

Efeitos da ingestão de diferentes fontes lipídicas na mucosite em camundongos submetidos à quimioterapia com ARA-C

Effects of the intake of different lipid sources in mucositis in mice undergoing chemotherapy with ARA-C

Maria Letícia Tostes Gazzinelli¹, Séphora Fonseca², Jacqueline I Alvarez-Leite³, Maria de Fátima Piccolo Barcelos⁴

RESUMO

Os lipídeos desempenham importante papel no metabolismo, na composição estrutural, transmissão de sinais celulares e na função imunológica do organismo. Os diferentes ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis e fosfolípidos vão ditar o tipo de resposta orgânica. Os agentes antineoplásicos são drogas amplamente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, tratamento este que, muitas vezes, resulta em efeitos colaterais responsáveis pela restrição da dose e sucesso da quimioterapia. Assim, dietas que previnam os efeitos deletérios da quimioterapia poderiam ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer ou quimioterapia. Este trabalho teve por objetivo verificar a ação do consumo de diferentes fontes lipídicas à base de ácidos graxos ômega-3 (óleo de linhaça), triacilgliceróis de cadeia média (gordura de coco) e ácidos graxos trans (gordura vegetal hidrogenada) no trofismo intestinal de camundongos submetidos a tratamento com o quimioterápico (citarabina). Analisando o efeito da citarabina neste estudo, verificou-se que essa droga agrediu o organismo, causando perda de peso dos camundongos, diminuição da massa celular intestinal (sugerida pela redução no teor de DNA da mucosa intestinal) e relativo aumento da proteína na mucosa intestinal, principalmente nos animais alimentados com óleo de soja. As demais fontes lipídicas não alteraram os efeitos vistos pelo uso da citarabina. Os resultados sugerem, nas condições realizadas, não haver na utilização das fontes lipídicas citadas concomitantemente à aplicação da citarabina influência benéfica sobre o tratamento, sendo que a ingestão de óleo de soja pela sua riqueza em ácidos graxos ômega-6, poderia piorar o processo inflamatório decorrente da quimioterapia.

Palavras-chave: Lipídeos; Mucosa Intestinal/efeito de drogas; Neoplasias; Antineoplásicos; Quimioterapia; Citarabina; Trofismo Intestinal.

ABSTRACT

Lipids play an important role in metabolism, in the structural composition, in the transmission of cellular signals and in the body immune function. The different fatty acids that make up the triacylglycerols and phospholipids will dictate the type of organic response. The antineoplastic agents are widely used drugs in the treatment of various cancers, a treatment that often results in side effects responsible for restricting the rate and success of the chemotherapy. Thus, diets that prevent the deleterious effects of chemotherapy could be used as adjunct treatment of cancer or chemotherapy. This work was aimed at investigating the effects of the consumption of several lipid-based omega-3 (flaxseed oil), medium chain triglycerides (coconut) and Trans fatty acids (hydrogenated vegetable fat) in the intestinal trophism of mice treated with chemotherapy (cytarabine). Analyzing the effect of cytarabine in this study, it was found that this drug damaged the body, causing weight loss in mice, decreased intestinal cell mass (suggested by the reduction in the DNA content of the intestinal mucosa) and relative increase of protein in the intestinal mucosa mainly in animals fed with

Recebido em: 12/05/2010
Aprovado em: 05/07/2010

Instituição:

Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional,
Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG – Brasil.

Endereço para correspondência:

Séphora Fonseca
Rua: Rio de Janeiro, 1.165, apto. 603
Bairro: Centro
Belo Horizonte, MG – Brasil
CEP: 30.160-041
E-mail: sephorafonseca@yahoo.com.br

soybean oil. The other fat sources did not alter the effect seen by the use of cytarabine. The results suggest, in the existing conditions, that there is no beneficial influence on the treatment due to the use of the mentioned lipid sources concomitantly to the application of the cytarabine, and the intake of soybean oil, for its richness in Omega-6, could exacerbate the inflammatory process resulting from the chemotherapy.

Key words: Lipids; Intestinal Mucosa/drug effects; Neoplasms; Antineoplastic Agents; Cytarabine; Bowel Trophism.

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos são constituídos por cadeias hidrocarbonadas ácidas de comprimento entre quatro e 36 carbonos (C4 a C36), sendo que os mais frequentes na natureza contêm números pares de átomos de carbono, de 12 a 24, em cadeias não ramificadas. Eles podem ser liberados por hidrólise de tecidos de forma de armazenamento de energia.¹ Alguns ácidos graxos possuem também uma série de funções específicas, chegando a ser estudados como coadjuvantes no tratamento do câncer.²

A mucosa intestinal, importante barreira contra patógenos e toxinas, em condições normais está em constante processo de renovação celular. A proliferação diminuída do epitélio intestinal e sua atrofia podem ser potencialmente danosas em diversas situações³, tais como a desnutrição, o jejum prolongado⁴, a administração de nutrição parenteral total ou alimentação com dietas elementares^{5,6}, como também nas doenças inflamatórias intestinais e na administração de quimioterápicos⁷.

A resposta de indivíduos submetidos aos quimioterápicos por determinado período de tempo, especificamente em função de seu trofismo intestinal, pode variar conforme a fonte lipídica consumida anteriormente e durante suas aplicações.⁸

Os efeitos colaterais intestinais da quimioterapia podem ser tão graves a ponto de limitar sua eficácia clínica. A citarabina (1-b-D-arabinofuranosylcytosine, ara-C) é uma droga análoga à pirimidina, que interage com DNA prevenindo a proliferação celular. É um quimioterápico largamente utilizado em pacientes com leucemia e outros tipos de câncer, que age especificamente em células de proliferação rápida. Sua administração induz enterite na mucosa intestinal, importante fator na intolerância ao tratamento, má-absorção e síndromes septicêmicas causadas por translocação bacteriana. Esses pacientes já debili-

tados e sofrendo má-absorção são frequentemente submetidos a suporte nutricional enteral, que pode contribuir para hipotrofia intestinal.⁹

O estudo de diferentes lipídeos presentes na dieta tem sido feito no sentido de proteger o trofismo intestinal, evitando as hipotrofias que ocorrem em diversas enfermidades. As fontes lipídicas com efeito protetor são: a) triacilgliceróis de cadeia média (TCM) em modelos animais submetidos à nutrição parenteral¹⁰; b) ácidos graxos ômega-3 na proteção da toxicidade por metotrexato¹¹; c) ácidos graxos de cadeia curta na mucosite causada por citarabina⁹.

Os triacilgliceróis de cadeia média são encontrados no coco, babaçu, amêndoa e em reduzida quantidade no leite. São considerados essenciais dois ácidos graxos poli-insaturados, um deles da família ômega-6, o ácido linoleico, e o outro da família ômega-3, o ácido α -linolênico ou ALA, que ao serem ingeridos originam vários outros ácidos graxos de extrema importância funcional para o organismo. O ácido graxo linoleico (w 6) é encontrado em óleos e sementes vegetais (soja, milho, algodão e girassol) e em baixo teor no leite e carne; já o linolênico (w 3), em óleos de peixe, de linhaça, de noz, de canola e em menos quantidade no óleo de soja. Os ácidos graxos poli-insaturados de configuração *trans* são encontrados em gorduras vegetais hidrogenadas, margarinas, cremes vegetais e em óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados após o aquecimento destes; e a maioria deles são ácidos graxos que promovem ações deletérias para o organismo.^{12,13}

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFMG.

As dietas foram preparadas segundo o padrão do *American Institute of Nutrition (AIN-93)* descrito por Reeves *et al.*¹⁴, com algumas modificações em relação às fontes e teor de lipídeos, contendo 10% de lipídeos em quatro padrões. Os ácidos graxos utilizados foram óleo de linhaça (rico em ômega-3), gordura de coco (fonte de triacilgliceróis de cadeia média, TCM), gordura vegetal hidrogenada (rica em ácidos graxos *trans*) e óleo de soja (rico em ômega-6), que também foi usado no grupo-controle. (Tabela 1)

Tabela 1 - Composição das dietas oferecidas aos animais experimentais, caracterizadas pelas diferentes fontes lipídicas, elaboradas conforme AIN-93, com modificações

Nutrientes (g/kg)	Linhaça	Coco	Gordura Hidrogenada	Soja
Caseína	193,0	193,0	193,0	193,0
Metionina	2,9	2,9	2,9	2,9
Amido de milho	512,4	512,4	512,4	512,4
Sacarose	96,8	96,8	96,8	96,8
Celulose	48,4	48,4	48,4	48,4
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01
MM*	33,8	33,8	33,8	33,8
MV**	9,6	9,6	9,6	9,6
Colina	2,4	2,4	2,4	2,4
Lipídeos				
Óleo de soja	0,0	0,0	0,0	100,0
Óleo de linhaça	100,0	0,0	0,0	0,0
Banha de coco	0,0	100,0	0,0	0,0
Gordura hidrogenada	0,0	0,0	100,0	0,0
Total	1000	1000	1000	1000

kcal/kg: Proteína= 786,0; Carboidratos=243,7; Lipídeos = 90 Densidade calórica= 4,12 kcal/g

* mistura de minerais - AIN 93

**mistura de vitaminas - AIN 93 Rhoster, São Paulo.

Foram colocados em gaiolas coletivas com acesso livre a água e dieta cinco grupos de oito camundongos suíços criados no biotério Enio Cardillo Vieira (ICB, UFMG), com peso de $35,3 \pm 5,1$ g. A ingestão alimentar durante o período experimental também foi quantificada. A partir da tarde do oitavo dia, foi administrado, intraperitonealmente (IP), ara-C (1- β -D-Arabinofuranosylcytosina/Aracytin, Rhodia Farma Ltda., Brasil). Os animais foram sacrificados no 10º dia, sob anestesia (xilazina, 10 mg/kg e ketamina 80 mg/kg, intraperitonealmente) para retirada de sangue quatro horas após a última dose de ara-C. Os intestinos foram removidos após sacrifício e cuidadosamente lavados em solução salina a 0,9%. (Figura 1)

Quatro doses de ara-C foram administradas, intraperitonealmente (IP), em intervalos de 12 horas (iniciando às 20:00 h do oitavo dia). A dose foi calculada para 0,15 mg de ara-C para cada 10 g de peso de animal por dia. A droga foi diluída em solução salina (100 mg/5330ml) no momento do uso e permaneceu em geladeira a 4°C por, no máximo, 24 horas (conforme descrito pelo fabricante). No grupo-controle foi administrada solução salina (IP), no mesmo volume e horários da citarabina. Após o sacrifício, todo o intestino delgado foi retirado e os 6 cm proximais foram separados para as posteriores dosagens.

A análise estatística dos experimentos considerou o delineamento inteiramente casualizado. O experi-

mento utilizou cinco grupos de animais, classificados conforme os tratamentos: óleo de linhaça, gordura de coco, gordura hidrogenada e óleo de soja - dividido em duas classes, com e sem ara. O grupo sem ara foi denominado como controle, utilizando a soja como tratamento.

O método estatístico baseou-se na análise de variância, seguindo o modelo inteiramente casualizado.¹⁶ Foram utilizados teste de Grubb para avaliação de *outliers* e ANOVA para a comparação dos cinco grupos, com posterior comparação pelo teste de Bonferroni. O nível de significância foi fixado em 5%. Para realização da análise estatística utilizou-se o *software* PadGraph Prism 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ganho ponderal e ingestão alimentar: o ganho ponderal foi positivo e semelhante em todos os grupos experimentais até o início da quimioterapia. Nos dois dias após o início da administração de citarabina, houve perda ponderal importante em todos os grupos, enquanto o grupo-controle não tratado manteve o ganho ponderal. Os animais alimentados com óleo de soja e coco tratados com ara-C apresentaram perda ponderal mais significativa comparados aos controles sem tratamento com ara-C ($p < 0,05$). Essa

perda de peso associou-se a sinais clínicos como: enjojo, anorexia, vômitos, dor abdominal, febre, inflamação oral, com odinofagia, diarreia e disfunção hepática¹⁷. Esses fatores levam, por si sós, à perda ponderal, independentemente de mucosite ou diminuição da absorção intestinal.

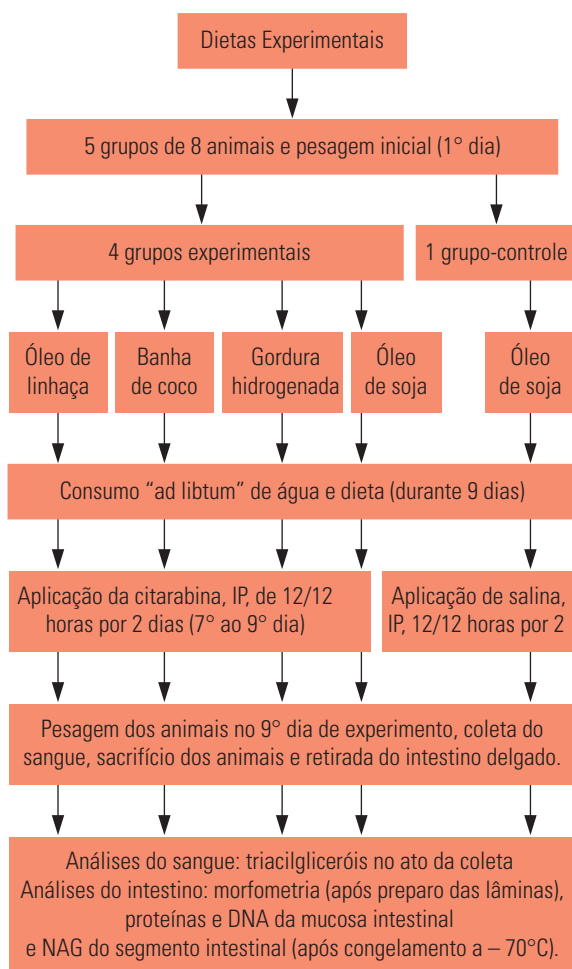


Figura 1 - Desenho experimental do estudo feito para avaliar diferentes fontes lipídicas na mucosite induzida por ara-C em camundongos *Swiss*.

Ramos *et al.*⁹, usando dose mais baixa de citarabina (3,6 mg/camundongo/dia) por dois dias, observaram redução significativa do trofismo intestinal, que foi menos intensa nos grupos que receberam ácidos graxos de cadeia curta por via oral. Os autores relataram elevada redução do trofismo intestinal quando a citarabina foi administrada por quatro dias, mas parte dos camundongos morreu antes de se completarem quatro dias do tratamento.

A dose de citarabina utilizada neste experimento foi mais alta (5,25 mg/camundongo/dia) em relação à

usada por Ramos *et al.*⁸. Porém, constatou-se menos agressão na mucosa intestinal, comparado ao citado anteriormente. As divergências podem ter sido causadas pelas diferenças entre os animais experimentais, que no trabalho de Ramos *et al.* foram suíços, isentos de germes, portanto, sem flora intestinal estabelecida. Além disso, os camundongos eram mais jovens e com menos peso. Os autores utilizaram, ainda, ração comercial com baixo teor de lipídeos (3%) e de proteína.

Ramos *et al.*⁸ encontraram efeito protetor com a administração oral de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Porém, apesar dos TCM e TCC terem digestão e absorção semelhantes, suas atividades biológicas no trato digestivo são diferentes, podendo não ter o mesmo efeito de proteção contra quimioterápicos. É sabido que butirato um - ácido graxo de cadeia curta de quatro carbonos - é usado como energia preferencial do colonócito, o que não ocorre com os demais ácidos graxos. A gordura de coco não contém ácidos graxos de cadeia curta, possuindo principalmente ácido láurico, C_{12:0} (47% de sua composição), o maior ácido graxo de cadeia média, considerado por alguns até como pertencendo à classe de cadeia longa.

Os resultados aqui apresentados mostram que, apesar da diferença de peso, a quantidade de proteína intestinal foi semelhante entre os tratamentos. (Figura 2)

Nota-se que os dados foram analisados considerando-se o comprimento (cm) e não o peso (g) de uma amostra de tecido, devido ao fato do intestino atrófico tem menos quantidade de células na mucosa. Assim, ao se considerar os dados em mg/g, consideram-se mais outras camadas da parede intestinal que não a mucosa, distorcendo-se o valor real - embora Ramos *et al.*⁸ tenham descrito menos quantidade de proteína na mucosa intestinal de camundongos tratados com citarabina por dois dias em relação ao grupo-controle. Os dados aqui apresentados sugerem que componentes imunológicos como citocinas, transudatos e outros mascararam a redução da proteína da mucosa. Corroborando esses dados estão os de concentração de macrófagos, como sugerido pela dosagem da enzima N-acetil-glicosamina (NAG) e dosagem de RNA na mucosa, que foram reduzidas nos animais submetidos à quimioterapia. (Figura 3)

A dosagem de DNA, que reflete indiretamente a celularidade da mucosa, mostrou redução de DNA nos animais do grupo soja comparado aos controles sem ara-C. Esse grupo foi também o mesmo que apresentou a maior perda ponderal, ambos sugerindo o pior perfil orgânico após a quimioterapia.

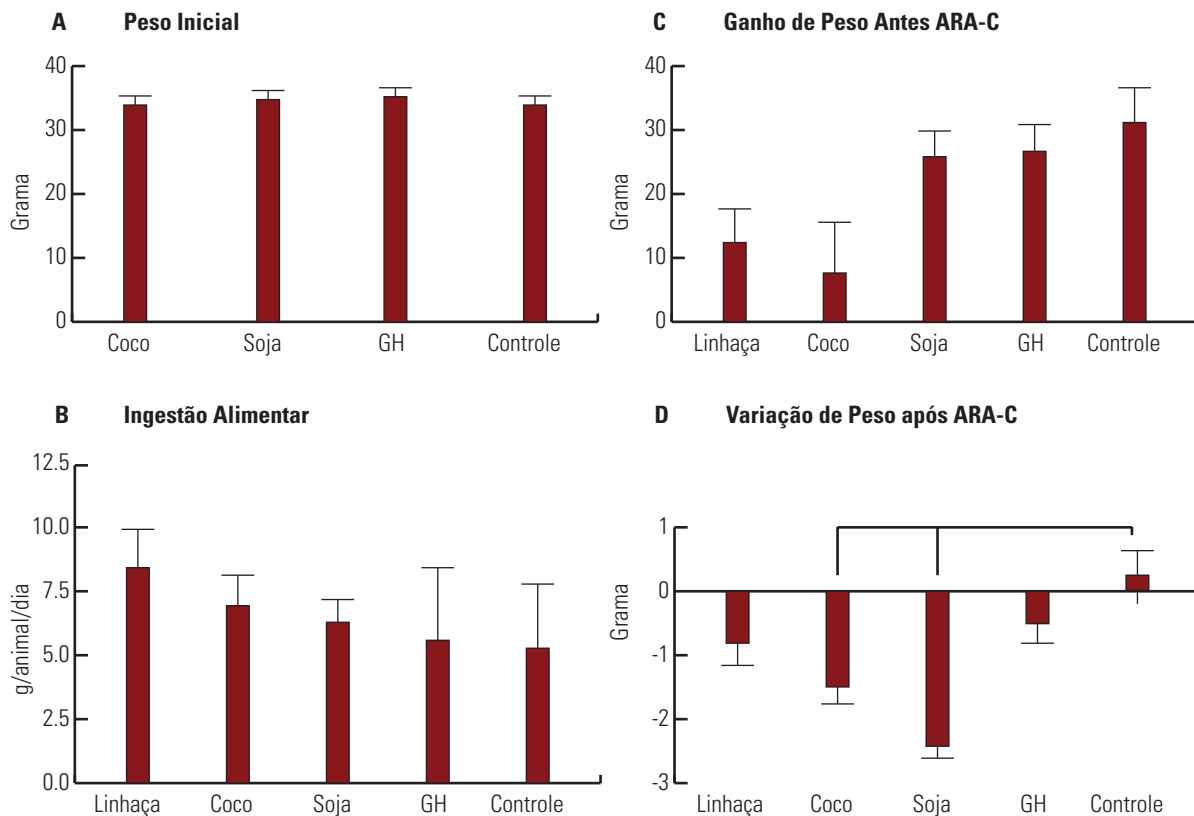


Figura 2 - Peso inicial (A), ingestão alimentar (B), ganho de peso antes do ara-C (C) e variação do peso após início de ara-C (D) de animais consumindo dietas com diferentes fontes lipídicas e submetidos ou não à administração de ara-C. * Estatisticamente diferente ($p < 0,05$).

Analisando os grupos tratados com citarabina e o controle, notou-se o maior conteúdo de DNA no grupo-controle, comparado aos demais com quimioterapia.

Esse resultado confirma a redução do trofismo intestinal após quimioterapia. A Figura 4 mostra também a relação das proteínas dosadas, corrigidas para a concentração de DNA da mucosa intestinal. Os resultados revelam aumento da relação de proteínas, provavelmente relacionado ao estado inflamatório. Infelizmente não foi possível medir o teor de citocinas inflamatórias ou mesmo a concentração de neutrófilos ou linfócitos T, importantes células envolvidas no processo inflamatório. Embora tenha sido medida indiretamente a concentração de macrófagos a partir da enzima NAG, essas células muitas vezes são residentes na mucosa intestinal, refletindo mais a integridade que o processo inflamatório local. A presença de mais de um tipo de N-acetilglicosaminidase (NAG) em células da mu-

cosa intestinal já foi relatada por alguns autores¹⁸. Esse fator pode significar que a NAG, no caso das mucosas intestinais, não seja bom parâmetro para avaliar a migração de macrófagos em tecidos com alterações tróficas. A diminuição do NAG no tecido intestinal de camundongos tratados com citarabina pode ser interpretada como mais um dado sugestivo de alteração funcional do intestino desses animais, refletindo indiretamente a diminuição do trofismo intestinal pelo quimioterápico.

Os resultados aqui observados sugerem que o modelo testado é eficiente para o estudo dos efeitos da citarabina na mucosa intestinal. O óleo de soja mostrou-se associado a pior evolução dos animais, uma vez que acarretou mais perda de peso, redução de DNA e maior quantidade relativa de proteínas na mucosa (provavelmente associada a moléculas inflamatórias). Porém, nenhum benefício foi notado em relação aos demais lipídeos (ricos em ácido graxo ômega-3, gordura *trans* ou TCM).

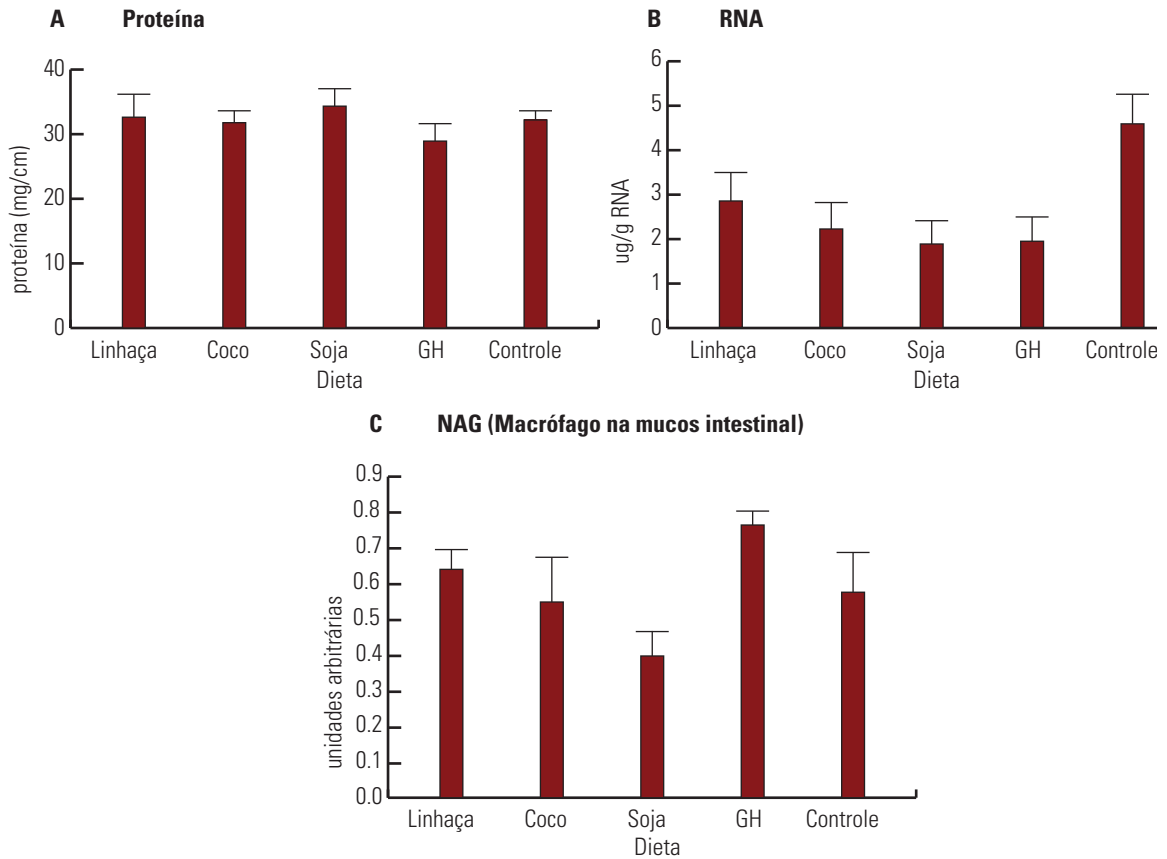


Figura 3 - Quantificação de proteína (A), RNA (B) e macrófagos (C) na mucosa intestinal de animais submetidos a dietas com diferentes fontes de lipídeos e tratados com ara-C.

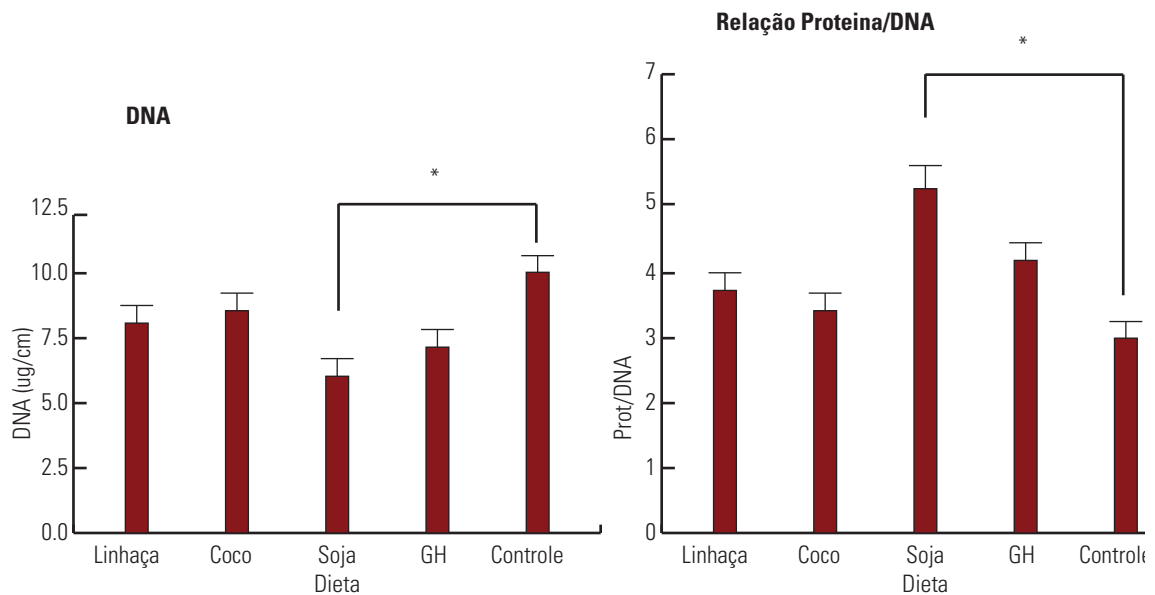


Figura 4 - DNA (mg/5cm) e relação proteína/DNA da mucosa intestinal de camundongos, consumindo diferentes fontes lipídicas e submetidos ou não à administração de ara-C.

* Estatisticamente diferente ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A dose e dias de tratamento com citarabina utilizada foram suficientes para reduzir o peso, DNA e macrófagos na mucosa intestinal. O modelo experimental utilizado propõe que, das diferentes fontes lipídicas, apenas o uso de óleo de soja apresentou perfil diferente (mais adverso), indicando efeitos indesejáveis com seu uso. Porém, em relação às demais fontes lipídicas, não há dados suficientes para indicar ou restringir seu uso concomitante com citarabina.

REFERÊNCIAS

1. Nelson DL, Lehninger MM. Princípios de bioquímica. 3ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
2. Witzig TE, Timm M, Stenson M, Svingen PA, Kaufmann SH. Induction of apoptosis in malignant b cells by phenilbutyrate or phenilacetate in combination with chemoterapeutic agents. Clin Cancer Res. 2000 Feb; 6(2):681-92.
3. Kissmeyer-Nielsen P, Mortensen FV, Laurberg S, Hessov I. Transmural trophic affect of short chain fatty acid infusions on atrophic, defunctioned rat colon. Dis Colon Rectum. 1995 Sep; 38(9):946-51.
4. Hartman L, Lago RC. Rapid preparation to fatty acids methyl esters. Lab Pract. 1973 Jul; 22(6):475-6 passim.
5. Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. XXI. Scheduling of arabinosylcytosine to take advantage of its S-phase specificity against leukemia cells. Cancer Chemother Rep. 1967 Jun; 51(3):125-65.
6. Hosoda N, Nishi M, Nakagawa M, Hiramatsu Y, Hioki K, Yamamoto M. Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats. J Surg Res. 1989 Aug; 47(2):129-33.
7. Ibrahim NK, Sahin AA, Dubrow RA, Lynch PM, Boehnke-Michaud L, Valero V, *et al.* Colitis associated with docetaxel-based chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. Lancet. 2000 Jan 22; 355(9200):281-3.
8. Ramos MG. Associação de AGCC com agentes quimioterápicos-papel no trofismo intestinal e apoptose [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
9. Ramos MG, Bambirra EA, Cara DC. Oral administration of Short-Chain Fatty Acids Reduces the Intestinal Mucositis Caused by treatment with Ara-C in Mice Fed Commercial or Elemental Diets. Nutr Cancer. 1997; 28(2):212-7.
10. Waitzberg DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p.1395-404.
11. Mitsugi K, Nakamura T, Kashiwabara N, Ariyama H, Tanaka R, Baba E, *et al.* Protection against methotrexate toxicity by a soybean protein- and omega-3 fatty acid-containing diet: comparative study with a casein-containing diet. Oncol Rep. 2004 Jul; 12(1):41-5.
12. Assis MAA. Consulta de nutrição: controle e prevenção do colesterol elevado. Florianópolis: Insular; 1997. p. 168.
13. Alvarez-Leite JI, Peluzio MCG. Lípidos In: Teixeira Neto F. Nutrição clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p 8-19.
14. Reeves P G, Nielsen FH, Faheey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN 76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123(11):1939-51.
15. Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA-UFMG, Protocolos Anestésicos: protocolos em animais de pequeno porte. Belo Horizonte, 2006. [Citado em 2006 jul. 10]. Disponível em: http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com_content&task=view&id=22
16. Pimentel GF. Curso de estatística experimental. 13ª ed. Piracicaba-SP: Nobel; 1990. 468 p.
17. Mian N, Herries DG, Cowen DM, Batte EA. The multiple forms and kinetic properties of the N-acetyl-beta-D-hexosaminidases from colonic tumours and mucosa of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. Biochem J. 1999 Jan; 177(1):319-30.