criptas intestinais.

2.4.1 Ensaio Cometa

Para a execução da técnica, uma alíquota do sangue obtido por punção cardíaca foi destinada a avaliação de danos no DNA de leucócitos. Para isso, a coleta foi realizada na ausência de luz e 500 µl de sangue foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml contendo EDTA para evitar a coagulação da amostra.

Sobre cada lâmina de microscopia previamente coberta com uma camada de gel de agarose normal (1,5%), foi acrescentada uma camada de 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) a 1%, misturada com 15 µL do sangue coletado. Foram preparadas 2 lâminas para cada animal, totalizando 12 lâminas por tratamento. As lâminas foram cobertas com lamínulas e permaneceram na geladeira por 5 minutos para que ocorresse a polimerização do gel. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10; solução de lise para uso: 100 mL da solução de lise estoque acrescidos de 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO), e mantidas a 4 °C por 2 horas. Após a lise celular, as lâminas foram mergulhadas em tampão de eletroforese alcalino, por 25 minutos, o que permitiu a desespiralização do DNA e exposição dos sítios álcali lábeis em seguida foram submetidas à eletroforese (25V, 300 mA, por 30 minutos). A neutralização do material foi realizada a 4 °C em solução de Tris 0,4 M, pH 10,5 por período de 25 minutos, e a fixação por 5 minutos em etanol 98%. As lâminas foram coradas com solução de iodeto de propídio (40 µl/lâmina de solução a 2 µg/ml) e analisadas em microscópio de epifluorescência, sendo contados 150 nucleóides por lâmina totalizando 300 nucleóides/animal e 1800 nucleóides/tratamento. As análises dos cometas foram realizadas por meio de escore visual, conforme classificação descrita por Collins et al. (1997), e adaptadas por Marcussi et al.

(2011), onde são consideradas cinco categorias: sem danos (dano<5%), baixo nível de dano (5-20%), médio nível de dano (20-40%), alto nível de dano (40-95%) e totalmente danificado (dano>95%).

2.4.2 Leucograma

Para a contagem global de leucócitos no sangue, 2 μL de sangue obtido por punção cardíaca foram diluídos em 40 μL de solução de ácido acético a 2%. Desta diluição, 10 μL foram colocados na câmara de Neubauer, a qual foi levada ao microscópio óptico, em aumento final de 100 x, para proceder a contagem das células viáveis.

A somatória da contagem dos quatro quadrantes externos é multiplicado por 50, o que nos dá o número de leucócitos por mm^3 .

Para a contagem diferencial dos leucócitos foi realizado um esfregaço convencional para cada animal. Os esfregaços foram fixados e corados pelo método do *kit* panótico rápido e, posteriormente, observados ao microscópio óptico, em objetiva de imersão. Em cada lâmina, 100 células distribuídas em basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos foram analisadas e contadas, o que forneceu a porcentagem de cada uma delas, bem como permitiu a avaliação da morfologia celular.

2.4.3 Análises histopatológicas

Após a eutanásia, o intestino delgado foi removido cuidadosamente e perfundido com solução salina a 0,9%. Em seguida, o intestino foi dividido em suas três porções anatômicas: duodeno, jejuno e íleo. Cada segmento foi identificado em sua porção inicial e armazenado em formaldeído a 10% tamponado. As amostras foram processadas como rotina para inclusão em

parafina e obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura. As lâminas foram devidamente codificadas e coradas pela técnica hematoxilina e eosina. O material foi submetido à análise histopatológica e morfométrica.

A análise histopatológica envolveu a observação do aspecto das vilosidades e criptas intestinais, assim como a presença e intensidade de infiltrado inflamatório. A gravidade da mucosite foi determinada de acordo com os escores leve, leve a moderado, moderado e ascentuado e também quanto a presença ou não de alteração no epitélio das criptas intestinais.

2.4.4 Morfometria intestinal

Através das imagens dos cortes histológicos foi feita a morfometria intestinal (profundidade de criptas, altura de vilosidades intestinais).

Para obtenção das imagens, os cortes foram selecionados a partir da observação em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e as imagens capturadas com o auxílio de um computador.

As variáveis morfométricas foram analisadas pelo programa computacional de análises morfométricas Cell B[®] (Olympus). Apenas as vilosidades com conjunto visível de epitélio e criptas definido, foram medidas.

A altura foi obtida pela função *Arbitrary distance* do programa, em que foi traçada uma reta da base até o ápice de cada vilosidade. Naquelas que apresentavam curva, foram feitos dois ou mais traços seguindo a direção do ápice da vilosidade.

2.4.5 Índice mitótico das criptas intestinais

A partir das lâminas de histopatologia, foi realizada a análise do índice mitótico (IM) das criptas intestinais com auxílio do microscópio de luz, em uma

objetiva de 40 x. Foram contados 2000 núcleos das células da camada basal do epitélio de revestimento das criptas em todas as áreas em que este apresentou-se bem definido, além de todas as células com o núcleo apresentando figuras mitóticas. O IM foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados. Esse número resultante foi multiplicado por 100 para um resultado em porcentagem.

2.4.6 Avaliação do infiltrado inflamatório no intestino

A avaliação do infiltrado inflamatório intestinal consistiu na mensuração da atividade das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG) mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), presentes em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos respectivamente. No momento da eutanásia, uma porção do duodeno foi retirada e armazenada em *freezer* a uma temperatura de -80 °C para a mensuração da atividade enzimática. Esta análise teve a finalidade de avaliar a reação inflamatória de mucosite intestinal induzida pela citarabina, uma vez que estas enzimas são marcadoras do processo inflamatório, medida pelo acúmulo dessas células nos tecidos.

As atividades enzimáticas de N-acetilglicosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) foram avaliadas no jejuno, como descrito por Werner (1992). Resumidamente, as amostras de tecido foram homogeneizadas e centrifugadas. Os peletes foram dissolvidos em HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,5% e tampão de fosfato e, após homogeneização e sessões de congelamento / descongelamento, as suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação das enzimas. Para a quantificação da EPO, 75 µL do sobrenadante foram adicionados a 75 µL de OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA), diluída em Tris-HCl e H₂O₂, e incubadas a 37

°C no escuro durante 30 min. A reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ e, em seguida, o produto da reação foi lido a 492 nm. Para a quantificação da MPO, 25 µL do sobrenadante foram adicionados a 25 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e DMSO (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e a mistura foi incubada a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, 100 µL de H₂O₂ foram adicionados ao sobrenadante. A reação foi parada por adição de H₂SO₄ e, em seguida, o produto da reação foi lido a 450 nm. Para a quantificação de NAG, os precipitados foram dissolvidos em Triton X-100 (0,1) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e centrifugados. Em seguida, 100 µL de sobrenadante foram adicionados a 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em tampão citrato/fosfato. Após a incubação, 100 µL de tampão de glicina. Foram utilizados para parar a reação e o produto da reação foi lido a 400 nm. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Lowry et al. (1951).

2.4.7 Análise estatística

Os dados obtidos, tais como leucograma, morfometria da mucosa intestinal, índice mitótico e medida da atividade de enzimas foram submetidos a análise de variância, com um arranjo fatorial de 2 x 2 x 2. Após o teste de normalidade, e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SAS (1996). A análise histopatológica teve seus resultados expressos de forma descritiva e o teste cometa descrito através de unidades arbitrárias como descrito por Collins (2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio cometa

A figura 1 apresenta os resultados obtidos do ensaio cometa para os diferentes tratamentos.

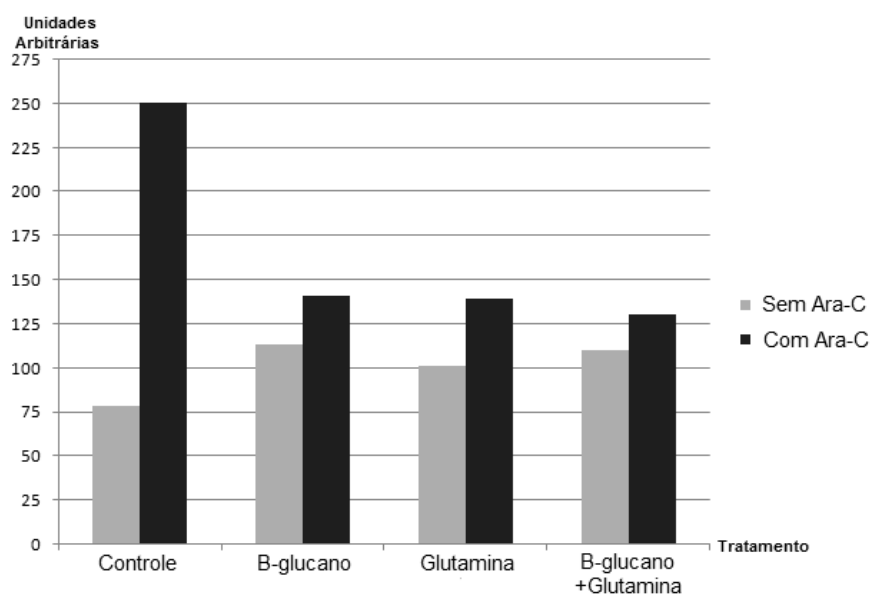


Figura 1 Frequência de células com a presença de Cometa, distribuídos nos diferentes tratamentos representados pelas unidades arbitrárias dos animais tratados com β -glucano e/ou glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C

Observa-se que o grupo tratado apenas com Ara-C apresentou maior nível de danos no DNA dos leucócitos, havendo uma brusca redução no número de nucleoides pertencentes à classe sem danos (classe 0), quando comparado ao grupo controle sem Ara-C. Ao comparar os grupos controles com e sem Ara-C, observa-se um aumento de dez vezes nos nucleoides pertencentes as classes 3 e

4 que caracterizam os maiores níveis de danos. Para os grupos que receberam apenas o β -glucano, pôde-se observar que os animais apresentaram níveis de danos no DNA superiores aos do grupo que recebeu apenas salina, contudo, o pré-tratamento com β -glucano resultou em diminuição dos danos induzidos pelo Ara-C. Resultados similares foram observados para os grupos tratados previamente com glutamina e desafiados ou não com Ara-C, quando comparados ao controle sem o fármaco.

Para o grupo previamente tratado com os dois compostos e posteriormente desafiados com o Ara-C, foi observada uma redução superior a 50% no valor das unidades arbitrárias em comparação ao grupo que recebeu apenas o fármaco, sugerindo que a associação dos dois compostos resulta em efeito protetor.

A figura 2 apresenta os vários graus de classificação dos cometas visualizados no ensaio.

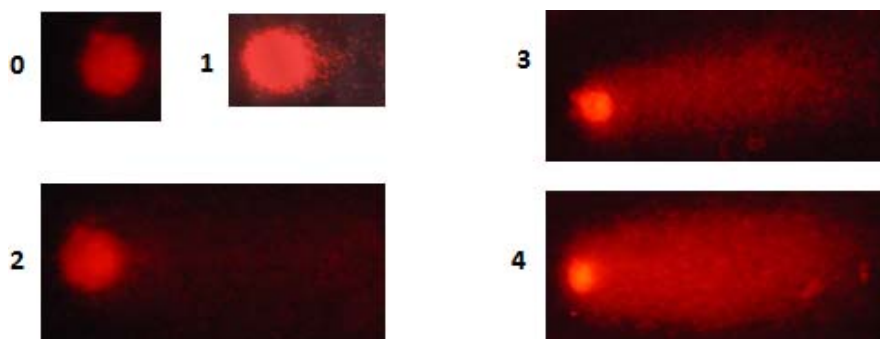


Figura 2 Diferentes classes de cometas e seus respectivos níveis de danos (<5%: Classe 0; 5-20%: Classe 1; 20-40%: Classe 2; 40-85%: Classe 3 e >85%: Casse 4).

Em um estudo realizado com cultivo celular em que se avaliou os efeitos indutores de danos genéticos com diferentes protocolos de tratamento, foi observado, assim como em nosso estudo, que o tratamento com β -glucano,

promoveu uma redução de danos no DNA, o que sugere que o composto poderia reagir com o agente mutagênico sulfonato de metilmetano, impedindo a interação deste com o DNA (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo Angeli et al. (2006), o efeito protetor do β -glucano, em concentrações mais baixas (quais?), também foi observada em cultura celular (tipo celular), na presença ou ausência de um de Ara-C, inibidor da DNA polimerase.

Mora et al. (2002), trabalhando com a cisplatina como agente quimioterápico em ratos, observaram que a glutamina usada profilaticamente foi efetiva em reduzir sua ação genotóxica sobre as células da medula óssea. Essas informações estão em acordo com os resultados observados em nosso estudo a respeito do efeito protetor da glutamina contra danos induzidos pelo Ara-C nos leucócitos, quando administrada isoladamente.

Apesar de os resultados sugerirem que a administração de β -glucano e glutamina associados possa apresentar efeito anti-genotóxico contra os danos induzidos por Ara-C em leucócitos sanguíneos de camundongos, novos estudos poderão trazer mais informações sobre as formas de ação destes compostos uma vez que, por meio dos ensaios realizados no presente trabalho, não é possível afirmar se estes compostos interagem com o Ara-C reduzindo ou eliminando seu potencial tóxico ou se atuam como bloqueadores de seus efeitos ligando-se a receptores dos leucócitos murinos.

3.2 Análises histopatológicas

A descrição dos achados histopatológicos dos segmentos intestinais analisados para os diferentes tratamentos encontra-se no quadro 1B do anexo B.

Na avaliação morfológica do intestino delgado dos animais do grupo controle sem Ara-C não foram observadas alterações morfológicas, havendo a arquitetura tecidual preservada e as camadas mucosa e submucosa íntegras.

Dentre as alterações intestinais observadas, descrevem-se para o grupo controle com Ara-C as lesões mais significativas, havendo notáveis diferenças na arquitetura tecidual dos segmentos estudados quando comparados àqueles não tratados com Ara-C ou tratados com o β -glucano e/ou a Glutamina. Para este grupo, descreve-se a ocorrência leve a moderada de abscessos de criptas, com o achatamento ou pavimentação do epitélio das criptas e, também, a ocorrência de edema e infiltrado inflamatório por mononucleares, leve a moderado na maior parte das amostras avaliadas. Esses achados corroboram com o que Santos (2011) descrevem para o tratamento com quimioterápicos, pois em decorrência da intensa renovação celular no intestino, há uma grande incorporação da droga ao DNA ou RNA das células, causando apoptose, diminuindo o número de células presentes e causando lesões e alterações na arquitetura da mucosa (SANTOS, 2011).

No tratamento β -glucano sem Ara-C, pôde-se observar em três das amostras uma hiperplasia moderada da placa de Peyer, principalmente no duodeno. Para os outros tratamentos, observou-se a ocorrência esporádica de abscesso leve a moderado de criptas intestinais, mas com raras apresentações de alterações significativas no epitélio e também raras ocorrências de infiltrado inflamatório na camada submucosa.

As mucosites intestinais induzidas por agentes quimioterápicos são difíceis de serem estudadas, pois existe um grande número de fatores envolvidos em sua fisiopatologia e isso torna seu estudo complexo e de difícil padronização (LIMA, 2004). No presente trabalho refere-se a abscessos de criptas intestinais como em descrição das seguintes lesões: presença de polimorfonucleares (predominantemente neutrófilos) e/ou mononucleares no interior das criptas; presença de debris celulares; ocorrência de necrose; dilatação das criptas e pavimentação do epitélio. Tudo isso podendo ocorrer de forma discreta, leve, moderada ou acentuada.

A figura 3 apresenta algumas imagens obtidas das lâminas histopatológicas do intestino delgado representativas de cada tratamento.

As alterações intestinais observadas nos animais que receberam o tratamento controle com o Ara-C neste trabalho, corroboram com Busch (1993), o qual descreve que de forma aguda, as principais alterações no intestino induzidos pela quimioterapia são picnose e cariorrexia nas células das criptas, erosões, encurtamento das vilosidades, diminuição do conteúdo das criptas e abscessos de criptas com predominância de neutrófilos e eosinófilos. As vilosidades tem seu epitélio alterado, ficando mais expostas e cobertas geralmente por algumas células epiteliais residuais.

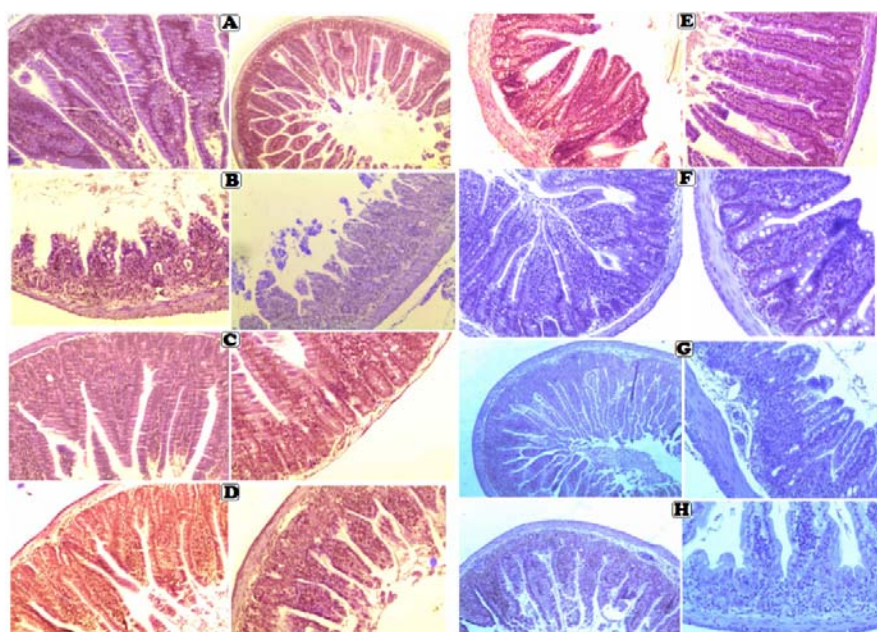


Figura 3 Imagens obtidas das lâminas histopatológicas do intestino delgado representativas de cada tratamento

Nota: **A:** controle sem Ara-C; **B:** controle com Ara-C; **C:** β -glucano sem Ara-C; **D:** glutamina sem Ara-C; **E:** β -glucano + glutamina sem Ara-C; **F:** β -glucano com Ara-C; **G:** glutamina com Ara-C; **H:** β -glucano + glutamina com Ara-C (aumento de 400 x).

Tais achados foram confirmados pela análise histopatológica, a qual evidenciou o achatamento das vilosidades e aumento da profundidade de criptas, o que indica a tentativa de recuperação do epitélio, além de aumento da infiltração de leucócitos na lâmina própria e solução de continuidade do epitélio. Adicionalmente, os citados efeitos ocorreram primariamente no duodeno, seguido pelo jejuno e em menor quantidade no íleo.

Esses achados estão de acordo com os encontrados por outros autores, os quais mostraram que mudanças inflamatórias graves ocorreram dentro de três dias de quimioterapia em modelo animal semelhante ao utilizado neste estudo, com infiltração de polimorfonucleares e linfócitos na lâmina própria, achatamento das vilosidades e perda da continuidade do epitélio, especialmente na porção proximal do intestino delgado e em menor grau na sua porção distal (SANTOS, 2011).

Nossas observações se aproximam daquelas feitas por Ramos et al. (1999), que trabalhando com camundongos gnotobióticos desafiados com Ara-C, constataram a indução de lesões intestinais severas induzidas pelo fármaco, tais como, encurtamento das vilosidades, redução do número de enterócitos, infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa e necrose.

Dentre as alterações observadas no fígado, não houve grandes diferenças entre os grupos experimentais, sendo elas a ocorrência isolada de congestão difusa leve; pequenos e isolados focos de necrose associados a restos celulares em meio ao parênquima normal e vacuolização hepatocelular difusa leve em algumas poucas amostras. No entanto, Ramos et al. (2003) descreveram lesões de acúmulo do fármaco neste órgão, levando a um acúmulo gorduroso, o que não foi observado em nosso estudo.

Uma característica marcante observada no baço foi a presença leve a moderada de megacariócitos, principalmente naqueles animais que receberam o

β -glucano, podendo indicar um estímulo hematopoiético promovido por este composto.

Nos linfonodos mesentéricos não foram observadas alterações marcantes, salvo por duas amostras do grupo controle com Ara-C, que apresentaram pequenos focos isolados de necrose dos centros germinativos.

3.3 Índice mitótico das criptas intestinais

Os valores médios de índice mitótico observados nos diferentes tratamentos são apresentados na figura 4.

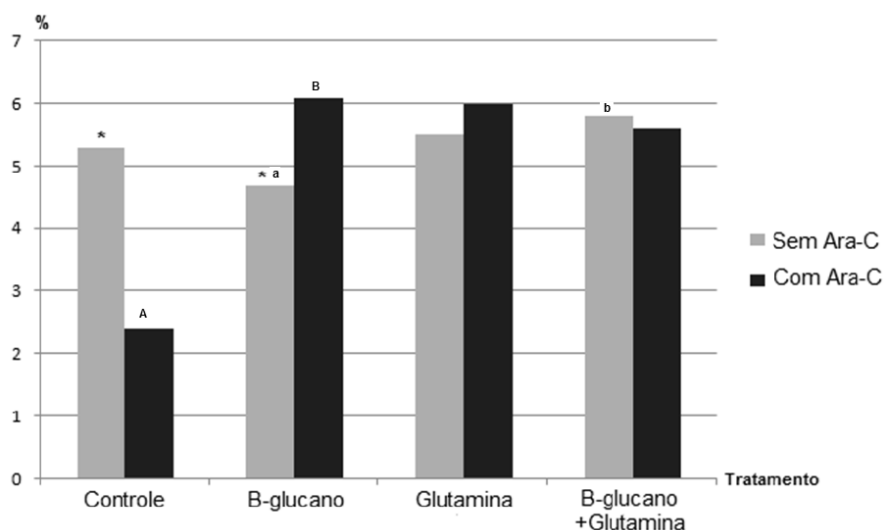


Figura 4 Índice Mitótico (%) das criptas intestinais para os diferentes tratamentos

Observou-se que houve diferença significativa entre o grupo controle sem Ara-C e o grupo controle com Ara-C, portanto a administração do Ara-C foi

capaz de reduzir o índice mitótico quando consideram os animais que não receberam qualquer outro tipo de tratamento.

Comparando-se os animais que receberam o β -glucano, observou-se diferença ($P < 0,05$) entre os animais que receberam o Ara-c e aqueles que não receberam, portanto a administração do β -glucano foi capaz de aumentar significativamente índice o mitótico, quando comparado com aqueles animais em que não foi feita sua administração.

Quando são comparados os animais que não receberam o Ara-C, mas que receberam o β -glucano, há uma diferença ($P < 0,05$) entre aqueles que receberam e não receberam a glutamina, portanto pode-se dizer que a glutamina foi capaz de melhorar o índice mitótico naqueles animais em que foi administrada.

A associação do β -glucano e da glutamina não resultou em melhora do índice mitótico das criptas intestinais, independentemente da administração do Ara-C.

Tohamy et al. (2003), testaram o efeito inibitório do β -glucano na indução de aberrações cromossômicas na medula óssea e células espermatogênicas de camundongos tratados com vários fármacos anti-neoplásicos. Observaram que o β -glucano restaurou significativamente o índice mitótico na medula óssea que havia sido suprimida pelos medicamentos, concluindo assim um papel importante em reduzir a genotoxicidade induzidas por fármacos anti-neoplásicos.

Segundo Carneiro Filho et al. (2004), a glutamina pode ativar vias de sinalização de mitose, inclusive quinases ativadas por mitógenos e fatores de transcrição, levando a respostas proliferativas, o que pôde ser confirmado em nosso estudo, uma vez que a glutamina aumentou significativamente o IM dos animais desafiados com o Ara-C.

3.4 Leucograma

As figuras 5, 6 e 7 apresentam os valores médios das contagens total e diferencial dos leucócitos circulantes no sangue periférico, porcentagem de linfócitos e porcentagem de neutrófilos, respectivamente, para os diferentes tratamentos.

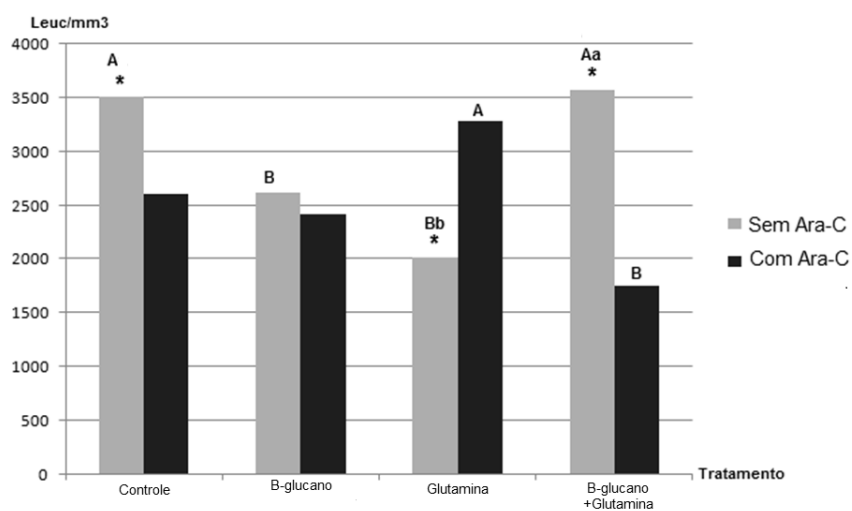


Figura 5 Leucócitos totais (cel/mm³) sanguíneos para os diferentes tratamentos

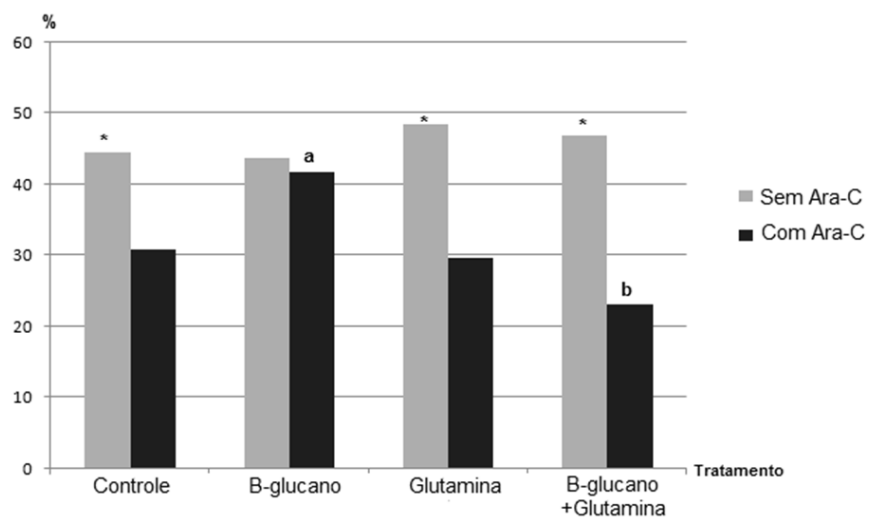


Figura 6 Porcentagem de linfócitos sanguíneos periféricos para os diferentes tratamentos

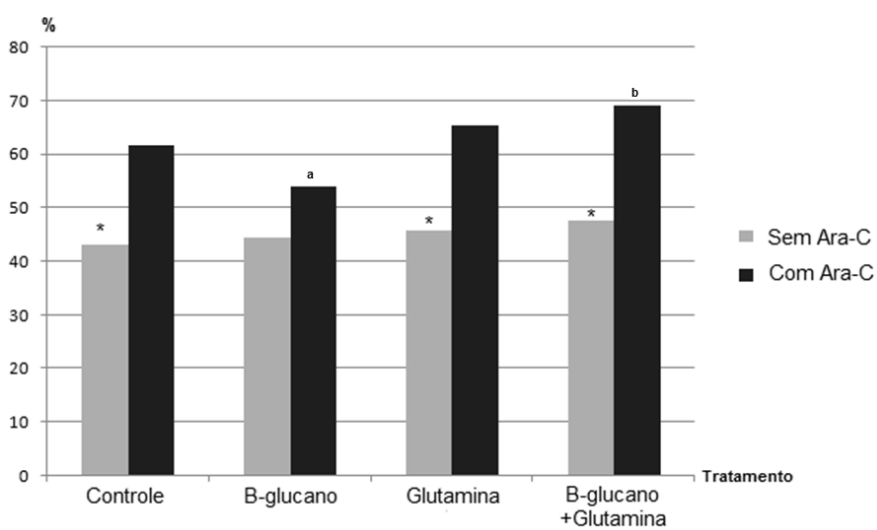


Figura 7 Porcentagem de linfócitos sanguíneos periféricos para os diferentes tratamentos

Com relação aos leucócitos circulantes totais, observou-se com o presente trabalho que o Ara-C causou uma leucopenia significativa nos animais tratados com esse fármaco, nos animais que somente receberam a glutamina, bem como nos animais que receberam a glutamina associada ao β -glucano. Pode-se também observar que quando a glutamina e o β -glucano foram administrados isoladamente, houve uma leucopenia em relação ao controle.

Com relação aos neutrófilos, observou-se que a administração de Ara-c foi capaz de promover um aumento dessas células no sangue ($P < 0,05$) quando se compara os grupos com seus respectivos controles. Observou-se também que a glutamina, quando associada ao β -glucano aumentou os níveis de neutrófilos no sangue naqueles animais desafiados pelo Ara-c.

Quanto aos linfócitos, pôde-se observar que a administração de Ara-c foi capaz de promover uma diminuição dessas células no sangue ($P < 0,05$) em relação aos animais controle e que a associação do β -glucano e da glutamina aumentou ainda mais a linfopenia.

Segundo Verçosa Júnior et al. (2004) camundongos portadores de tumor de Ehrlich sólido tratados com extratos de *A. Blazei* (rico em β -glucano) apresentaram maiores valores dos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma), o que vai de encontro com nossos resultados, possivelmente por não se tratar de estudos sob as mesmas condições fisiológicas e/ou patológicas. Além disso, esse mesmo grupo de autores observou uma maior presença de megacariócitos no baço, o que poderia estar relacionado com um estímulo na função hematopoiética, o que também foi observado no presente estudo.

Nosso estudo corrobora com os achados de Santos (2011) que trabalhou com o efeito de vários antineoplásicos sobre o leucograma e observou acentuada leucopenia à custa de redução tanto de mononucleares quanto de polimorfonucleares (neutrófilos). Estes dados, possivelmente estão relacionados ao efeito mielossupressor da droga (KWOK; SCHUBERT, 2000).

Apesar de nossos achados, Kogan e Kocher (2007) não encontraram diferença significativa nas contagens de células sanguíneas (DETALHAR¹¹). Numerosos estudos indicam que derivados de leveduras contendo frações de β -glucano modulam parte do sistema imune e aumentam o status funcional dos macrófagos. Porém, poucos dados foram publicados a respeito dos efeitos desses extratos no número de leucócitos sanguíneos (REISINGER et al., 2012).

3.5 Morfometria Intestinal

Segundo Kuzmuk et al. (2005), a altura das vilosidades e a profundidade das criptas, utilizadas para mensurar o desenvolvimento do intestino, podem ser consideradas como indicadores da saúde intestinal. A figura 8, 9 e 10 representam os valores médios encontrados para a altura das vilosidades no duodeno, jejuno e íleo, respectivamente, para cada tratamento.

Com relação à mensuração das vilosidades intestinais, observa-se que no duodeno há uma significativa diminuição da altura das mesmas entre os grupos tratados com o Ara-C e os respectivos controles e que o β -glucano isoladamente ou em associação com a glutamina foi capaz de preservar a altura das vilosidades nos animais submetidos ao tratamento pelo Ara-C. Isso corrobora com os achados de Soares et al. (2008), que trabalhando com ratos Wistar observou que os vilos apresentaram-se íntegros, porém, menores que aqueles observados nos animais do grupo controle, caracterizando um quadro de mucosite ocasionada pela administração de 5-fluorouracil (um inibidor da DNA polimerase).

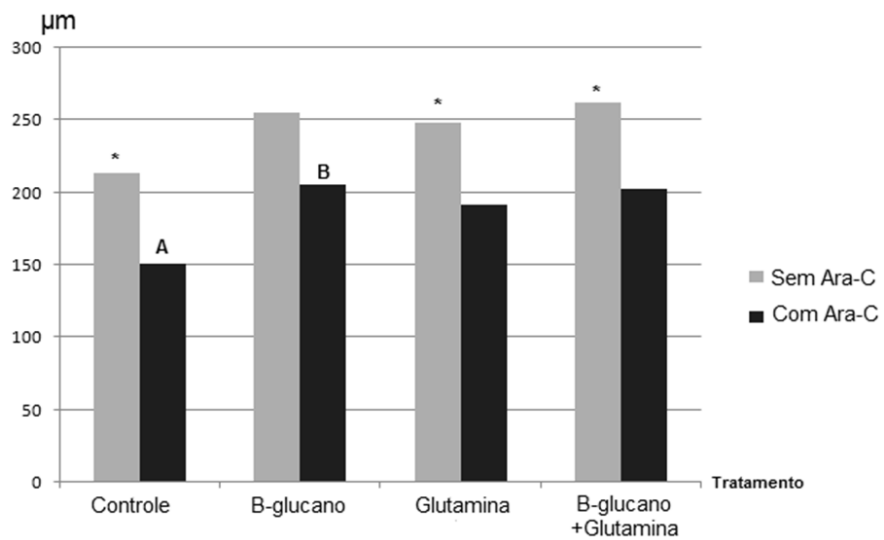


Figura 8 Altura das vilosidades no duodeno (µm) para os diferentes tratamentos

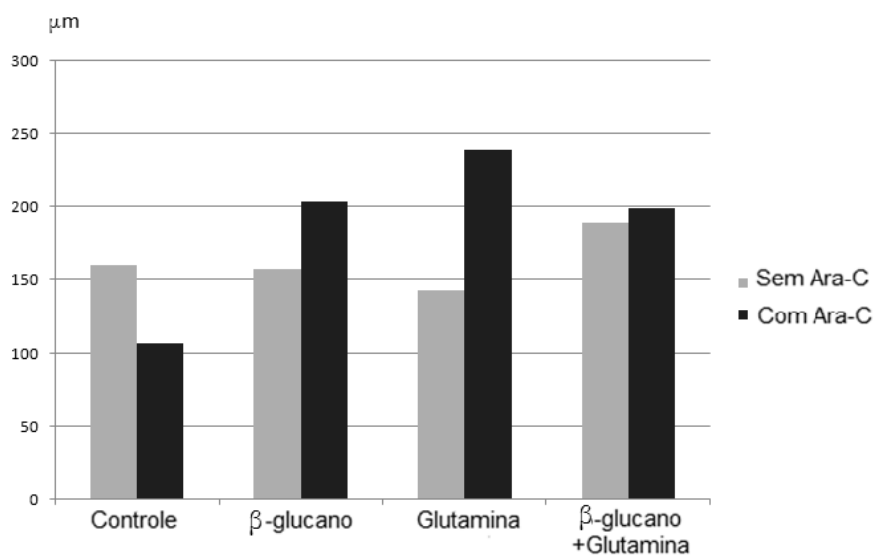


Figura 9 Altura das vilosidades no jejuno (µm) para os diferentes tratamentos

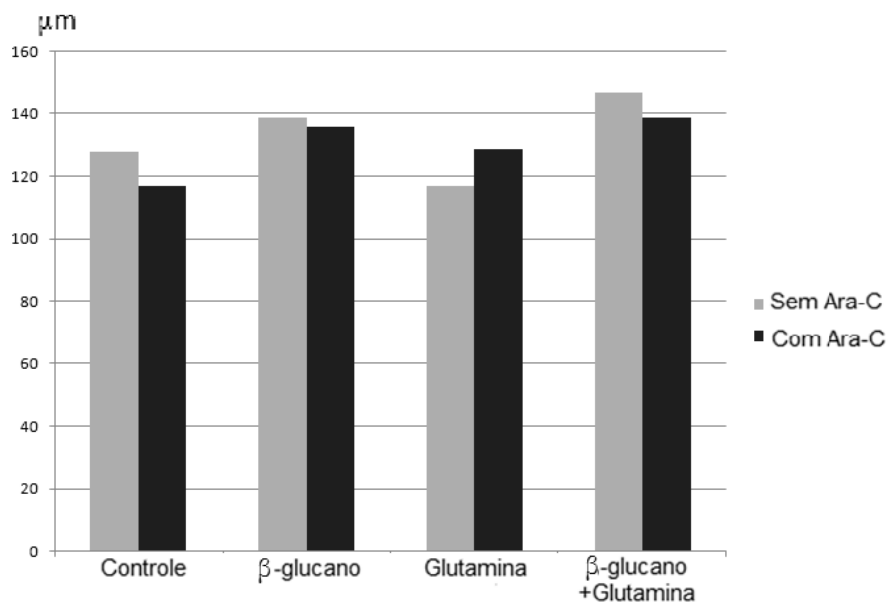


Figura 10 Altura das vilosidades no íleo (μm) para os diferentes tratamentos

No jejuno, observou-se que a glutamina foi capaz de aumentar o comprimento das vilosidades quando os animais foram tratados com o Ara-C e também reverter a baixa altura das mesmas, quando administrada em associação com o β -glucano. No íleo observou-se apenas uma diferença ($P < 0,05$) nos animais não tratados com o Ara-C e que receberam a glutamina isolada e aqueles que a receberam em associação com o β -glucano, mostrando então que nenhum das duas substâncias isoladamente exerceram efeito de proteção neste segmento intestinal frente ao desafio pelo antineoplásico.

Esses achados estão de acordo com o que Lopes (2008) encontrou quando da adição de glutamina à dieta de frangos de corte, o que resultou em efeito benéfico no comprimento de vilosidades dos animais no duodeno, porém no jejuno e íleo não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle.

Monteiro (2006) trabalhando com camundogos propôs que a glutamina seria capaz de reestabelecer a atrofia nas vilosidades e hiperplasia das criptas

intestinais e constatou que houve a reversão da atrofia das vilosidades após a mucosite induzida pelo 5-fluorouracil no duodeno e jejuno, e houve a redução da hiperpasia das criptas no íleo e duodeno. Este mesmo autor não observou alterações nos padrões de mitose nas criptas intestinais.

A análise morfométrica feita por Carneiro Filho et al. (2004) mostrou um aumento significativo na área de absorção das vilosidades no grupo tratado com a glutamina em comparação com os camundongos tratados somente com o 5-fluorouracil. Em resumo, os autores mostraram que a glutamina administrada por via oral marcadamente acelera a recuperação intestinal após o desafio com o 5-fluorouracil, possivelmente por interação com fatores tróficos locais e por restaurar o suprimento de fontes de glutamina para o intestino, amenizando a mucosite induzida pelo fármaco. Apesar de o presente estudo não ter avaliado a área das vilosidades, pode-se observar um efeito positivo ($P < 0,05$) na altura das mesmas jejunais nos animais desafiados com o Ara-C. Isso pode ter ocorrido pelo fato de a glutamina ser fundamental em casos de estresse tecidual, quando as demandas pelo aminoácido aumentam e por ser o jejuno o local de sua maior absorção.

Um estudo avaliando a eficácia de extrato de levedura (contendo β -glucano) em vários parâmetros não mostrou efeitos significativos relativos a altura de vilosidades e profundidade de criptas intestinais (REISINGER et al., 2012). Outro estudo também não reportou diferenças morfométricas trabalhando nas mesmas condições (BAURHOO et al., 2009). Nosso estudo mostrou algumas diferenças ($P < 0,05$) naqueles animais desafiados e que receberam o β -glucano, no duodeno e jejuno. No íleo observou-se o efeito benéfico do β -glucano apenas quando este foi associado à glutamina.

As figuras 11, 12 e 13 apresentam os valores médios encontrados para a mensuração das profundidades de criptas intestinais para duodeno, jejuno e íleo, respectivamente, para os diferentes tratamentos.

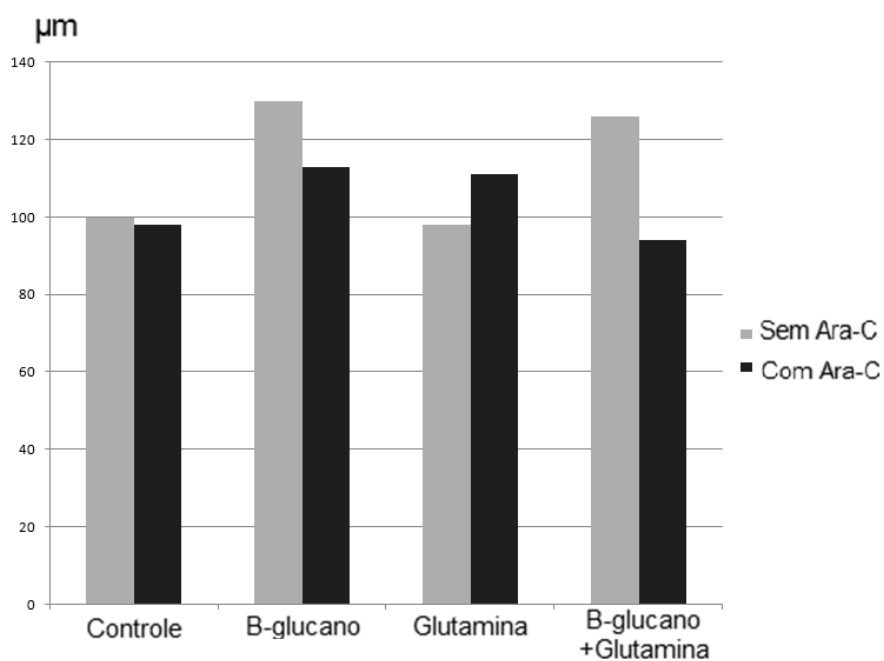


Figura 11 Profundidade de criptas no duodeno intestinal (μm) para os diferentes tratamentos

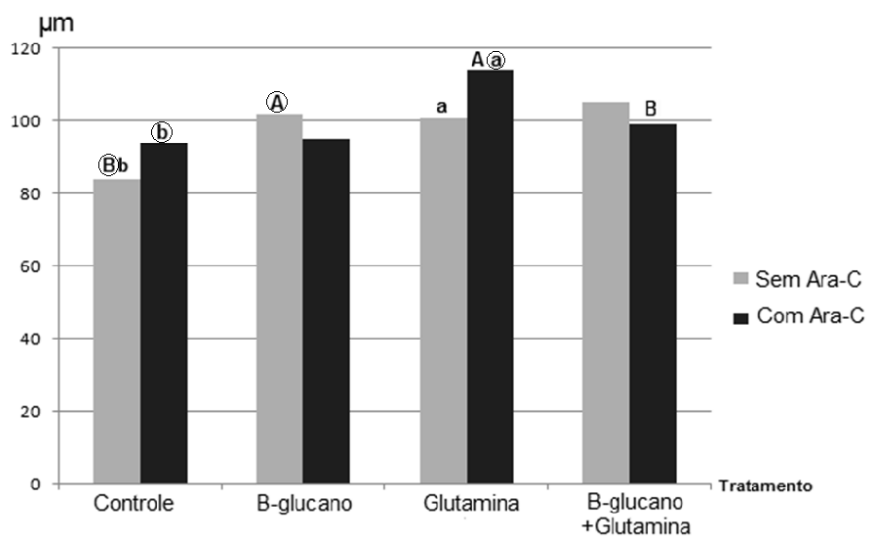


Figura 12 Profundidade de criptas no jejunum intestinal (μm) para os diferentes tratamentos

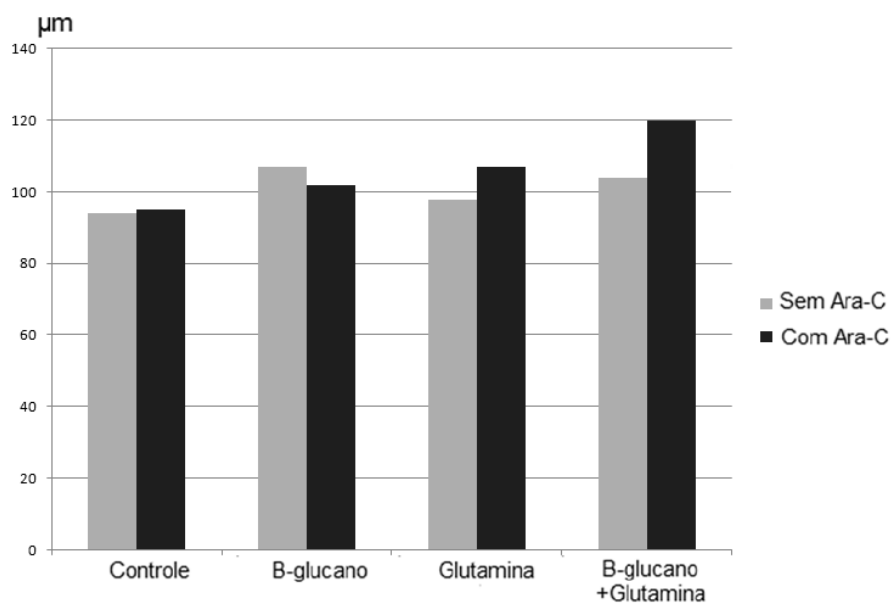


Figura 13 Profundidade de criptas no íleo intestinal (μm) para os diferentes tratamentos

Observa-se que no duodeno houve significativa diminuição na profundidade das criptas nos animais tratados com a glutamina e Ara-c em relação aos seus controles (glutamina sem Ara-C). Entre os animais não tratados pelo Ara-c, o β -glucano foi capaz de provocar um aumento na profundidade das criptas. No jejuno, pode-se observar que o β -glucano promoveu uma redução da profundidade das criptas isoladamente naqueles animais não desafiados e uma redução quando em associação com a glutamina naqueles animais submetidos ao desafio pelo Ara-C. A glutamina isoladamente promoveu um aumento da profundidade das criptas tanto nos animais não desafiados quanto nos desafiados pelo Ara-C. No íleo, entre os animais desafiados pelo Ara-C, a administração da glutamina em associação ao β -glucano causou o aumento médio na profundidade das criptas ($P < 0,05$).

O aumento na profundidade das criptas acompanhado da redução na altura dos vilos indica *turnover* negativo, havendo maior extrusão no ápice dos vilos, e o aumento na profundidade da cripta indica a tentativa do organismo em recuperar a estrutura do vilão. Guimarães e Guedes (2007) explicam que a maior profundidade de cripta é decorrente do aumento da proliferação celular, indicando que há regeneração da mucosa intestinal em caso de maior perda celular.

Em nosso estudo, assim como em outros (CARNEIRO FILHO et al., 2004; HWANG et al., 2003) não foi possível encontrar significantes benefícios com a administração oral da glutamina em todos os parâmetros morfológicos relacionados com a reparação intestinal após o desafio, muito provavelmente devido a sua instabilidade química e solubilidade em solução aquosa.

3.6 Avaliação da infiltração inflamatória no intestino pela mensuração da atividade da NAG, MPO e EPO

A avaliação do infiltrado inflamatório intestinal consistiu na mensuração da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO), presentes em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, respectivamente. As análises foram realizadas somente para os grupos que receberam a glutamina. Considera-se então que todos os dados se referem a animais que receberam a glutamina.

As figuras 14, 15 e 16 apresentam os valores médios de atividade das enzimas encontrados no segmento intestinal avaliado.

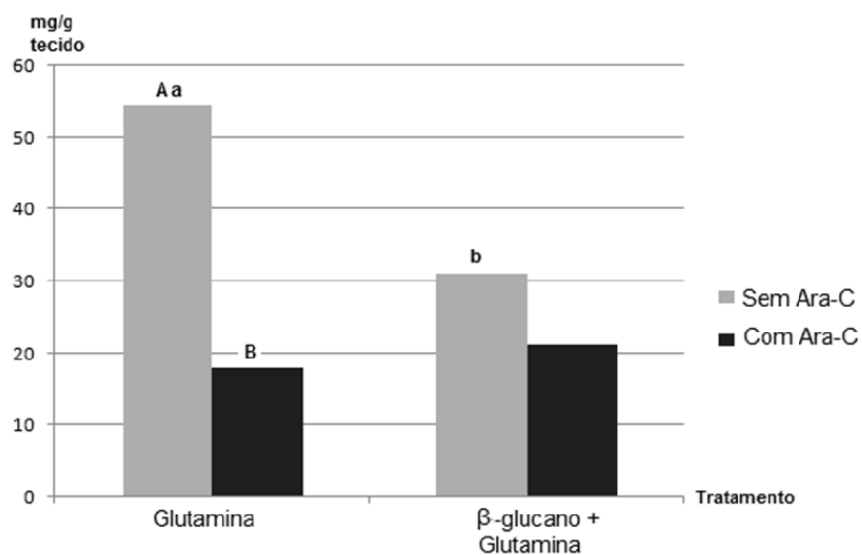


Figura 14 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos

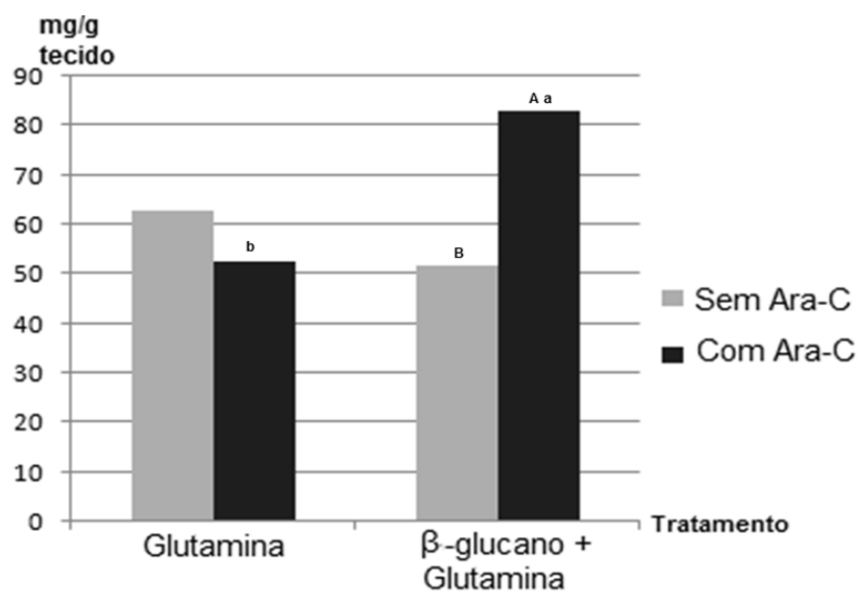


Figura 15 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos

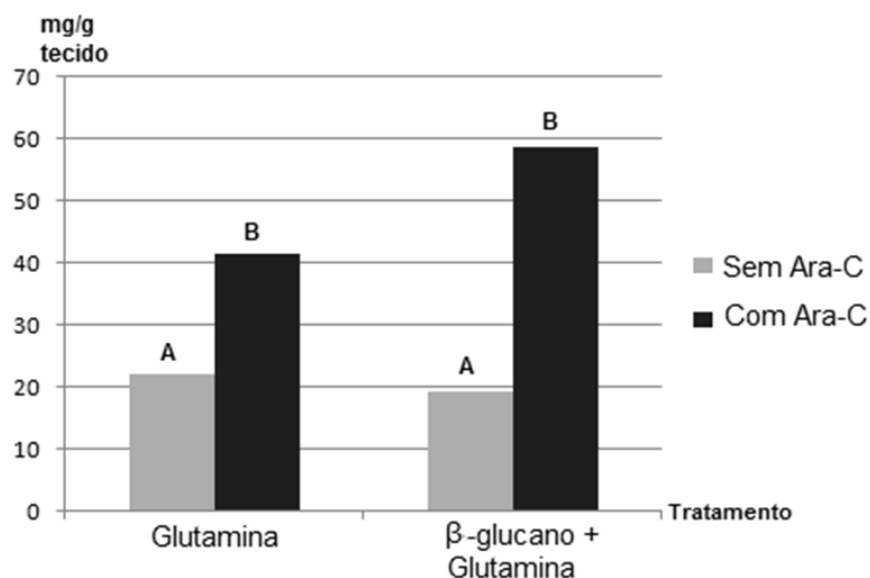


Figura 16 Atividade de n-acetilglicosaminidase em segmento intestinal nos diferentes tratamentos

Pode-se observar que a administração do Ara-c provocou um decréscimo significativo na atividade da N-acetilglicosaminidase no segmento intestinal avaliado e que o β-glucano em associação com a glutamina também promoveu uma diminuição ($P < 0,05$) de sua atividade nos animais não desafiados.

Com relação à mieloperoxidase, observou-se que o β-glucano em associação com a glutamina promoveu um aumento significativo na atividade desta enzima entre os animais desafiados pelo Ara-C, e também entre aqueles animais que receberam o Ara-C comparados aos que não receberam qualquer tipo de desafio.

A EPO teve sua atividade significativamente aumentada quando houve o desafio pela administração do Ara-c tanto nos animais que receberam o β-

glucano, quanto naqueles que não receberam. A glutamina isolada ou em combinação com o β -glucano não preveniu o aumento desses níveis.

No início da mucosite é comum ocorrer um aumento na atividade de MPO uma vez que os neutrófilos são as primeiras células de combate imunológico a atingir o sítio onde está ocorrendo a injúria (FERREIRA et al., 2011). Yeh et al. (2006) constataram que a suplementação com a glutamina diminui a atividade da MPO em vários órgãos, incluindo o intestino e portanto, diminuindo a infiltração neutrofílica nesses tecidos.

Sener et al. (2006) demonstraram a toxicidade induzida pelo metotrexato (um supressor da síntese de DNA) em ratos Wistar relacionada a apoptose de leucócitos e observaram que o β -glucano previne essa apoptose e outras injúrias oxidativas. Observaram também que o composto promove uma diminuição da atividade de MPO em vários órgãos (intestinos, fígado e rins) e, portanto, diminui a infiltração neutrofílica, o que contribui em muito com o stress oxidativo e danos teciduais. Em nosso estudo, porém observamos que o β -glucano em associação com a glutamina aumentou os níveis de atividade da MPO intestinal. Isso pode ter ocorrido por uma interação das duas substâncias, cuja ação isolada não foi avaliada ou pela avaliação ter acontecido num momento de inflamação aguda.

4 CONCLUSÕES

O tratamento com o β -glucano foi capaz de reverter a genotoxicidade induzida pelo Ara-C, recuperar os parâmetros de morfologia intestinal, causando também leve hiperplasia das placas de Peyer e melhorando o aspecto geral da arquitetura tecidual do intestino. A glutamina isoladamente recuperou a altura das vilosidades e o índice mitótico das criptas intestinais e em associação com o β -glucano foi capaz de reverter a leucopenia. O uso do β -glucano e da glutamina isoladamente reflete efeitos benéficos no trofismo intestinal, mas seus efeitos em associação ainda precisam ser melhor esclarecidos.

REFERÊNCIAS

AL-BEITAWI, N. A.; EL-GHOUSEIN, S. S.; NOFAL, A. H. Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 125, p. 304-307, 2009.

ANGELI, J. P. F. et al. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, London, v. 22, p. 285-291, 2006.

BUSCH, D. B. Radiation and chemotherapy injury: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 15, p. 49-89, 1993.

CARNEIRO FILHO, B. A. et al. Alanyl-Glutamine Hastens Morphologic Recovery From 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Mice. **Nutrition**, New York, v. 20, n. 10, 2004.

COLLINS, A. R. The Comet assay for DNA damage and repair - principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, p. 249-261, 2004.

DRITZ, S.S. et al. Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *streptococcus suis* infection in weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Campaign, v. 73, p. 3341-3350, 1995.

FERREIRA, P. et al. Tratamento da mucosite em pacientes submetidos a transplante de medula óssea: uma revisão sistemática. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 563-70, 2011.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, hitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.

GUIMARÃES, V. C.; GUEDES, R. M. C. Aditivos alimentares para manutenção da integridade intestinal de aves e suínos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 54, p. 391-405, 2007.

HWANG J. M. et al. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 109, n. 2, p. 149-154, 2003.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 109, p. 161-165, 2007.

KUZMUK, J. et al. Diet and age affect intestinal morphomoly and large bowel fermentative end-product concentrations in sênior and Young adult dogs. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 135, p. 1940-1945, 2005.

KWOK, K.; SCHUBERT, M. M. Drogas antineoplásicas. In: YAGIELA, J. A.; NEIDLE, E. A.; DOWD, F. **Farmacologia e terapêuticam para dentistas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 533-548.

LI, Y. et al. Influence of several non-nutrient additives on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 387-395, 2008.

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

LOPES, K. L. A. M. **Suplementação de glutamina em dietas iniciais para frangos de corte**. 2008. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 193, p. 265-275, 1951.

MONTEIRO, M. C. S. A. **Restabelecimento da barreira morfo-funcional intestinal através da suplementação com glutamina, alanil-glutamina e**

peptídeos em camundongos com mucosite induzida por 5-flourouracil. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MORA, L.O. et al. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 65–70, 2002.

OLIVEIRA, R. L. et al. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 20, p. 1225-1233, 2006.

RAMOS, M. G. **Associação de AGCC com agentes quimioterápicos – papel no trofismo intestinal e apoptose.** 2003. 157 p. Tese (Doutorado em Bioquímica-Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

RAMOS, M. G. et al. Protection by Short-chain fatty acids against 1- β -D arabinofuranosylcytosine-induced intestinal lesions in germfree mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 13. n. 4, p. 950-953, 1999.

REISINGER, N. et al. Efficacy of a yeast derivative on broiler performance, intestinal morphology and blood profile. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 143, p. 195-200, 2012.

SANTOS, L. C. **Efeito do quimioterápico 5-flourouracil no perfil do tecido adiposo e no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes do receptor de ldl (LDLr^{-/-}).** 2011. 131 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SENER, G. et al. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 542. p. 170-178, 2006.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-flourouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 63, p. 91-98, 2008.

SONCK, E. et al. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 135, p. 199-207, 2010.

ŠTUKELJ, M. et al. The effect of the combination of acids and tannin in diet on the performance and selected biochemical, haematological and antioxidant enzyme parameters in grower pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 52, n. 19, p. 1-8, 2010.

TOHAMY, A. A. et al. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 541, p. 45-53, 2003.

VERÇOSA JÚNIOR, D. et al. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 32-34, 2004.

WERNER, U. S. I. Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. **Inflammation Research**, Basel, v. 36, n. 3/4, p. 101-103, 1992.

YEH, C. L. et al. Dietary glutamine supplementation reduces cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in mice with gut-derived sepsis. **Nutrition**, New York, v. 22, p. 408-413, 2006.

ANEXO A – Análises estatísticas

Tabela A1 Dados apresentados pela análise de variância para a variável leucócitos totais/mm³, para os diferentes tratamentos.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUCANO	1	63.757052	63.757052	1.871	0.1790
GLUTAMINA	1	19.731567	19.731567	0.579	0.4511
ARAC	1	146.907651	146.907651	4.311	0.0443
GLUCANO*GLUTAMINA	1	50.317712	50.317712	1.477	0.2314
GLUCANO*ARAC	1	510.331201	510.331201	14.977	0.0004
GLUTAMINA*ARAC	1	10.572337	10.572337	0.310	0.5806
GLUCANO*GLUTAMINA*A	1	894.427895	894.427895	26.250	0.0000
erro	4	1362.944937	34.073623		
Total corrigido	47	3058.990351			
CV (%) =		11.36			
Média geral:		51.3851895		Número de observações:	48

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

Tabela A2 Dados apresentados pela análise de variância para a variável neutrófilos (%), para os diferentes tratamentos.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUCANO	1	0.001801	0.001801	0.003	0.9563
GLUTAMINA	1	2.016654	2.016654	3.396	0.0728
ARAC	1	17.306317	17.306317	29.147	0.0000
GLUCANO*GLUTAMINA	1	0.405234	0.405234	0.682	0.4136
GLUCANO*ARAC	1	0.163741	0.163741	0.276	0.6024
GLUTAMINA*ARAC	1	0.492651	0.492651	0.830	0.3678
GLUCANO*GLUTAMINA*AR	1	0.292932	0.292932	0.493	0.4865
erro	40	23.750595	0.593765		
Total corrigido	47	44.429925			
CV (%) =		10.58			
Média geral:		7.2809255		Número de observações:	48

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

Tabela A3 Dados apresentados pela análise de variância para a variável monócitos (%), para os diferentes tratamentos.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUCANO	1	0.275179	0.275179	1.374	0.2481
GLUTAMINA	1	4.939459	4.939459	24.656	0.0000
ARAC	1	4.882255	4.882255	24.371	0.0000
GLUCANO*GLUTAMINA	1	0.909401	0.909401	4.539	0.0393
GLUCANO*ARAC	1	0.063111	0.063111	0.315	0.5777
GLUTAMINA*ARAC	1	5.744594	5.744594	28.675	0.0000
GLUCANO*GLUTAMINA*AR	1	0.091905	0.091905	0.459	0.5021
erro	40	8.013284	0.200332		
Total corrigido	47	24.919188			
CV (%) =	18.39				
Média geral:	2.4336222		Número de observações:	48	
Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)					

Tabela A4 Dados apresentados pela análise de variância para a variável linfócitos (%), para os diferentes tratamentos.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUCANO	1	0.001616	0.001616	0.002	0.9633
GLUTAMINA	1	0.830714	0.830714	1.101	0.3003
ARAC	1	16.408954	16.408954	21.753	0.0000
GLUCANO*GLUTAMINA	1	2.035027	2.035027	2.698	0.1083
GLUCANO*ARAC	1	0.257306	0.257306	0.341	0.5625
GLUTAMINA*ARAC	1	4.392893	4.392893	5.824	0.0205
GLUCANO*GLUTAMINA*AR	1	2.010074	2.010074	2.665	0.1104
erro	40	30.172735	0.754318		
Total corrigido	47	56.109320			
CV (%) =	14.21				
Média geral:	6.1129826		Número de observações:	48	
Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)					

Tabela A5 Dados apresentados pela análise de variância para a variável IM, para os diferentes tratamentos.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUCANO	1	0.000919	0.000919	15.000	0.0004
GLUTAMINA	1	0.001519	0.001519	24.796	0.0000
ARAC	1	0.000052	0.000052	0.850	0.3620
GLUCANO*GLUTAMINA	1	0.000752	0.000752	12.279	0.0011
GLUCANO*ARAC	1	0.001302	0.001302	21.259	0.0000
GLUTAMINA*ARAC	1	0.000252	0.000252	4.116	0.0492
GLUCANO*GLUTAMINA*AR	1	0.002002	0.002002	32.687	0.0000
erro	40	0.002450	0.000061		
Total corrigido	47		0.009248		
CV (%) =	14.97				
Média geral:	0.0522917			Número de observações:	48

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Tabela A6 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Altura de Vilosidades (μm), para os diferentes tratamentos, no duodeno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	11041.333333	11041.333333	6.235	0.0167
GLUT	1	4680.750000	4680.750000	2.643	0.1118
ARAC	1	38420.083333	38420.083333	21.696	0.0000
GLUC*GLUT	1	3710.083333	3710.083333	2.095	0.1556
GLUC*ARAC	1	102.083333	102.083333	0.058	0.8115
GLUT*ARAC	1	3.000000	3.000000	0.002	0.9674
GLUC*GLUT*ARAC	1	261.333333	261.333333	0.148	0.7029
erro	40	70834.000000	1770.850000		
Total corrigido	47		129052.666667		
CV (%) =	19.45				
Média geral:	216.3333333			Número de observações:	48

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Tabela A7 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Altura de Vilosidades (μm), para os diferentes tratamentos, no jejuno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	12.753507	12.753507	3.366	0.0740
GLUT	1	20.033614	20.033614	5.287	0.0268
ARAC	1	6.212329	6.212329	1.640	0.2078
GLUC*GLUT	1	7.739851	7.739851	2.043	0.1607
GLUC*ARAC	1	0.795822	0.795822	0.210	0.6492
GLUT*ARAC	1	15.154192	15.154192	4.000	0.0523
GLUC*GLUT*ARAC	1	33.060426	33.060426	8.726	0.0052
erro	40	151.557456	3.788936		
Total corrigido	47		247.307196		
CV (%) =		14.94			
Média geral:		13.0261698		Número de observações:	48
Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)					

Tabela A8 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Altura de Vilosidades (μm), para os diferentes tratamentos, no íleo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	4.754189	4.754189	4.675	0.0866
GLUT	1	0.558753	0.558753	0.549	0.4629
ARAC	1	0.004542	0.004542	0.004	0.9471
GLUC*GLUT	1	0.572542	0.572542	0.563	0.4575
GLUC*ARAC	1	0.000511	0.000511	0.001	0.9822
GLUT*ARAC	1	0.154021	0.154021	0.151	0.6992
GLUC*GLUT*ARAC	1	1.860915	1.860915	1.830	0.1838
erro	40		40.681119		1.017028
Total corrigido	47		48.586591		
CV (%) =		8.87			
Média geral:		11.3701120		Número de observações:	48
Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)					

Tabela A9 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Profundidade de Criptas (μm), para os diferentes tratamentos, no duodeno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	2405.500833	2405.500833	9.400	0.0039
GLUT	1	109.203333	109.203333	0.427	0.5173
ARAC	1	1052.813333	1052.813333	4.114	0.0492
GLUC*GLUT	1	785.700833	785.700833	3.070	0.0874
GLUC*ARAC	1	2751.240833	2751.240833	10.751	0.0022
GLUT*ARAC	1	0.163333	0.163333	0.001	0.9800
GLUC*GLUT*ARAC	1	667.520833	667.520833	2.608	0.1142
erro	40	10236.563333	255.914083		
Total corrigido	47	18008.706667			
CV (%) =		14.71			
Média geral:		108.7666667			Número de observações: 48

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Tabela A10 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Profundidade de Criptas (μm), para os diferentes tratamentos, no jejuno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	37.453333	37.453333	0.313	0.5789
GLUT	1	1478.520000	1478.520000	12.363	0.0011
ARAC	1	68.640833	68.640833	0.574	0.4531
GLUC*GLUT	1	703.800833	703.800833	5.885	0.0199
GLUC*ARAC	1	1037.880000	1037.880000	8.678	0.0053
GLUT*ARAC	1	8.003333	8.003333	0.067	0.7972
GLUC*GLUT*ARAC	1	0.040833	0.040833	0.000	0.9853
erro	40	4783.753333	119.593833		
Total corrigido	47	8118.092500			
CV (%) =		11.03			
Média geral:		99.1875000			Número de observações: 48

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Tabela A11 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Profundidade de Criptas (μm), para os diferentes tratamentos, no íleo.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	1190.020833	1190.020833	5.797	0.0208
GLUT	1	642.403333	642.403333	3.129	0.0845
ARAC	1	326.563333	326.563333	1.591	0.2145
GLUC*GLUT	1	2.253333	2.253333	0.011	0.9171
GLUC*ARAC	1	1.763333	1.763333	0.009	0.9266
GLUT*ARAC	1	688.567500	688.567500	3.354	0.0745
GLUC*GLUT*ARAC	1	107.400833	107.400833	0.523	0.4737
erro	40	8211.686667	205.292167		
Total corrigido	47	11170.659167			
CV (%) =		13.87			
Média geral:	103.3291667		Número de observações: 48		

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

Tabela A12 Dados apresentados pela análise de variância para a variável N-acetil-glicosaminidase (NAG), para os diferentes tratamentos, no jejuno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	0.152907	0.152907	0.101	0.7531
ARAC	1	10.483644	10.483644	6.929	0.0141
GLUC*ARAC	1	21.894823	21.894823	14.472	0.0008
erro	26	39.335855	1.512917		
Total corrigido	29	71.867228			
CV (%) =		21.48			
Média geral:	5.7254775		Número de observações: 30		

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

Tabela A13 Dados apresentados pela análise de variância para a variável mieloperoxidase (MPO), para os diferentes tratamentos, no jejuno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	9.982782	9.982782	2.892	0.1010
ARAC	1	8.896992	8.896992	2.577	0.1205
GLUC*ARAC	1	10.652756	10.652756	3.086	0.0907
erro	26	89.751738	3.451990		
Total corrigido	29	119.284269			
CV (%) =	22.82				
Média geral:	8.1408757		Número de observações: 30		

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

Tabela A14 Dados apresentados pela análise de variância para a variável Peroxidase de Eosinófilos (EPO), para os diferentes tratamentos, no jejuno.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GLUC	1	4.326809	4.326809	3.785	0.0626
ARAC	1	45.681433	45.681433	39.961	0.0000
GLUC*ARAC	1	0.184159	0.184159	1.036	0.9975
erro	26	29.721993	1.143154		
Total corrigido	29	78.546076			
CV (%) =	18.06				
Média geral:	5.9213003		Número de observações: 30		

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

ANEXO B – Tabelas estatísticas

Tabela B1 Frequência de nucleóides de leucócitos sanguíneos com a presença de Cometa, distribuição nas classes consideradas e valores de unidades arbitrárias para animais tratados com β -glucano, glutamina e desafiados ou não pela administração do Ara-C.

Tratamento	Classes de Cometa (%)					Células com Cometa (%)	Unidades Arbitrárias*
	0	1	2	3	4		
Controle s/ Ara-C	40,2	45,1	11,3	2,8	0,6	59,58	78,50
Controle c/ Ara-C	6,61	25,94	28,0	34,44	5,0	93,39	205,28
β-G s/ Ara-C	27,6	40,7	23,4	7,4	0,9	72,44	113,56
Glut s/ Ara-C	26,9	50,4	16,8	5,4	0,4	73,06	101,28
Glut e β-G s/ Ara-C	22,0	53,4	17,7	6,1	0,8	78,00	110,28
β-G c/ Ara-C	13,9	44,4	29,0	12,2	0,4	86,11	140,89
Glut c/ Ara-C	15,4	41,6	32,0	10,2	0,8	84,56	139,39
Glut e β-G c/ Ara-C	20,8	42,5	23,3	12,4	1,0	79,17	130,22

S/: sem; C/: com; β -G: β -glucano; Glut: glutamina.

* Porcentagens calculadas sobre as médias, sendo considerados 300 nucleóides, duas lâminas por animal, em um total de seis animais por tratamento.

Tabela B2 Índices mitóticos médios das células das criptas intestinais do jejuno de camundongos submetidos ao tratamento com β -glucano e glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C.

Índice Mitótico (%)				
	β -glucano	Glutamina		CV (%)
		S/	C/	
S/ Ara-c	S/	5,3*	5,5	14,97
	C/	4,7 a*	5,8 b	
C/ Ara-c	S/	2,4 Aa	6,0 b	
	C/	6,1B	5,6	

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste F ($P < 0,05$);

* Sem lesão difere de seu respectivo tratamento com a lesão ($P < 0,05$).

Tabela B3 Valores médios do leucograma** de camundongos submetidos ao tratamento com β -glucano e glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C.

	β -glucano	Glutamina		CV (%)
		S/	C/	
Leucócitos Totais (cel/mm ³)				
S/ Ara-c	S/	3517 Aa*	2017 Bb*	11,36
	C/	2617 Bb	3575 Aa*	
C/ Ara-c	S/	2609	3284 A	
	C/	2425	1759 B	
Neutrófilos %				
S/ Ara-c	S/	43,3*	45,8*	10,58
	C/	44,5	47,7*	
C/ Ara-c	S/	61,6	65,5	
	C/	54,0 b	69,2 a	
Monócitos %				
S/ Ara-c	S/	10,50 b*	5,33 b	18,39
	C/	11,83 a*	5,33 b	
C/ Ara-c	S/	5,50	3,83	
	C/	4,00	5,83	
Linfócitos %				
S/ Ara-c	S/	44,5*	48,5*	14,21
	C/	43,7	47,0*	
C/ Ara-c	S/	30,8	29,8	
	C/	41,8 a	23,2 b	

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste F (P<0,05);

* Sem lesão difere de seu respectivo tratamento com a lesão (P<0,05);

** As contagens de eosinófilos e basófilos obtiveram valores irrisórios, portanto os dados não foram apresentados.

Tabela B4 Valores médios das medidas das alturas das vilosidades nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo de camundongos submetidos ao tratamento com β -glucano e glutamina, desafiados ou não pelo tratamento com Ara-C.

	β -glucano	Glutamina		CV (%)
		S/	C/	
Duodeno (μm)				
S/ Ara-c	S/	214 *	248 *	19,45
	C/	255	262 *	
C/ Ara-c	S/	151 A	192	
	C/	206 B	203	
Jejuno (μm)				
S/ Ara-c	S/	160	143 *	14,94
	C/	158	189	
C/ Ara-c	S/	107 Ab	239 a	
	C/	204 B	199	
Íleo (μm)				
S/ Ara-c	S/	128	117 A	8,87
	C/	129	147 B	
C/ Ara-c	S/	117	129	
	C/	136	139	

a,b Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

* Sem lesão difere de seu respectivo tratamento com a lesão ($P < 0,05$).

Tabela B5 Valores médios das medidas de profundidade de criptas nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo de camundongos submetidos ao tratamento com β -glucano e glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C.

	β -glucano	Glutamina		CV (%)
		S/	C/	
Duodeno (μ m)				
S/ Ara-c	S/	100 B	98 B	14,71
	C/	130 A	126 A*	
C/ Ara-c	S/	98	111	
	C/	113	94	
Jejuno (μ m)				
S/ Ara-c	S/	84 Bb	101 a	11,03
	C/	102 A	105	
C/ Ara-c	S/	94 b	114 Aa	
	C/	95	99 B	
Íleo (μ m)				
S/ Ara-c	S/	94	98	13,87
	C/	107	104	
C/ Ara-c	S/	95	107	
	C/	102 b	120 a	

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

* Sem lesão difere de seu respectivo tratamento com a lesão ($P < 0,05$)

Tabela B6 Valores médios dos valores da atividade das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) intestinais de camundongos submetidos ao tratamento com β -glucano e glutamina, desafiados ou não pelo Ara-C.

	β -glucano		CV (%)
	S/	C/	
NAG (mg/g tecido)			
S/ Ara-c	54,406Aa	31,08b	21,48
C/ Ara-c	17,918B	21,296	
	β -glucano		
	S/	C/	
MPO (mg/g tecido)			
S/ Ara-c	62,94	52,77 B	22,82
C/ Ara-c	51,92 b	83,17 Aa	
	β -glucano		
	S/	C/	
EPO (mg/g tecido)			
S/ Ara-c	22,34 B	19,25B	18,06
C/ Ara-c	41,60 A	58,68A	

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste F ($P < 0,05$).

ANEXO C – Achados histopatológicos

Quadro C1 Descrição dos achados histopatológicos para os órgãos avaliados para cada animal de cada tratamento realizado.

Grupo	N	Duodeno	Jejuno	Íleo	Fígado	Baço
Controle sem Ara-C	1	Foco de infiltrado mononuclear leve na lâmina própria	Inflamação fisiológica, sem necrose	SA	Congestão difusa leve (eutanásia?)	SA
	2	SA	SA	SA	Pequeno foco de necrose associado a restos celulares em meio ao parênquima	Presença de megacariócitos (+++)
	3	SA	SA	SA *	SA	Presença de megacariócitos (+)
	4	SA	SA	SA	SA	Hemosiderose difusa leve
	5	SA	SA	SA	SA	Presença de megacariócitos (++); Hemosiderose difusa leve
	6	SA	Presença de pequena quantidade de debris celulares nas criptas e epitélio levemente achatado	SA	SA	Hemosiderose difusa leve

Controle com Ara-C	1	SA	Lesão moderada nas criptas com achatamento do epitélio (Abscesso de criptas)	SA*	SA	SA
	2		Abscesso moderado de criptas com achatamento de epitélio	Abscesso leve de criptas com achatamento de epitélio; infiltrado inflamatório leve na submucosa; achatamento de vilosidades		SA
	3	SA	Abscesso de criptas moderado como epitélio pavimentoso*	SA*	SA	SA
	4	Abscesso em raras criptas; núcleos das criptas grandes e vacuolizados (nucléolos múltiplos e evidentes)	Abscesso de criptas moderado, com alteração no epitélio	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
	5	Abscessos em raras criptas	Abscessos de criptas moderado	Abscessos de criptas moderado	SA	SA
	6	Abscessos de criptas moderado	Abscessos de criptas moderado, com achatamento de epitélio*	Abscessos de criptas moderado	SA	SA

β-G sem Ara-C	1	SA	SA	SA ¹ Hiperplasia das PP	SA	Presença de megacariócitos (+)
	2	SA	SA	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
	3	SA*	SA ²	SA ¹ Hiperplasia das PP	Vacuolização difusa leve	Presença de megacariócitos (++)
	4	SA* ²	SA	SA ¹	Necrose focal discreta	Presença de megacariócitos (+)
	5	SA	SA ^{1,2}	SA ²	SA	Presença de megacariócitos (+)
	6	SA ²	SA ²	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
Glut. sem Ara-C	1	SA	Abscesso de criptas leve, sem alterações de epitélio *	Infiltrado inflamatório leve misto na submucosa com predomínio de neutrófilos	SA	SA
	2	Infiltrado inflamatório supurativo leve e debris celulares na luz das criptas *	Abscesso de criptas leve, sem alterações de epitélio	SA*	SA	SA

	3	SA	Raras criptas contendo neutrófilos; infiltrado inflamatório discreto na submucosa com predomínio de neutrófilos	SA	Vacuolização hepatocelular difusa leve	SA
	4	Raras criptas contendo neutrófilos e debris celulares como o epitélio mais pavimentoso	Abscesso de criptas leve; *	SA	SA	Hemosiderose difusa leve
	5	SA	Abscesso de criptas moderado com dilatação da luz e pavimentação do epitélio	SA*	SA	SA
	6	SA	Abscesso de criptas leve, sem alteração de epitélio	SA	SA	Hemosiderose difusa leve
β-G + Glut sem Ara-C	1	SA	SA*	SA	SA	SA
	2	SA	SA	SA	SA	Presença de megacariócitos (++); hemosiderose difusa leve
	3	SA	SA ²	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
	4	SA	SA	SaA*	SA	Presença de megacariócitos (+)
	5	SA	SA*	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
	6	SA	SA	SA	SA	

β-G com Ara-C	1	SA	SA*	SA	SA	Presença de megacariócitos (++)
	2	SA	SA	SA ¹	SA	Presença de megacariócitos (++)
	3	Necrose moderada em tecido linfóide	SA	SA* ¹		Presença de megacariócitos (+); hemossiderose leve difusa
	4	SA ²	SA*	SA	SA	Presença de megacariócitos (+)
	5	SA	SA	SA	SA	Presença de megacariócitos (++)
	6	SA*	SA ²	SA	SA	Presença de megacariócitos (++); necrose multifocal nos centros germinativos
Glut com Ara-C	1	SA	Criptas com quantidade leve de debris celulares e neutrófilos	SA	SA	SA
	2	Criptas com quantidade leve de debris celulares e neutrófilos, sem alteração de epitêlio	Criptas com quantidade moderada de debris celulares e neutrófilos, sem alteração de epitêlio; infiltração leve de polimorfonu-clears na submucosa e lamina própria.			
	3	SA*	Criptas com quantidade moderada de debris celulares e neutrófilos, com achatamento	SA	SA	SA

			de epitélio			
	4	SA	Criptas com quantidade moderada de debris celulares e neutrófilos, sem alteração de epitélio	SA	SA*	Quantidade leve de megacariócitos (+)
	5	SA	Presença moderada de debris celulares e neutrófilos nas criptas, com achatamento de epitélio	SA*	SA	Quantidade leve de megacariócitos (+)
	6	SA	Algumas criptas dilatadas com debris celulares e necrose, com achatamento de epitélio	SA	SA	Quantidade leve de megacariócitos (+)
β-G + Glut com Ara-C	1	SA	SA	SA	SA	SA
	2	SA	Abscesso leve de criptas, sem alteração de epitélio	Raras criptas com debris celulares e neutrofilico, sem alteração de epitélio	SA	Hemosiderose difusa leve
	3	SA	Abscesso moderado de criptas, algumas com pavimentação de epitélio	Abscesso moderado de criptas, com pavimentação de epitélio	SA	Hemosiderose difusa leve
	4	SA	Abscesso leve de criptas, sem alteração de epitélio	SA	SA	SA
	5	SA	SA	Leve infiltrado neutrofilico na submucosa ¹	SA	SA

	6	SA	Raras criptas com abscesso, algumas dilatadas	Abscesso moderado de criptas, com pavimentação de epitélio; presença de infiltrado polimorfonuclear na submucosa	SA	SA
--	---	----	---	--	----	----

β -G: β -glucano; Glut: glutamina; Abscesso de criptas: infiltrado de polimorfonucleares e presença de debris celulares;

(+++) grande quantidade; (++) moderada quantidade; (+) baixa quantidade;

*: observado placa de Peyer e/ou aglomerado linfóide;

¹: pequenos focos de necrose dentro dos folículos linfóides dos linfonodos mesentéricos;

²: hiperplasia de placa de Peyer observada