

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA**

FABIANE LA FLOR ZIEGLER

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNAS
LÁCTEAS SOBRE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA),
NA MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS E EM CÉLULAS
LEUCÊMICAS”**

Campinas

2010

FABIANE LA FLOR ZIEGLER

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNAS
LÁCTEAS SOBRE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA),
NA MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS E EM CÉLULAS
LEUCÊMICAS”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Z624a

Ziegler, Fabiane La Flor.

Avaliação do efeito da suplementação com proteínas lácteas sobre pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), na mucosite induzida por quimioterápicos e em células leucêmicas / Fabiane La Flor Ziegler. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro de leite. 2. Caseína. 3. Leucemia mieloide aguda. 4. Mucosite. 5. Células leucêmicas. I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of the effect of the supplementation with milk proteins on patients with acute myeloid leukemia (AML) in chemotherapy-induced mucositis and leukemic cells

Palavras-chave em inglês (Keywords): Milk whey proteins, Casein, Acute myeloid leukemia, Mucositis, Leukemic cells

Área de Concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor de Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri

Geórgia Alvares de Castro

João Ernesto de Carvalho

Maria Marluce dos Santos Vilela

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Data da Defesa: 20/08/2010

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em 20/08/2010 por Fabiane La Flor Ziegler aprovado pela comissão julgadora em 20/08/2010.

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)

Profa. Dra. Geórgia Alvares de Castro
(Membro)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
(Membro)

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela
(Membro)

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(Membro)

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni
(Membro)

Profa. Dra. Yara Maria Franco Moreno
(Membro)

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro
(Membro)

Aos que sempre acreditaram e acima de tudo confiaram em mim,

DEDICO

A meu marido **Júlio César**, que soube entender minha paixão pela nutrição e vida acadêmica e que sempre me incentivou a seguir adiante superando os obstáculos em busca de meus objetivos;

A minha **família**, que aprendeu a consolar a dor da saudade na alegria dos reencontros.

A meu eterno mestre Prof. Dr. **Valdemiro Carlos Sgarbieri**, pelo apoio, incentivo e ajuda incondicional em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, sempre me estendendo sua mão amiga.

As **crianças e adolescentes** que fizeram parte do presente trabalho **e seus familiares**, pela confiança e colaboração. Para vocês minha especial gratidão!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por iluminar minhas decisões, guiar meus passos e acima de tudo por ter me dado força para vencer as dificuldades e a oportunidade de ter uma vida feliz pelas conquistas alcançadas.

À meu amado **Júlio César**, pelo amor, apoio, incentivo e por ser meu porto seguro em todos os momentos;

À minha mãe **Marilene** e meus irmãos **Guilherme e Rafael**, pelo amor, carinho e compreensão, que me fizeram ter coragem para sempre prosseguir;

À maravilhosa família do meu marido, **Iolanda, Bi, Gláucia, Alexandre, Adriana e Caique**, por terem me acolhido com tanto amor e carinho, tornando-se também minha querida família.

Ao meu pai de coração, **Jaime Homrich**, exemplo de profissional, pela educação, ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao amigo especial **Waldir Filho**, pela dedicação e amor à minha mãe e irmãos, ajudando-os a suportar e aliviar minha ausência.

Ao meu chefe, amigo e agora compadre **Prof. Sgarbieri**, pela amizade, ensinamentos, dedicação, competência e por dividir comigo as dificuldades enfrentadas e alegrias conquistadas ao longo dessa jornada;

Aos membros da **Banca Examinadora**, pela contribuição e sugestões apresentadas.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP**, especialmente ao **Departamento de Alimentos e Nutrição**, pela oportunidade em realizar o curso.

AGRADECIMENTOS

Aos **Professores do Departamento de Alimentos e Nutrição**, pela colaboração, incentivo e pôr disponibilizarem seus laboratórios, em diferentes momentos, durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório de Nutrição e Metabolismo: **Alice, Cláudia, Elisvânia, Maria Inês, Paula e Pablo**, pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade.

Aos **Funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição**, pela amizade e colaboração. Em especial à querida amiga **Suzana**, pela ajuda incondicional, ensinamentos e amizade, proporcionando-me momentos divertidíssimos.

Ao Professor **Dr. João Ernesto de Carvalho**, pela colaboração, amizade e pôr disponibilizar seu laboratório e toda sua equipe para a execução de grande parte deste trabalho.

Aos profissionais **Karin Monteiro, Sirlene Tinti, Ana Possenti, Aninha e toda a equipe do laboratório de Farmacologia do CPQBA**, pela carinhosa recepção e ajuda fundamental na realização dos experimentos, inclusive nos finais de semana e feriados.

À Professora **Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela**, pela ajuda, confiança e pôr disponibilizar o laboratório de Imunologia no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, para a realização das análises do estudo clínico.

Às **companheiras de laboratório no CIPED**, pelo auxílio e companhia. Em especial à amiga **Taís Mazzola**, pelo incentivo, essencial ajuda, companhia e alegria, tornando o ambiente de trabalho no laboratório tão acolhedor e agradável.

AGRADECIMENTOS

Ao Pesquisador **Gilberto Franchi**, pela ajuda, amizade e parceria no desenvolvimento dos estudos *in vitro* e *in vivo*.

À Dra. **Sílvia Brandalise**, pela confiança e por permitir que eu realizasse a coleta de dados da pesquisa no Centro Infantil Boldrini.

À nutricionista e amiga **Wanélia Afonso**, pela amizade, ajuda e ensinamentos em nutrição oncológica.

À dentista **Regina Mendonça**, pelo incentivo, ajuda e apoio desde o início dessa trajetória.

À bióloga **Leonice Fraga da Silva**, por sua ajuda fundamental, sempre me avisando sobre os possíveis casos novos de leucemia mieloide aguda que internavam no Centro Infantil Boldrini.

À toda equipe multiprofissional do Centro Infantil Boldrini, em especial a médica **Vitória Pinheiro**, a **equipe de enfermagem** e **do laboratório de análises clínicas**, pelo suporte junto aos pacientes, coleta de material biológico e disponibilização do laboratório para preparo das amostras.

Às **crianças, adolescentes e seus responsáveis** por transformarem um desejo em realidade.

À companheira de trabalho mais “*Faca na Bota*” que eu poderia conhecer e amiga querida de todas as horas **Daniela Miotto Bernardi**, incansável em me socorrer nas piores dificuldades. Sempre tão prestativa ... Jamais esquecerei tudo o que fizeste por mim. Palavras não traduzem a imensa gratidão pela sua amizade e ajuda despretenciosa!

AGRADECIMENTOS

À amiga do coração **Janesca Roman**, que mesmo distante, sempre me incentivou com suas palavras amigas e me ajudou a crescer como profissional.

À amiga **Yara Moreno**, por sua experiência e competência em nutrição clínica, estando presente ao longo dessa jornada me ajudando inúmeras vezes.

À amiga **Maria Inés Abecia**, pela companhia, apoio e ajuda fundamental no início desse trabalho.

Às amigas e companheiras da república “A casa das 7 mulheres” **Fran, Bela, Roberta, Tati, Renata e Pri**, pela amizade, estímulo e compreensão nos momentos mais difíceis e também pelas inesquecíveis festas e churrascos.

Aos meus **amigos de Valinhos**, pela amizade e por proporcionarem momentos de descontração e divertimento sensacionais.

Aos meus **amigos da Unicamp**, os quais sabem o quão difícil é deixar a família, os amigos e o local que amamos para partir em busca da realização profissional, pela amizade, carinho e pelos vários momentos de diversão.

Aos **familiares e amigos distantes**, os quais mesmo de longe sempre torceram pela minha realização profissional.

A todos da secretaria de Pós-Graduação, em especial ao **Cosme e Marcos**, pela paciência e dedicação.

Ao **CNPq** pela bolsa de estudo concedida.

AGRADECIMENTOS

À empresa **Hilmar Cheese Company**, pela doação do concentrado de proteínas do soro de leite bovino utilizado durante a execução desse trabalho.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

Fabiane.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	23
LISTA DE FIGURAS	29
RESUMO GERAL	39
ABSTRACT	43
CONCLUSÕES GERAIS	47
INTRODUÇÃO	49
CAPÍTULO 1	
“Revisão de Literatura”	55
1. ALIMENTOS FUNCIONAIS E IMUNONUTRIÇÃO	55
1.1. Leite bovino	56
1.1.1 Componentes	57
1.1.2 Propriedades funcionais fisiológicas	60
2. CÂNCER	67
2.1. Câncer Pediátrico: Leucemias Agudas	67
2.2. Tratamento do Câncer	69
2.3. Efeitos Adversos do Tratamento	71
2.4. Estado nutricional no câncer	74
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CAPÍTULO 2	
“Suplementação com proteínas do soro de leite bovino em pacientes pediátricos com leucemia mieloide aguda (LMA) nos primeiros 60 dias do tratamento quimioterápico”	87
RESUMO	87
1. INTRODUÇÃO	89
2. OBJETIVOS	91
2.1. Objetivo Geral	91
2.2. Objetivos Específicos	91

3. HIPÓTESES	91
4. MÉTODOS	92
4.1. Delineamento do Estudo	92
4.2. População.....	92
4.3. Protocolo do Tratamento Quimioterápico.....	93
4.4. Caracterização Físico-química dos Suplementos.....	97
4.4.1 Concentrado protéico de soro de leite.....	97
4.4.2 Maltodextrina.....	98
4.5. Suplementação Alimentar.....	99
4.6. Avaliação Nutricional.....	102
4.6.1. Antropometria e Composição Corporal.....	102
4.6.2. Necessidades Energéticas Diárias e Ingestão Alimentar.....	104
4.7. Avaliação Bioquímica.....	105
4.7.1. Coleta das Amostras Biológicas.....	105
4.7.2. Dosagem de Proteínas Séricas.....	105
4.7.3. Hemograma.....	106
4.7.4. Glutaciona Eritrocitária.....	106
4.7.5. Dosagem de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e no plasma.....	107
4.7.6. Dosagem de Imunoglobulina A salivar.....	108
4.8. Avaliação Clínica.....	109
4.8.1. Avaliação da Evolução da Mucosite.....	109
4.9. Aspectos Éticos.....	109
4.10. Análise Estatística.....	110
5. RESULTADOS	111
5.1. Caracterização da População.....	111
5.2. Avaliação Nutricional.....	114
5.2.1. Antropometria e Composição Corporal.....	114
5.2.2. Necessidades Energéticas Diárias e Ingestão Alimentar.....	118
5.3. Avaliação Bioquímica.....	124
5.3.1. Dosagem de Albumina e Pré-Albumina.....	124
5.3.2. Parâmetros Hematológicos.....	127

5.3.3. Glutathiona Eritrocitária.....	130
5.3.4. Dosagem de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico e no plasma.....	131
5.3.5. Dosagem de IgA salivar.....	136
5.4. Avaliação Clínica.....	137
6. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM HUMANOS.....	140
7. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM HUMANOS.....	157
8. DIFICULDADES ENCONTRADAS NA PESQUISA COM HUMANOS.....	157
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158

CAPÍTULO 3

“Desenvolvimento de um modelo de indução de mucosite gastrointestinal por quimioterápicos, em ratos Wistar, e avaliação da eficácia de proteínas lácteas na proteção da mucosa”.....	167
RESUMO.....	167
1. INTRODUÇÃO.....	169
2. OBJETIVOS GERAIS.....	170
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	170
3.1. Materiais.....	170
3.2. Métodos.....	171
3.2.1. Caracterização físico-química.....	171
3.2.2. Avaliação <i>in vivo</i>	171
3.2.3. Parâmetros analisados durante os experimentos.....	174
3.2.4. Análise Estatística.....	180
4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	181
4.1. EXPERIMENTO 1 (Piloto).....	181
4.1.1. Objetivos Específicos.....	181
4.1.2. Protocolo Experimental.....	181
4.1.3. Resultados.....	184
4.1.4. Conclusões do Experimento 1.....	192
4.2. EXPERIMENTO 2.....	192
4.2.1. Objetivos Específicos.....	192

4.2.2. Protocolo Experimental.....	192
4.2.3. Resultados.....	194
4.2.4. Conclusões do Experimento 2.....	210
4.3. EXPERIMENTO 3.....	211
4.3.1. Objetivos Específicos.....	211
4.3.2. Protocolo Experimental.....	211
4.3.3. Resultados.....	213
4.3.4. Conclusões do Experimento 3.....	231
4.4. EXPERIMENTO 4.....	232
4.4.1. Objetivos Específicos.....	232
4.4.2. Protocolo Experimental.....	232
4.4.3. Resultados.....	233
4.4.4. Conclusões do Experimento 4.....	240
4.5. EXPERIMENTO 5.....	241
4.5.1. Objetivos Específicos.....	241
4.5.2. Protocolo Experimental.....	241
4.5.3. Resultados.....	242
4.5.4. Conclusões do experimento 5.....	249
5. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM RATOS.....	250
6. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM RATOS.....	261
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	262

CAPÍTULO 4

“Avaliação, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , dos efeitos de proteínas lácteas sobre células leucêmicas humanas transplantadas em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e em cultura de células”.....	269
RESUMO.....	269
1. INTRODUÇÃO.....	271
2. OBJETIVOS GERAIS.....	272
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	273
3.1. Materiais.....	273
3.2. Métodos.....	273

3.2.1. Caracterização físico-química	273
3.2.2. Avaliação <i>in vivo</i>	274
3.2.3. Avaliação <i>in vitro</i>	277
3.2.4. Análise Estatística	278
4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	279
4.1. EXPERIMENTO 1, <i>in vivo</i>	279
4.1.1. Objetivos Específicos	279
4.1.2. Protocolo Experimental	279
4.1.3. Resultados	279
4.1.4. Conclusões do Experimento 1, <i>in vivo</i>	283
4.2. EXPERIMENTO 2, <i>in vivo</i>	283
4.2.1. Objetivos Específicos	283
4.2.2. Protocolo Experimental	284
4.2.3. Resultados	284
4.2.4. Conclusões do Experimento 2, <i>in vivo</i>	294
4.3. EXPERIMENTO 1, <i>in vitro</i>	295
4.3.1. Objetivos Específicos	295
4.3.2. Protocolo Experimental	295
4.3.3. Resultados	296
4.3.4. Conclusões do Experimento 1, <i>in vitro</i>	300
4.4. EXPERIMENTO 2, <i>in vitro</i>	300
4.4.1. Objetivos Específicos	300
4.4.2. Protocolo Experimental	300
4.4.3. Resultados	302
4.4.4. Conclusões do Experimento 2, <i>in vitro</i>	307
5. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM CÉLULAS LEUCÊMICAS	307
6. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM CÉLULAS LEUCÊMICAS	318
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	319
APÊNDICES	325
ANEXOS	343

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Proteínas do soro de leite bovino e principais funções fisiológicas.....59

TABELA 2. Classificação da Leucemia Mieloide Aguda.....69

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Composição centesimal do concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC).....97

TABELA 2. Valores obtidos para os aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do concentrado protéico do soro de leite bovino (WPC).....98

TABELA 3. Composição nutricional da maltodextrina (MOR-REX[®] 1910) de acordo com informações do fabricante.....99

TABELA 4. Valores de recomendação para proteínas (g/dia) de acordo com *Dietary Reference Intakes* - DRI (Institute of Medicine, 2002/2005).....100

TABELA 5. Classificação da mucosite.....109

TABELA 6. Caracterização da população estudada.....113

TABELA 7. Comparação das variáveis antropométricas e da composição corporal, entre o grupo maltodextrina e WPC, no início da intervenção nutricional dos pacientes com LMA.....114

TABELA 8. Necessidades energéticas diárias (NED) e ingestão alimentar de energia, proteína, lipídios, carboidratos e fibras de pacientes com LMA no início da intervenção nutricional.....118

TABELA 9. Contribuição energética e de macronutrientes, para as faixas etárias estudadas, de 100% ou 50% de suplementação com maltodextrina (MALTO) e WPC.....119

TABELA 10. Necessidades energéticas diárias (NED) e ingestão alimentar de energia, proteína, lipídios, carboidratos e fibras de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.....121

TABELA 11. Adequação da ingestão alimentar dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e

WPC.....	123
TABELA 12. Comparação dos níveis de albumina sérica (g/dL) e pré-albumina sérica (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).....	125
TABELA 13. Parâmetros hematológicos em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).....	127
TABELA 14. Parâmetros hematológicos em pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.....	129
TABELA 15. Concentração de citocinas (pg/mL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).....	132
TABELA 16. Comparação dos níveis de IgA salivar (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).....	136
TABELA 17. Níveis de IgA salivar (mg/dL) de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina ou WPC.....	137
TABELA 18. Avaliação da evolução da mucosite (n° de dias e percentual) dos pacientes com LMA durante a intervenção nutricional.....	138
TABELA 19. Percentual do grau de mucosite dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2).....	139
TABELA 20. Mediana do % de tempo em que os pacientes com LMA dos grupos maltodextrina e WPC permaneceram em cada grau de mucosite.....	140

CAPÍTULO 3

TABELA 1. Descrição dos possíveis diagnósticos histopatológico na mucosa gastrointestinal de cada porção avaliada nos experimentos 3, 4 e 5.....	178
TABELA 2. Escores médios da avaliação clínica realizada com os grupos tratados com 5-FU ao longo do experimento.....	188
TABELA 3. Escores médios da avaliação clínica realizada com os grupos tratados com sulfato de vincristina ao longo do experimento.....	188
TABELA 4. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 2.....	197
TABELA 5. Escores médios da avaliação clínica realizada ao longo do experimento.....	198
TABELA 6. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais 1, 2, 3 e 4.....	206

TABELA 7. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais 5 e 6.....	207
TABELA 8. Composição centesimal das dietas AIN-93G formuladas com caseína ou WPC.....	213
TABELA 9. Ingestão de dieta dos grupos experimentais durante todo experimento 3.....	215
TABELA 10. Escores médios da avaliação clínica realizada durante o experimento.....	216
TABELA 11. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) para os grupos experimentais.....	221
TABELA 12. Valores obtidos de hematócrito(%)para os grupos experimentais..	221
TABELA 13. Resultados da análise histopatológica para avaliação da mucosite gastrointestinal em ratos Wistar adultos.....	224
TABELA 14. Resultados da análise histopatológica para avaliação da recuperação da mucosa gastrointestinal em ratos Wistar adultos.....	226
TABELA 15. Análise microbiológica dos grupos experimentais antes da administração da 1ª dose de 5-FU (D21).....	228
TABELA 16. Análise microbiológica dos grupos experimentais 24h após administração da 2ª dose de 5-FU (D25).....	229
TABELA 17. Análise microbiológica dos grupos experimentais 8 dias após a administração da 3ª dose de 5-FU (D35).....	230
TABELA 18. Ingestão de dieta dos grupos experimentais.....	234
TABELA 19. Escores médios da avaliação clínica realizada ao longo do experimento.....	234
TABELA 20. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais.....	237
TABELA 21. Resultados da análise histopatológica para avaliação da mucosite gastrointestinal em ratos Wistar adultos.....	240
TABELA 22. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 5.....	243
TABELA 23. Contagem diferencial de leucócitos de ratos <i>Wistar</i> adultos após 21 dias de experimento.....	245
TABELA 24. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os	

grupos experimentais.....	247
---------------------------	-----

CAPÍTULO 4

TABELA 1. Valores obtidos para a razão do peso do órgão pelo peso corporal (%) dos grupos experimentais.....	281
TABELA 2. Evolução da Leucemia Linfóide Aguda em camundongos NOD/SCID.....	282
TABELA 3. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 2.....	286
TABELA 4. Valores obtidos para a razão do peso do órgão pelo peso corporal (%) dos grupos experimentais.....	286
TABELA 5. Evolução da Leucemia Linfóide Aguda (% de células blásticas) em camundongos NOD/ SCID.....	287
TABELA 6. Resultados da doença residual mínima (DRM) dos grupos tratados com quimioterápico.....	288
TABELA 7. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais.....	292
TABELA 8. Percentual de inibição do WPC em relação às células leucêmicas/linfoma: K562, Nalm-6, CEM e RAMOS.....	297
TABELA 9. Quantidade de glutathione total (pmol/célula) das linhagens K562, Nalm-6 e Jurkat, realizadas em tempos diferentes após o preparo das amostras.....	302
TABELA 10. Quantidade de células viáveis, não viáveis e n° de células/mL da linhagem K562 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....	303
TABELA 11. Quantidade de glutathione total (pmol/célula) da linhagem K562 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....	304
TABELA 12. Quantidade de células viáveis, não viáveis e n° de células/mL da linhagem Nalm-6 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....	304
TABELA 13. Quantidade de glutathione total (pmol/célula) da linhagem Nalm-6 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....	305
TABELA 14. Quantidade de células viáveis, não viáveis e n° de células/mL da	

linhagem HL-60 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....306

TABELA 15. Quantidade de glutathiona total (pmol/célula) da linhagem HL-60 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....306

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1.** Fluxograma do esquema terapêutico do protocolo NOPHO-AML 93. Fonte: LIE *et al.* (2005).....96
- FIGURA 2.** Peso corporal dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.....115
- FIGURA 3.** Escores Z dos índices antropométricos altura/idade e IMC/idade dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.....116
- FIGURA 4.** Valores absolutos (mm) das pregas cutâneas do tríceps (PCT) e subescapular (PCSE) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....117
- FIGURA 5.** Valores absolutos (mm) da circunferência braquial (CB) e da circunferência muscular do braço (CMB) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.....118
- FIGURA 6.** Distribuição % de macronutrientes dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.....122
- FIGURA 7.** Albumina sérica (g/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina.....126
- FIGURA 8.** Pré-albumina sérica (mg/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....126
- FIGURA 9.** Concentração de glutatona eritrocitária (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).....130
- FIGURA 10.** Concentração de glutatona reduzida em eritrócitos (mg/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$,

Teste de Comparações Múltiplas.....	131
FIGURA 11. Concentração de TNF- α de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....	133
FIGURA 12. Concentração de IL-6 de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....	134
FIGURA 13. Concentração de IL-10 de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....	134
FIGURA 14. Concentração de IFN- γ de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.....	135
FIGURA 15. Concentração de TGF- β 2 presente no plasma de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....	135
FIGURA 16. Concentração de IL-8 presente no plasma de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).....	136

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Dietas AIN-93G peletizadas. (A) Dieta AIN-93G sem adição de proteína; (B) Dieta AIN-93G com 12% de WPC; (C) Dieta AIN-93G com 12% de caseína.....	172
FIGURA 2. Ilustração do procedimento de gavagem em ratos. Fonte: Guimarães e Mázaró (2004).....	173
FIGURA 3. Protocolo experimental do ensaio biológico com ratos Wistar para o quimioterápico 5-Fluoruracila (5-FU). Eutanásias para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação espontânea da mucosa estão demonstradas em verde e vermelho, respectivamente.....	182
FIGURA 4. Protocolo experimental do ensaio biológico com ratos Wistar para o quimioterápico sulfato de vincristina. Eutanásias para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação espontânea da mucosa estão demonstradas em verde e vermelho, respectivamente.....	183

- FIGURA 5.** Curvas de peso dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico 5-FU. G 1: dose única de 150mg/Kg; G 2: 2 doses de 150mg/Kg; G 3: 3 doses de 100mg/Kg e G 4: 2 doses de 100mg/Kg..... 184
- FIGURA 6.** Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico 5-FU ao longo do estudo. G 1: dose única de 150mg/Kg; G 2: 2 doses de 150mg/Kg; G 3: 3 doses de 100mg/Kg e G 4: 2 doses de 100mg/Kg. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey..... 185
- FIGURA 7.** Curvas de perda de peso dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina. G 2: 5 doses de 0,25mg/Kg; G 3: 3 doses de 0,5mg/Kg e G 4: 3 doses de 0,75mg/Kg..... 186
- FIGURA 8.** Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina ao longo do estudo. G 2: 5 doses de 0,25mg/Kg; G 3: 3 doses de 0,5mg/Kg e G 4: 3 doses de 0,75mg/Kg..... 188
- FIGURA 9.** Avaliação clínica da presença de diarreia e piloereção dos grupos tratados com 5-FU. (A) Animal hígido; (B) Animal do G 2, 72h após a 2ª dose de 150mg/Kg; (C) Animal do G 3, 72h após a 3ª dose de 100mg/Kg; (D) Animais hígidos; (E) Animal do G 4, 72h após a 2ª dose de 100mg/Kg e (F) Animais do G 3, 24h após a 3ª dose de 100mg/Kg..... 189
- FIGURA 10.** Avaliação clínica da presença de piloereção dos grupos tratados com sulfato de vincristina. (A) Animais hígidos; (B) Animal à esquerda do G 4 (0,75mg/Kg), animal ao centro e no fundo do G 3 (0,5mg/Kg) e animal à direita do G 2 (0,25mg/Kg)..... 189
- FIGURA 11.** Avaliação anatomopatológica após 3 dias da 2ª administração de 5-FU para o grupo 4 tratado com a dose de 100mg/Kg. (A) Estômago dilatado e conteúdo líquido; (B) Conteúdo intestinal líquido; (C), (D) e (E) Ulceração na região duodenal..... 190
- FIGURA 12.** Avaliação anatomopatológica do trato gastrointestinal após 3 dias da 2ª administração de 5-FU para o grupo 2 tratado com a dose de 150mg/Kg. (A) Região do reto; (B) Região duodenal..... 191
- FIGURA 13.** Protocolo do experimento 2. Eutanásias para avaliação da mucosite

estão demonstradas em verde..... 193

FIGURA 14. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais: G 1: Controle salina + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 2: Controle salina; G 3: Caseína Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 4: WPC Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU..... 195

FIGURA 15. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais: G 5: Caseína + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 6: WPC + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU..... 196

FIGURA 16. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais: G 1: Controle salina + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 2: Controle salina; G 3: Caseína Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 4: WPC Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 5: Caseína + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 6: WPC + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey..... 196

FIGURA 17. Avaliação clínica da presença de piloereção entre animais dos grupos experimentais 48h após a administração da 3ª dose de 5-FU. (A) G 2: controle salina; (B) G 1: Controle salina + 5-FU; (C) G 3: Caseína Pré + 5-FU ; (D) G 4: WPC Pré + 5-FU; (E) G 5: Caseína + 5-FU e (F) G 6: WPC + 5-FU..... 199

FIGURA 18. Avaliação anatomopatológica 48h após a administração da 3ª dose de 5-FU para o grupo 5, tratado com caseína; e para o grupo 6, tratado com WPC. (A) Grupo 5: Estômago dilatado e conteúdo intestinal líquido; (B) Grupo 6: Ulceração na região do estômago e do duodeno; (C) Grupo 6: Ulcerações espalhadas na região do intestino..... 200

FIGURA 19. Avaliação anatomopatológica 72h após a administração da 3ª dose de 5-FU dos grupos experimentais: 1, 2, 3 e 4. (A) Animal hígido do controle; (B) Animal do controle + 5-FU com ulceração no ceco; (C) Animal Caseína Pré + 5-FU com ulcerações ao longo do intestino; (D) Animal WPC Pré + 5-FU aparentemente sem ulcerações importantes..... 201

FIGURA 20. Valores de leucócitos ($\times 10^3/uL$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento..... 204

FIGURA 21. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/uL$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle

salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento205

FIGURA 22. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento208

FIGURA 23. Valores de glutatona (mg/dL) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento209

FIGURA 24. Protocolo do experimento 3. Eutanásias para avaliação da mucosite estão demonstradas em verde211

FIGURA 25. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais214

FIGURA 26. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento218

FIGURA 27. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do

experimento	220
FIGURA 28. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento	222
FIGURA 29. Valores de glutathiona (mg/dL) do experimento 3 G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento	223
FIGURA 30. Imagens de microscopia óptica da mucosa das porções do TGI: (A) Esôfago (mucosite leve); (B) Estômago região glandular (mucosite intensa); (C) Duodeno (mucosite intensa); (D) Jejunum (mucosite moderada); (E) Jejunum (mucosite intensa). Coloração HE, aumento de 100x e 400x	227
FIGURA 31. Protocolo do experimento 4. Eutanásias para avaliação da mucosite estão demonstradas em verde	232
FIGURA 32. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com diferentes doses de 5-FU. Letras minúsculas comparam cada grupo individualmente e letras maiúsculas comparam os grupos entre si no início e no final do experimento. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey	233
FIGURA 33. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento	236
FIGURA 34. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento	237

- FIGURA 35.** Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento238
- FIGURA 36.** Valores de glutatona (mg/dL) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento239
- FIGURA 37.** Protocolo do experimento 5. Estímulo imunológico: injeção peritoneal de 5×10^6 hemáceas de carneiro (SRBC). PELET. = dieta com WPC ou caseína peletizada.....242
- FIGURA 38.** Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.....244
- FIGURA 39.** Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.....246
- FIGURA 40.** Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.....248
- FIGURA 41.** Valores de glutatona eritrocitária (mg/dL) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8,

CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.....249

CAPÍTULO 4

FIGURA 1. Evolução do peso dos animais durante o experimento.....280

FIGURA 2. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.....280

FIGURA 3. Sobrevida global dos animais dos grupos experimentais. G 1: dieta com CASEÍNA; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta COMERCIAL.....282

FIGURA 4. Evolução do peso dos animais durante o experimento. G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL.....285

FIGURA 5. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT e G 4: dieta COMERCIAL. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.....285

FIGURA 6. Sobrevida global dos animais dos grupos experimentais. G1: dieta com WPC + QT; G 2: dieta com WPC; G3: dieta com CASEÍNA + QT; G 4: dieta COMERCIAL.....289

FIGURA 7. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.....290

FIGURA 8. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.....291

FIGURA 9. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.....293

FIGURA 10. Valores de glutatona eritrocitária (mg/dL). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.....294

FIGURA 11. Percentual de inibição do WPC em relação às células leucêmicas: K562, Nalm-6, CEM e RAMOS para as concentrações de 25; 12,5 e 6,25 mg/mL de WPC.....298

FIGURA 12. Curva do percentual de inibição da linhagem Nalm-6.....299

FIGURA 13. Curva do percentual de inibição da linhagem CEM.....299

FIGURA 14. Protocolo geral do experimento 2 *in vitro*. QT = quimioterápico Ara-C.....301

RESUMO GERAL

O objetivo geral da presente pesquisa foi avaliar o efeito de um concentrado de proteínas do soro do leite bovino (WPC) enriquecido com o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e lactoferrina, em pacientes pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda - LMA (Capítulo 2); desenvolver um modelo de mucosite gastrointestinal induzida por quimioterápicos, em ratos Wistar, para posterior avaliação da eficácia das proteínas lácteas na proteção da mucosa (Capítulo 3); avaliar os efeitos pelo WPC e por uma caseína comercial, *in vivo* e *in vitro* sobre células leucêmicas humanas transplantadas em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e em cultura de células (Capítulo 4). Para todos os estudos foi utilizado WPC enriquecido com TGF- β e lactoferrina doado pela empresa *Hilmar Cheese Company* (Cal, USA). No capítulo 2 realizou-se estudo de intervenção nutricional, prospectivo, duplo cego com placebo controlado, onde foram avaliados 21 pacientes, entre 0 a 19 anos, virgens de terapia, admitidos no Centro Infantil Boldrini, Campinas - SP. Foram avaliados quanto à adequação da ingestão alimentar, estado nutricional (EN), dosagem de glutathione (GSH) eritrocitária, hemograma, produção de citocinas no plasma e em cultura de células, imunoglobulina A salivar e evolução da mucosite. Foram comparados os resultados bioquímicos dos pacientes com um grupo controle de indivíduos saudáveis da mesma faixa etária. Utilizou-se o *software* SPSS para as análises estatísticas ($p < 0,05$). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro 14097. Tomados em conjunto os resultados indicaram que o WPC apresentou efeito positivo sobre o EN dos pacientes, porém não influenciou na composição corporal. A distribuição % dos macronutrientes estava adequada em todos os tempos para os grupos WPC e maltodextrina (placebo), mas o % de adequação dos micronutrientes não atendia às recomendações em sua maioria. As análises bioquímicas não evidenciaram superioridade do WPC em relação ao placebo. Não houve diferença significativa entre os grupos sobre a avaliação clínica da mucosite oral. Na comparação dos pacientes com LMA e indivíduos saudáveis (controle) pode-se constatar níveis estatisticamente superiores do controle nos parâmetros

bioquímicos de albumina, pré-albumina, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e interferon gama (IFN- γ) quando estimuladas pela vacina BCG liofilizada e produção de IL-6 quando estimulada por fitohemaglutinina (PHA). No entanto, para a concentração de GSH eritrocitária e produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ verificou-se que os pacientes com LMA apresentaram níveis estatisticamente superiores em relação ao controle saudável. No capítulo 3 foi elaborado um protocolo de indução de mucosite em ratos Wistar testando-se os quimioterápicos 5-Fluoruracila (5-FU) e sulfato de vincristina (SV), em administrações de diferentes concentrações e número de doses. Através desse experimento concluiu-se que o SV não foi um bom agente indutor de mucosite, ao contrário do 5-FU. A partir desses resultados foram realizados experimentos com 5-FU visando ajuste das condições dos experimentos inclusive do número, periodicidade e concentração das doses do quimioterápico. O melhor modelo de indução de mucosite gastrointestinal foi obtido através da administração de 3 doses de 5-FU com intervalo de 3 dias entre cada dose, nas concentrações entre 50 e 70 mg/Kg/dose. Os índices bioquímicos não foram influenciados pelo efeito da peletização da dieta e, de modo geral não houve diferença significativa entre os grupos tratados com WPC e com caseína. Independente da natureza da proteína (WPC ou caseína) observou-se maior proteção contra o 5-FU quando os animais receberam as dietas previamente à administração do quimioterápico. Ao contrário do esperado, o estímulo imunológico com hemáceas de carneiro não promoveu aumento nos níveis de GSH nos eritrócitos. As proteínas do soro do leite protegeram a mucosa, em termos de promover menor intensidade de mucosite, nos períodos mais críticos (72h após a 2^a e a 3^a dose de 5-FU) nas regiões de maior prevalência, duodeno e jejuno, quando se comparou com os resultados obtidos para os grupos tratados com caseína. Para os experimentos *in vivo*, do capítulo 4, utilizaram-se células de leucemia linfóide aguda (LLA) pediátrica humana, isoladas de pacientes do Centro Infantil Boldrini, as quais foram inoculadas em camundongos NOD/SCID. Nesses experimentos, utilizou-se dieta AIN-93G com WPC ou caseína e dieta comercial e o quimioterápico SV. Avaliou-

se: peso corporal, consumo de dieta, razão entre peso dos órgãos (rim, baço e fígado) e peso corporal, evolução da leucemia, tempo de sobrevivência, hemograma e níveis de glutatona em eritrócitos do sangue periférico. Nos experimentos *in vitro* foram usadas 6 linhagens celulares: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B), Jurkat (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), CEM (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), RAMOS (Linfoma Burkitt) e HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda). Foram testadas a citotoxicidade (IC_{50}) do WPC, a viabilidade celular e os níveis de glutatona total nas células leucêmicas estudadas em 4 tempos (0, 24, 48 e 72h) e 4 condições diferenciadas (células; células + WPC; células + WPC + ARAC-C; células + ARA-C). Todos os resultados, tanto do capítulo 3 como do 4, foram analisados através do *software* “Statística: Basic Statistics and Tables”. Não houve diferença entre o WPC e a caseína em relação aos parâmetros avaliados nos experimentos *in vivo*, exceto na análise de Doença Residual Mínima (DRM), na qual a caseína se mostrou mais efetiva que o WPC. Constatou-se superioridade do WPC sobre os resultados de peso corporal, razão dos rins e baço pelo peso e evolução da leucemia em relação aos animais tratados com dieta comercial. Não foi possível verificar um efeito sinérgico entre o WPC e o quimioterápico sulfato de vincristina. No que se refere aos experimentos *in vitro*, o WPC apresentou IC_{50} para Nalm-6 de 6,72 mg/mL e para a linhagem CEM de 11,84 mg/mL. Verificou-se que as linhagens K562, Nalm-6 e HL-60 apresentaram perfis semelhantes em relação à viabilidade celular. No entanto, em relação à produção de glutatona total, cada linhagem comportou-se de maneira diferenciada, sendo que a maior produção em todas as condições e tempos estudados, foi para a linhagem HL-60 seguida pela K562.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of a bovine milk whey protein concentrate (WPC), enriched with transforming growth factor beta (TGF- β) and lactoferrin in pediatric patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) (Chapter 2); in a chemotherapeutic-induced gastrointestinal mucositis model in Wistar rats (Chapter 3); evaluate in human leukemic cells in culture or transplanted into immune-deficient mouse NOD/SCID (Chapter 4). WPC enriched with TGF- β and lactoferrin was donated by Hilmar Cheese Company (Cal, USA). Chapter 2 describes a randomized, double-blind, placebo controlled, prospective clinical trial of nutritional intervention with participation of 21 therapy-naïve patients with AML aged 0-19 years from Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP. Food intake, nutritional status, red blood cell glutathione (GSH) concentration, haemogram, cytokine concentration in plasma and cell cultures, salivary immunoglobulin A (IgA) and evolution of mucositis were studied. Healthy individuals at the same age range were used as a control group. The statistical analysis was done using SPSS software ($p < 0.05$). The research protocol was approved by the National Committee of Ethics in Research (CONEP), registered by the number 14097. WPC showed a positive effect in the nutritional status of the patients, but it did not influence their body composition. Percentual distribution of macronutrients was adequate in all times of analyses for both WPC and maltodextrin (placebo) groups, but the percentage of adequacy of the majority of micronutrients did not reach recommendation. Other laboratorial analyses and evolution of mucositis did not show any difference between WPC and placebo groups. Comparison of AML patients with a group of healthy control showed higher concentrations of albumin, prealbumin, haematocrit, hemoglobin, platelets, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine-stimulated tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) and interferon gamma (IFN- γ) and phytohemagglutinin (PHA)-stimulated IL-6 in controls. On the other hand, patients with AML had higher red blood cell glutathione concentration and spontaneous TNF- α and IFN- γ production in comparison to controls. Chapter 3 describes the experiments involved in the development of a chemotherapeutic-induced model of mucosites, in Wistar rats, in

which 5-Fluoruracila (5-FU) and Vincristine Sulfate (VS) were used, in various concentrations and number of doses. Through this experiment it was concluded that the VS was not a good promoter of mucositis in rats, unlike 5-FU. From these results, experiments were performed with 5-FU considering conditions of the experiments including the number, frequency and concentration of the doses of chemotherapeutic. The best model was obtained by the administration of 3 doses of 5-FU, each with a 3-days interval and concentrations in the range of 50 to 70 mg/Kg/dose. Haematological parameters and erythrocyte glutathione (GSH) were not influenced by pelletization of the diet and no difference was found between WPC and casein groups. Independent of the protein type (casein or WPC) the effect of 5-Fluoruracila was less deleterious when the diets were offered prior to the chemotherapeutic treatment. Contrary to expected, sheep red blood cells did not stimulate higher production of erythrocyte GSH by the WPC. WPC decreased mucositis intensity better than casein protecting the mucosa during the most critical periods (72h after 2nd and 3rd doses of 5-FU) in the intestinal regions of major prevalence of mucositis (duodenum and jejunum). More studies are required to support the WPC benefit in the protection and recovery of the mucosa GIT in experimental animal models, and possibly in humans. In chapter 4, cells originated from patients with Acute Lymphoid Leukemia (ALL) from Centro Infantil Boldrini were inoculated in NOD/SCID mice. The animals were fed with commercial diet or AIN-93G diet with WPC or casein as the only protein source and used the chemotherapeutic vincristine sulfate. Body weight, diet ingestion, ratio between organs (kidney, spleen and liver) and body weight, leukemia evolution, survival time, haemogram and glutathione levels were evaluated. The cell lineages K562 (Chronic Myeloid Leukemia), Nalm-6 (B cell, ALL), Jurkat (T cell, ALL), CEM (T cell, ALL), RAMOS (Burkitt's Lymphoma) and HL-60 (AML) were used for the in vitro assays, in which WPC cytotoxicity (IC₅₀), cell viability and glutathione levels were accessed in four different times (0, 24, 48 and 72h) and conditions (cells; cells + WPC; cells + WPC + ARA-C; cells + ARA-C). Data were submitted to statistic analysis by using the: Basic Statistics and Tables software. There was no differences between WPC and casein in relation to the parameters evaluated in vivo, with the exception of the analysis of Minimal Residual Disease (MRD), in

which casein seemed to be more effective than WPC. Results on body weight, ratio between organs and body weight and evaluation of leukemia were better for the WPC group when compared with animals fed commercial diet. No synergistic effect between the WPC and vincristine sulfate could be observed. In the in vitro experiments, WPC IC_{50} was 6,72 mg/mL for Nalm-6 and 11,84 mg/mL for CEM cells. K562, Nalm-6 and HL-60 cell lineages showed similar viability profiles. However, each lineage produced different total glutathione concentration in the culture medium, with a higher production achieved by HL-60 cells, followed by K562 cells.

CONCLUSÕES GERAIS

Suficientes detalhes dos resultados e conclusões para cada linha de pesquisa desenvolvida nesta tese aparecem no resumo geral. Cumpre-nos destacar algumas das conclusões que, em nossa opinião, contribuíram para uma melhor compreensão das propriedades nutritivas e funcionais das proteínas lácteas e seus efeitos positivos registrados no conjunto dos estudos desenvolvidos.

1) No estudo da suplementação dietética em pacientes com LMA durante os primeiros 60 dias do tratamento quimioterápico pode-se concluir: a) a suplementação com o concentrado proteico de soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina promoveu melhora significativa no estado nutricional (EN), evidenciada pelo desenvolvimento ponderal e medidas antropométricas, o que não se observou no grupo que recebeu maltodextrina (placebo); os inquéritos dietéticos revelaram deficiências: energéticas, no conteúdo de fibras e na maioria dos micronutrientes na dieta ingerida pelos pacientes com LMA; c) as demais variáveis estudadas: bioquímicas e avaliação clínica da mucosite oral não mostraram diferenças significativas entre os grupos WPC e placebo; d) adicionalmente, na comparação entre pacientes e controle saudável, evidenciou-se que a LMA promove, além do déficit imunológico uma profunda deficiência de plaquetas e dos elementos sanguíneos da série vermelha, sugerindo grande risco de anemia nesses pacientes.

2) O modelo de mucosite desenvolvido em ratos Wistar conduziu às seguintes conclusões importantes: a) o quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU) revelou-se bastante eficaz na promoção de mucosite em todo o trato gastrointestinal (TGI) do rato, particularmente no intestino delgado (duodeno e jejuno); b) as proteínas do soro de leite (WPC) mostraram-se mais eficientes que a caseína na atenuação da intensidade da mucosite gastrointestinal em algumas porções avaliadas e nos períodos mais críticos do desenvolvimento da mucosite (após a 2ª e a 3ª dose do quimioterápico); c) a utilização do WPC na dieta por um período prévio à

administração do quimioterápico influenciou positivamente na manutenção do peso dos animais; d) o estímulo imunológico via administração intraperitoneal de hemáceas de carneiro não influenciou os níveis de glutatona eritrocitária, em nenhuma das dietas proteicas (WPC ou caseína).

3) O modelo murino NOD/SCID inoculado com células humanas de leucemia linfóide aguda (LLA) permitiu as seguintes conclusões: a) nem o WPC nem a caseína foram capazes de inibir ou retardar o desenvolvimento de células blásticas no sangue periférico dos animais, sem diferença estatística entre essas proteínas; b) a análise da doença residual mínima (DRM), determinada pela contagem de células blásticas residuais na medula óssea, revelou maior eficácia da caseína que o WPC; c) não houve diferença na sobrevivência global dos animais nos grupos WPC e caseína. Nos experimentos *in vitro* com o WPC concluiu-se: d) na faixa de concentração de WPC utilizada (0,39 a 25mg/mL) em meio de cultura, o IC₅₀ pode ser determinado apenas para as linhagens Nalm-6 (6,72mg/mL) e CEM (11,84 mg/mL), o que indica baixa citotoxicidade do WPC para as linhagens celulares testadas; e) a linhagem HL-60 foi a que apresentou concentração celular mais elevada de glutatona total, seguida pela linhagem K562.

4) Com foco na mucosite avaliada nos pacientes com LMA e no modelo experimental em ratos, impõem destacar: nos pacientes avaliou-se apenas a mucosite oral através de observação macroscópica; o modelo animal permitiu estudar todo o trato gastrointestinal, não somente pela observação macroscópica, mas também pela análise histopatológica incluindo todas as porções gastrointestinais. Essa análise possibilitou demonstrar que a mucosite assumiu intensidades diferenciadas nas diversas regiões do TGI do rato, tendo sido mais prevalente e severa no intestino delgado, particularmente duodeno e jejuno, onde o efeito protetor do WPC se fez nitidamente presente.

5) É possível que a ausência de efeito positivo do WPC sobre a mucosite oral nos pacientes possa ser atribuída à avaliação restrita (apenas oral e macroscópica) e a baixa adesão à suplementação pelos pacientes, comparada com a realizada nos roedores envolvendo todo o TGI e técnica diagnóstica mais apurada.

INTRODUÇÃO

As leucemias constituem o tipo de câncer mais comum na faixa etária entre 0 a 18 anos, correspondendo a aproximadamente um terço de todas as neoplasias humanas (BRASIL, 2008).

Nas últimas 3 décadas houve avanço significativo no tratamento da maioria dos cânceres pediátricos, particularmente das leucemias linfocíticas. No caso das crianças e adolescentes portadores de leucemia mieloide aguda (LMA), o avanço foi sensivelmente menor (RIES *et al.*, 2006). Segundo Pui (1998) houve importante progresso no combate à toxicidade do tratamento, observando-se um decréscimo das taxas de óbito nas duas primeiras semanas de 5% a 10% na década de 70, chegando a 2% atualmente.

Dados do Centro Infantil Boldrini, registrados no período de 1999 a julho de 2009, revelaram que as taxas de sobrevida global e de sobrevida livre de eventos para pacientes com LMA atendidos na instituição foram de $43,1\% \pm 4,9\%$ (N = 122; vivos = 61) e de $34,9\% \pm 6,8\%$ (N = 120; remissão completa = 54), respectivamente.

As formas mais comuns de tratamento antineoplásico incluem quimioterapia, radioterapia e cirurgia (PENG *et al.*, 2005; SAVARESE *et al.*, 2003). O tratamento, assim como a própria doença, proporciona efeitos agressivos para o paciente, deixando o organismo vulnerável e conseqüentemente aumentando o risco de comprometimento nutricional. A desnutrição, quando presente, prejudica a resposta ao tratamento por agravar ainda mais o quadro clínico (VIANA *et al.*, 1994).

Adicionalmente, o tratamento quimioterápico resulta em toxicidade para o trato gastrointestinal, com o aparecimento de efeitos adversos como anorexia, náuseas, vômitos, mucosite, diarreia, xerostomia, entre outros. Como conseqüência a ingestão oral nesses pacientes é frequentemente insatisfatória e a intervenção nutricional através da orientação dietética e da prescrição de

suplementos é necessária, conforme preconiza a *American Society of Parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN, 2007).

Particularmente a mucosite pode afetar o sucesso da terapia antineoplásica, por limitar a capacidade dos pacientes em tolerar as doses farmacologicamente preconizadas de alguns medicamentos, e dessa forma acaba promovendo um impacto negativo sobre a saúde e a qualidade de vida dos pacientes (SONIS *et al.*, 2004; SQUIER, 1990; SONIS e CLARK, 1991).

Pesquisas com o objetivo de investigar a mucosite induzida por quimioterápicos têm sido instrumento para identificar os mecanismos moleculares da injúria da mucosa, ainda não completamente elucidados, sendo extremamente difíceis em estudos clínicos com humanos (GIBSON *et al.*, 2005). Dessa forma, estudos *in vivo* com animais têm implicações importantes para o desenvolvimento de um tratamento adequado para a mucosite gastrointestinal humana (LOGAN *et al.*, 2007).

A literatura relaciona o leite e seus compostos bioativos à inibição da progressão do câncer em grande número de estudos, principalmente, *in vivo* e *in vitro*. Artigos de revisão (SGARBIERI, 2004; MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 1999) detalham as diversas ações fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino, destacando-se como propriedades de interesse para a presente pesquisa: ação anticâncer e imunomoduladora, através dos mecanismos de imunoestimulação da síntese de glutatona, de linfócitos, linfocinas e imunoglobulinas, inibidor de espécies reativas do oxigênio (ERO), proteção do material genético (DNA); proteção da mucosa gastrointestinal através do estímulo à síntese de prostaglandinas (PGE₂, PGI₂), da formação de muco e inibição de gastrina; ação redutora; ações antimicrobiana e antiviral.

Dificuldades foram enfrentadas no desenvolvimento da pesquisa clínica com suplementação nutricional oral, acarretando uma baixa adesão dos pacientes em decorrência dos efeitos adversos promovidos pelo tratamento quimioterápico.

Entretanto, mesmo antes da execução da pesquisa, já haviam sido encontradas dificuldades em relação ao tempo para a aprovação do projeto pelo comitê de ética do CEP Boldrini para posterior análise do CONEP, bem como, a demora na liberação da alfândega brasileira para o recebimento do concentrado de proteínas do soro de leite, doado pela empresa Hilmar Cheese Company, California, USA.

Problemas dessa natureza reduziram o tempo de coleta de dados da pesquisa, o que se somou ao agravante do baixo número de pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia mieloide aguda, que é uma patologia predominante em adultos, além do elevado número de óbitos.

Diante do exposto, os autores da presente pesquisa resolveram trabalhar paralelamente em estudos alternativos, a saber: estudos *in vivo* com ratos Wistar para o desenvolvimento de um protocolo de indução de mucosite, bem como, para posterior análise das propriedades funcionais de proteção da mucosa gastrointestinal pelas proteínas lácteas; *in vitro* com células leucêmicas e *in vivo* em modelos de camundongos imunodeficientes NOD/SCID, em que não somente as proteínas do soro, mas também as caseínas foram testadas.

Optou-se por apresentar a tese em quatro capítulos: o Capítulo 1, apresenta uma revisão sucinta da literatura sobre alimentos funcionais e imunonutrição, destacando-se as propriedades fisiológicas anticâncer, imunomoduladora, antimicrobiana e de proteção à mucosa das proteínas do soro do leite, câncer, particularmente as leucemias, seu tratamento e efeitos adversos do mesmo, com destaque para a mucosite. No Capítulo 2 foi realizado o estudo da suplementação com proteínas do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina, em pacientes pediátricos com LMA nos primeiros 60 dias do tratamento quimioterápico. O capítulo 3 refere-se ao desenvolvimento de um modelo de indução de mucosite gastrointestinal por quimioterápicos, em ratos Wistar, e avaliação da eficácia de um concentrado de soro de leite bovino (WPC-TGF β) e de uma caseína comercial, na proteção da mucosa. No capítulo 4 avaliou-se, *in vivo* e *in vitro*, os efeitos do WPC e da caseína sobre células

leucêmicas humanas transplantadas em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e em cultura de células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION. **The A.S.P.E.N. Nutrition support core curriculum: a case-based approach – the adult patient**. 2.ed. USA: Managing, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p. 53/p.21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 4, n.4, p. 188-195, mar. 2005.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.J.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 33, n. 5, p. 448-460, aug. 2007.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, Saindpoint, v.9, n.2, p.136-56, jun. 2004.

PENG, C.T.; WU, K.H.; LAN, S.J.; TSAI, J.P.; TSAI, F.J.; TSAI, C.H. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing chemotherapy. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1158-1163, may. 2005.

PUI, C.H. Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 292-301, jul. 1998.

RIES, L.A.G.; EISNER, M.P.; KOSARY, C.L.; HANKEY, B.F.; MILLER, B.A.; CLEGG, L.; EDWARDS, B.K. **SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999**. Bethesda: National Cancer Institute. Disponível em: <http://www.seer.cancer.gov/csr/>. Acesso em: 08 abr 2006.

SAVARESE, D.M.F.; SAVY, G.; VAHDAT, L.; WISCHMEYER, P.E.; COREY, B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. **Cancer Treatment Reviews**, Netherlands, v. 29, n. 6, p. 501-13, dec. 2003.

SGARBIERI, V.C. The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an overview). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 51, n.2, p. 104-21, mar./abr.1999.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.4, p. 397-409, oct./dec. 2004.

SONIS, S.; CLARK, J. Prevention and management of oral mucosites induced by antineoplastic therapy. **Oncology**, Basel, v. 5, n. 12, p. 11-18, dec. 1991.

SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B.N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives in cancer therapy induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, Philadelphia, v.100, n.9, S1995-2025, may. 2004.

SQUIER, C.A. Oral complications of cancer therapies: Mucosal alterations. **NCI monographs / National Cancer Institute**, Bethesda, v. 9, p. 169-72, 1990.

VIANA, M.B.; MURAO, M.; RAMOS, G.; OLIVEIRA, H.M.; DE CARVALHO, R.I.; DE BASTOS, M.; COLOSIMO, E.A.; SILVESTRINI, W.S. Malnutrition as a prognostic factor in lymphoblastic leukaemia: a multivariate analysis. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 71, n. 4, p. 304 –310, oct. 1994.

CAPÍTULO 1

“Revisão de Literatura”

1. ALIMENTOS FUNCIONAIS E IMUNONUTRIÇÃO

Atualmente, a preocupação com a alimentação e a saúde, bem como suas interações, tem aumentado em nossa sociedade. O consumidor tem mostrado cada vez maior preferência por alimentos que possam trazer algum benefício adicional em relação ao produto tradicionalmente comercializado (BELLO, 1995).

O termo alimento funcional foi utilizado pela 1ª vez no Japão na década de 80, para alimentos fortificados com constituintes especiais que apresentavam efeitos fisiológicos saudáveis diferenciados. Em 1984 cientistas japoneses estudaram a relação entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação do sistema fisiológico. Em 1991, o ministro da saúde do Japão introduziu uma norma para aprovação de uma categoria de alimentos relacionada especificamente a saúde denominados FOSHU (*Food for Special Health Uses*) (ROBERFROID, 2000).

Um alimento pode ser considerado funcional por interferir, de maneira satisfatória, benéficamente em, pelo menos, uma função fisiológica, contribuindo para o bem estar, saúde ou redução de risco de doenças (ROBERFROID, 2002).

Para Neumann *et al.* (2000), alimento funcional é todo alimento ou constituintes de alimentos e bebidas que ofereçam efeito saudável, além de seu valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel vantajoso na diminuição de riscos e tratamento de doenças.

A modulação do sistema imune através da ingestão de alimentos funcionais é uma estratégia atrativa e não invasiva de otimizar a imunidade e melhorar a saúde. Tem se verificado que vários tipos de dietas e suplementos são capazes de modular as funções imunológicas, e seus componentes bioativos têm sido

propostos para constituir a base de produtos alimentares funcionais imunomoduladores (MORENO, 2007).

Vários estudos com animais e humanos têm demonstrado que os nutrientes requeridos para o funcionamento eficiente do sistema imunológico incluem aminoácidos essenciais, ácido graxo ômega-3, vitaminas (A, E, C, B₆, B₁₂ e ácido fólico) e minerais (Zn, Cu, Fe e Se) (CALDER e KEW, 2002). Adicionalmente López-Varela, González-Gross e Marcos (2002) acrescentaram os pré-bióticos e probióticos à lista de nutrientes imunomoduladores. Esses mesmos autores enfatizaram que o consumo de alimentos funcionais pode reduzir o risco de várias doenças crônicas, como as cardiovasculares, câncer, diabetes, hipertensão e osteoporose.

Abordagem posterior para os alimentos funcionais diz respeito ao estudo da nutrigenômica, através de informações das interações gene-dieta que possibilitam selecionar alimentos/nutrientes que promovam uma ótima saúde ou reduza o risco de doenças crônicas (FERGUSON, 2009).

Vários compêndios foram editados e publicados nas últimas 2 décadas, contendo artigos de revisões sobre o leite e outros alimentos funcionais que resumem, em boa parte, os conhecimentos científicos e tecnológicos desenvolvidos nesta nova área da alimentação e nutrição humana (GOLDBERG, 1994; MAZZA, 1998; BOSCOE e LISTOW, 2008; ANTUNES E PACHEO, 2009).

No presente capítulo serão abordadas prioritariamente algumas propriedades funcionais das proteínas do soro de leite bovino, descritas na literatura recente como capazes de combater neoplasias e efeitos colaterais dos tratamentos radioterápicos e/ou quimioterápicos, particularmente sobre a mucosa oral e gastrointestinal, as mucosites.

1.1. Leite bovino

O leite é o produto da secreção das glândulas mamárias, constituído por uma fase dispersante e outra dispersa (glóbulos de gordura e micelas de caseína),

formando uma emulsão natural estável em condições normais de temperatura ou refrigeração (SGARBIERI, 1996). Devido a sua composição, apresenta elevado valor nutricional, sendo extremamente importante para a nutrição, crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos (PLAYFORD, MAcDONALD e JOHNSON, 2000).

1.1.1. Componentes

De acordo com Steijns (2001) o leite apresenta os seguintes componentes bioativos: caseínas, proteínas do soro de leite, imunoglobulinas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, lipídios (esfingolipídios, ácido linoleico conjugado), lactose, cálcio e vitaminas (D, B₆ e B₁₂).

O leite bovino é composto principalmente por água (88%). Dentre os macronutrientes 4,9% corresponde a carboidrato (lactose); 3,8% a lipídios e 3,3% a proteínas. Em relação ao conteúdo protéico, cerca de 80% é representado por caseínas, 19% por proteínas do soro de leite e 1% por proteínas constituintes das membranas dos glóbulos de gordura (SGARBIERI, ZIEGLER e CASTRO, 2009).

De acordo com Eigel *et al.* (1984), as proteínas do soro são universalmente definidas como as proteínas que permanecem na fração líquida do leite após a coagulação da caseína em pH 4,6 a 20 °C, durante a fabricação de queijos. Segundo Zinsly *et al.* (2001) o soro de leite pode ser obtido através de 3 processos, a saber:

- Coagulação enzimática: utiliza a enzima quimosina (renina) obtendo-se o coágulo de caseína e o soro doce;
- Precipitação ácida no pH do ponto isoelétrico (pI): obtém-se caseinatos e soro ácido;
- Separação física das micelas de caseína por microfiltração: obtém-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, como concentrados ou isolados protéicos.

O emprego de tecnologias de membranas (ultrafiltração/diafiltração) permite a obtenção de concentrados e isolados protéicos, sem que ocorra desnaturação e consequente perda das propriedades funcionais fisiológicas (MAUBOIS e OLIVIER, 1997). A indústria tem dispendido grande esforço no decorrer dos últimos 30 anos para desenvolver processos em escala comercial para a produção de concentrados de proteína do soro (WPC) e isolado de proteína do soro (WPI), altamente funcionais, adequados para o uso em alimentos e ingredientes alimentícios. A diferença entre ambos está na composição, sendo que o WPI contém uma maior concentração de proteínas (> 90%) e, proporcionalmente, menor quantidade de lactose e minerais que o WPC, o qual poderá conter entre 25 e 80% de proteínas (FOEGEDING *et al.*, 2002).

As principais proteínas do soro de leite bovino são a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro bovino, lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidase (IMAFIDON, FARKYE e SPANIER, 1997; MLEKO e GUSTAW, 2002; MARSHALL, 2004). Também possui o glicomacropéptido e fatores de crescimento que podem afetar o sistema imune (MERCIER, GAUTHIER e FLISS, 2004). As principais características dessas proteínas e suas funções fisiológicas estão descritas na Tabela 1.

Segundo Playford, MacDonald e Johnson (2000), dentre os fatores de crescimento, o TGF- β está presente em altas concentrações tanto no colostro (20 - 40 mg/L) como no leite bovino (1 - 2 mg/L). Esses autores reportaram que fatores de crescimento derivados do leite podem ser úteis para o tratamento de uma variedade de condições gastrointestinais, incluindo doença inflamatória intestinal, injúria intestinal induzida por antiinflamatórios não esteroidais, mucosite induzida por quimioterápicos, síndrome do intestino curto, diarreia infecciosa, entre outras.

As proteínas do leite e do soro são completas quanto sua composição aminoacídica e de elevado valor nutricional. Elas contêm em quantidades variáveis e na proporção correta todos os aminoácidos que o organismo humano necessita. É importante destacar que as mesmas possuem um excedente de aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina e isoleucina (SLOAN,

2002). Destacam-se também pela excelente digestibilidade e por serem completamente biodisponíveis.

TABELA 1. Proteínas do soro de leite bovino e principais funções fisiológicas.

Proteínas	Peso molecular (kDa)	Quantidade (%)	Função fisiológica
α -lactalbumina	14,1	20-25	Fonte de AA essenciais e de cadeia ramificada, imunomodulação, ação anticâncer
β -lactoglobulina	18,3	50-55	Fonte de AA essenciais e de cadeia ramificada, antioxidante
BSA	66,2	5-10	Fonte de AA essenciais, transporte de nutrientes
Lactoperoxidase	77	0,5	Ação antimicrobiana
Lactoferrina	80	1-2	Ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anticâncer, imunomoduladora e absorção de Fe
Imunoglobulinas	160 a 900	10-15	Proteção imunológica
GMP		10-15	Fonte de AA de cadeia ramificada, ação antimicrobiana e antiviral

Adaptado de SHAH (2000); MARSHALL (2004). BSA = Albumina do soro bovino; GMP = glicomacropéptido.

Estudos demonstraram que o WPI e o WPC apresentam como propriedades nutricionais e tecnológicas um excelente conteúdo de aminoácidos essenciais, elevada digestibilidade, boa solubilidade, capacidade emulsificante, geleificante e de retenção de água, adequada viscosidade e adesividade, além da habilidade de formação de espuma (HUFFMAN, 1996).

Cabe ressaltar, que as proteínas do soro de leite bovino apresentam além das propriedades acima descritas, relevantes propriedades funcionais fisiológicas. Essas propriedades podem influenciar o metabolismo e o sistema imunológico,

proporcionando ao indivíduo maior eficiência metabólica sendo sua utilização de grande interesse por pacientes portadores de vários tipos de câncer.

1.1.2. Propriedades funcionais fisiológicas

Anticâncer

As teorias para explicar a origem do câncer levam em consideração fatores multifatoriais incluindo fatores genéticos e ambientais, dentre os quais a alimentação desempenha papel preponderante (SGARBIERI, 1999).

Bounous (2000) discute o papel do WPC no tratamento de câncer através do seu potencial antitumoral. Conforme esse autor, os aminoácidos precursores da glutatona disponíveis no soro de leite podem em 1º lugar aumentar a concentração de glutatona em tecidos relevantes, em 2º estimular o sistema imune e em 3º desintoxicar carcinógenos potenciais.

Em trabalho de revisão Parodi (2007) também discute a importância da glutatona na carcinogênese, o autor destaca as seguintes ações:

- Potente antioxidante celular: atuando diretamente ou através da enzima glutatona peroxidase dependente de selênio participa da destruição de espécies reativas do oxigênio, responsáveis pela oxidação de lipídios, proteínas e DNA;
- Desintoxicante: atuando diretamente ou enzimaticamente em reações catalizadas pela glutatona-S-transferase participa da desintoxicação de xenobióticos, carcinógenos e seus metabólitos;
- Agente redutor: mantém os grupos sulfidrila das proteínas e o ácido ascórbico (importante antioxidante) no estado reduzido.

As reações descritas acima ocasionam a oxidação da glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), a qual pode ser reduzida intracelularmente formando GSH bioativa através da ação de glutatona redutase. É fundamental a manutenção de altas taxas GSH:GSSG para o eficiente funcionamento de vias dependentes de GSH.

Um estudo, utilizando um modelo com ratos, investigou a capacidade de várias fontes proteicas dietéticas comuns (proteínas do soro de leite bovino, caseína, carne e soja) no retardamento ou inibição do desenvolvimento de câncer de cólon. Os animais receberam injeções subcutâneas do carcinógeno dimetilhidrazina. Os resultados mostraram que as proteínas do soro de leite bovino retardaram significativamente o desenvolvimento de câncer de cólon quando comparadas com as demais proteínas testadas. Somente 30% dos animais desse grupo desenvolveram tumores, comparado com 55% nos animais que receberam dieta com proteínas da carne e 60% nos que receberam proteína de soja (REGESTER *et al.*, 1996). Dias *et al.* (2006) comprovaram a capacidade do WPC em inibir a formação de criptas aberrantes e o desenvolvimento de tumores de cólon induzido por azoximetano, em ratos.

Pesquisas *in vitro* mostraram que o isolado de proteínas do soro de leite bovino (WPI), quando comparado com a caseína, aumentou a síntese de glutathione e protegeu as células da próstata em humanos contra oxidantes que induzem a morte celular (KENT, HARPER e BOMSER, 2003). Em outro trabalho *in vitro* a albumina do soro bovino inibiu o crescimento de células cancerígenas de mama humana (LAURSEN, BRIAND e LYKKESFELDT, 1990).

Hipótese encontrada na literatura, ainda não totalmente comprovada, sugere que em modelos animais e *in vitro* as células cancerígenas armazenariam grande quantidade de glutathione (GSH), como mecanismo de sua própria defesa, e que em presença de proteínas do soro de leite poderiam perder GSH tornando-se, como consequência, menos resistentes à ação de quimioterápicos (RUSSO *et al.*, 1986; BARUCHEL e VIAUX, 1996). Esse possível efeito “sinérgico” entre proteínas do soro de leite e quimioterápicos poderia aumentar a eficácia do tratamento.

Modelos animais, usualmente de tumorigênese de mama e cólon, mostraram, em sua maior parte, a superioridade das proteínas do soro de leite bovino em relação a outras fontes proteicas na supressão do desenvolvimento de tumores. Sua ação é atribuída ao alto teor de cistina/cisteína e do dipeptídeo γ -

glutamilcisteína, os quais são substratos eficientes para a síntese de glutatona, importante antioxidante celular e imunomodulador (CASTRO, SGARBIERI e ZIEGLER, 2009).

Segundo Parodi (2007) as proteínas do soro de leite bovino com potente ação anticâncer são: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro bovina (BSA) e lactoferrina. Entre as propriedades da lactoferrina destacam-se indução de apoptose, inibição da angiogênese e modulação de carginógenos através da metabolização de enzimas e ligação ao ferro.

A ação antitumoral das proteínas do soro de leite ocorre através dos mecanismos de imunoestimulação da síntese de glutatona, de linfócitos, linfocinas e imunoglobulinas, inibição de espécies reativas do oxigênio (ERO), proteção do material genético (DNA) através de formação de complexos com substâncias tóxicas como aflatoxinas, amins poliaromáticas e outras, com substâncias procarcinogênicas tais como 1,2-dimetilhidrazina, 7,12-dimetilbenzantraceno, compostos nitrosados e, através da metilação de sítios específicos do DNA e sua consequente estabilização (SGARBIERI, 1999; SGARBIERI, 2004; MARSHALL, 2004).

Além dos estudos descritos anteriormente, a ação antitumoral das proteínas do soro de leite bovino também foi demonstrada *in vitro*: células B16F10 de melanoma murino (HAKANSON *et al.*, 1995), ação apoptótica sobre vários tipos de células cancerígenas (SVENSSON, 2000), apoptose em células de leucemia humana (ROY *et al.*, 2002), inibição de metástase de células B16F10 de melanoma murino (BEZAULT *et al.*, 1994), inibição de cirrose e carcinoma hepatocelular pelo vírus da hepatite C - HCV (IKEDA *et al.*, 1998); *in vivo*, em animais (BOUNOUS *et al.*, 1988; PARKER e GOODRUM, 1990; BOUNOUS, BATIST e GOLD, 1991; McINTOSH *et al.*, 1995; McINTOSH *et al.*, 1998; McINTOSH e LE LEU, 2001) e em humanos, submetidos à cirurgia de câncer da cabeça e pescoço (CHMIEL, 1997), vírus HCV (TSUDA *et al.*, 2002), carcinoma metastático de mama, pâncreas e fígado (KENNEDY *et al.*, 1995), papiloma de

pele (GUSTAFSSON *et al.*, 2004) e glioblastoma humano transplantado para ratos (FISCHER *et al.*, 2004).

Imunomoduladora

De acordo Brink (1996), confirmado por Sgarbieri, Ziegler e Castro (2009), as proteínas do soro de leite são capazes de elevar os níveis de glutathione celular, sendo a glutathione um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, atuando como um potente agente imunomodulador.

Essas proteínas parecem proteger o organismo através de dois mecanismos gerais principais: 1) modulação da resposta imune, aparentemente através do aumento da concentração de glutathione nos tecidos; 2) promoção da metilação do DNA através do metabolismo do dipeptídeo cisteína-metionina (McINTOSH *et al.*, 1998). O 1º mecanismo é evidenciado pelo estímulo à proliferação de linfócitos, da fagocitose, de células natural *killer*, da atividade de linfócitos T auxiliares (helper) e linfócitos T citotóxicos (PARODI, 2007).

Estudo realizado por Dias *et al.* (2006) confirmou a propriedade do WPC e seus hidrolisados enzimáticos de estimularem a síntese de glutathione em vários órgãos de ratos e camundongos, bem como, estimularem a produção de anticorpos (IgM) em camundongos após desafio com hemácias de carneiro (SRBC).

As proteínas do soro do leite em sua forma de concentrado (WPC) ou de hidrolisado revelaram um maior efeito estimulatório do sistema imune que a caseína. Uma alta correlação foi verificada entre a resposta de estímulo do sistema imune de células do baço e a concentração de glutathione no tecido hepático. O WPC apresenta uma série de propriedades fisiológicas relacionadas ao estímulo do sistema imune, as quais podem ser benéficas para pessoas com síndromes de deficiência imune, doenças infecciosas e doenças neurodegenerativas (SGARBIERI *et al.*, 2000).

A redução dos níveis de glutathione está associada com a diminuição da resposta imune. A glutathione intracelular está diretamente relacionada à habilidade dos linfócitos em responder a estímulos imunogênicos em animais. A resposta imune humoral, envolvida na produção de anticorpos, requer rápida síntese de proteínas que, por sua vez, requer uma adequada ingestão dietética de aminoácidos essenciais encontrados em proteínas como as do soro de leite (BOUNOUS e GOLD, 1991).

Há poucos estudos clínicos que demonstram a ação das proteínas do soro de leite sobre o sistema imune. Um concentrado de proteínas do soro de leite (20g/dia) foi ingerido durante 3 meses, por adultos jovens com fibrose cística, resultando em aumento de 46,6% nos níveis de glutathione linfocitária (GREY *et al.*, 2003). Em adultos infectados pelo HIV-1 a ingestão de concentrado de proteínas de soro de leite (45 g/dia) aumentou significativamente a glutathione plasmática em 15 dias e esse efeito se manteve após 6 meses de ingestão (MICKE *et al.*, 2001).

O poder imunoestimulatório das proteínas do soro de leite bovino também foi testado em crianças portadoras do vírus HIV em um estudo duplo-cego prospectivo. As crianças receberam suplementação com WPC ou maltodextrina (placebo) por 4 meses. Os autores observaram aumento nos níveis de linfócitos T CD4⁺ e de glutathione eritrocitária com diminuição da ocorrência de episódios infecciosos no grupo que recebeu o concentrado de proteínas do soro de leite bovino (MORENO *et al.*, 2006).

Pesquisadores avaliaram os efeitos de diferentes fontes proteicas dietéticas (caseína, proteínas da soja e isolado proteico do soro de leite - WPI) na modulação do colesterol oxidado, observando as mudanças no metabolismo dos lipídios e na função imune em ratos jovens (4 semanas) e ratos adultos (8 meses). Os autores concluíram que o WPI pode amenizar alterações na função imune ocasionadas pela oxidação do colesterol em ambos os casos (MINEHIRA *et al.*, 2000).

Muitos estudos em modelos animais, também têm evidenciado o papel imunestimulatório de proteínas específicas presentes no soro de leite bovino, dentre elas destacam-se a lactoferrina e a β -lactoglobulina (TSUDA *et al.*, 1998; YOO *et al.*, 1998). Sgarbieri (2004) também destaca a ação imunestimulatória das imunoglobulinas, lactoperoxidase e do glicomacropéptido.

Por outro lado, o fator de crescimento e transformação β (TGF- β) apresenta importante função imunossupressora, fundamental para a manutenção da homeostase do sistema imune. O TGF- β inibe a proliferação de células T, assim como, bloqueia a diferenciação de células T CD4⁺ e CD8⁺ *naive* em células T efetoras, podendo suprimir a imunidade através da via das células T regulatórias (BECKER, FANTINI e NEURATH, 2006). A inadequada sinalização do TGF- β em relação às células T tem apresentado implicações na patogênese de algumas doenças, como a doença inflamatória intestinal (MONTELEONE, PALLONE e MACDONALD, 2004) e o câncer (DERYNCK, AKHURST e BALMAIN, 2001).

Antimicrobiana e antiviral

Segundo Sgarbieri (2004) as proteínas do soro do leite que apresentam atividade antimicrobiana e antiviral evidenciada por *estudos in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos são: lactoferrina e seu peptídeo lactoferricina, lactoperoxidase, α -lactalbumina e imunoglobulinas.

De acordo com Shah (2000) o mecanismo de ação antimicrobiana da lactoferrina se deve à sua capacidade de quelar ferro, tornando-o indisponível para os microorganismos que necessitam desse nutriente para sua proliferação. Além disso, a lactoferrina tem capacidade de romper a membrana externa de bactérias gram-negativas agindo sobre seu componente lipopolissacarídeo, exercendo ação antibiótica (TOMITA *et al.*, 2002).

A lactoferricina, peptídeo formado através da hidrólise da lactoferrina pela ação da pepsina apresentou, além de atividade bactericida, propriedade antifúngica em relação a *Candida albicans* (JONES *et al.*, 1994).

Artigos de revisão relataram que a lactoperoxidase apresenta propriedade bactericida através da oxidação de tiocianatos e a α -lactalbumina atua como antimicrobiana através da ligação com metais pesados, dentre eles o ferro (MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2004).

A α -lactalbumina é uma proteína que contém cálcio ligado de forma reversível, o qual é liberado em condições de acidez (pH abaixo de 4), mudando sua conformação e formando oligômeros que na presença de um ácido graxo monoinsaturado adquirem propriedades antibióticas e apoptóticas. Essa transformação estrutural e de bioatividade ocorre tanto com a α -lactalbumina humana como com a bovina (SVENSSON *et al.*, 2000).

Proteção da mucosa gastrointestinal

A ação protetora da mucosa gástrica, por vários preparados de proteína do soro de leite, também tem sido demonstrada. Em estudos com ratos, Rosaneli e colaboradores pesquisaram o efeito inibidor do WPC e seus hidrolisados sobre a ação ulcerogênica do etanol e da indometacina (anti-inflamatório não esteroideal). Os autores concluíram que houve proteção da mucosa estomacal através da inibição de lesões ulcerativas entre 50 a 80% em relação ao grupo controle negativo que recebeu salina (ROSANELI *et al.*, 2002; ROSANELI *et al.*, 2004).

Outros estudos revelaram que a α -lactalbumina é a proteína do soro de leite que apresenta proteção da mucosa gástrica contra ulcerações, o que não foi verificado para a β -lactoglobulina em modelos animais com ratos (USHIDA *et al.*, 2003; MEZZARROBA *et al.*, 2006).

Os mecanismos sugeridos para a proteção da mucosa gastrointestinal ocorrem através do estímulo à síntese de prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2), da formação de muco, inibição de gastrina, ação redutora, ações antiviral e antibacteriana (SGARBIERI, 1999; SGARBIERI, 2004; MARSHALL, 2004).

Estudo em modelo com hamsters (CLARKE *et al.*, 2002) demonstrou que frações do soro de leite bovino protegeram a mucosa oral dos animais por prevenir o desenvolvimento de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-fluoruracila.

O fator de crescimento e transformação β (TGF- β) apresenta ação inibitória sobre a proliferação celular estando associado com a manutenção da integridade do epitélio do trato gastrointestinal e também ajudando no seu reparo após injúrias (PLAYFORD, MACDONALD e JOHNSON, 2000).

Diante do exposto, verifica-se que a literatura relaciona benefícios do leite e seus componentes bioativos contra o câncer em grande número de estudos *in vitro* e *in vivo*. Porém os resultados de estudos epidemiológicos com humanos ainda são limitados e inconclusivos. Portanto, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de ação no organismo humano, bem como, a quantidade que deve ser ingerida desses componentes bioativos para promover efeitos benéficos devem ser realizados.

2. CÂNCER

O câncer está entre as doenças crônicas não hereditárias de maior prevalência, na faixa etária de 0-18 anos, nos países industrializados e em países em vias de industrialização. É uma doença influenciada por inúmeros fatores que podem ser de origem genética ou ambiental. Embora os avanços das ciências biológicas, da física e da medicina tenham permitido aumentar o índice de sobrevivência dos pacientes com vários tipos de câncer, o número de novos casos e de mortalidade pela doença parece não ter diminuído proporcionalmente (JEMAL *et al.*, 2003). Trata-se de uma doença que se instala em qualquer idade podendo, entretanto, nos adultos, demorar vários anos para o seu diagnóstico e manifestação clínica.

2.1. Câncer Pediátrico: Leucemias Agudas

O câncer é uma das mais importantes causas de morte na faixa etária pediátrica (0 a 18 anos). Os tipos mais comuns de câncer, nesta faixa etária são:

as leucemias, particularmente a leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), tumores do sistema nervoso central (SNC), linfomas, neuroblastomas, tumor de Wilms, osteossarcoma, sarcoma de Ewing e outros. Dos casos de LLA, 80% ocorrem em crianças e, apenas 10% dos casos de LMA ocorrem nessa faixa etária. No Brasil tem-se verificado discreto aumento do câncer pediátrico (BRASIL, 2008).

De acordo com Viana *et al.* (2003) a LMA em crianças é uma doença pouco estudada, principalmente em nosso país. A maioria dos trabalhos publicados refere-se a estudos em adultos.

As leucemias são o resultado da transformação neoplásica da célula progenitora hematopoiética multipotente caracterizada pela proliferação de blastos anormais com prejuízo na produção de células normais. A LMA é caracterizada pela proliferação de mieloblastos anormais (CHAUFFAILLE e CAMPOS, 2005).

Segundo Casciato (2008) as células leucêmicas normalmente replicam-se mais lentamente que as suas correspondentes normais. A hematopoiese é anormal até mesmo antes da proporção de células blásticas na medula apresentar um aumento perceptível. Os precursores de leucócitos imaturos e com mau funcionamento substituem progressivamente a medula óssea e infiltram outros tecidos.

A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), segundo Harris *et al.* (1999), considera critério diagnóstico a infiltração da medula óssea por 20% ou mais de mieloblastos (Tabela 2), passando a considerar também os aspectos genéticos e moleculares, além da história prévia de mielodisplasia.

TABELA 2. Classificação da Leucemia Mieloide Aguda.

Tipo	Descrição	Frequência (%)	Prognóstico
M0	Minimamente diferenciada	< 5	Desfavorável
M1	Sem maturação	20	Desfavorável
M2	Com maturação	30	Bom
M3	Promielocítica e variação microgranular	8	Bom
M4	Mielomonocítica	28	Bom
	Monocítica		
M5	a- sem maturação b- com maturação	10	Desfavorável
M6	Eritroleucemia	4	Desfavorável
M7	Megacarioblástica	< 5	Desfavorável

Fonte: HARRIS *et al.* (1999).

2.2. Tratamento do Câncer

Nas últimas 3 décadas houve avanço significativo no tratamento da maioria dos cânceres pediátricos, particularmente para as leucemias linfocíticas. Entre 1974 e 1999 a sobrevida livre de doença em 5 anos, para indivíduos na faixa etária até 20 anos submetidos a tratamentos para diferentes tipos de câncer, aumentou de 56 para 77%. Espera-se que em 2010 essa porcentagem tenha se elevado para 85% (RIES *et al.*, 2006). Viana *et al.* (2003) em estudo com 83 crianças com LMA aos cinco anos de seguimento verificaram que as probabilidades estimadas de sobrevida global, de remissão completa e de sobrevida livre de eventos foram de 31,1% ± 5,4%, 49,6% ± 7,4% e 30,5% ± 5,3%, respectivamente.

Os tratamentos das leucemias e de outros tipos de câncer pediátrico envolvem o emprego de quimioterápicos, cirurgia (transplante) e da radioterapia (PENG *et al.*, 2005; SAVARESE *et al.*, 2003). Estes que se acompanham de efeitos colaterais, comprometendo não somente a qualidade de vida, mas

podendo até levar o paciente ao óbito (BELFIELD e DWYER, 2004; SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004).

O tratamento quimioterápico da LMA inclui, sucintamente, uma fase de indução da remissão da medula, seguida da consolidação da remissão, e em alguns protocolos uma fase de manutenção quimioterápica. A fase de indução da remissão tem como objetivos tornar o paciente assintomático e reduzir a porcentagem de blastos mieloides a menos de 5% do total das células nucleadas no esfregaço de medula óssea (VIANA *et al.*, 2003).

Aproximadamente 2/3 dos pacientes portadores de LMA conseguem uma remissão completa (RC) atingindo uma sobrevida média entre 12 a 24 meses. Dentre esses pacientes 20% sobrevivem por 5 anos ou mais, inclusive podendo obter a cura. A remissão completa é um fator prognóstico importante em todas as formas da leucemia aguda, sendo definida, de acordo com Casciato (2008), quando todos os critérios seguintes forem satisfeitos:

- Medula óssea contendo < 2% de blastos;
- Contagens de eritrócitos, granulócitos e plaquetas retornarem ao normal;
- Organomegalia é resolvida;
- Estado de desempenho tendo retornado ao normal.

O tratamento de suporte consiste na administração de concentrados de eritrócitos para corrigir a anemia; transfusão de plaquetas, quando a contagem for menor que 10 mil/mm³ em pacientes estáveis ou menor que 50 mil/mm³ em pacientes com sangramento e, antibioticoterapia. No período de granulocitopenia há um alto risco de infecção bacteriana, necessitando de vigilância constante e pronta ação a qualquer processo febril para evitar septicemia (CHAUFFAILLE e CAMPOS, 2005).

As terapias convencionais utilizadas no tratamento do câncer até o presente parecem ter atingido um patamar de sucesso, embora ainda ocorra elevada porcentagem de ocorrências que resultam em óbito (LUPULESCU, 2001). Sugerem-se, como terapias alternativas ou auxiliares, estratégias que envolvam

conhecimento do metabolismo das células cancerosas como, terapias envolvendo citocinas incluindo fatores de crescimento e seus inibidores, interferons, terapias de diferenciação celular, vitaminas e seus análogos sintéticos, terapia genômica, metabolismo de transcrição, terapia antiangiogênese e antimetastática (LUPULESCU, 2001).

2.3. Efeitos Adversos do Tratamento

Quimioterapia e radioterapia, embora efetivas no tratamento de neoplasias, podem causar danos a tecidos normais que apresentam rápida divisão celular. Em função da alta taxa de renovação celular, as mucosas do trato gastrointestinal tornam-se especialmente susceptíveis aos efeitos da quimioterapia e radioterapia. Os níveis de toxicidade da terapia oncológica podem levar à suspensão do tratamento, até que as complicações sejam resolvidas (SQUIER, 1990).

Clinicamente, os efeitos da toxicidade da quimioterapia sobre a mucosa gastrointestinal atingem seu pico de intensidade entre o 7º e o 10º dias após o início do ciclo, com resolução espontânea do quadro ocorrendo em menos de duas semanas (SONIS e CLARK, 1991).

Mucosite

A mucosite afeta os tecidos que compõe o epitélio e a submucosa gastrointestinal. A identificação de eventos moleculares que certamente devem ocorrer nas lesões da mucosa oferece alternativas de intervenções para a prevenção e o tratamento das mucosites (SONIS *et al.*, 2004).

Os pacientes podem apresentar intensa dor, náuseas, gastro-enterites, diminuição da ingestão alimentar, tornando-os altamente susceptíveis à infecção. Inflamação severa, lesões e ulcerações também podem ocorrer (DUNCAN e GRANT, 2003).

A ação dos agentes citotóxicos, que leva ao “rompimento” das barreiras mucosas, comprometem sua capacidade de impedir a entrada para a circulação

de patógenos como vírus, bactérias e fungos. Dentre os agentes infecciosos mais frequentes estão o vírus Herpes Simples-1 (HSV-1), bacilos gram-negativos e *Streptococcus alpha-hemolíticos* (ROLSTON e RUBENSTEIN, 2001). Dentre os fungos, merece destaque as infecções por *Candida albicans*.

Durante as fases iniciais da mucosite, um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, particularmente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina-6 (IL-6), tem sido observado no plasma sanguíneo e/ou mucosa de pacientes e animais sujeitos à toxicidade não hematológica, incluindo as mucosites (HALL *et al.*, 1995).

A complexa fisiopatologia da mucosite apenas recentemente tem sido melhor pesquisada, sendo reflexo de uma série dinâmica de eventos moleculares e celulares, envolvendo todas as células e tecidos do epitélio e da submucosa. Este fato tem dificultado o desenvolvimento de medidas paliativas ou preventivas eficientes (DUNCAN e GRANT, 2003).

Conforme Sonis (2004) a hipótese para a fisiopatologia da mucosite se desenvolve de acordo com 5 estágios: iniciação, lesões primárias, amplificação, ulceração e cicatrização. Nem todos esses estágios se manifestam, uma vez que em baixos graus de mucosite (baixa severidade) o dano é limitado, com rápida cicatrização e re-população do epitélio, prevenindo a ocorrência do estágio ulcerativo (SONIS, 1998).

Iniciação: A quimioterapia promove danos em componentes celulares, DNA e não-DNA, que resultam em lesões diretas nas células do epitélio basal, bem como, na submucosa. Simultaneamente, formam-se espécies reativas do oxigênio (ERO), que são mediadores cruciais nos processos degenerativos que se seguem. Embora neste estágio a membrana pareça perfeitamente normal, uma cascata de eventos se inicia na submucosa e que ao longo do processo vai resultar na destruição da mucosa.

Lesões primárias: As moléculas de DNA e não-DNA danificadas e as EROs ativam fatores de transcrição, destacando-se o fator nuclear κ B (NF- κ B). Essas transformações ocorrem em todas as células e tecidos que formam a mucosa. A ativação do fator nuclear NF- κ B resulta na elevação da expressão de mais de 200 genes, muitos dos quais com efeitos diretos sobre a toxicidade da mucosa. A elevação da expressão gênica pela quimioterapia induz a produção de fatores de transcrição para a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6. Tem sido observado aumento dos níveis dessas proteínas nas células da mucosa. É possível que a presença dessas proteínas estimulem lesões primárias dos tecidos conectivos e endoteliais, iniciando uma sinalização mesênquima-epitélio, reduzindo a oxigenação epitelial e levando a injúrias e morte do epitélio basal.

Amplificação da sinalização: As citocinas pró-inflamatórias, não somente causam danos nos tecidos, mas também, introduzem um controle retroativo positivo que amplifica as lesões primárias, iniciadas pela quimioterapia. Uma cascata de eventos metabólicos se inicia, promovendo, finalmente, a ativação da enzima apoptótica caspase 3 e a morte de células.

Ulceração: Cerca de 7 a 10 dias após início da administração da quimioterapia, a integridade do epitélio se rompe e ocorre a ulceração. A fase ulcerativa é extremamente dolorosa, uma vez que a barreira protetora que recobre os terminais nervosos na lâmina própria é eliminada. Bactérias orais colonizam a úlcera, onde liberam produtos da parede celular que penetram no tecido conectivo e estimulam a liberação de outras citocinas. Ocorre então a infiltração de elementos inflamatórios (macrófagos e mastócitos). A úlcera poderá ficar coberta de material fibroso e exudato de bactérias, normalmente referida como pseudo-membrana.

Cicatrização: Na maioria dos casos a mucosite se caracteriza por um fenômeno agudo, que é auto-limitado. Cicatrização espontânea ocorre em cerca de 2-3 semanas depois da administração do quimioterápico. O epitélio migra das

margens da úlcera, como consequência de sinais originários das células do mesênquima e da matriz extracelular, que determina proliferação, migração e diferenciação.

Vários modelos animais tem sido desenvolvidos para investigar a mucosite com respeito às mudanças morfológicas que ocorrem na mucosa após administração de agentes citotóxicos, bem como, para determinar a ação de substâncias (nutricionais e drogas) na proteção da mucosa (LOGAN *et al.*, 2007).

O primeiro modelo animal para investigar a mucosite induzida por quimioterápicos envolveu a utilização de hamsters *Golden Syrian* que receberam 5-fluoruracila (5-FU). Análises clínicas e histológicas indicaram que as mudanças que ocorreram na mucosa dos animais foram similares ao verificado em humanos com mucosite (SONIS *et al.*, 1990).

A prevalência de mucosite é variável e dependente do tipo de tratamento assim como da doença que está sendo tratada. A mucosite ocorre entre 80 a 100% dos pacientes tratados com regimes de “alto risco” como nos casos de radioterapia de cabeça e pescoço, altas doses de quimioterapia (por exemplo nos protocolos adotados para LMA) e nos transplantes de medula óssea. Em regimes considerados de “baixo risco” para o desenvolvimento da toxicidade da mucosa, a prevalência de mucosite está entre 10 a 15% (LOGAN *et al.*, 2007).

Os tratamentos clínicos disponíveis atualmente não conseguem prevenir a mucosite. Entretanto, podem limitar sua severidade e duração (DUNCAN e GRANT, 2003).

2.4. Estado nutricional no câncer

Na avaliação do estado nutricional, o consumo alimentar é um parâmetro que se mensura com o objetivo de coletar informações dietéticas para estimar a adequação da ingestão de indivíduos e grupos populacionais. É utilizado para investigar a relação entre dieta, saúde e estado nutricional e avaliar a educação

nutricional, a intervenção nutricional e os programas de suplementação alimentar (FISBERG *et al.*, 2000).

Normalmente, crianças com alguma doença podem ter seu apetite alterado e conseqüentemente afetar seu balanceamento de nutrientes. Estudos avaliaram que, durante o ciclo da quimioterapia, crianças e adolescentes com câncer apresentaram redução de 40 a 50% na ingestão habitual (PINHO *et al.*, 1997; GARÓFOLO *et al.*, 1998). Este fato ocorre em virtude da existência de aversões alimentares e inapetência durante o tratamento quimioterápico, contribuindo para uma depleção nutricional mais intensa (BROEDER DEN *et al.*, 1998).

Um estudo com 140 pacientes desnutridos e portadores de neoplasias foi realizado para avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico, cirúrgico e/ou radioterápico. Os autores Daly, Dudrick e Copeland (1979) mostraram que a imunidade celular apresentou uma correlação direta e significativa com os parâmetros usados na avaliação dos índices nutricionais. Os pacientes com resposta imunológica deficiente apresentaram uma frequência maior de desnutrição grave, níveis séricos de albumina baixos, linfopenia mais acentuada, resposta inferior ao tratamento quimioterápico e morbidade maior no período pós-cirúrgico.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A.E.C.; PACHECO, M.T.B. **Leite para Adultos - Mitos e Fatos Frente à Ciência**. São Paulo: Varela, 2009.

BARUCHEL, S.; VIAUX, G. In vitro selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in mammal cells and rat mammary carcinoma model. **Anticancer Research**, Athens, v. 16, n. 3A, p. 1095-100, may./june.1996.

BECKER, C.; FANTINI, M.C.; NEURATH, M.F. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 17, n. 1-2, p. 97-106, feb./apr. 2006.

BELFIELD, P.M.; DWYER, A.A. Oral complications of childhood cancer and its treatments: current best practice. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1035-41, may. 2004.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos:nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**, Madrid, n. 265, p. 25-30, 1995.

BEZAULT, J.; BHIMANI, R.; WIPROVNICK, J.; FURMANSKI, P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and developmental metastasis in mice. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 9, p. 2310-2, may. 1994.

BOSCOE, A.B.; LISTOW, C.R. **Protein Research Progress**. New York: Nova Science Publishers. 2008. 253 p.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Athens, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, nov/dec. 2000.

BOUNOUS, G.; BATIST, G.; GOLD, P. Whey protein in cancer prevention. **Cancer Letters**, Virginia, v. 57, n. 2, p. 91-94, may. 1991.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Quebec, v. 14, n. 4, p. 271-278, aug. 1991.

BOUNOUS, G.; PAPENBURG, R.; KONGSHAVN, P.A.L.; GOLD, P.; FLEISZER D. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. **Clinical and Investigative Medicine**, Quebec, v. 11, n. 3, p. 213-217, june. 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, Chicago, v.1, p. 21-28, jan.1996.

BROEDER DEN, E.; LIPPENS, R.J.; VAN'T HOF, M.A.; TOLBOOM, J.J.; VAN STAVEREN, W.A.; HOFMAN, Z.; SENGERS, R.C. Effects of naso-gastric tube feeding on the nutritional status of children with cancer. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 52, n. 7, p. 494-500, jul. 1998.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, London, v. 88, suppl. 2, S165-176, nov. 2002.

CASCIATO, D.A. **Manual de oncologia clínica**. São Paulo: Tecmedd, 2008.

CASTRO, G.A.; SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F. O efeito dos constituintes do leite na carcinogênese. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos – Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. ; CAMPOS, M.G.V. Leucemias. In: FORONES, N. M.; FILHO, R.J.; TADOKORO, H.; FREIRE, C.A.R. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar de oncologia**. Barueri: Manole, 2005.

CHMIEL, J.F. Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 3., 1997, Chicago. **Proceedings of the 3rd International Whey Conference**, Chicago, 1997, p. 310-314.

CLARK, J.; BUTLER, R.; HOWARTH, G. READ, L.; REGESTER G. Exposure of oral mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy-induced mucositis in the hamsters. **Oral Oncology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 478-485, jul. 2002.

DALY, J.M.; DUDRICK, S.J.; COPELAND, E.M. Evaluation of nutritional indices as prognostic indicators in the cancer patient. **Cancer**, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 925-931, mar. 1979.

DERYNCK, R.; AKHURST, R.J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**, New York, v. 29, n. 2, p. 117-129, oct. 2001.

DIAS, N.F.G.P.; SGARBIERI, V.C.; JACOBUCCI, H.B.; RANGEL, H.A.; TANIKAWA, C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse. **Le Lait**, France, v. 86, n.1, p.11-14, 2006.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 853 – 874, nov. 2003.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARRELL, H.M.; Jr. HARWALKER, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 8, p. 1599-1886, 1984.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 109, n. 3, p. 452-458, mar. 2009.

FISBERG, M.; BANDEIRA, C.R.S.; BONILHA, E.A.; HALPERN, G.; HIRSCHBRUCH, M.D. Hábitos alimentares na adolescência. **Pediatria Moderna**, São Paulo, v. 36, n. 11, p. 766-70, 2000.

FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; MOSSBERG, A.K.; GRONLI, J.; MORK, S.; BJERKVIK, R.; SVANBORG, C. Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis – like mechanism. **Cancer Research**, Baltimore , v. 64, n. 6, p. 2105-2112, mar. 2004.

FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P.; DOUCET, D.; McGUFFEY, M.K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 151-159, may. 2002.

GARÓFOLO, A.; DALL'AGNOL, T.M.; ANCONA, L.F.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; PETRILLI, A.S. Ingestão alimentar de crianças e adolescentes com câncer. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA, 6., 1998, Guarujá. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**. Guarujá: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 1998. 67 p

GOLDBERG, I. (Ed.). **Functional foods**. New York: Chapman & Hall, Inc. 1994

GREY, V.; MOHAMMED, S.R.; SMOUNTAS, A.A.; BAHLOOL, R.; LANDS, L.C. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 195-198, dec. 2003.

GUSTAFSSON, L.; LEIJONHUFVUD, R.N.I.; ARONSSON, M.D.A.; MOSSBERG, A.K.; SVANBORG, C. Treatment of skin papillomas with topical α -lactalbumin-oleic acid. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, n. 26, p. 2663-2672, june. 2004.

HAKANSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABLARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 92, n. 17, p. 8064-8068, aug.1995.

HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; STUART, R.K. The influence of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 concentrations on non hematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 23, n. 12, p. 1256-60, nov. 1995.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H.K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T.A.; BLOOMFIELD, C.D. WHO classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, New York, v. 17, n. 12, p. 3835-49, dec. 1999.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

IKEDA, M.; SUGIYAMA, K.; TANAKA, T.; TANAKA, K.; SEKIHARA, H.; SHIMOTOLM, K.; KATO, N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 245, n. 2, p. 549-553, apr. 1998.

IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A.M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 7, p. 663-688, nov. 1997.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, New York, v. 53, n. 1, p. 5-26, jan./feb. 2003.

JONES, E.M.; SMART, A.; BLOOMBERG, G.; BURGESS, L.; MILLAR, M.R. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. **The Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 77, n. 2, p. 208-214, aug. 1994.

KENNEDY, R.S.; KNOK, G.P.; BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; LEE, T.D.G. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: phase I-II clinical study. **Anticancer Research**, Athens, v. 15, n. 6B, p. 2643-2650, nov./dec. 1995.

KENT, K.D.; HARPER, W.J.; BOMSER, J.A. Effect of whey protein isolate in intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cell. **Toxicology in vitro**, New York, v. 17, n. 1, p. 27-33, feb. 2003.

LAUERSEN, I.; BRIAND, P.; LYEKESFELDT, A.E. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. **Anticancer Research**, Athens, v. 10, n. 2A, p. 343-352, mar./apr. 1990.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.J.; GIBSON, R.J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D.M.K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 33, n. 5, p. 448-460, aug. 2007.

LOPÉZ-VARELA, S.; GONZÁLEZ-GROSS, M.; MARCOS, A. Functional foods and the immune system: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 56, suppl 3, S29-33, aug. 2002.

LUPULESCU, A. Role of cancer cell metabolism in cancer therapy and cancer prevention. In: _____. **Cancer cell metabolism and cancer treatment**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2001.

MARSHALL, N.D. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, Saindpoint, v. 9, n. 2, p. 136-156, june. 2004.

MAUBOIS, J.L.; OLIVIER, G. Extraction of milk proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. 579-595 p.

MAZZA, G. (Ed.) **Functional foods. Biochemical & processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc. 1998. 460 p.

McINTOSH, G.H. ; LE LEU, R.K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 7, p. 1053-1066, jul. 2001.

McINTOSH, G.H.; REGESTER, G.O.; LE LEU, R.K.; ROYLE, P.J. ; SMITHERS, G.W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 4, p. 809-816, apr.1995.

McINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as a

functional food ingredients. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p. 425-434, 1998.

MERCIER, A.; GAUTHIER, S.F.; FLISS, I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. **International Dairy Journal**, Barking, v.14, n.3, p. 175-183, mar. 2004.

MEZZARROBA, L.F.H.; CARVALHO, J.E.; PONEZI, A.N.; ANTONIO, M.A.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p.1005-1012, sept. 2006.

MICKE, K.M.; BEEH, J.F.; SCHLAA K.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 31, n. 2, p. 171-178, feb. 2001.

MINEHIRA, K.; INOUE, S.; NONAKA, M.; OSADA, K.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Effects of dietary protein type on oxidized cholesterol-induced alteration in age-related modulation of lipid metabolism and indices of immune function in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1483, n. 1, p. 141-153, jan. 2000.

MLEKO, S.; GUSTAW, W. Rheological changes due to substitution of total milk protein by whey proteins in dairy desserts. **Journal of Food Science Technology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 170-172, 2002.

MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; MACDONALD, T.T. Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 513-517, oct. 2004.

MORENO, Y.M.F. **Proliferação celular e citocinas BCG específicos em crianças com AIDS: efeito de suplementos nutricionais**. 2007, 243f. Tese. (Doutorado na Saúde da Criança e do Adolescente) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007

MORENO, Y.M.F.; SGARBIERI, V.C.; DA SILVA, M.N.; TORO, A.; VILELA, M.M. Features of whey protein concentrate supplementation in children with rapidly progressive HIV infection. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 52, n. 1, p. 34-38, feb. 2006.

NEUMANN, A.I.C.P.; ABREU, E.S.; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimento, nutracêuticos ... Você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 71, p. 19-23, 2000.

PARKER, N.T.; GOODRUM, K.J. A comparison of casein, lactalbumin and soy protein effect on the immune response to a T-dependent antigen. **Nutrition Research**, New York, v. 10, p. 781-792, 1990.

PARODI, P.W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 13, n. 8, p. 813-828, 2007.

PENG, C.T.; WU, K.H.; LAN, S.J.; TSAI, J.P.; TSAI, F.J.; TSAI, C.H. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing chemotherapy. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1158-1163, may. 2005.

PINHO, N.B.; PACHECO, A.S.; BALUZ, K.G.; NAJMAN, H.L.; SIMMA, F. Suporte nutricional pediátrico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 257-263, 1997.

PLAYFORD, R.J.; MACDONALD, C.E.; JOHNSON, W.S. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 72, n. 1, p. 5-14, jul. 2000.

REGESTER, G.O.; McINTOSH, G.H.; LEE, V.W.K.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, Australia, v. 48, n. 3, 123- 127, 1996.

RIES, L.A.G.; EISNER, M.P.; KOSARY, C.L.; HANKEY, B.F.; MILLER, B.A.; CLEGG, L.; EDWARDS, B.K. **SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999**. Bethesda: National Cancer Institute. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/. Acesso em: 08 abr. 2006.

ROBERFROID, M.B. A European consensus of scientific concepts of functional foods. **Nutrition**, Burbank, v. 16, n. 7-8, p. 689-691, jul./aug. 2000.

ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. **The British Journal of Nutrition**, London, v. 87, suppl. 2, S139-143, may. 2002.

ROLSTON, K.V.I.; RUBENSTEIN, E.B. Initial clinical evaluation and risk assessment of the febrile neutropenic cancer patient. In: TALCOTT, J.A., RUBENSTEIN, E.B. **Textbook of febrile neutropenia**. London: Martin Dunitz, 2001, p. 151-166.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of

stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 5, n. 4, p. 221-228, 2002.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, n. 3, p. 309-314, 2004.

ROY, M.K.; KUWABARA, Y.; HARA, K.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Peptides from N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2065-2074, sept. 2002.

RUSSO, A.; DE GRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; MITCHELL, J.B. Selective modulation of glutathione levels in normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. **Cancer Research**, Baltimore, v. 26, n.6, p. 2845-2848, june.1986.

SAVARESE, D.M.F.; SAVY, G.; VAHDAT, L.; WISCHMEYER, P.E.; COREY, B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 29, n. 6, p. 501-13, dec. 2003.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.4, p. 397-409, oct./dec. 2004.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996, 517 p.

SGARBIERI, V.C. The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an overview). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 5, p. 104-121, 1999.

SGARBIERI, V.C.; RANGEL, H. A.; ZINSLY, P.F.; PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.P. Novel nutritional and physiological functions of milk proteins. In: WORLD CONFERENCE OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4., 2000, Wuxi. **Annals IV World Conference of Food Science and Technology**. Wuxi, China, 2000, p. 196-210.

SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F.; CASTRO, G.A. Componentes do leite e sistema imune. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos – Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

SHAH, N.P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **The British Journal of Nutrition**, London, v. 84, suppl. 1, S3-10, nov. 2000.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2002.

SONIS, S.; CLARK, J. Prevention and management of oral mucosites induced by antineoplastic therapy. **Oncology**, Basel, v. 5, n. 12, p. 11-18, dec. 1991.

SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 39 – 43, jan. 1998.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews.Cancer**, London, v. 4, n. 4, p. 277-284, apr. 2004.

SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B.N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives in cancer therapy induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, Philadelphia, v. 100, suppl. 9, S1995-2025, may. 2004.

SQUIER, C.A. Oral complications of cancer therapies: Mucosal alterations. **NCI monographs / National Cancer Institute**, Bethesda, v. 9, p. 169-72, 1990.

STEIJNS, J.M. Milk ingredients as nutraceuticals. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, n. 3, p. 81-88, dec. 2001.

SVENSSON, M. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 8, p. 4221-4226, apr. 2000.

TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S.; HAYASAWA, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 109- 112, 2002.

TSUDA, H.; SEKINE, K.; FUJITA, K.; LIGO, M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms – a review of experimental and clinical studies. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 131-136, 2002.

TSUDA, H.; SEKINE, K.; NAKAMURA, J.; USHIDA, Y.; KUHARA, T.; TAKASUKA, N.; KIM, D.J.; ASAMOTO, M.; BABA-TORIYAMA, H.; MOORE, M.A.; NISHINO, H.; KAKIZOE, T. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 273-284, 1998.

USHIDA, Y.; SHIMOKAWA, Y.; MATSUMOTO, H.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. Effects of bovine α -lactalbumin on gastric defense mechanisms in naïve rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokio, v. 67, n. 3, p. 577-583, mar. 2003.

VIANA, M.B.; CUNHA, K.C.C.M.S.; RAMOS, G.; MURAO, M. Leucemia mieloide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 489-496, 2003.

YOO, Y.C.; WATANABE, S.; WATANABE, R.; HATA, K.; SHIMAZAKI, K.; AZUMA, I. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 285-291, 1998.

ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.4, p. 1-8, 2001.

CAPÍTULO 2

“Suplementação com proteínas do soro de leite bovino em pacientes pediátricos com leucemia mieloide aguda (LMA) nos primeiros 60 dias do tratamento quimioterápico”

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar nos primeiros 60 dias do tratamento quimioterápico a influência da suplementação com proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β e lactoferrina em pacientes pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Os resultados bioquímicos do grupo LMA foram comparados com um grupo controle de indivíduos saudáveis da mesma faixa etária. Para tal, foi realizado um ensaio clínico, prospectivo, duplo cego com placebo controlado, em que foram avaliados 21 pacientes portadores de LMA e isentos de terapia, admitidos no Centro Infantil Boldrini, Campinas - SP no período de março de 2008 a novembro de 2009. O aporte do suplemento protéico foi de aproximadamente 50% dos valores estabelecidos pelas DRIs (*Dietary Reference Intakes*) de acordo com a faixa etária dos pacientes, e a administração foi proporcionada em duas doses diárias. Foram analisadas as seguintes variáveis: medidas antropométricas (peso, estatura, estatura por idade, IMC por idade, prega cutânea tricipital, prega cutânea subescapular, somatório das pregas, circunferência do braço e circunferência muscular do braço), avaliação da ingestão alimentar (energética, macro e micronutrientes), proteínas séricas (pré-albumina e albumina), hemograma, glutatona eritrocitária, citocinas (TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ), imunoglobulina A salivar e grau de mucosite. A análise estatística foi realizada através do software SPSS versão 7.5 com 5% de significância. O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro de número 14097. A distribuição percentual dos macronutrientes estava adequada em todos os tempos analisados para os grupos WPC e placebo. Para o grupo placebo houve redução significativa do peso dos pacientes no decorrer da pesquisa: 20,05Kg; 17,38Kg e 15Kg. No entanto, para o grupo WPC houve aumento significativo tanto no peso quanto na mediana dos dois índices antropométricos avaliados, o que não foi verificado para o grupo

placebo. O WPC não conseguiu evitar a redução significativa ($p = 0,028$) nos valores medianos de glutathiona, o mesmo ocorrendo com o grupo placebo ($p = 0,003$). Houve redução significativa dos níveis de leucócitos para os dois grupos; porém, não houve diferença sobre a produção de IgA salivar e de citocinas. O grau 2 de mucosite foi mais prevalente, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos sobre sua severidade. Tomados os resultados em conjunto verificou-se que o WPC apresentou efeito positivo sobre o estado nutricional dos pacientes, porém não influenciou sua composição corporal. A distribuição percentual dos macronutrientes estava adequada em todos os tempos para os dois grupos, mas o percentual de adequação dos micronutrientes estava inadequado (inferior a 90%) para a maioria dos nutrientes. A suplementação com WPC e maltodextrina não interferiu na ingestão da dieta dos pacientes com LMA e sim os efeitos colaterais do próprio tratamento quimioterápico. As demais análises bioquímicas não evidenciaram superioridade do WPC em relação ao placebo. Na comparação dos pacientes com LMA e indivíduos saudáveis constataram-se níveis estatisticamente superiores do controle no que se refere à albumina, pré-albumina, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ quando estimuladas por BCG e produção de IL-6 quando estimulada por PHA. Para a concentração de glutathiona eritrocitária e produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ verificou-se que os pacientes com LMA apresentaram níveis estatisticamente superiores em relação ao controle saudável.

1. INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil no Brasil é considerado raro, representando de 2 a 3% de todos os tumores malignos. A estimativa para os anos de 2008 e 2009 foi de 9.890 casos por ano. Entretanto, dados de 2005 apontaram o câncer como segunda causa de morte em crianças e adolescentes, representado 8% de todas as causas de morte e ficando atrás apenas de causas externas (acidentes e violência), de acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008).

As leucemias são as neoplasias mais comuns na criança, correspondendo a cerca de 30% de todas as doenças malignas em pacientes com menos de 14 anos de idade. A leucemia mieloide aguda (LMA) corresponde a 20% das leucemias agudas em crianças. Progressos limitados têm ocorrido na cura da LMA nas últimas décadas, em contraste com a forma linfoblástica (RAVINDRANATH, 2003).

Leucemias agudas são neoplasias primárias da medula óssea caracterizadas por formarem um grupo heterogêneo de doenças, nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como acúmulo dessas células em outros tecidos (ELMAN e SILVA, 2007).

A etiologia ainda não está completamente elucidada, porém são enfatizados como possíveis causas: efeitos da irradiação, exposição a substâncias químicas (por exemplo drogas antineoplásicas), fatores genéticos e hereditários, doenças hematológicas e tabagismo (CASCIATO, 2008).

Os sinais e sintomas das leucemias agudas decorrem da queda dos elementos figurados do sangue. Devido à anemia, o paciente apresenta fraqueza, mal-estar geral, palidez, fadiga, palpitações e dispnéia ao exercício. Sangramento mucoso, como gengivorragia, epistaxe e hemorragia conjuntival, petéquias, equimoses ou sangramento prolongado devido a plaquetopenia. Febre e infecções são devidas à diminuição de granulócitos normais (CHAUFFAILLE e CAMPOS, 2005).

A desnutrição energético-proteíca (DEP) comumente encontrada em pacientes com câncer pode ser causada tanto pela doença, como pelo tratamento quimioterápico e radioterápico (MAHAN e ESCOTT-STUMPS, 1998).

A mucosite é um dos maiores problemas para os pacientes em tratamento de câncer, sendo um importante fator dose-limitante da quimioterapia e radioterapia. Afeta, indiretamente, o sucesso da terapia antineoplásica, por limitar a capacidade dos pacientes em tolerar as doses farmacologicamente preconizadas de alguns medicamentos (SQUIER, 1990; SONIS e CLARK, 1991; SONIS *et al.*, 2004), podendo interromper ou até mesmo cessar precocemente o tratamento (LOGAN *et al.*, 2007).

A mucosite gastrointestinal se manifesta de muitas formas, com impacto negativo sobre a saúde, a qualidade de vida do paciente e o custo do tratamento do câncer pediátrico (SONIS *et al.*, 2004). O risco de infecções sistêmicas e até mesmo a morte estão aumentados em pacientes com mucosite (LOGAN *et al.*, 2007).

Artigos de revisão detalham as várias ações fisiológicas das proteínas do soro de leite bovino, que podem ser assim resumidas: ação antitumoral, através dos mecanismos de imunoestimulação da síntese de glutathiona, de linfócitos, linfocinas e imunoglobulinas; inibição de espécies reativas do oxigênio (ERO); proteção do material genético (DNA), através de formação de complexos com substâncias tóxicas como aflatoxinas, procarcinogênicas, compostos nitrosados e, pela metilação de sítios específicos do DNA e sua conseqüente estabilização; proteção da mucosa gastrointestinal através do estímulo à síntese de prostaglandinas (PGE₂, PGI₂), da formação de muco e inibição de gastrina; ação redutora; ações antiviral e antibacteriana (SGARBIERI, 2004; MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 1999).

A intervenção e o acompanhamento nutricional têm como objetivo promover o crescimento e o desenvolvimento normal da criança e do adolescente, melhorar a resposta imunológica, aumentar a tolerância do paciente ao tratamento e melhorar a sua qualidade de vida (PINHO *et al.*, 2004). Os autores também

destacam a importância da intervenção nutricional em qualquer etapa do tratamento, porém sendo mais eficaz quando iniciada ao diagnóstico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar de maneira prospectiva e randomizada, o papel da suplementação dietética com um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β e lactoferrina, sobre os efeitos tóxicos da mucosite, em pacientes pediátricos portadores de LMA durante os 60 primeiros dias do tratamento quimioterápico.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis os parâmetros bioquímicos dos pacientes com LMA.

- Avaliar a influência da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β e lactoferrina em relação ao grupo placebo (maltodextrina) sobre:
 - a adequação da ingestão alimentar (energética, de macro e micronutrientes);
 - o estado nutricional através de medidas antropométricas e das proteínas séricas (pré-albumina e albumina);
 - a dosagem de glutatona eritrocitária;
 - a resposta do sistema imunológico através dos parâmetros hematológicos, da produção de imunoglobulina A salivar e da produção de citocinas em resposta à BCG e à fitohemaglutinina (PHA);
 - a evolução clínica da mucosite.

3. HIPÓTESES

- A suplementação alimentar com proteínas do soro de leite é capaz de diminuir os efeitos danosos da quimioterapia sobre a mucosa do aparelho digestivo e as manifestações da mucosite.

- O suplemento com o concentrado protéico do soro de leite deve propiciar efeitos favoráveis sobre o sistema imunológico dos pacientes com LMA.
- O suplemento protéico é capaz de melhorar o estado nutricional dos pacientes com LMA submetidos à quimioterapia.

4. MÉTODOS

4.1. Delineamento do Estudo

Ensaio clínico de intervenção nutricional prospectivo, duplo-cego com placebo controlado, com duração de 2 meses de suplementação, conduzido entre março de 2008 a novembro de 2009.

Foram realizadas três avaliações, a primeira logo após o diagnóstico de LMA, coincidindo o início da intervenção nutricional com o início do tratamento quimioterápico (Tempo 0), a segunda trinta dias após o início da intervenção nutricional (Tempo 1) e a terceira sessenta dias após o início da intervenção nutricional, bem como, do tratamento quimioterápico (Tempo 2). As avaliações foram realizadas pela pesquisadora responsável pelo estudo de acordo com o protocolo elaborado pela mesma (**Apêndice 1**).

4.2. População

A população de estudo foi constituída por pacientes admitidos no Centro Infantil Boldrini, Campinas - São Paulo.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram os seguintes:

- ter confirmado o diagnóstico de LMA (com exceção do subtipo LMA-M3);
- não ter recebido tratamento prévio para a LMA;
- pertencer à faixa etária entre 0-19 anos de idade;
- sem manifestações clínicas de alergia às proteínas do leite bovino, intolerância à lactose ou de doença inflamatória intestinal crônica.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 2**) para o estudo, devidamente preenchido e assinado pelo paciente ou responsável.

Além dos pacientes portadores de LMA, um grupo controle de crianças e adolescentes saudáveis também fez parte do estudo. Os critérios de inclusão para esse grupo foram os seguintes:

- indivíduos na mesma faixa etária dos pacientes que participaram da pesquisa, de ambos os gêneros;
- não apresentar qualquer patologia nem estar recebendo nenhuma medicação no momento da coleta;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 3**) para a pesquisa, devidamente preenchido e assinado pelo participante ou responsável.

4.3. Protocolo do Tratamento Quimioterápico

O tratamento da Leucemia Mieloide Aguda (LMA) consiste na administração de quimioterápicos objetivando-se a remissão medular. Os pacientes participantes deste estudo foram tratados utilizando-se o protocolo elaborado pela *Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology*, NOPHO-AML 93 (LIE *et al.*, 2005).

Este protocolo foi realizado e modificado a partir dos protocolos NOPHO-AML 84 e 88. Entre janeiro de 1993 a dezembro de 2001, 243 pacientes diagnosticados com LMA (casos novos) de 21 centros de tratamento localizados nos países nórdicos foram tratados pelo protocolo NOPHO-AML 93 (LIE *et al.*, 2005). Desses pacientes em 5 anos, 48% obtiveram sobrevida livre de eventos; 52% obtiveram sobrevida livre de doença e 65% obtiveram sobrevida global.

O presente estudo limitou-se às fases da quimioterapia mais agressiva, que ocorrem nos primeiros 60 dias de tratamento. As fases do protocolo NOPHO-AML 93 são denominadas de indução e consolidação e estão descritas abaixo.

Terapia de Indução

O 1º curso de quimioterapia da fase de indução é denominado de ATEDox e compõe-se de:

- **Ara-C (Citosina-Arabinosídeo)**: 200 mg/m²/dia de infusão intravenosa contínua do dia 01 ao dia 04 (4 doses);

- 6-TG (Tioguanina): 100 mg/m² de 12 em 12 horas por infusão intravenosa do dia 01 ao dia 04, totalizando 8 doses (2 doses/dia);
- Etoposídeo (VP-16): 100 mg/m²/dia de infusão intravenosa contínua do dia 01 ao dia 04 (4 doses);
- Doxorubicina: 75mg/m² por 8 horas em infusão intravenosa no 5º dia (1 dose);
- Metotrexato: 6-12mg intratecal no 1º dia (1 dose).

No 16º dia após início do tratamento quimioterápico realiza-se punção da medula óssea para avaliar o status de remissão. Nesse momento o paciente poderá ser classificado em:

- Remissão completa: a medula óssea está regenerando células hematopoiéticas normais e contém < 5% de células leucêmicas (como reconhecido pela morfologia dos blastos ou por relevantes marcadores citogenéticos).
- Remissão parcial: a medula óssea está regenerando células hematopoiéticas normais e contém entre 5 e 20% de células leucêmicas.
- Doença resistente: a medula óssea contém >20% de células leucêmicas.

Para os pacientes que obtiveram uma boa resposta, ou seja, < 5% de blastos, espera-se a recuperação hematológica para o início do 2º curso de indução, o qual é idêntico ao 1º e foi descrito acima.

Para os pacientes com mais de 5% de blastos recomenda-se que recebam sequencialmente diferentes cursos de quimioterápicos até obtenção da remissão completa. Primeiramente devem receber o curso AM e se persistirem com mais de 5% de blastos na medula óssea devem receber o curso HdA₂E, ambos descritos a seguir.

Curso AM:

- Ara-C (Citosina-Arabinosídeo): 100 mg/m²/dia de infusão intravenosa contínua do dia 01 ao dia 05 (5 doses);
- Mitoxantrona: 10mg/m² por 30 minutos em infusão intravenosa do dia 01 ao dia 03 (3 doses);
- Metotrexato: 6-12mg intratecal no 1º dia (1 dose).

Curso HdA₂E:

- Ara-C (Citosina-Arabinosídeo): 2g/m² por 2 horas de infusão intravenosa a cada 12 horas do dia 01 ao dia 03 (totalizando 6 doses);
- Etoposídeo (VP-16): 100mg/m²/dia por 1 hora de infusão intravenosa do dia 02 ao dia 05 (4 doses);
- Metotrexato: 6-12mg intratecal no 1º dia (1 dose).

Terapia de Consolidação

Pacientes que completaram todos os cursos da terapia de indução, que estão em remissão completa (RC) e recuperados hematologicamente, estão prontos para iniciar a terapia de consolidação. No protocolo NOPHO-AML 93 essa terapia é constituída por quatro cursos de quimioterapia denominados de: HA₁M; HdA₂E (descrito acima); HA₃ e novamente HdA₂E.

Curso HA₁M:

- Ara-C (Citosina-Arabinosídeo): 1g/m² por 2 horas de infusão intravenosa a cada 12 horas do dia 01 ao dia 03 (totalizando 6 doses);
- Mitoxantrona: 10mg/m² por 30 minutos em infusão intravenosa do dia 01 ao dia 05 (5 doses);
- Metotrexato: 6-12mg intratecal no 1º dia (1 dose).

Curso HA₃:

- Ara-C (Citosina-Arabinosídeo): 3g/m² por 2 horas de infusão intravenosa a cada 12 horas do dia 01 ao dia 03 (totalizando 6 doses);
- Metotrexato: 6-12mg intratecal no 1º dia (1 dose).

De acordo com a descrição acima, o esquema terapêutico do protocolo NOPHO-AML 93 foi apresentado na Figura 1.

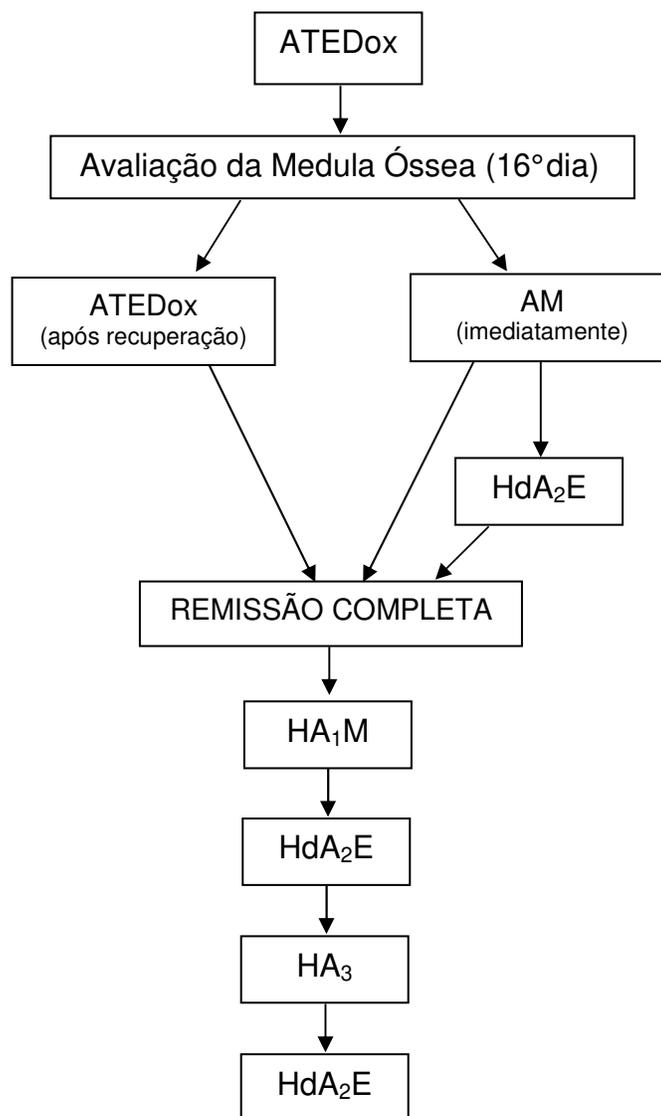


FIGURA 1. Fluxograma do esquema terapêutico do protocolo NOPHO-AML 93. Fonte: LIE *et al.* (2005).

As principais classes de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer, de acordo com dados do Instituto Nacional de câncer (INCA), bem como, os possíveis efeitos colaterais dos quimioterápicos utilizados no protocolo NOPHO-AML 93, conforme Casciato (2008), encontram-se especificados nos **Anexos 1 e 2**.

4.4. Caracterização Físico-química dos Suplementos

4.4.1. Concentrado protéico de soro de leite

A presente pesquisa recebeu a doação do concentrado de soro de leite bovino (WPC) enriquecido com o fator TGF- β e lactoferrina, o qual foi produzido em planta piloto pela Hilmar Ingredients, uma divisão da empresa Hilmar Cheese Company, California, USA.

Foi realizada a composição centesimal (Tabela 1) e a determinação de aminoácidos totais (Tabela 2) do WPC utilizado na pesquisa.

- **Composição centesimal do WPC**

- Umidade, sólidos totais, cinza e proteína: foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (2005).
- Lipídios totais: foram determinados pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (nas proporções 10, 20, e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.
- Carboidratos totais: estimados por diferença, subtraindo-se de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

TABELA 1. Composição centesimal do concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC).

<i>Componentes (%)</i>	WPC
Proteína (N x F) ¹	68,85 \pm 0,58
Proteína (base seca)	73,5
Lipídios totais	13,98 \pm 0,50
Cinza	4,26 \pm 0,02
Umidade	6,33 \pm 0,09
Carboidrato ²	6,58

¹Fator (F) = 6,38. ²Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinza + umidade). Resultados são média de 3 determinações analíticas.

- **Determinação de aminoácidos totais**

Para identificação e quantificação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas à vácuo e mantidas a

110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado sob vácuo parcial à 50 °C e fez-se a recuperação da amostra e m tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300), para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN, STEIN e MOORE,1958). Solução padrão de aminoácidos Pierce (EUA) foi utilizada como referência.

TABELA 2. Valores obtidos para os aminoácidos totais (g por 100g de proteína) do concentrado protéico do soro de leite bovino (WPC).

Aminoácidos	WPC (g/100g de proteína)
Aminoácidos essenciais	
Histidina	1,9
Isoleucina	5,8
Leucina	10,3
Lisina	8,6
Metionina	3,1
Cistina	2,3
Fenilalanina	3,5
Tirosina	3,2
Triptofano	ND
Valina	5,3
Treonina	6,3
Aminoácidos não essenciais	
Alanina	5,0
Arginina	3,3
Ácido Aspártico	10,9
Ácido Glutâmico	16,9
Glicina	2,1
Prolina	5,9
Serina	5,5

ND = Não Determinado. Resultados são médias de duas determinações analíticas.

4.4.2. Maltodextrina

A maltodextrina (MOR-REX[®] 1910) utilizada como placebo na pesquisa foi adquirida da empresa CornProducts Brasil – Ingredientes Industriais Ltda, São Paulo-SP.

O produto apresenta como funcionalidade as seguintes características: baixa higroscopicidade; confere sabor ligeiramente doce; solúvel a frio; viscosidade e aspectos iguais à sacarose.

Na Tabela 3 encontra-se a composição nutricional da maltodextrina utilizada na pesquisa.

TABELA 3. Composição nutricional da maltodextrina (MOR-REX[®] 1910) de acordo com informações do fabricante.

<i>Componentes</i>	Malto (Qde/100g)
Valor Calórico, Kcal	380,0
Carboidratos, g	95,0
Proteínas, g	0,0
Lipídios totais, g	0,0
Fibra alimentar, g	0,0
Cálcio, mg	39,5
Ferro, mg	3,4
Sódio, mg	56,0

4.5. Suplementação Alimentar

À medida que foram sendo admitidos no Centro Infantil Boldrini, os pacientes diagnosticados com LMA e virgens de terapia obedeceram a uma ordem de entrada, previamente aleatorizada, entre suplemento A e suplemento B (Anexo 3). Um grupo recebeu suplementação oral proteica na forma de um concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina e o outro grupo recebeu um produto placebo (maltodextrina), na mesma quantidade e densidade calórica.

Por se tratar de uma pesquisa duplo cego, apenas em março de 2010 a pesquisadora responsável soube que o suplemento A se tratava do placebo (maltodextrina) e o suplemento B se tratava do WPC.

A suplementação dietética foi realizada diariamente por um período total de 60 dias a contar do início do tratamento quimioterápico. O aporte do suplemento protéico foi aproximadamente 50% dos valores estabelecidos pelas *Dietary Reference Intakes* - DRIs (Institute of Medicine, 2002/2005) de acordo com a faixa etária de cada paciente (Tabela 4).

TABELA 4. Valores de recomendação para proteínas (g/dia) de acordo com *Dietary Reference Intakes* - DRIs (Institute of Medicine, 2002/2005).

Faixa etária	Proteína (g/dia)	
	Masculino	Feminino
0-6m	9,1	
7-12m	11,0	
1-3a	13,0	
4-8a	19,0	
9-13a	34,0	34,0
14-18a	52,0	46,0
19-30a	56,0	46,0

O suplemento foi administrado em duas doses diárias na forma líquida (dissolvido em leite, sucos ou outras bebidas) ou ainda na forma original de pó misturado a farinhas, cereais matinais, sopas, purês de frutas ou outros tipos de alimentos, sempre respeitando a tolerância do paciente e a temperatura máxima de 50 °C, para não provocar a desnaturação das proteínas.

Todas as orientações em relação à administração do suplemento foram realizadas pela pesquisadora verbalmente e também na forma escrita através de um manual de instruções (**Apêndice 4**), que foi entregue após a autorização e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Através desse manual os pacientes e/ou responsáveis realizavam o controle diário da ingestão do suplemento, o qual também foi realizado periodicamente pela pesquisadora.

A suplementação foi imediatamente interrompida nos casos em que os pacientes apresentaram manifestações de intolerância gastrointestinal ou alérgica, bem como, quando apresentaram quadro clínico incompatível com a ingestão oral, como por exemplo, presença de colite com sonda nasogástrica aberta.

Em relação à apresentação dos suplementos em pó, ambos foram fornecidos na forma de sachês, com quantidades de produto de acordo com a faixa etária de cada paciente.

Comercialmente, muitos produtos em pó são acondicionados em laminados flexíveis. A composição do laminado deve oferecer barreira necessária para a proteção do produto. Dessa forma, as embalagens (sachês) devem ser constituídas de um material de barreira ao vapor de água, oferecendo também proteção contra penetração de luz e oxigênio.

As embalagens utilizadas na pesquisa foram adquiridas da empresa Hembapack, São Paulo-SP. Esses sachês apresentavam 3 soldas pouch (ref. SP-002) com gramatura de $116 \text{ g/m}^2 \pm 5 \text{ g/m}^2$ e estrutura composta de três camadas de proteção.

O WPC e a maltodextrina foram devidamente embalados nos respectivos sachês no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição – DEPAN/FEA, UNICAMP, Campinas-SP.

Antes do início da coleta de dados da pesquisa, no Centro Infantil Boldrini, as amostras foram enviadas para a realização de análises microbiológicas, como garantia de controle de qualidade e segurança da ingestão dos produtos pelos pacientes, uma vez que os mesmos foram manuseados durante o processo de embalagem.

Essas análises foram realizadas na Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP. Os resultados estavam de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para o Grupo de Alimentos 26 (Alimentos para Grupos Populacionais Específicos), Itens b (alimentos para imunossuprimidos e imunocomprometidos) e c (dietas enterais, em pó e módulos de nutrientes em pó para composição de dieta enteral), da Resolução RDC número 12 de 10 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil (2001).

A avaliação nutricional e bioquímica foi realizada no início do tratamento (T0), 30 dias após o início (T1) e, ao final das 8 semanas (T2), conforme descrição a seguir. A avaliação clínica da mucosite foi realizada continuamente durante todo o estudo.

4.6. Avaliação Nutricional

A escolha das medidas que foram utilizadas na realização da pesquisa para a avaliação nutricional dos pacientes com LMA obedeceu às condutas consensuadas para avaliação nutricional de pacientes oncológicos pediátricos submetidos à quimioterapia e radioterapia de acordo com o Consenso Nacional de Nutrição Oncológica do Instituto Nacional de Câncer – INCA (BRASIL, 2009).

4.6.1. Antropometria e Composição Corporal

Determinadas pela obtenção do peso, altura, circunferência braquial, pregas cutâneas do tríceps e subescapular, conforme brevemente descrito a seguir.

A medida do peso foi realizada em balança digital vertical (Filizola, São Paulo, SP), com aproximação de 0,1 kg. Os pacientes estavam vestindo roupas leves e sem sapatos. A altura foi obtida em estadiômetro, o qual possuía régua graduada em centímetros. A técnica adotada para a coleta das medidas baseou-se nas recomendações propostas pelo *Anthropometric Standardization Reference Manual* (LOHMAN, 1988).

Com os dados do peso e altura foi calculado o índice de massa corporal (IMC) que é a relação entre o peso e o quadrado da altura (kg/m^2).

Os escores Z dos índices antropométricos estatura/idade e IMC/idade foram calculados utilizando as curvas de referência propostas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006; WHO, 2007). Como os pacientes participantes da pesquisa apresentaram de 0 a 19 anos, optou-se por utilizar apenas os índices antropométricos presentes para toda a faixa etária em estudo. Dessa forma, o

índice peso/idade não foi calculado por ser indicado apenas para indivíduos menores de 10 anos.

Os escores Z dos índices descritos acima foram calculados com o programa *WHO Anthro* v. 3.0.1, para crianças de até 5 anos, e *WHO Anthro Plus* v. 1.0.2, para crianças com 5 anos ou mais e adolescentes até 19 anos. Ambos programas foram obtidos através do site da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, 2010*).

Para a classificação do estado nutricional dos indivíduos a partir destes indicadores, foram utilizados os valores de referência baseados no escore Z (desvio-padrão) estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para crianças e adolescentes (WHO, 2006 / 2007), de acordo com a descrição abaixo.

IMC/Idade	
Valores Críticos (Escore Z)	Diagnóstico Nutricional
< Escore-z -3	Magreza acentuada
> Escore-z -3 e < Escore-z -2	Magreza
> Escore-z -2 e < Escore-z +1	Eutrofia
> Escore-z +1 e < Escore-z +2	Sobrepeso
> Escore-z +2 e < Escore-z +3	Obesidade
> Escore-z +3	Obesidade grave

Estatura/Idade	
Valores Críticos (Escore Z)	Diagnóstico Nutricional
< Escore-z -3	Muito baixa estatura para a idade
> Escore-z -3 e < Escore-z -2	Baixa estatura para a idade
≥ Escore-z -2	Estatura adequada para a idade

A composição corporal foi determinada pela obtenção da circunferência braquial (CB) e das pregas cutâneas.

A circunferência braquial foi obtida com fita métrica não extensível, milimetrada de acordo com o procedimento descrito por Lohman (1988).

As pregas cutâneas do tríceps (PCT) e subescapular (PCSe) foram medidas com um compasso de dobras cutâneas *Lange* (*Lange Skinfold Caliper; Beta Technology Incorporated Cambridge, Maryland, USA*) conforme procedimento descrito por Lohman (1988). A tomada das pregas foi efetuada sob forma de rodízio com três repetições visando diminuir o erro de medição. O valor adotado foi o da média aritmética entre as medidas tomadas (VASCONCELOS, 1995).

A partir da medida da CB e dos valores da PCT foi estimada a circunferência muscular do braço (CMB) de acordo com a fórmula:

$$\text{CMB (cm)} = \text{circunferência do braço (cm)} - (0,314 \times \text{dobra cutânea triceptal})$$

Para referência da classificação da CMB foi utilizada a tabela percentilar proposta por Frisancho (1990). Valores abaixo do P (percentil) 5 são indicadores de risco de doenças e distúrbios associados à desnutrição. Diferentemente do que ocorre com outras medidas, valores acima do P95 não indicam excesso de gordura corporal, visto que se trata da medida indireta do tecido muscular.

Para o cálculo de percentis da circunferência braquial, da prega cutânea triceptal, da prega cutânea subescapular e do somatório dessas pregas também foram utilizados os valores de referência descritos por Frisancho (1990). Valores abaixo do P5 são indicadores de risco de doenças e distúrbios associados à desnutrição; valores entre o P5 e o P95 indicam normalidade e valores acima do P95 representam risco de doenças relacionadas ao excesso de peso.

4.6.2. Necessidades Energéticas Diárias e Ingestão Alimentar

As necessidades energéticas diárias (NED) foram calculadas de acordo com as equações preconizadas pelas *Dietary Reference Intake* - DRI (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006), as quais levam em consideração a faixa etária, gênero, peso, estatura e fator atividade.

A ingestão energética e a proteica, bem como, a distribuição dos macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios) e micronutrientes (cálcio, ferro,

zinco, selênio, vitamina E e C) foram estimadas através do inquérito alimentar Recordatório 24 horas realizado nos tempos T0, T1 e T2.

Os cálculos nutricionais foram realizados a partir do Programa AVANUTRI - Sistema de Avaliação e Prescrição Nutricional versão 4.0, e a sua adequação foi avaliada pelas *Dietary Reference Intakes* - DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 2000, 2002, 2005) ajustadas para gênero e idade.

4.7. Avaliação Bioquímica

4.7.1. Coleta das Amostras Biológicas

Foram coletados pela equipe de enfermagem do Centro Infantil Boldrini entre 15 a 20 mL de sangue por técnicas padrão em tubos adequados para cada procedimento realizado, sendo tomados cuidados a fim de evitar a hemólise das amostras. A coleta do material biológico dos participantes do grupo controle foi realizada no ambulatório do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), pela enfermeira responsável.

As amostras de plasma foram obtidas através do sangue periférico, coletado em tubos com EDTA (Vacuette, Brasil), centrifugado por 5 minutos a 2800 rpm. Sequencialmente foram separadas alíquotas de 220 μ L, sendo armazenadas a -80°C para análises posteriores.

A coleta de saliva foi realizada com pipeta de plástico Pasteur estéril e descartável, coletando-se em torno de 1,0 mL. Os participantes receberam orientações de não comer ou beber (exceto água) uma hora antes da coleta, bem como, realizar higiene oral através de lavagem com água pura.

4.7.2. Dosagem de Proteínas Séricas

Foram determinadas as seguintes proteínas séricas: fração pré-albumina por nefelometria e albumina através de reação colorimétrica com verde de bromocresol por espectrofotometria. Essas análises foram realizadas no

Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica (DPC) do Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP.

4.7.3. Hemograma

O hemograma foi realizado rotineiramente no laboratório do Centro Infantil Boldrini nos pacientes de LMA como forma de acompanhamento clínico. Dessa forma, os dados de hemograma utilizados nessa pesquisa foram obtidos através dos prontuários dos pacientes. Para o grupo controle de indivíduos saudáveis o hemograma foi realizado na Seção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas, UNICAMP.

4.7.4. Glutathiona Eritrocitária

A concentração de glutathiona reduzida nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria através do método descrito por Beutler (1986) e com modificação proposta por Penna (1995), cujo princípio baseia-se no fato de que todos os compostos não protéicos sulfidrílicos dos eritrócitos permanecem estáveis devido à presença da glutathiona e, que eles possuem a capacidade de reduzir o 5,5'-Dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), composto dissulfídico, originando um cromóforo amarelado cuja densidade óptica pode ser determinada por espectrofotometria.

Neste método, os eritrócitos de sangue periférico, coletados em tubos com EDTA (Vacuette, Brasil), foram lisados em água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas (precipitadas) com solução de ácido metafosfórico glacial. Após incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. Foram acrescentados a 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foram adicionados 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e, obtida uma segunda densidade óptica (DO2).

As densidades óticas foram obtidas, em duplicata, no espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-70, Fullerton, EUA).

A concentração de GSH (mg/dL) nos eritrócitos foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{(\text{DO2} - \text{DO1}) \times 31040}{\text{hematócrito}}$$

Em que: o valor 31040 é o coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido pela GSH multiplicado pelas diluições.

4.7.5. Dosagem de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e no plasma

A fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 7,5 µg/mL (Sigma, EUA) foi utilizada como controle positivo. O meio de cultura completo (meio RPMI 1640, Sigma, EUA), acrescido de 1% de glutamina (Sigma, EUA), 0,1% de gentamicina e 10% de soro AB humano (Sigma, EUA), inativado, foi usado como controle negativo (produção espontânea). A vacina de BCG Moreau Rio de Janeiro liofilizada (Instituto Butantan, SP, Brasil), após reconstituída com meio RPMI 1640, foi usada como antígeno, na concentração ótima de 5×10^5 UFC/mL.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através da centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800 rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI.

As células foram cultivadas na concentração de 2×10^6 células/mL em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNC™, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37°C, e atmosfera de 5% de CO₂ durante 48 horas.

Alíquotas foram coletadas do sobrenadante da cultura e armazenadas a -80 °C até a realização da análise da produção de citocinas por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Para as dosagens de Interferon gama (IFN-γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) e

Fator de Crescimento e Transformação beta (TGF- β) foram utilizados Kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA). As análises foram realizadas no sobrenadante da cultura de CMSP para as seguintes citocinas: TNF- α , IL-10, IL-6 e IFN- γ . Para as análises de IL-8 e TGF- β 2 foram usadas amostras de plasma.

Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) conforme os protocolos do fabricante. As placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do *Kit*. Em seguida, incubadas com anticorpos de detecção, conjugados à biotina. A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) e a interrupção ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450 nm, sendo que as amostras indetectáveis foram consideradas como zero.

Para todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão com gráfico de dispersão no qual a variável *X* foi a densidade óptica obtida nas leituras e *Y*, a concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi gerada através de uma linha de tendência polinomial, e aceita apenas quando o R² fosse maior que 0,98. Para este cálculo foi utilizado o programa Microsoft Excel versão 2002 (Microsoft Corporation, EUA). As amostras e pontos da curva padrão foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.7.6. Dosagem de Imunoglobulina A salivar

A saliva coletada dos pacientes foi armazenada em tubos cônicos de 1,5 mL, centrifugada por 7 minutos a 1000g, e armazenada a -80 °C, até o momento da análise por nefelometria. Essa análise foi realizada no Laboratório Dr. Franceschi, Campinas-SP, utilizando-se protocolo de alta sensibilidade.

4.8. Avaliação Clínica

4.8.1. Avaliação da Evolução da Mucosite

Durante o período do estudo todos os pacientes receberam as mesmas orientações quanto à higiene oral e a realização de bochechos com soro fisiológico ou solução salina a 1%, como procedimento de rotina. Conforme critérios estabelecidos pelo *National Cancer Institute* - NCI (2003), a classificação da mucosite está apresentada no Tabela 5.

TABELA 5. Classificação da mucosite.

Classificação	Sintomas
Grau 0	Sem mucosite / sem sintomas.
Grau 1	Eritema da mucosa, dor leve. Sintomas respiratórios mínimos, mas não interferem funcionalmente.
Grau 2	Eritema doloroso, edema, úlceras ou pseudomembranas, mas o paciente pode se alimentar. Necessidade de dieta modificada. Sintomas respiratórios interferindo funcionalmente.
Grau 3	Eritema doloroso, edema, úlceras ou pseudomembranas confluentes. Sangramento ao menor trauma. O paciente não pode se alimentar ou ingerir líquidos adequadamente.
Grau 4	Úlceras extensas. Necrose tecidual. Sangramento espontâneo significativo. Necessita de suporte enteral ou parenteral. Risco de vida.
Grau 5	Morte

Fonte: National Cancer Institute - NCI. Common Terminology Criteria for Adverse Events (2003).

A avaliação do grau de mucosite foi realizada pela equipe médica e obtida dos prontuários dos pacientes.

4.9. Aspectos Éticos

Os responsáveis legais pelos pacientes incluídos neste estudo receberam todas as informações relacionadas aos objetivos da pesquisa, bem como, sobre os métodos e procedimentos utilizados para a sua execução. Os pacientes com mais de 7 anos de idade, e cujo nível de compreensão permitia, também foram devidamente esclarecidos sobre todos os aspectos relacionados com a pesquisa. Uma vez cientes da natureza dos procedimentos e desconfortos aos quais os

pacientes seriam submetidos, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, foi solicitado que os responsáveis assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 2**).

Foram rigorosamente seguidos todos os aspectos éticos recomendados para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostos pelas diretrizes e normas da Resolução nº 196 de 10 de Outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo de pesquisa recebeu o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Infantil Boldrini - Campinas-SP, tendo como registro, o número 31/2008. O mesmo foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro de número 14097 (**Anexo 4**). Para a inclusão de um grupo controle de crianças e adolescentes saudáveis (**Anexo 5**) foi submetido um adendo ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Infantil Boldrini - Campinas-SP.

4.10. Análise Estatística

Os dados foram organizados e analisados com o programa *SPSS® for Windows*, versão 7.5.1. (SPSS Inc., 1989 – 1996, EUA). As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como mediana (valores mínimo e máximo).

A comparação da avaliação bioquímica entre pacientes com leucemia mieloide aguda e indivíduos saudáveis (controle) foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Em relação à suplementação alimentar, as possíveis diferenças de cada tempo analisado, entre o suplemento protéico de soro de leite e a maltodextrina, usada como placebo, foram calculadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ou pelo teste paramétrico T de Student, de acordo com a distribuição de cada variável. Já as diferenças de cada suplemento individualmente analisado ao longo do tempo de estudo foram calculadas com os testes não paramétricos de Friedman e de comparações múltiplas.

Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

As figuras foram feitas no Software *GraphPad Prism, version 4.0* (GraphPad Software, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da População

Durante o período de coleta de dados da pesquisa (1 ano e 8 meses) o número de casos novos de LMA, com exceção do sub-tipo M3, foi de vinte e um sujeitos. O sub-tipo M3 apresenta características e tratamento diferenciado dos demais sub-tipos, por esse motivo foi excluído da pesquisa.

De acordo com Casciato (2008) a classificação FAB (Francesa, Americana e Britânica) da Leucemia Aguda foi proposta inicialmente em 1976, sendo que a LMA foi classificada em vários sub-tipos, os quais diferenciam-se de acordo com sua morfologia e histoquímica, a saber: M0 (Mieloblástica sem maturação); M1 (Mieloblástica com maturação mínima); M2 (Mieloblástica com maturação); M3 (Promielocítica); M3v (Promielocítica, variante microgranular); M4 (Mielomonocítica); M4 Eos (Mieloblástica com eosinófilos anormais); M5 (Monocítica); M6 (Eritroleucemia) e M7 (Megacarioblástica). A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu uma classificação para as leucemias agudas que acrescenta características moleculares e clínicas à classificação morfológica usual (APPELBAUM, 2005).

Conforme a classificação FAB, dentre os pacientes avaliados durante a realização da pesquisa: 9 foram classificados como M5; 4 como M2; 1 como M1; 1 como M7 e 6 pacientes não apresentavam a especificação de seu sub-tipo no prontuário.

Dos vinte e um pacientes avaliados no início da intervenção nutricional, 11 eram do sexo feminino e 10 eram do sexo masculino; apresentaram idade mediana de 6,83 (0,58 a 19,83) anos; 14 (66,7%) eram brancos, 2 (9,5%) negros e 5 pardos (23,8%). Em relação ao estado nutricional inicial dos pacientes, 95%

estava adequado em relação ao índice antropométrico estatura por idade e 85% foi considerado eutrófico quando foram avaliados através do índice IMC por idade.

Os pacientes foram aleatorizados para pertencerem ao grupo de estudo WPC (B) ou ao grupo placebo maltodextrina (A). O processo de aleatorização, bem como, a ordem de entrada dos pacientes no estudo foi descrita no **Anexo 3**.

O grupo placebo foi composto inicialmente por 10 pacientes, dos quais 9 finalizaram o estudo. Já o grupo experimental iniciou o estudo com 11 pacientes e foi concluído com 7. Em todos os casos de perda no seguimento o motivo foi o óbito dos pacientes. Entre esses pacientes 2 foram a óbito entre a avaliação inicial (T0) e a 2ª avaliação (T1) e os demais entre a 2ª (T1) e a última avaliação (T2).

No início da intervenção nutricional a idade dos pacientes do grupo WPC apresentou mediana de 9,2 (4,3 a 19,8) anos. No caso dos pacientes do grupo placebo (maltodextrina) a mediana foi de 5 (0,58 a 17,25) anos. As medianas das idades dos dois grupos não diferiram estatisticamente ($p = 0,273$).

Para melhor caracterizar a população estudada a Tabela 6 foi elaborada com os dados iniciais de cada paciente. Os valores de peso e a altura dos pacientes apresentaram ampla variação entre o valor mínimo e o máximo devido à faixa etária estudada ter sido bastante abrangente.

No momento do diagnóstico de leucemia (T0) 11 pacientes estavam com quantidades de leucócitos superior aos valores normais e 8 apresentaram valores abaixo do limite inferior de normalidade. Apenas 2 pacientes apresentaram valores de eritrócitos dentro dos limites de normalidade, os demais apresentaram valores inferiores indicando um possível quadro de anemia no diagnóstico. Os valores de plaquetas de 17 pacientes estavam inferiores ao adequado. Esses dados refletem as alterações provocadas pela leucemia sobre as células sanguíneas.

O grupo controle foi composto por 24 crianças e adolescentes saudáveis. Desses, 17 eram do sexo feminino e 7 eram do sexo masculino; apresentando idade mediana de 9,67 (1,5 a 18,25) anos.

TABELA 6. Caracterização da população estudada.

Pacientes	Suplemento ¹	Gênero ²	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	WBC ³ (x 10 ⁹ /L)	RBC ⁴ (x 10 ¹² /L)	PLAQ ⁵ (x 10 ⁹ /L)
1	B	F	11	31,2	139	2,1	2,79	16
2	B	M	6	23,5	123	2,4	4,19	159
3	A	F	16	55,2	165	57,8	2,33	34
4	A	F	14	59,1	167	140,0	1,93	38
5	B	M	17	52,5	164	1,4	4,36	17
6	B	F	5	18,5	105	10,4	2,06	33
7	B	F	13	40,2	156,5	13,1	2,74	19
8	B	F	19	47	163	2,2	2,53	115
9	B	F	4	18,3	107	4,1	2,55	90
10	B	F	5	16	108	4,3	2,12	18
11	A	M	6	28	136	2,8	2,66	173
12	A	M	0,58	9	71	55,0	2,96	220
13	A	M	1	9	72,5	29,3	2,85	21
14	A	M	4	16,6	106,5	19,9	3,96	58
15	A	M	17	68,5	176	494,0	2,39	34
16	A	M	5	23,5	118	1,1	1,78	164
17	A	F	2	12	89	106,0	1,94	34
18	B	F	9	30,5	141	20,16	2,49	18
19	B	F	9	38	131	7,2	3,12	73
20	A	M	3	12,7	98	33,3	2,48	74
21	B	M	7	35,1	137	41,4	3,10	73
Mediana			6,83	28	131	13,1	2,55	38
(Mín.- Máx.)			(0,6-19,8)	(9-68,5)	(71-176)	(1,1-494)	(1,8-4,4)	(16-220)
Referência ⁶						(4,5-10,5)	(4,0-6,0)	(150-450)

¹ A = Maltodextrina, B = WPC; ² F = feminino, M = masculino; ³ WBC = Células Brancas Sanguíneas ou Leucócitos; ⁴ RBC = Células Vermelhas Sanguíneas ou Eritrócitos; ⁵ PLAQ = Plaquetas. ⁶ Valores de referência de normalidade para células sanguíneas.

5.2. Avaliação Nutricional

5.2.1. Antropometria e Composição Corporal

No início do estudo não foi observada diferença estatística entre os grupos nos parâmetros antropométricos e de composição corporal avaliados, evidenciando que os grupos eram comparáveis. As medianas, mínimo e máximo desses parâmetros encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7. Comparação das variáveis antropométricas e da composição corporal, entre o grupo maltodextrina e WPC, no início da intervenção nutricional dos pacientes com LMA.

Variáveis ¹	Maltodextrina				WPC				p ²
	n	Mediana	Mín.	Máx.	n	Mediana	Mín.	Máx.	
Peso (Kg)	10	20,05	9	68,5	11	31,2	16	52,5	0,341
Esc. Z E/I	10	0,47	-3,17	2,87	10	-0,29	-1,6	1,94	0,459
Esc. Z IMC/I	10	0,035	-1,82	1,13	10	-0,23	-1,22	2,11	0,853
PCT (mm)	10	7	6	25	11	10	7	18	0,145
PCSe (mm)	9	6	4,5	15	11	6	5	14	1
ΣPC (mm)	8	14,75	11,5	40	10	16	13	32	0,533
CB (cm)	10	16,75	12,6	27	11	19,5	15,4	23	0,418
CMB (cm)	10	14,36	10,72	24,2	11	16,79	11,95	20,8	0,644

¹ Variáveis: Escore Z estatura/idade; Escore Z IMC/idade; PCT = prega cutânea tripectral; PCSe = prega cutânea subescapular; ΣPC = somatório da prega cutânea tripectral e subescapular; CB = circunferência braquial; CMB = circunferência muscular do braço. ² Valores de p calculados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

De acordo com a classificação do estado nutricional (EN) proposta pela OMS para crianças (2006) e adolescentes (2007), 19 indivíduos estavam com estatura adequada para idade e apenas 1 apresentava muito baixa estatura para idade (grupo maltodextrina); 18 indivíduos estavam eutróficos, 2 com sobrepeso (1 de cada grupo) e 1 obeso (grupo WPC) de acordo com o índice IMC/idade.

Conforme Frisancho (1990): 19 indivíduos estavam com EN adequado e apenas 1 estava com risco de desnutrição (grupo maltodextrina) de acordo com os dados da prega cutânea tripectral; através da análise da prega cutânea subescapular 18 indivíduos estavam com EN adequado e 1 com risco de

obesidade (grupo WPC) e pelo somatório dessas duas pregas 100% dos indivíduos estavam com EN adequado.

Em relação a CB e CMB, 3 indivíduos (2 do grupo maltodextrina e 1 do grupo WPC) e 4 indivíduos (1 do grupo maltodextrina e 3 do grupo WPC) estavam em risco de desnutrição, respectivamente, sendo que os demais estavam com EN adequado de acordo com a classificação elaborada por Frisancho (1990).

Não houve diferença estatística em relação ao peso dos pacientes em cada tempo analisado (T0, T1 e T2) entre o grupo WPC e o grupo maltodextrina. Porém, ao longo do estudo houve diferença no peso corporal dos pacientes, tanto no grupo WPC ($p = 0,006$), como no grupo maltodextrina ($p = 0,011$) (Figura 2).

A Figura 2 mostra que para o grupo maltodextrina houve uma redução nos valores das medianas do peso dos pacientes no decorrer da pesquisa: 20,05 (9 a 68,5) Kg; 17,38 (8 a 62) Kg e 15 (7,2 a 60) Kg, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparou-se entre si os tempos T1 e T2 e entre T0 e T2. Por outro lado, para o grupo WPC não houve diferença significativa nos valores de mediana entre T0 x T1, com um aumento estatisticamente significativo, quando se comparou a avaliação inicial e a final.

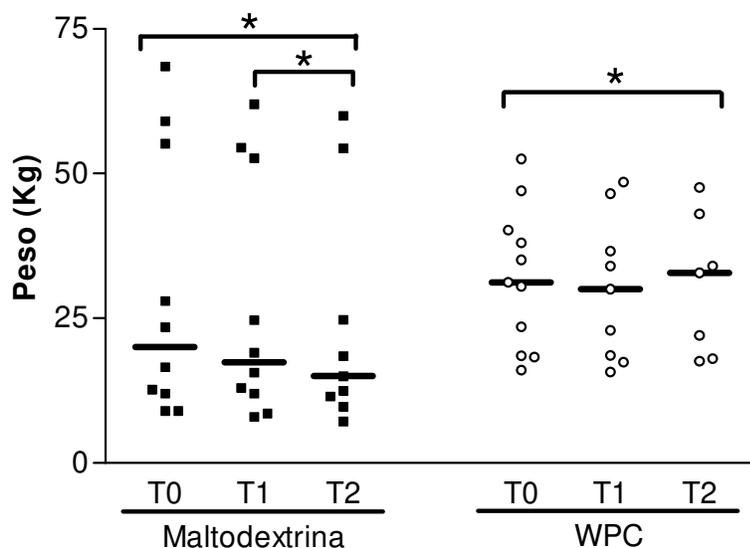


FIGURA 2. Peso corporal dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

* Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.

Nas avaliações realizadas em T0, T1 e T2, não houve diferença significativa entre os grupos WPC e maltodextrina nos escores Z dos índices antropométricos estatura/idade e IMC/idade (Figura 3). No entanto, quando comparado individualmente cada grupo ao longo do estudo verificou-se diferença estatística para ambos os grupos nos dois índices avaliados.

O grupo maltodextrina apresentou diminuição progressiva nos valores das medianas dos escores Z estatura/idade com diferença significativa entre o início (T0) e o final (T2) da intervenção nutricional. O mesmo aconteceu com os valores das medianas dos escores Z para IMC/idade com diferença significativa entre os tempos: T1 x T2 e T0 x T2.

O grupo WPC apresentou diferença significativa entre o início (T0) e o final (T2) nos valores da mediana dos escores Z de ambos os índices antropométricos avaliados.

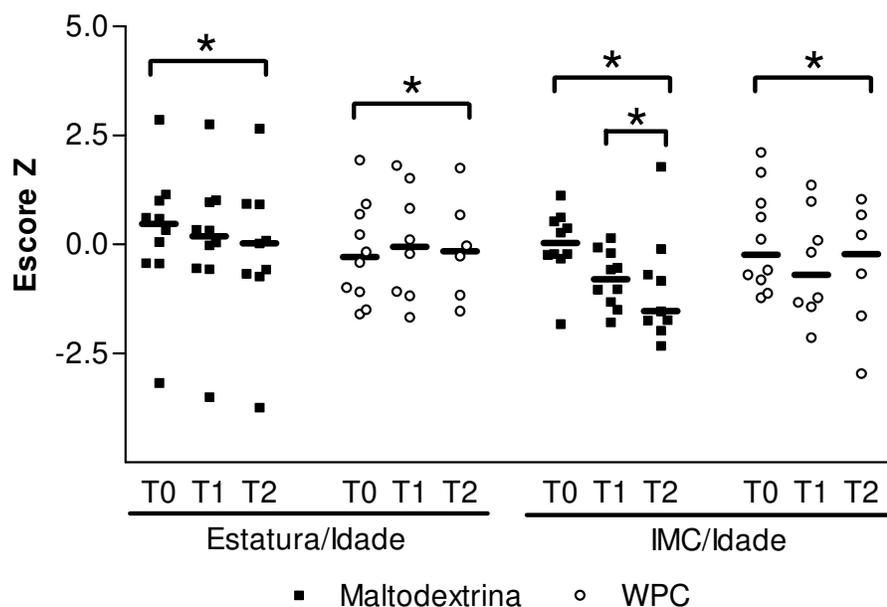


FIGURA 3. Escores Z dos índices antropométricos altura/idade e IMC/idade dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.

Em relação à composição corporal, não houve diferença significativa nos valores das pregas cutâneas tricipital e subescapular (Figura 4) nem nos valores de CMB (Figura 5) entre os grupos estudados em cada tempo de análise e no decorrer do estudo dos grupos individualmente.

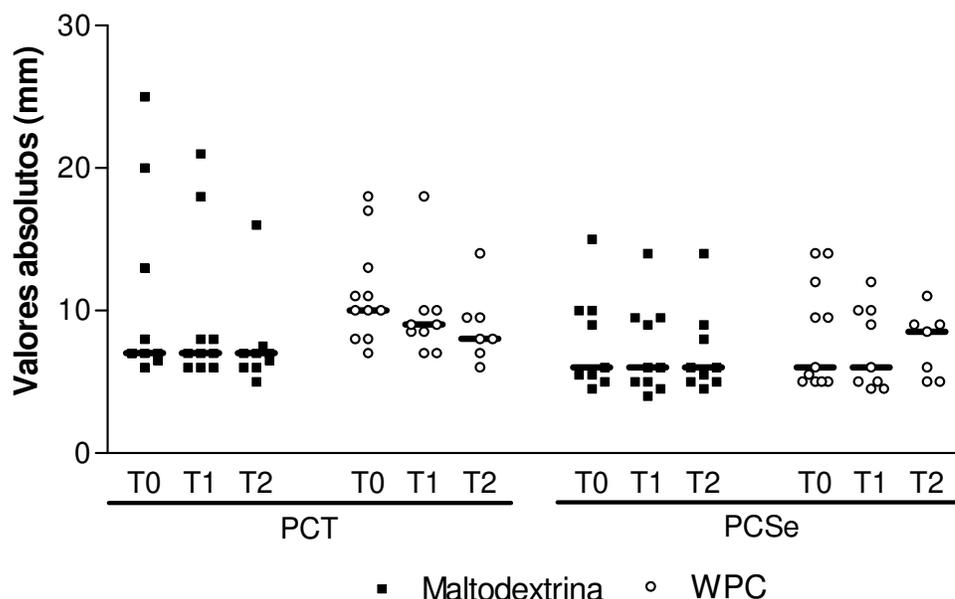


FIGURA 4. Valores absolutos (mm) das pregas cutâneas do tríceps (PCT) e subescapular (PCSE) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

Apenas o grupo WPC apresentou diferença significativa ($p = 0,032$) no decorrer dos sessenta dias de intervenção no somatório das pregas cutâneas tricipital e subescapular, ocorrendo uma recuperação nos valores medianos entre o início e o final da intervenção.

Os demais parâmetros que estimam a gordura corporal mostraram diminuição significativa nos valores de circunferência braquial (CB) (Figura 5) no grupo maltodextrina ($p = 0,011$) e no grupo WPC ($p = 0,004$). Para o grupo maltodextrina houve diferença significativa entre T1 x T2 e entre T0 x T2 e para o grupo WPC as diferenças significativas foram encontradas entre T0 x T1 e entre T0 x T2.

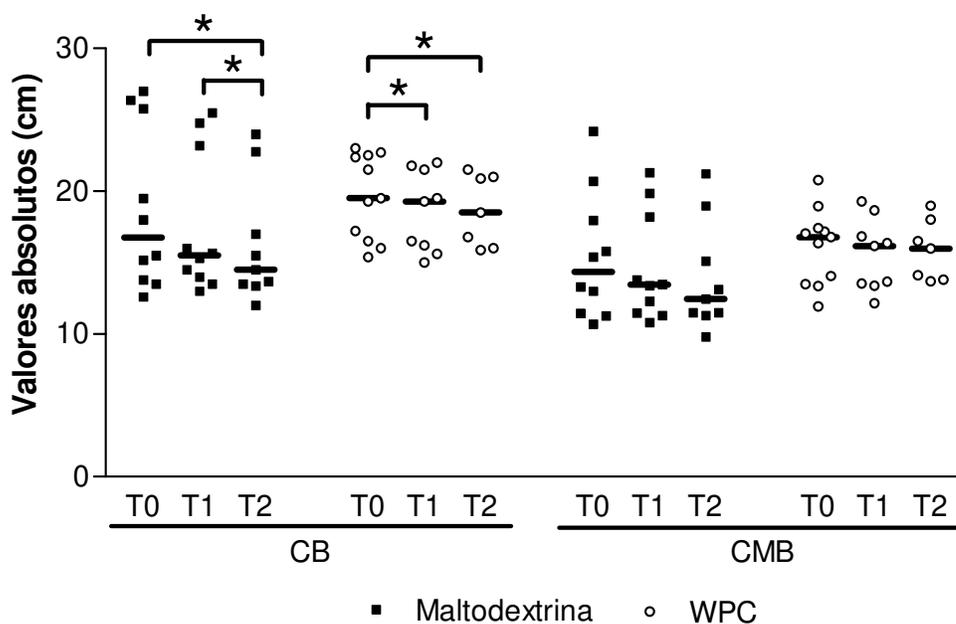


FIGURA 5. Valores absolutos (mm) da circunferência braquial (CB) e da circunferência muscular do braço (CMB) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

* Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.

5.2.2. Necessidades Energéticas Diárias e Ingestão Alimentar

As necessidades energéticas diárias (NED), a ingestão energética e de macronutrientes de todos os pacientes com LMA no início da intervenção nutricional, encontram-se descritas na Tabela 8.

TABELA 8. Necessidades energéticas diárias (NED) e ingestão alimentar de energia, proteína, lipídios, carboidratos e fibras de pacientes com LMA no início da intervenção nutricional.

Ingestão Alimentar	Pacientes com LMA (n = 21)
NED (Kcal/dia) ¹	1436,64 (721,0 – 2479,43) ²
Energia (Kcal/dia)	1299,19 (208,31 – 2865,06)
Proteína (g/dia)	59,61 (2,78 – 129,28)
Lipídio (g/dia)	34,21 (2,87 – 106,14)
Carboidrato (g/dia)	165,38 (33,9 – 368,56)
Fibra (g/dia)	5,1 (0,2 – 15,9)

¹NED = Necessidades Energéticas Diárias, calculadas através das equações preconizadas pelas *Dietary Reference Intakes* - DRI (Institute of Medicine, 2002/2005); ² Mediana (mínimo e máximo).

Os pacientes portadores de leucemia mieloide aguda iniciaram a intervenção com uma deficiência mediana na ingestão energética de 9,5%. As medianas da ingestão proteica e de carboidratos estavam acima das recomendações da DRI (2002) para todas as faixas etárias estudadas. No entanto a ingestão de fibras estava muito inferior às recomendações.

Os dados da Tabela 9 apresentam a contribuição de energia e macronutrientes presentes no WPC e na maltodextrina, das faixas etária estudadas, para os pacientes que ingeriram 100% da dose recomendada de suplementação (2 sachês/dia) e para aqueles que ingeriram 50% do recomendado (1 sachê/dia).

TABELA 9. Contribuição energética e de macronutrientes, para as faixas etárias estudadas, de 100% ou 50% de suplementação com maltodextrina (MALTO) e WPC.

Grupo	Suplementação	Energia (Kcal) e Nutrientes (g)	Faixas Etárias				
			7 -12 (meses)	1 – 3 (anos)	4 – 8 (anos)	9 – 13 (anos)	14 – 19 (anos)
MALTO	100% (2 sachês/dia)	Energia	19,0	38,0	45,6	76,0	106,4
		Proteína	0	0	0	0	0
		Lipídio	0	0	0	0	0
		Carboidrato	4,75	9,5	11,4	19	26,6
	50% (1 sachê/dia)	Energia	9,5	19	22,8	38	53,2
		Proteína	0	0	0	0	0
		Lipídio	0	0	0	0	0
		Carboidrato	2,4	4,75	5,7	9,5	13,3
WPC	100% (2 sachês/dia)	Energia	17,1	34,2	42,8	77,0	102,6
		Proteína	2,75	5,5	6,9	12,4	16,5
		Lipídio	0,56	1,1	1,4	2,5	3,3
		Carboidrato	0,26	0,53	0,66	1,2	1,6
	50% (1 sachê/dia)	Energia	8,6	17,1	21,4	38,5	51,3
		Proteína	1,38	2,75	3,4	6,2	8,2
		Lipídio	0,28	0,55	0,7	1,2	1,6
		Carboidrato	0,13	0,26	0,33	0,6	0,8

É importante ressaltar que, em média, os pacientes dos dois grupos avaliados apresentaram uma ingestão dos suplementos de aproximadamente 50% do recomendado ao longo dos sessenta dias de intervenção.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados das necessidades energéticas diárias (NED) e ingestão alimentar de energia, proteína, lipídios, carboidratos e fibras de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.

No início da intervenção nutricional não houve diferença significativa nos valores medianos das NED (Kcal/dia), da ingestão de energia e dos demais nutrientes entre os grupos WPC e maltodextrina. Ambos os grupos iniciaram a intervenção com um valor mediano de ingestão energética inferior às suas necessidades.

Quanto à ingestão de proteínas, apesar de não haver diferença estatística entre as medianas dos dois grupos, pode-se observar que a mediana do grupo WPC foi superior as recomendações das DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002/2005) em T0 e T1 para todas as faixas etárias avaliadas.

Com 4 semanas (T1), os pacientes foram novamente avaliados. Nesse momento houve significância entre os grupos apenas em relação às necessidades energéticas diárias, as quais foram superiores para o grupo WPC. Em T2 verificou-se que a ingestão energética entre os grupos de estudo foi significativamente diferente, com uma mediana de aproximadamente 50% abaixo das NED recomendadas para o grupo WPC, além disso, houve diferença entre os grupos na ingestão de carboidratos.

A ingestão de fibras foi muito baixa nos dois grupos, porém apenas para o grupo WPC houve significância estatística no decorrer do estudo ($p = 0,05$).

TABELA 10. Necessidades energéticas diárias (NED) e ingestão alimentar de energia, proteína, lipídios, carboidratos e fibras de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.

Variáveis	Grupo	T0	T1	T2	p ²
NED (Kcal/dia)	Maltodextrina	1378,9 (721 – 2479,4)	1167,0 (634 – 1395)	1223,1 (562,8 – 2252,5)	0,549
	WPC	1436,6 (1167 – 1943,9)	1820,1 (1168, – 2305,9)	1435,2 (1162 – 1813)	0,165
	p³	0,673	0,006	0,482	
Energia (Kcal/dia)	Maltodextrina	1106,6 (245,2 – 2865,1)	1519,7 (466,1 – 3783,9)	1210,29 (546,6 – 2099,5)	0,846
	WPC	1310,3 (208,3 – 2194,1)	788,3 (272,3 – 1924,4)	756,2 (210,6 – 1088,4)	0,651
	p³	0,778	0,298	0,018	
Proteína (g/dia)	Maltodextrina	26,7 (5,6 – 111,9)	52,5 (13,8 – 118,3)	34,2 (14,9 – 67,9)	0,846
	WPC	61,65 (2,8 – 129,3)	51,8 (9,8 – 122,0)	30,3 (9,6 – 46,4)	0,368
	p³	0,526	0,908	0,277	
Lipídio (g/dia)	Maltodextrina	36,7 (9,7 – 106,1)	39,4 (14,2 – 130,7)	40,1 (16,7 – 84,1)	1,000
	WPC	34,21 (2,9 – 64,8)	21,7 (1,4 – 49,8)	28,3 (6,9 – 42,7)	0,651
	p³	0,725	0,247	0,085	
Carboidrato (g/dia)	Maltodextrina	153,6 (33,9 – 368,5)	217,0 (70,8 – 533,7)	177,3 (84,3 – 267,8)	0,607
	WPC	172,5 (42,8 – 318,4)	100,3 (19,3 – 246,8)	87,2 (27,4 – 152,2)	0,102
	p³	0,673	0,247	0,025	
Fibra (g/dia)	Maltodextrina	4,0 (0,2 – 15,3)	3,2 (0,4 – 13,0)	2,7 (1,4 – 19,9)	0,846
	WPC	6,3 (0,3 – 15,9)	1,95 (0,1 – 4,2)	3,6 (0,0 – 6,7)	0,05
	p³	0,275	0,296	0,749	

¹Mediana (mínimo e máximo); ² Valor de p calculado pelo Teste de Friedman compara a contribuição dos suplementos no decorrer do estudo; ³ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney compara os suplementos entre si em cada tempo avaliado.

Na avaliação da distribuição percentual dos macronutrientes, segundo as DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002/2005), a ingestão de carboidrato deve fornecer entre 45 a 65% das calorias ingeridas, a de proteínas, entre 5 a 20% (1 a 3 anos) ou 10 a 30% (4 a 18 anos) e a de gordura entre 30 a 40% (1 a 3 anos) ou 25 a 35% (4 a 18 anos), as medianas do % dos macronutrientes estavam adequadas em todos os tempos para os dois grupos (Figura 6).

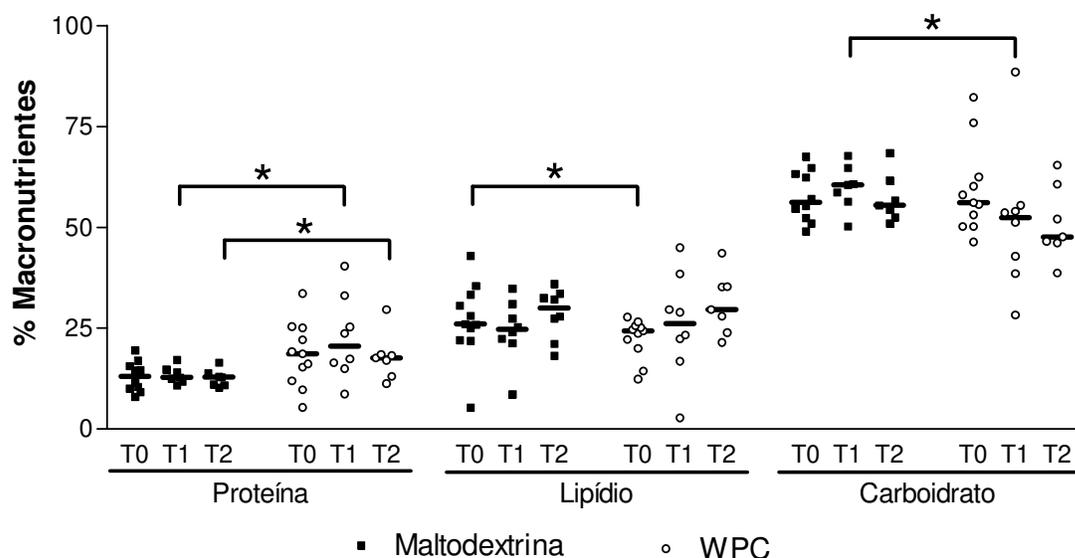


FIGURA 6. Distribuição % de macronutrientes dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

Houve diferença estatística entre os grupos WPC e maltodextrina nos percentuais de proteína em T1 ($p = 0,028$) e T2 ($p = 0,021$); de lipídios em T0 ($p = 0,029$) e de carboidratos em T1 ($p = 0,049$).

Embora os percentuais de distribuição dos macronutrientes estivessem adequados, é importante ressaltar que ao longo do estudo verificou-se que a quantidade calórica ingerida foi inferior ao recomendado, especialmente para o grupo WPC.

O percentual de adequação da ingestão dos micronutrientes, segundo recomendações das DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 2000, 2002), encontram-se descritos na Tabela 11.

TABELA 11. Adequação da ingestão alimentar dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.

% de Adequação	Grupo	T0	T1	T2	p ²
Cálcio	Maltodextrina	38,09 ¹ (11,6 – 136)	30,64 (7,8 – 76,2)	79,22 (15,4 – 231,3)	0,311
	WPC	25,15 (2,2 – 160,4)	17,17 (0,5 – 81,5)	15,48 (0,4 – 54,4)	
	p³	0,36	0,298	0,036	
Ferro	Maltodextrina	54,57 (2 – 171,3)	52,0 (17,1 – 147,1)	38,18 (12,7 – 95,0)	0,311
	WPC	75 (2,9 – 188,8)	28,56 (1,0 – 77,0)	29 (0,91 – 117,5)	
	p³	0,381	0,105	0,515	
Zinco	Maltodextrina	69,33 (3,3 – 145,6)	48,0 (10,0 – 356,7)	70,0 (3,33 – 130)	0,957
	WPC	60,0 (3,3 – 104)	48,38 (0,0 – 90)	33,75 (0,0 – 98,8)	
	p³	0,698	0,908	0,277	
Selênio	Maltodextrina	62,47 (1,5 – 210,3)	43,45 (0,0 – 312)	86,18 (0,0 – 247)	0,311
	WPC	150,67 (1,0 – 668)	41,93 (0,0 – 272)	54,67 (0,36 – 107)	
	p³	0,057	0,862	0,482	
Vitamina E	Maltodextrina	45,33 (2,9 – 139,3)	76,67 (0,0 – 148,6)	64,0 (36,7 – 118,3)	0,309
	WPC	48,57 (2,9 – 132)	27,1 (0,0 – 74,3)	29,33 (2,9 – 171,4)	
	p³	0,573	0,073	0,277	
Vitamina C	Maltodextrina	95,67 (21,3 – 900,3)	51,33 (0,0 – 623,1)	40,8 (11,5 – 196,2)	0,115
	WPC	83,6 (2,9 – 822)	6,2 (0,0 – 202,8)	9,33 (0,0 – 261,6)	
	p³	0,944	0,118	0,565	

¹Mediana (mínimo e máximo); ² Valor de p calculado pelo Teste de Friedman compara a contribuição dos suplementos no decorrer do estudo; ³ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney compara os suplementos entre si em cada tempo avaliado.

O percentual de adequação da ingestão dos micronutrientes, segundo DRIs (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 2000, 2002), estava inadequado (< 90%) para

a maioria dos nutrientes avaliados, com exceção do selênio em T0, no grupo WPC.

No início do ensaio clínico, no tempo T1 e em T2, não foi observada diferença significativa no % de adequação dos micronutrientes avaliados entre os grupos WPC e maltodextrina, com exceção do cálcio em T2 ($p = 0,036$), muito baixo para o grupo WPC.

5.3. Avaliação Bioquímica

5.3.1. Dosagem de Albumina e Pré-Albumina

As variações de referência dependem do método analítico, tipo de amostras e laboratório específico que executa o exame bioquímico (CARDOSO e MARTINS, 1998). Dessa forma os valores normais de referência utilizados pelo Laboratório de Bioquímica do Departamento de Patologia Clínica (DPC) do Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP são descritos a seguir:

Albumina:

5 dias a 14 anos: 3,8 a 5,4 g/dL

15 a 18 anos: 3,2 a 4,5 g/dL

Adulto: 3,4 a 4,8 g/dL

Pré-albumina: 20 a 40 mg/dL

As proteínas séricas proporcionam um índice mais sensível da desnutrição protéico-energética do que o refletido pelos dados antropométricos (YOUNG e HILL, 1978). De acordo com Cardoso e Martins (1998) valores abaixo do normal para albumina e pré-albumina representam:

Albumina:

- Desnutrição leve: 3,0 a 3,4 g/dL
- Desnutrição moderada: 2,1 a 2,9 g/dL
- Desnutrição grave: < 2,1 g/dL

Pré-albumina:

- Desnutrição leve: 10 a 15 mg/dL
- Desnutrição moderada: 5 a 10 mg/dL
- Desnutrição grave: < 5 mg/dL

Na Tabela 12 encontram-se os resultados da comparação dos níveis das proteínas séricas albumina e pré-albumina entre os pacientes com LMA e indivíduos saudáveis. Verificou-se que tanto os níveis de albumina como os de pré-albumina do grupo controle foram estatisticamente superiores aos níveis séricos dessas proteínas em pacientes com LMA.

TABELA 12. Comparação dos níveis de albumina sérica (g/dL) e pré-albumina sérica (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).

Proteínas Séricas		LMA (n = 20)	Controle (n = 23)
Albumina	Mediana	3,6	4,8
	Mínimo - Máximo	2,6 - 4,6	4,4 - 5,4
	p ¹		< 0,0001
Pré-albumina	Mediana	11,75	21,45
	Mínimo - Máximo	3,97 - 24,0	13,1 - 34,6
	p ¹		< 0,0001

¹ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney.

Nas Figuras 7 e 8 encontram-se os resultados de albumina e pré-albumina, respectivamente dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2) dos grupos maltodextrina e WPC.

Os valores de mediana para albumina (g/dL) do grupo maltodextrina nos três tempos analisados foram de 3,6 (normal); 3,1 (desnutrição leve); e 3,6 (normal). Para o grupo WPC as medianas foram de 3,6 (normal); 3,3 (normal apenas para indivíduos entre 15 a 18 anos, sendo classificado como desnutrição leve segundo referências da literatura) e 3,8 (normal).

Para os níveis de pré-albumina (mg/dL) os valores medianos encontrados em T0 foram de 11,6 (desnutrição leve) e 12,4 (desnutrição leve) para o grupo maltodextrina e WPC, respectivamente. Em T1 obteve-se o valor mediano de 12,5

(desnutrição leve) para os dois grupos e em T2 o valor mediano foi de 12,1 (desnutrição leve) e 15,2 (desnutrição leve), respectivamente.

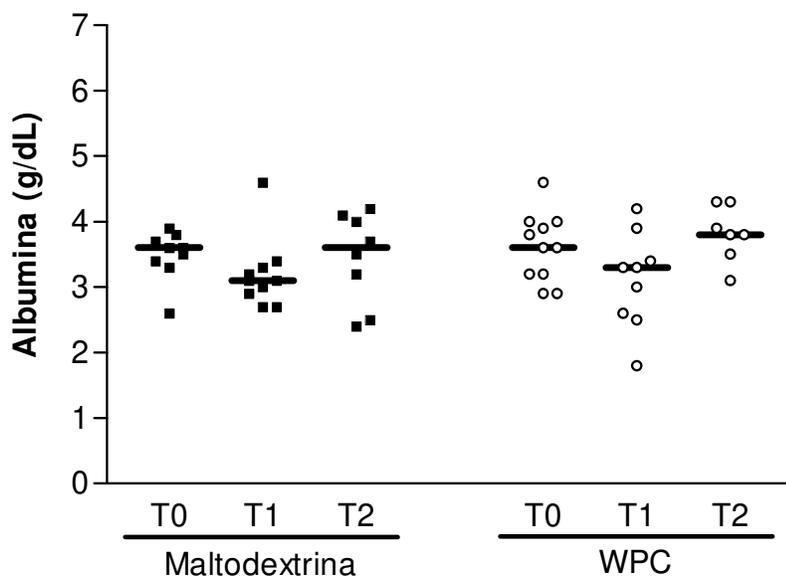


FIGURA 7. Albumina sérica (g/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).

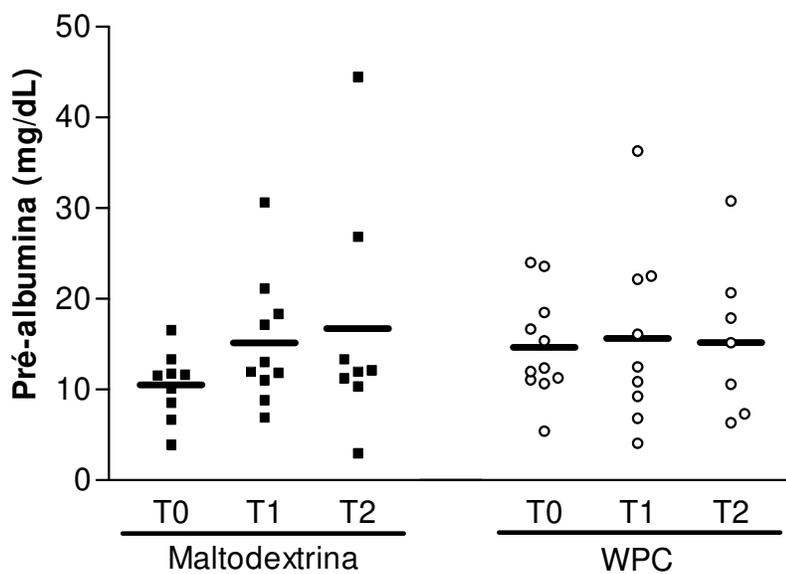


FIGURA 8. Pré-albumina sérica (mg/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (o).

Não houve diferença significativa entre as medianas das proteínas séricas (Figuras 7 e 8) dos grupos maltodextrina e WPC nos tempos avaliados T0, T1 e T2, bem como, no decorrer do estudo avaliando-se separadamente cada grupo.

5.3.2. Parâmetros Hematológicos

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da comparação dos parâmetros hematológicos entre os pacientes com LMA e os indivíduos saudáveis.

TABELA 13. Parâmetros hematológicos em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).

Parâmetros	LMA (n = 21)	Controle (n = 24)	p ²
Leucócitos (células x 10 ⁹ /L)	13,10 (1,1 – 494,0)	6,51 (1,79 – 15,11)	0,219
Linfócitos (células x 10 ⁹ /L)	2,30 (0,6 – 58,4)	2,80 (1,83 – 8,64)	0,368
Monócitos (células x 10 ⁹ /L)	1,30 (0,1 – 10,6)	0,45 (0,24 – 0,91)	0,308
Granulócitos (células x 10 ⁹ /L)	4,30 (0,1 – 48,6)	3,64 (1,91 – 5,57)	0,825
Eritrócitos (células x 10 ¹² /L)	2,55 (1,78 – 4,36)	4,82 (4,17 – 5,40)	< 0,0001
Hematócrito (%)	23,40 (16,6 – 36,6)	40,7 (34,1 – 47,2)	< 0,0001
Hemoglobina (g/dL)	7,70 (5,6 – 12,5)	13,35 (11,1 – 15,5)	< 0,0001
Plaquetas (células x 10 ⁹ /L)	38,00 (16,0 – 220,0)	307,0 (162,0 – 461,0)	< 0,0001

¹ Mediana (mínimo e máximo); ² Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney.

Não houve diferença estatística nas medianas dos níveis de leucócitos, refletindo-se também em suas sub-populações (linfócitos, monócitos e granulócitos), comparando-se os pacientes com LMA e o grupo controle saudável.

Através dos dados da Tabela 14 ressalta-se a superioridade estatística do grupo de indivíduos saudáveis em relação aos portadores de LMA no que se refere aos níveis de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas.

Na Tabela 14 encontram-se os resultados dos parâmetros hematológicos dos pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) dos grupos maltodextrina e WPC.

O número de leucócitos do grupo maltodextrina teve inicialmente seus valores medianos de 44,15 (1,1 a 494,0) células $\times 10^9/L$, no tempo T1 foi 2,95 (0,2 a 6,8) e em T2 a mediana foi de 1,9 (0,4 a 11,6) células $\times 10^9/L$. No grupo WPC as medianas foram: 4,3 (1,4 a 41,4); 2,0 (0,2 a 4,4) e 2,1 (1,2 a 4,7) células $\times 10^9/L$. Houve diferença significativa entre os grupos apenas no início da intervenção nutricional. Além disso, o grupo maltodextrina apresentou redução significativa no número de leucócitos entre T0 xT1 e entre o início e o final da intervenção (Tabela 14).

Em relação ao número de linfócitos, foi observada diminuição significativa entre o início e o final da intervenção no grupo maltodextrina ($p = 0,03$). No grupo WPC houve diminuição significativa apenas entre T0 e T1. O número de monócitos foi reduzido significativamente ($p = 0,032$) no decorrer do estudo apenas para o grupo maltodextrina.

Na série vermelha não houve diferença entre os grupos maltodextrina e WPC nos tempos T0, T1 e T2 nem ao longo do estudo. Verificou-se também que os valores medianos de eritrócitos (células $\times 10^{12}/L$), hematócrito (%) e hemoglobina (g/dL) ficaram abaixo do limite mínimo adequado para os dois grupos em todos os tempos avaliados.

TABELA 14. Parâmetros hematológicos em pacientes com LMA no início (T0), 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina e WPC.

Parâmetros	Grupo	T0	T1	T2	p ²
Leucócitos (células x 10 ⁹ /L)	Maltodextrina	44,15 ^a (1,1 – 494,0) ¹	2,95 ^b (0,2 – 6,8)	1,9 ^b (0,4 – 11,6)	0,013
	WPC	4,3 (1,4 – 41,4)	2,0 (0,2 – 4,4)	2,1 (1,2 – 4,7)	0,18
	p³	0,02	0,12	0,874	
Linfócitos (células x 10 ⁹ /L)	Maltodextrina	8,5 ^a (1,0 – 58,4)	1,4 ^{ab} (1,0 – 3,0)	0,42 ^b (0,2 – 2,80)	0,03
	WPC	1,8 ^a (0,6 – 9,4)	0,88 ^b (0,1 – 2,4)	1,4 ^{ab} (0,3 – 2,7)	0,012
	p³	0,04	0,005	0,184	
Monócitos (células x 10 ⁹ /L)	Maltodextrina	5,1 ^{ab} (0,1 – 10,6)	0,2 ^b (0,0 – 0,6)	0,0 ^c (0,0 – 1,2)	0,032
	WPC	0,3 (0,2 – 7,6)	0,0 (0,0 – 0,4)	0,3 (0,1 – 1,89)	0,115
	p³	0,077	0,082	0,081	
Granulócitos (células x 10 ⁹ /L)	Maltodextrina	9,85 (0,4 – 48,6)	1,3 (0,1 – 3,4)	1,6 (0,1 – 8,0)	0,165
	WPC	2,5 (0,1 – 24,4)	0,8 (0,1 – 2,2)	0,68 (0,2 – 1,2)	0,223
	p³	0,092	0,183	0,098	
Eritrócitos (células x 10 ¹² /L)	Maltodextrina	2,44 (1,78 – 3,96)	2,94 (2,2 – 3,8)	2,49 (1,87 – 4,03)	0,169
	WPC	2,74 (2,06 – 4,36)	3,13 (1,72 – 3,67)	2,78 (2,25 – 3,78)	0,651
	p³	0,223	0,656	0,621	
Hematócrito (%)	Maltodextrina	19,65 (16,6 – 32,5)	25,9 (18,1 – 31,1)	20,0 (15,9 – 36,2)	0,459
	WPC	25,2 (17,9 – 36,6)	26,9 (14,4 – 30,9)	22,5 (19,2 – 31,4)	0,565
	p³	0,127	0,678	0,932	
Hemoglobina (g/dL)	Maltodextrina	6,8 (5,6 – 11,0)	8,9 (6,2 – 11,1)	7,3 (5,8 – 12,7)	0,097
	WPC	8,5 (6,1 – 12,5)	9,2 (5,3 – 10,8)	7,9 (6,6 – 11,0)	0,368
	p³	0,059	0,767	0,953	
Plaquetas (células x 10 ⁹ /L)	Maltodextrina	48,00 (21,0 – 220,0)	129,5 (13 – 535)	136,0 (19,0 – 366,0)	0,264
	WPC	33,0 (16,0 – 159,0)	177,0 (2,0 – 239,0)	73,0 (8,0 – 280,0)	0,067
	p³	0,138	0,87	0,315	

¹Mediana (mínimo e máximo); ² Valor de p calculado pelo Teste de Friedman compara os suplementos no decorrer do estudo; ³ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney compara os suplementos entre si em cada tempo avaliado. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo Teste de Comparações Múltiplas.

Os valores medianos do Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH) e da Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) estavam dentro dos limites de normalidade para os grupos WPC e placebo em todos os tempos avaliados.

No início do ensaio clínico os valores medianos das plaquetas encontravam-se muito abaixo do normal (150 a 450 células $\times 10^9/L$), (WILLIAMS, MORRIS e NELSON, 1995) nos dois grupos. Apenas no grupo WPC no tempo T1 os valores de plaquetas estavam acima de 150.000 células/ mm^3 . Não foram observadas diferenças entre os tempos nos grupos. Quando os níveis de plaquetas diminuía consideravelmente, os pacientes recebiam transfusões de plaquetas como parte do tratamento e acompanhamento clínico.

5.3.3. Glutaciona Eritrocitária

A concentração mediana de GSH nos eritrócitos dos pacientes com LMA diferiu significativamente ($p < 0,0001$) dos valores observados nos indivíduos saudáveis. A concentração de GSH foi de 82,88 (61,94 a 151,77) mg/dL nos pacientes com LMA e de 61,72 (38,03 a 80,75) mg/dL nos indivíduos do controle (Figura 9).

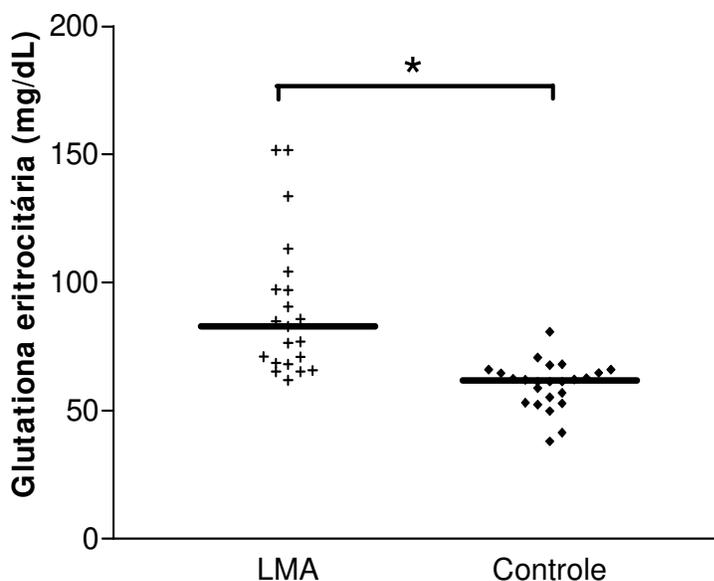


FIGURA 9. Concentração de glutaciona eritrocitária (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).

Na Figura 10 encontram-se os resultados de glutatona eritrocitária dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2) com maltodextrina e WPC.

A suplementação com WPC não evitou a redução significativa ($p = 0,028$) de GSH entre T0 e T2 (Figura 10). Entretanto, essa redução significativa já foi observada entre T0 e T1 ($p = 0,03$) para o placebo.

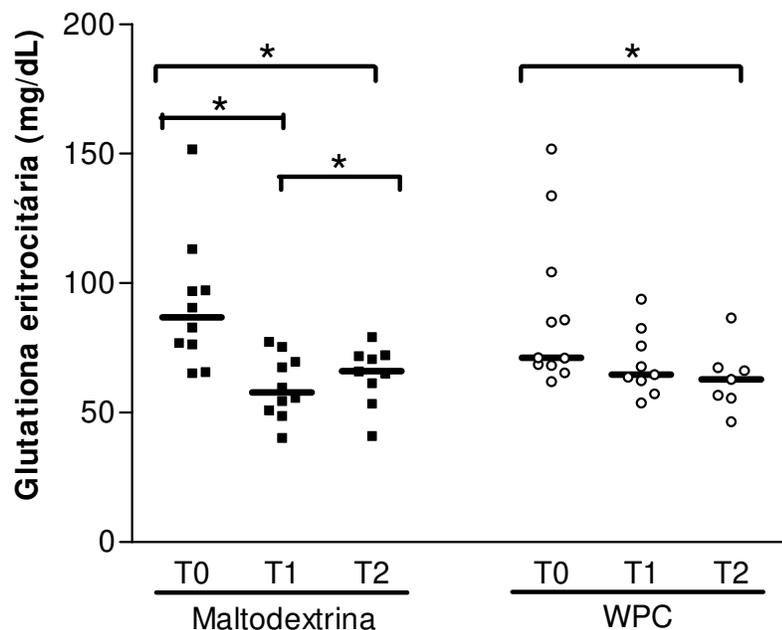


FIGURA 10. Concentração de glutatona reduzida em eritrócitos (mg/dL) dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○). * Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Comparações Múltiplas.

5.3.4. Dosagem de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico e no plasma

A Tabela 15 apresenta os resultados da comparação da produção de citocinas entre os pacientes com LMA e os indivíduos saudáveis, determinadas em três condições diferentes.

TABELA 15. Concentração de citocinas (pg/mL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).

Citocinas	Grupo	Condições		
		Espontânea	BCG	PHA
TNF- α	LMA	40,49 ¹ (0,0 – 418,9)	831,47 (41,01 – 15825,3)	683,17 (38,6 – 1977,2)
	Controle	22,42 (0,0 – 316,7)	4800,42 (1408,7 – 13101,1)	986,61 (88,7 – 2782,1)
	p²	0,011	< 0,0001	0,052
IL-6	LMA	455,64 (0,0 – 10328,2)	4807,2 (41 – 31186,7)	3010,4 (54,2 – 28250)
	Controle	736,17 (19,8 – 5044,4)	28961,67 (25176,7 – 293344,6)	9654,65 (1904,4 – 29051,1)
	p²	0,197	< 0,0001	0,002
IL-10	LMA	0,0 (0,0 – 1796,8)	124,54 (0,0 – 1783,05)	393,80 (63,8 – 1127,9)
	Controle	0,0 (0,0 – 119,7)	615,46 (118,6 – 2204,9)	627,52 (61,5 – 1465,2)
	p²	0,065	0,003	0,284
IFN- γ	LMA	23,17 (0,0 – 70,6)	98,71 (0,0 – 1665)	150,23 (0,0 – 3913,8)
	Controle	0,0 (0,0 – 48,9)	676,77 (0,0 – 1935,3)	87,96 (0,0 – 630,5)
	p²	0,012	0,003	0,273
TGF- β 2	LMA		90,78 ³ (0,0 – 1214,7)	
	Controle		96,15 (25,4 – 293,2)	
	p²		0,394	
IL-8	LMA		71,12 ³ (0,0 – 829,24)	
	Controle		57,71 (0,0 – 446,9)	
	p²		0,052	

¹ Mediana, mínimo e máximo; ² Teste de Mann-Whitney; ³ Valores determinados no plasma.

Na produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ verificou-se que os pacientes com LMA apresentaram superioridade estatística em relação ao controle de indivíduos saudáveis, não ocorrendo diferença estatística para IL-6 e IL-10.

Em relação ao estímulo específico com BCG, houve diferença estatística significativa entre o controle e os pacientes com LMA para todas as citocinas avaliadas. Observou-se que células de indivíduos saudáveis apresentaram maior produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ quando estimulados por BCG. No estímulo com PHA apenas a produção de IL-6 diferiu significativamente entre pacientes com LMA versus controle, sendo maior para esse último grupo.

As citocinas TGF- β 2 e IL-8, dosadas no plasma, não apresentaram diferença estatística significativa entre o controle saudável e os pacientes com LMA.

Não houve efeito da suplementação entre os grupos WPC e placebo, em todos os tempos avaliados, nas produções de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de culturas das células não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA (Figuras 11, 12 e 13). Assim como não houve diferença nas concentrações de TGF- β e IL-8 no plasma (Figura 15 e 16).

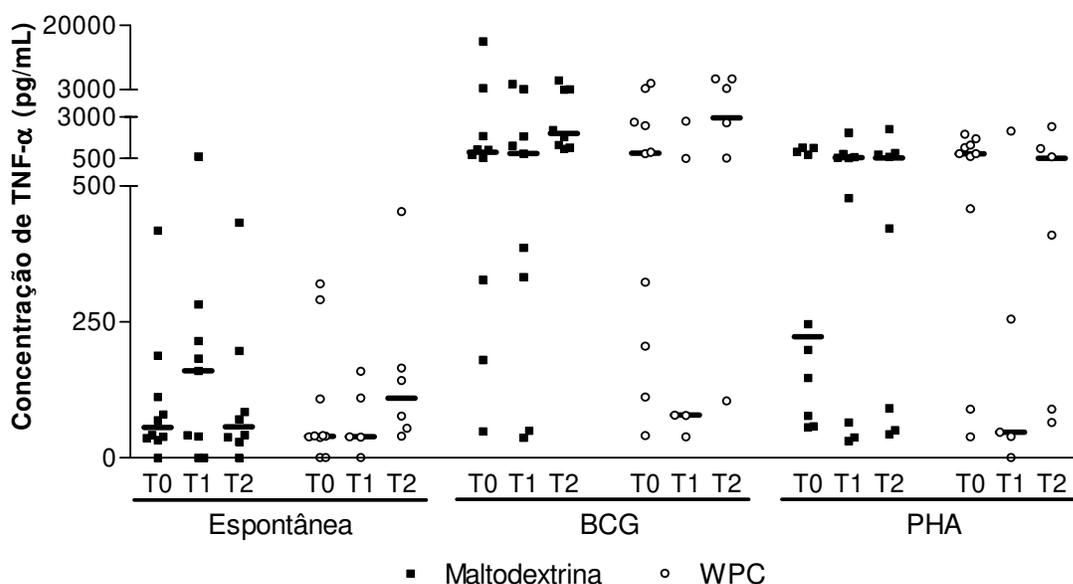


FIGURA 11. Concentração de TNF- α de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

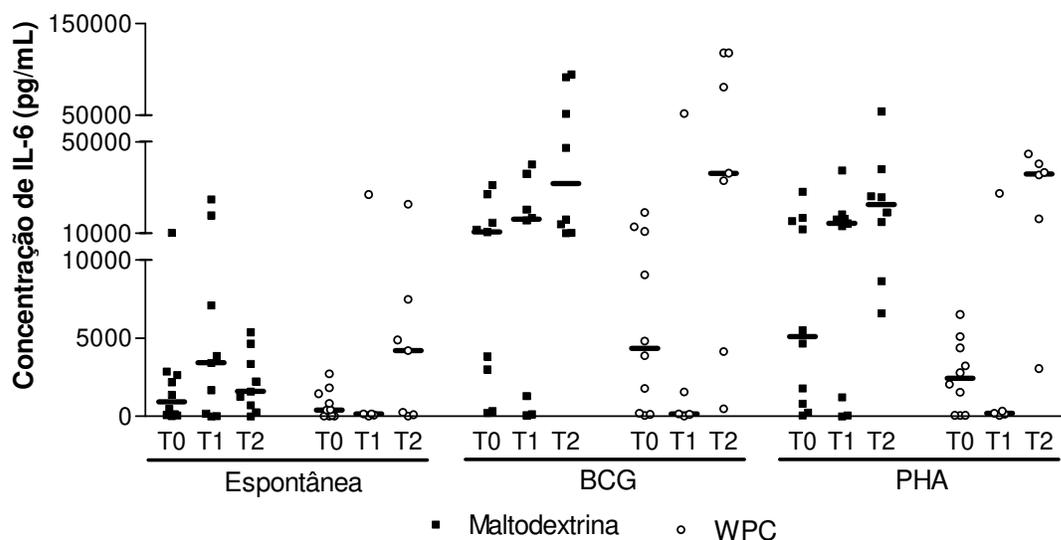


FIGURA 12. Concentração de IL-6 de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

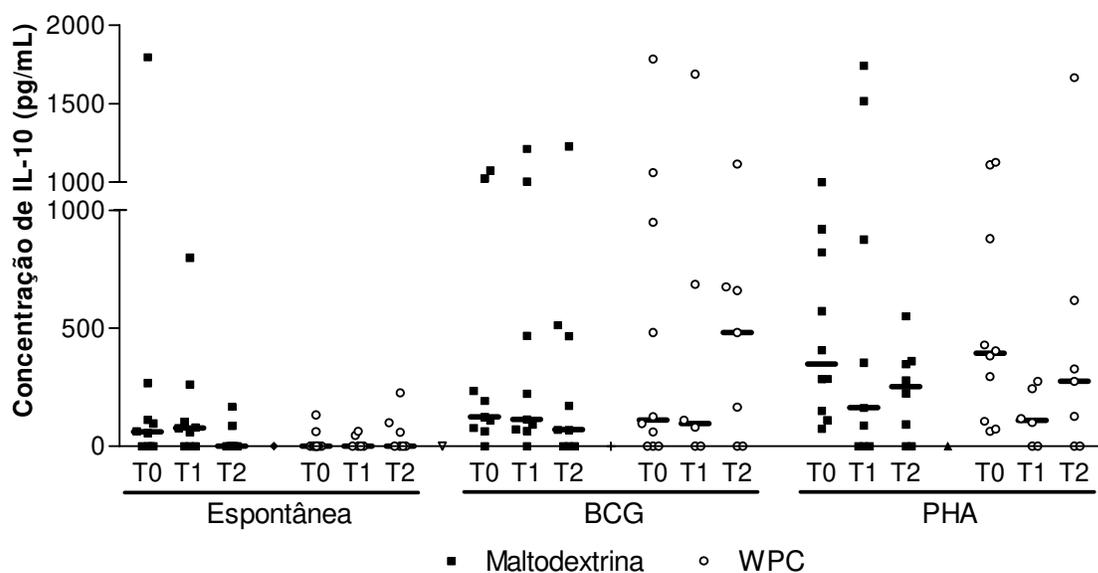


FIGURA 13. Concentração de IL-10 de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

Em relação ao IFN- γ , houve diferença significativa no início da intervenção nutricional entre os grupos WPC e placebo apenas no estímulo com PHA (Figura 14).

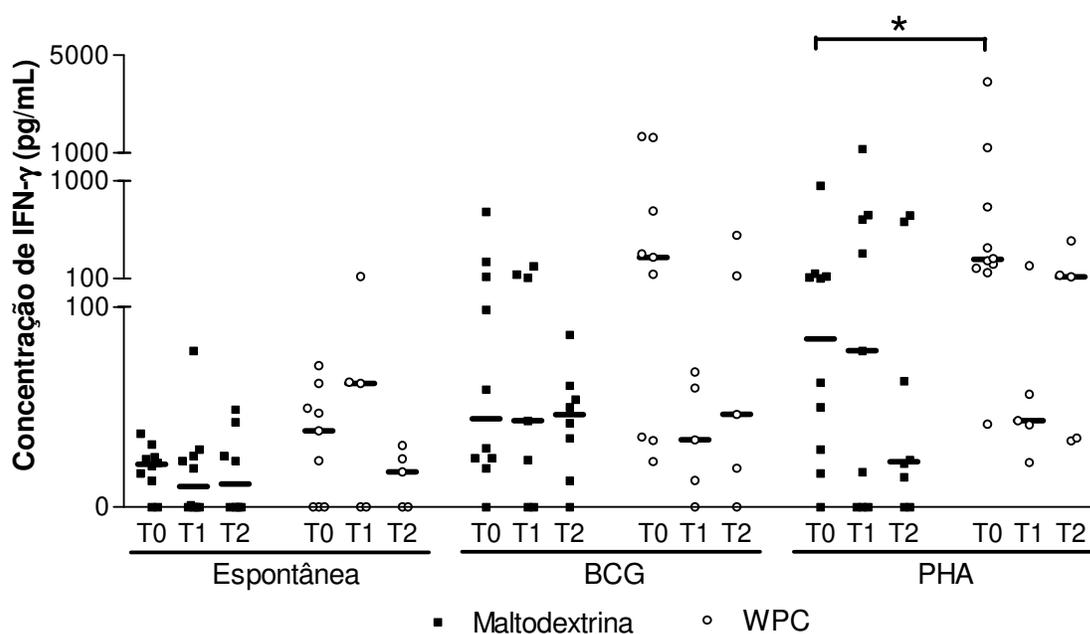


FIGURA 14. Concentração de IFN- γ de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

* Diferença significativa $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

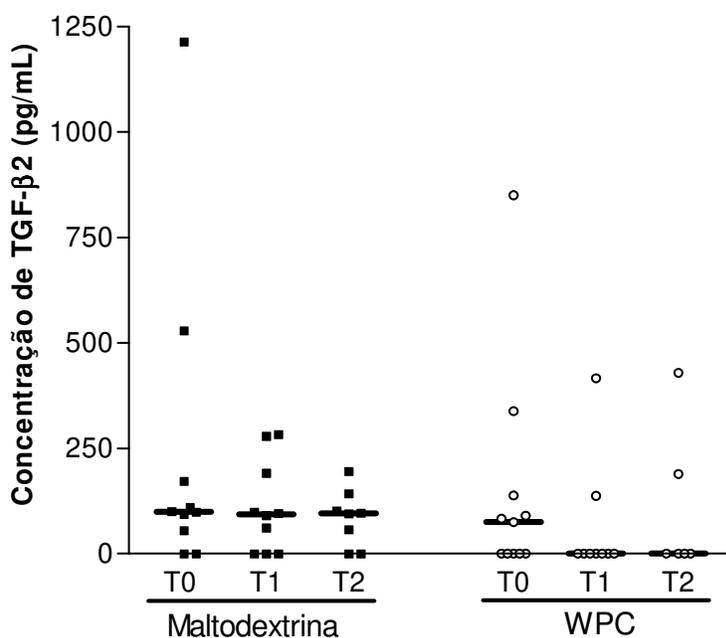


FIGURA 15. Concentração de TGF- β 2 presente no plasma de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

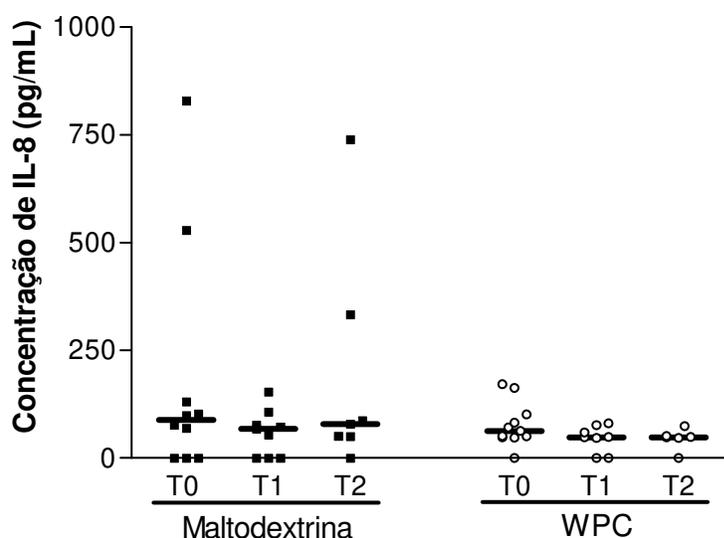


FIGURA 16. Concentração de IL-8 presente no plasma de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina (■) e WPC (○).

5.3.5. Dosagem de IgA salivar

Na Tabela 16 encontram-se os resultados da comparação dos níveis de IgA salivar entre os pacientes com LMA e indivíduos saudáveis.

TABELA 16. Comparação dos níveis de IgA salivar (mg/dL) em pacientes com LMA e em indivíduos saudáveis (controle).

IgA salivar (mg/dL)	LMA (n = 18)	Controle (n = 22)
Mediana	6,5	9,05
Mínimo - Máximo	1,0 - 17,4	1,8 - 25,1
p ¹	0,693	

¹ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney.

Os valores de IgA salivar não diferiram estatisticamente entre os pacientes com LMA e os indivíduos saudáveis.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 17 em relação os níveis de IgA salivar, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos WPC e placebo, assim como não houve diferença ao longo do estudo para cada

grupo individualmente apesar dos valores medianos terem diminuído entre o início e o fim da intervenção nutricional.

Os valores de referência para a imunoglobulina A na saliva de crianças de até 6 anos é de 1,7 a 9,1 mg/dL e para indivíduos com mais de 6 anos de idade é de 6,0 a 26,9 mg/dL. A mediana da idade dos pacientes do grupo WPC foi de 9,2 (4,3 a 19,8) anos, estando adequado os valores medianos de IgA salivar apenas no início da intervenção. No caso dos pacientes do grupo placebo a mediana foi de 5 (0,58 a 17,25) anos e portanto ficou dentro dos valores de normalidade no início e no final da intervenção.

TABELA 17. Níveis de IgA salivar (mg/dL) de pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção (T2) com maltodextrina ou WPC.

Avaliações	Maltodextrina	WPC	p¹
T0	6,6 (1,0 – 17,4)	6,4 (2,8 – 16,5)	0,651
T1	1,4 (1,0 – 30,0)	2,5 (1,4 – 6,7)	0,643
T2	3,4 (1,0 – 4,9)	2,5 (1,0 – 4,05)	0,845
p ²	0,174	0,135	

¹ Valor de p calculado pelo Teste de Mann-Whitney compara os suplementos entre si em cada tempo avaliado; ² Valor de p calculado pelo Teste de Friedman compara os suplementos no decorrer do estudo.

5.4. Avaliação Clínica

5.4.1. Avaliação da Evolução da Mucosite

Todos os pacientes diagnosticados com LMA participantes do estudo tiveram sua evolução clínica, especialmente a presença, severidade e duração da mucosite, acompanhada pela pesquisadora, uma vez que o objetivo principal do ensaio clínico foi avaliar os possíveis efeitos da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite bovino sobre os efeitos tóxicos da mucosite.

Na Tabela 18 encontram-se descritos o número de dias e seu respectivo percentual dos graus de mucosite que cada paciente apresentou ao longo de sua participação no estudo. Através desses resultados pode-se avaliar a presença, severidade e duração da mucosite.

TABELA 18. Avaliação da evolução da mucosite (nº de dias e percentual) dos pacientes com LMA durante a intervenção nutricional.

Pacientes	Graus de Mucosite									
	Grau 0		Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 4	
	Nº dias	%	Nº dias	%	Nº dias	%	Nº dias	%	Nº dias	%
1	17	56,67	6	20,00	5	16,67	1	3,33	0	0,00
2	35	58,33	10	16,67	14	23,33	1	1,67	0	0,00
3	10	27,03	1	2,70	3	8,11	21	56,76	2	5,41
4	40	66,67	4	6,67	9	15,00	6	10,00	1	1,67
5	35	58,33	2	3,33	8	13,33	7	11,67	8	13,33
6	42	70,00	3	5,00	10	16,67	2	3,33	3	5,00
7	40	66,67	8	13,33	5	8,33	4	6,67	3	5,00
8	38	63,33	5	8,33	14	23,33	3	5,00	0	0,00
9	36	60,00	9	15,00	8	13,33	4	6,67	3	5,00
10	30	50,00	5	8,33	11	18,33	11	18,33	3	5,00
11	30	50,00	7	11,67	11	18,33	8	13,33	4	6,67
12	56	93,33	4	6,67	0	0,00	0	0,00	0	0,00
13	49	81,67	3	5,00	8	13,33	0	0,00	0	0,00
14	33	55,00	7	11,67	8	13,33	7	11,67	5	8,33
15	53	88,33	1	1,67	6	10,00	0	0,00	0	0,00
16	38	63,33	3	5,00	7	11,67	11	18,33	1	1,67
17	40	66,67	4	6,67	8	13,33	8	13,33	0	0,00
18	5	21,74	0	0,00	1	4,35	10	43,48	7	30,43
19	0	0,00	2	8,70	6	26,09	9	39,13	6	26,09
20	42	70,00	11	18,33	1	1,67	6	10,00	0	0,00
21	41	68,33	4	6,67	5	8,33	10	16,67	0	0,00

Os pacientes estão ordenados pela ordem cronológica de entrada na pesquisa, sendo que não completaram os sessenta dias de intervenção nutricional os seguintes indivíduos: nº 1 (30 dias), nº 3 (37 dias), nº 18 (23 dias) e nº 19 (23 dias). Com exceção do paciente nº 1, os demais apresentaram mucosite de moderada a grave com predomínio do grau 3.

Todos os pacientes ficaram 50% ou mais do tempo da intervenção nutricional sem apresentar mucosite. Sendo que dos 21 pacientes, 12 apresentaram mucosite grau 4 por um período que variou entre 1 a 8 dias

consecutivos ou não. A mucosite grau 2 foi mais prevalente para a maior parte dos pacientes estudados (Tabela 18).

Outra forma de avaliar a presença e severidade da mucosite encontra-se apresentada na Tabela 19.

TABELA 19. Percentual do grau de mucosite dos pacientes com LMA no início (T0), após 30 dias (T1) e ao final da intervenção nutricional (T2).

Grau de Mucosite	T0		T1		T2	
	Frequência	%	Frequência	%	Frequência	%
0	21	100	15	78,95	13	76,47
1	0	0	2	10,53	0	0
2	0		1	5,26	4	23,53
3	0	0	1	5,26	0	0
4	0	0	0	0	0	0

Trinta dias após o início (T1), de 19 pacientes avaliados, 15 estavam sem mucosite e 4 apresentavam grau 1, 2 ou 3 de mucosite. Na avaliação final, de 17 pacientes 4 apresentavam mucosite (grau 2).

Para se avaliar o possível efeito da suplementação com WPC sobre a presença e severidade da mucosite entre os pacientes com LMA dos dois grupos estudados foi elaborada a Tabela 20.

Os grupos placebo e WPC não diferiram estatisticamente quando comparados em relação à presença e severidade da mucosite dos pacientes com LMA durante os sessenta primeiros dias do tratamento quimioterápico.

Entretanto, quando se analisou apenas o % de tempo em que os pacientes apresentaram mucosite (desconsiderando o grau 0), observou-se que as maiores incidências para o placebo foram os graus 2 e 3 enquanto para o grupo WPC foram os graus 1 e 2.

TABELA 20. Mediana do % de tempo em que os pacientes com LMA dos grupos maltodextrina e WPC permaneceram em cada grau de mucosite.

Graus de Mucosite	Maltodextrina		WPC		p ¹
	Mediana	Mín. – Máx.	Mediana	Mín. – Máx.	
0	66,67	27,03 – 93,33	59,16	21,74 – 70,00	0,240
1	6,67	1,67 – 18,33	8,51	3,33 – 20,00	0,159
2	13,33	1,67 – 18,33	16,67	4,35 – 26,09	0,168
3	13,33	10,00 – 56,76	6,67	1,67 – 43,48	0,220
4	5,41	1,67 – 8,33	5,00	5,0 – 30,43	0,362

¹ Valores de p calculados pelo teste de Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM HUMANOS

O presente estudo buscou avaliar a influência da suplementação com proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β e lactoferrina em pacientes pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda comparados a um grupo placebo (maltodextrina) sobre: estado nutricional; adequação da ingestão alimentar; concentração de glutatona eritrocitária e resposta do sistema imunológico (parâmetros hematológicos, produção de imunoglobulina A salivar e produção de citocinas em resposta a BCG e a PHA) e a evolução clínica da mucosite. Além disso, comparar os resultados de análises bioquímicas com um grupo controle de indivíduos saudáveis da mesma faixa etária.

Segundo Tazi *et al.* (2008) a avaliação nutricional (AN) é essencial na análise inicial em crianças e adolescentes submetidos à terapia antineoplásica, permitindo a identificação de seu estado nutricional (EN).

A determinação precoce do grau de desnutrição ou de risco nutricional permite estabelecer medidas de intervenção contribuindo para melhor qualidade de vida e sobrevida dos pacientes pediátricos durante o tratamento do câncer (SIGULEM, DEVINCENZI e LESSA, 2000).

A partir dos resultados de medidas antropométricas e de composição corporal verificou-se que mais de 80% dos indivíduos com LMA estudados estavam com o EN adequado no início da intervenção nutricional, ou seja, no

momento do diagnóstico da doença. Esses dados contrastam com os resultados encontrados em crianças portadoras de leucemia linfocítica aguda (LLA) quando avaliadas no momento do diagnóstico em relação ao seu EN. Borim *et al.* (2000) verificaram que 52,7% das crianças estavam eutróficas e 47,3% estavam desnutridas. Os índices antropométricos peso/estatura, estatura/idade e peso/idade estavam 21%, 34,2% e 31,5%, respectivamente, abaixo da normalidade.

A baixa incidência de desnutrição no momento do diagnóstico de leucemia mieloide aguda da presente pesquisa também foi encontrada em outro estudo com 23 crianças com LLA e/ou LMA. Nesse trabalho os autores verificaram que no diagnóstico as crianças não estavam desnutridas (SGARBIERI, FISBERG e TONE, 1999).

Em indivíduos pediátricos com câncer, o peso e a altura são medidas antropométricas muito usadas para o diagnóstico do EN. Outros parâmetros importantes para auxiliar o diagnóstico nutricional em oncologia pediátrica incluem as medidas da prega cutânea triptal (PCT), circunferência muscular do braço (CMB), avaliação de dados bioquímicos, clínicos e dietéticos (KENT-SMITH e MARTINS, 2004).

Na presente pesquisa observou-se no grupo placebo uma redução significativa dos valores das medianas do peso corporal dos pacientes no decorrer do estudo: 20,05 (9 a 68,5) Kg; 17,38 (8 a 62) Kg e 15 (7,2 a 60) Kg. Por outro lado, para o grupo WPC não houve diferença significativa durante os 30 primeiros dias do tratamento, com um aumento estatisticamente significativo quando se comparou a avaliação inicial (mediana de 31,2 Kg) e a final (mediana de 32,8 Kg) do peso. Em oposição a esse resultado, outro estudo de intervenção dietética realizado por Garófolo, Lopez e Petrilli (2002) com pacientes portadores de osteossarcoma verificou-se redução significativa na média de adequação sobre o peso ideal.

A proteína do soro de leite promoveu uma melhora significativa nas medianas dos escores Z dos índices antropométricos estatura/idade e IMC/idade

avaliados entre o início e o final da intervenção nutricional. O mesmo não aconteceu com o grupo placebo, no qual houve uma redução significativa nos valores medianos dos escores Z desses índices.

Ao longo do estudo não houve alteração da classificação do estado nutricional dos pacientes com LMA de acordo com o índice estatura/idade. A partir do índice IMC/idade observou-se um aumento de desnutrição entre a população estudada no tempo T1 (5,6%) e no final da intervenção (14,3%).

Em estudo publicado com 20 adolescentes apresentando osteossarcoma, verificou-se um aumento de 10% na prevalência de DEP através do IMC e das pregas cutâneas do tríceps e 15% através da CMB, quando comparados o 1º com o 3º mês de tratamento (GARÓFOLO, LOPEZ e PETRILLI, 2002).

No presente estudo não houve aumento na prevalência de desnutrição avaliada através das pregas cutâneas tricipital e subescapular, bem como pelo seu somatório. Já os dados de CMB revelaram um aumento do risco de desnutrição de 7,8% entre o início e o tempo 1 (30 dias) e 7,9% entre T1 e o T2 (60 dias), totalizando entre o início e o fim da intervenção nutricional um aumento de 15,7%. O quadro de risco de desnutrição foi mais evidente através da medida da CB onde os percentuais ao longo do estudo foram de: 15%; 44,4% e 50%.

Na pesquisa em pauta, não foi observada influência da intervenção nutricional com suplemento alimentar contendo proteínas do soro do leite bovino sobre a composição corporal dos pacientes com LMA. Uma provável justificativa para os resultados encontrados poderia ser que o tempo de suplementação de 2 meses tenha sido insuficiente para promover alterações na composição corporal.

A desnutrição, particularmente a protéico-calórica, pode influenciar na tolerância à terapia do câncer, aumentar o risco de co-morbidades e influenciar a sobrevivência e a sobrevida do paciente com câncer (SALA, PENCHARZ e BARR, 2004). O estado nutricional do indivíduo com câncer poderá se refletir nos níveis séricos de proteína podendo afetar os resultados do tratamento (YU *et al.*, 1994; MERRIT *et al.*, 1985).

As proteínas séricas têm sido consideradas na prática diária, indicadores sensíveis de complicações associadas à desnutrição. Entretanto, existem fatores, independentes dos fatores nutricionais, que podem modificar os níveis de proteínas séricas, como por exemplo: estado de hidratação, redução da síntese hepática, alterações da permeabilidade capilar por infecção ou carência de zinco, processos infecciosos, enteropatias, doenças hepáticas e renais, catabolismo aumentado como em períodos de estresse, hipermetabolismo e algumas neoplasias (BOTTONI *et al.*, 2000; VITOLLO, 2008).

Os resultados das medianas de albumina (4,8 g/dL) e pré-albumina (21,45 mg/dL) do controle de crianças e adolescentes saudáveis foram estatisticamente superiores ($p < 0,0001$) aos valores encontrados para os pacientes com LMA. Esses resultados refletem as diferenças esperadas entre o EN de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer.

Nos resultados da pesquisa ora apresentada, os valores medianos da albumina foram classificados como desnutrição leve (3,0 a 3,4 g/dL) apenas no tempo T1 para ambos os grupos. Já os níveis de pré-albumina revelaram uma classificação de desnutrição leve (10 a 15mg/dL) para os pacientes dos grupos maltodextrina e WPC em todos os tempos analisados.

Em estudo realizado com 226 pacientes oncológicos adultos Marín Caro e colaboradores (2008) constataram que 32% da população estudada apresentou concentração de albumina entre 3,0 a 3,5 g/dL (classificação de desnutrição leve), existindo uma correlação negativa, entre esses níveis de proteínas e dificuldades com a alimentação.

As necessidades de energia e nutrientes para indivíduos pediátricos variam de acordo com a faixa etária, sexo, peso e estatura devendo proporcionar o crescimento e desenvolvimento adequados e a manutenção de um bom estado de saúde. Apesar das necessidades nutricionais aumentadas, as recomendações para indivíduos pediátricos com câncer são as mesmas das crianças saudáveis (KENT-SMITH e MARTINS, 2004; BRASIL, 2009).

Pacientes gravemente doentes são acometidos por alterações metabólicas dos carboidratos, lipídios e proteínas. Tais alterações promovem aumento nas necessidades energéticas e catabolismo protéico, contribuindo para alterações imunológicas e gastrointestinais (GARÓFOLO, 2005).

De acordo com o Consenso Nacional de Nutrição Oncológica (BRASIL, 2009), a determinação das necessidades nutricionais pode ser obtida através de várias equações, não existindo na literatura uma recomendação específica estabelecida para a população pediátrica submetida à quimioterapia e radioterapia. Dessa forma, baseando-se na prática clínica, o consenso adotou, entre outras opções, para o uso do cálculo das necessidades calóricas a equação da DRI (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006), a qual foi utilizada na presente pesquisa.

Embora no presente estudo os percentuais de distribuição dos macronutrientes estivessem adequados ao longo do período de suplementação para o grupo suplementado com WPC e para o grupo placebo, verificou-se que a quantidade calórica ingerida não estava adequada às necessidades recomendadas, especialmente para o grupo WPC. Isto de fato está de acordo com a literatura, na qual estudos avaliaram durante o ciclo da quimioterapia, crianças e adolescentes com câncer, os quais apresentaram redução de 40 a 50% de sua ingestão habitual (PINHO *et al.*, 1997; GARÓFOLO *et al.*, 1998).

Pacientes com câncer apresentam alto turnover de proteínas associado ao aumento na taxa catabólica de proteínas musculares, que se reflete no aumento da excreção de nitrogênio urinário e a presença de balanço nitrogenado negativo. Diferentes vias proteolíticas são responsáveis pelo catabolismo do músculo esquelético, sendo que no câncer a principal via é a ubiquitina dependente de energia. Este processo é independente da quantidade de proteína consumida, portanto, a suplementação nutricional pode não reverter o catabolismo muscular presente nos pacientes oncológicos (TISDALE, 2001).

No presente estudo sugere-se que a suplementação com WPC tenha sido eficiente, evitando o catabolismo protéico, uma vez que promoveu aumento nas

medianas do peso corporal dos pacientes entre T0 e T2, o que não foi verificado no grupo placebo. As proteínas do soro do leite bovino são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, sendo consideradas de rápida metabolização, muito adequadas para situações de estresses metabólicos (SGARBIERI, 2004). Adicionalmente, o WPC possui um excedente de aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina, leucina e isoleucina (SLOAN, 2002), demonstrado na Tabela 2, bem como, através do seu excelente escore químico de aminoácidos essenciais apresentado na Tabela 3.

No presente estudo a mediana da ingestão proteica em g/dia nos tempos de avaliação T0, T1 e T2 para o grupo da proteína do soro de leite foi de: 61,6; 51,8 e 30,3 g/dia. Portanto, apenas em T2 a ingestão proteica estaria inferior ao recomendado pela DRI (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002) e especificamente para os pacientes acima de 14 anos, estando adequada para as demais faixas etárias.

Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer apresenta alguma dificuldade para se alimentar, mais de 50% necessita de acompanhamento nutricional e controle dos sintomas que interferem na ingestão de alimentos e cerca de 30% necessitam de suplemento nutricional (MARÍN CARO *et al.*, 2008).

O tratamento quimioterápico resulta em toxicidade para o trato gastrointestinal, com o aparecimento de efeitos adversos como anorexia, náuseas, vômitos, mucosite, diarreia, xerostomia, entre outros. Portanto, a ingestão oral nesses pacientes é frequentemente insatisfatória e a intervenção nutricional através da orientação dietética e da prescrição de suplementos é necessária para todos esses pacientes conforme preconiza a *American Society of Parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN, 2007).

Existem poucos estudos bem desenhados que avaliam o efeito de suplementos nutricionais orais em pacientes com caquexia causada pelo câncer. Bauer e colaboradores (2005) examinaram o efeito da adesão nutricional na ingestão e composição corporal em pacientes com câncer de pâncreas. Duzentos pacientes receberam um suplemento oral rico em proteínas e calorias acrescidos

ou não de ácidos graxos ômega-3 em um estudo randomizado, multicêntrico com duração de 8 semanas. Houve diferença significativa na ingestão de calorias, proteínas e no peso corporal entre os pacientes com boa adesão à prescrição nutricional em contraposição aos pacientes que não aderiram à suplementação. Neste estudo ficou evidente que a regularidade na ingestão do suplemento foi um fator decisivo para uma evolução favorável dos pacientes com câncer.

Esse fato foi constatado na pesquisa ora apresentada, uma vez que o baixo índice de adesão da suplementação ocorreu devido principalmente às alterações promovidas pelo próprio tratamento quimioterápico que reduziu ou até mesmo impediu, em alguns períodos, a ingestão oral por causar principalmente náuseas, vômitos, perda do apetite, mucosite e enterocolite. Todos esses fatores dificultaram muito a adesão pela maior parte dos pacientes com LMA na ingestão dos suplementos.

Outro problema ocasionado pelo tratamento de indivíduos com câncer é a neutropenia, que está associada ao aumento de infecções, podendo ocorrer no período em que os pacientes estão imunodeprimidos ou acometidos por infecções oportunistas, incluindo as causadas por alimentos. Práticas adequadas de higiene, armazenamento e cocção de alimentos, podem controlar o aparecimento de doenças e infecções (BRASIL, 2009). A orientação adequada ao paciente e aos responsáveis quanto aos cuidados com a dieta e com os alimentos que devem ser ingeridos e restringidos é fundamental na fase de imunodepressão.

No Centro Infantil Boldrini essas orientações para pacientes neutropênicos seguem as diretrizes adotadas pelo Consenso Nacional de Nutrição Oncológica (BRASIL, 2009).

Algumas pesquisas evidenciaram que durante o tratamento do câncer ocorrem deficiências de nutrientes. Garófolo (2005) menciona que os nutrientes com função antioxidante, tais como: β -caroteno, vitamina A, C e E, zinco, cobre e selênio, devem ser oferecidos no mínimo em quantidades para atingir as necessidades dos pacientes.

No presente estudo priorizou-se a avaliação dos nutrientes antioxidantes devido seu provável benefício para pacientes com câncer. Nenhum micronutriente estudado apresentou diferença significativa no decorrer da pesquisa quando os grupos WPC e placebo foram avaliados individualmente. Verificou-se também que o percentual de adequação foi inferior (< 90%) ao recomendado pela DRI (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002) para todos os micronutrientes avaliados tanto no grupo WPC como no placebo, com exceção para o elemento selênio (150,67%) no início da intervenção do grupo WPC.

É importante ressaltar que as principais fontes alimentícias de vitaminas e minerais são as frutas e hortaliças e que estes grupos de alimentos apresentam uma baixa ingestão pelos pacientes com câncer, até mesmo pelos riscos que esses grupos de alimentos representam se não forem tomados todos os cuidados de higiene e preparo preconizados pelo Consenso Nacional de Nutrição Oncológica (BRASIL, 2009). Essa mesma justificativa explica em parte a baixa ingestão de fibras observada nos pacientes com LMA estudados.

Diante do exposto, os pacientes acabam por modificar seus hábitos alimentares em decorrência da doença e do seu tratamento, refletindo diretamente na ingestão alimentar inadequada. A ingestão dos suplementos WPC e maltodextrina não inibiu a ingestão da dieta dos pacientes com LMA, o que deve ser atribuído aos efeitos colaterais promovidos pelo próprio tratamento quimioterápico.

Na comparação entre pacientes com LMA e o controle saudável não se constatou diferença significativa nos níveis de leucócitos, monócitos e granulócitos. Este achado pode ter ocorrido em função da ampla variação nos níveis de leucócitos dos pacientes, os quais podem estar aumentados, normais ou diminuídos em relação aos valores de referência de acordo com o descrito a seguir.

Os dados do hemograma de pacientes com leucemia aguda apresentam como características (CASCIATO, 2008):

- Leucócitos: A contagem das células brancas do sangue (WBC) é elevada em 60% dos casos, apresentando valores normais em 15% e valores reduzidos em 25%.
- Eritrócitos: 90% dos pacientes apresentam uma anemia normocrômica e normocítica, que geralmente é grave.
- Plaquetas: apresentam-se reduzidas em 90% dos pacientes e com menos de 50.000 células/uL em aproximadamente 40%.

No presente estudo os níveis de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) para os indivíduos saudáveis em relação aos pacientes com leucemia.

Viana *et al.* (2003) em estudo com 83 crianças com LMA verificaram que a mediana da contagem global de leucócitos ao diagnóstico foi de 23.300 leucócitos/mm³, assim distribuídos: 32% abaixo de 10.000; 34% entre 10.000 e 50.000; 19,5% entre 50.000 e 100.000 e 14,5% acima de 100.000. Os resultados de Viana e colaboradores, enfatizam a variação nos níveis de leucócitos de indivíduos com leucemia estando seus resultados em conformidade com os achados no estudo aqui relatado.

Na presente pesquisa o valor mediano dos níveis de leucócitos no início da intervenção nutricional dos pacientes com LMA foi de 13,1 células $\times 10^9/L$, estando, portanto, acima dos valores de referência (4,5 a 10,5 células $\times 10^9/L$).

Em relação à série vermelha os valores medianos de eritrócitos (células $\times 10^{12}/L$), hematócrito (%) e hemoglobina (g/dL) ficaram abaixo do limite mínimo (4,0 células $\times 10^{12}/L$; 35,0% e 11,0 g/dL, respectivamente) para os grupos WPC e placebo em todos os tempos avaliados. Estes resultados condizem com os da literatura, que relata a presença de anemia na maioria dos pacientes com leucemia aguda.

Por outro lado, os valores medianos do Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH) e da Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) estiveram dentro dos limites de normalidade para

todos os pacientes, independente do grupo de suplementação, em todos os tempos avaliados.

Sugere-se que as alterações nos parâmetros hematológicos no decorrer do estudo ocorreram principalmente em virtude do tratamento quimioterápico e da própria doença, ficando muito difícil identificar possíveis efeitos da suplementação com as proteínas do soro de leite bovino.

Concentrações adequadas de GSH são necessárias para a proliferação celular, incluindo linfócitos e células epiteliais do intestino (AW, 2003). A GSH é também essencial para a ativação de linfócitos T e leucócitos polimorfonucleares, bem como, na produção de citocinas e por isso, torna-se indispensável para a expressão da resposta imune, em situações de desafios imunológicos (WU *et al.*, 2004). Esses mesmos autores mencionaram que as concentrações celulares de GSH foram drasticamente reduzidas em resposta à desnutrição proteica, estresse oxidativo e em várias condições patológicas, como na desnutrição protéico-calórica, na síndrome de deficiência imunológica adquirida (AIDS) e nas neoplasias avançadas.

Estudo de Russo e colaboradores (1986) demonstraram que os níveis de GSH em células cancerígenas podem ser várias vezes superiores que os níveis das correspondentes células normais. De acordo com Engin (1995) os níveis de GSH eritrocitária foram 31% mais elevados em pacientes com carcinoma localizado e 78% superiores em pacientes com câncer metastático quando comparados com o controle saudável. Esses resultados podem refletir os níveis de GSH em tumores e, também que esses altos níveis podem estar associados com resistência das células tumorais ao tratamento quimioterápico.

Os resultados da presente pesquisa estão em concordância com os achados de Russo *et al.* (1986) e Engin (1995), uma vez que os níveis de GSH eritrocitária foram 34,3% mais elevados em pacientes com leucemia (82,88 mg/dL) em relação ao controle saudável (61,72 mg/dL), diferindo significativamente ($p < 0,0001$).

Poucos estudos clínicos tem sido conduzidos com proteínas do soro de leite bovino e câncer (MARSHALL, 2004). Em um pequeno estudo clínico com 7 pacientes, com carcinoma metastático de mama, pâncreas ou fígado, os quais receberam 30g/dia de WPC por 6 meses Kennedy *et al.* (1995) verificaram que em 6 pacientes, os níveis de glutathiona linfocitária estavam elevados inicialmente, sugerindo níveis elevados de glutathiona em tumores. Após completarem o estudo, 2 pacientes tiveram regressão tumoral com retorno dos níveis de glutathiona linfocitária ao normal; 2 pacientes obtiveram estabilização do tumor sem normalização dos níveis de glutathiona e, 3 pacientes tiveram progressão tumoral com elevação dos níveis de glutathiona acima dos valores iniciais. Esses resultados conflitantes indicam a necessidade de estudos clínicos com maior número de pacientes para investigar o potencial do WPC como coadjuvante ao tratamento quimioterápico.

No presente estudo, a suplementação com WPC promoveu uma progressiva redução significativa ($p = 0,028$) nos valores medianos de GSH entre o início (71,08 mg/dL) e o final (62,77 mg/dL) da intervenção (60 dias). Entretanto, no grupo placebo os níveis de GSH também foram significativamente reduzidos entre T0 e T1, porém voltaram a aumentar de maneira significativa entre T1 e T2. Essa redução progressiva nos níveis de GSH no grupo WPC levanta a questão: Teria havido redução nos níveis de GSH das células leucêmicas pelo efeito do WPC, tornando-as mais susceptíveis aos efeitos dos quimioterápicos?

Adicionalmente, após o início da suplementação, tanto com WPC como com maltodextrina, os valores de GSH eritrocitária foram reduzidos aos níveis de normalidade (57,7 a 79,3 mg/dL). Assim como no estudo de Kennedy *et al.* (1995), a presente pesquisa não conseguiu comprovar de maneira eficaz e conclusiva o potencial efeito sinérgico entre WPC e o tratamento quimioterápico.

Em indivíduos com câncer, a síntese de anticorpos pode estar comprometida ou exacerbada, na dependência dos mecanismos imunológicos envolvidos na proliferação de células tumorais, determinando elevação ou redução nas concentrações de frações das imunoglobulinas (SOUZA, LEHN e DENARDIN, 2003).

A imunoglobulina A secretora é um importante parâmetro para se avaliar o status imune da mucosa com a vantagem de ser medida através de métodos não invasivos e sem desconforto para o paciente. É considerada o mediador humoral mais importante para a imunidade das mucosas, por cooperar com uma variedade de mecanismos de proteção, por apresentar maior resistência à degradação proteolítica que outras classes de imunoglobulinas e por localizar-se especialmente nos tratos digestório e respiratório, impedindo a absorção de uma vasta quantidade de antígenos (BRANDTZAEG, 1995; LAMM *et al.*, 1995). A deficiência de IgA é o defeito mais comum do sistema imune humoral em humanos, podendo causar infecções gastrointestinais e respiratórias (TREDSSON, *et al.*, 1995).

Neste estudo não houve diferença significativa entre os pacientes com LMA e o controle saudável nos níveis de IgA salivar ($p = 0,693$). Assim como não houve diferença entre o grupo WPC e o placebo nos tempos T0, T1 e T2 da intervenção nutricional. Os níveis de IgA dos grupos WPC e placebo estavam abaixo dos parâmetros de normalidade para indivíduos com 6 anos ou mais (6,0 a 26,9 mg/dL) sugerindo maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções.

Martinez, Mendes e Alves (2007) estudaram os níveis de IgA salivar de 20 pacientes em dois momentos diferentes: com ulcerações aftosas recorrentes (UAR) e no período de quiescência (sem lesões). Os autores observaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos valores de IgA salivar nos períodos de lesão ativa em relação aos de quiescência. Outro estudo da década de 70 já havia constatado aumento de IgA salivar no período agudo de pacientes com UAR e diminuição nos períodos de regressão e cura das lesões (KAKIZAWA, NONA e OMORI, 1973).

De acordo com os estudos acima citados e analisando-se os resultados encontrados para os pacientes com LMA na presente pesquisa, evidencia-se a existência de uma forte associação entre a resposta imune humoral, níveis de IgA salivar e mucosite. Teria a presença de mucosite influenciado os níveis IgA salivar dos pacientes com LMA? Sua severidade poderia ter reduzido ainda mais esses

níveis? Ou esses resultados seriam decorrentes apenas da ação dos quimioterápicos? E finalmente, quais mecanismos estariam envolvidos?

Estes questionamentos são parcialmente respondidos através da pesquisa de Karolewska e colaboradores (2008), os quais avaliaram os mecanismos de defesa oral durante o tratamento da leucemia aguda de 44 crianças, comparando-as com um grupo controle saudável. Foram realizadas análises dos fatores salivares no momento do diagnóstico, durante e ao final do curso da quimioterapia. Os autores verificaram que a quimioterapia reduziu a concentração de IgA salivar e que os níveis dessa imunoglobulina foram inferiores nos pacientes com mucosite quando comparados com indivíduos sem mucosite. Logo o tratamento quimioterápico contribuiu para o comprometimento dos mecanismos de defesa salivar.

A imunidade contra tumores mediada por células pode ser aumentada pela expressão de citocinas e co-estimuladores em células tumorais e pelo tratamento de indivíduos portadores de tumor com citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T e células *NK*. O $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ são considerados agentes antitumorais eficazes em modelos animais, mas seu uso em pacientes é limitado por graves efeitos colaterais tóxicos. Ensaio clínico com $\text{IFN-}\alpha$ indicam sua capacidade de induzir a regressão de carcinomas renais, melanomas, sarcomas de Kaposi, linfomas e leucemia de células pilosas. Fatores de crescimento, como GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) e G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), são usados em protocolos de tratamento de câncer para diminuir os períodos de neutropenia e trombocitopenia após a quimioterapia ou transplante autólogo de medula óssea (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Níveis plasmáticos mais elevados de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 têm sido encontrados em pacientes com leucemia, tratados com quimioterapia, comparados com pacientes não submetidos a tratamento quimioterápico (HALL *et al.*, 1995). Outro estudo comparou os níveis de citocinas pró-inflamatórias entre pacientes adultos com câncer e um grupo controle saudável, observando que os níveis séricos de

IL-1 β ($24,7 \pm 15,5$ pg/mL), IL-6 ($27,2 \pm 16,7$ pg/mL) e TNF- α ($38,6 \pm 22,9$ pg/mL) foram superiores ($p < 0,0001$) nos pacientes com câncer em relação ao controle respectivamente ($8,3 \pm 5,7$; $4,1 \pm 3,8$; $20,5 \pm 6,8$ pg/mL).

Os resultados da presente pesquisa evidenciaram que na produção espontânea (sem estímulo) em cultura de células mononucleares, os níveis das citocinas TNF- α e IFN- γ foram estatisticamente superiores para os pacientes com leucemia em relação ao controle saudável, enquanto que na produção de IL-6 e IL-10 não houve diferença estatística entre os grupos LMA e controle.

Entretanto, nas condições estimuladas, seja por BCG ou PHA, os indivíduos saudáveis produziram maiores quantidades de citocinas em relação aos pacientes com LMA, com diferença significativa na maior parte dos casos. Houve exceção apenas para a resposta na produção de IFN- γ frente ao estímulo inespecífico da PHA, porém sem diferença estatística ($p = 0,273$).

Em relação as citocinas IL-8 e TGF- β 2, avaliadas no plasma, não houve diferença entre pacientes com LMA e indivíduos saudáveis.

Em um estudo com camundongos verificou-se que a lactoferrina apresentou efeitos anti-inflamatórios, uma vez que teve a capacidade de regular os níveis das citocinas IL-6 e TNF- α , reduzindo a inflamação e a mortalidade dos animais (MACHNICKI, ZIMECKI e ZAGULSKI, 1993).

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WPC e placebo em todos os tempos avaliados nas produções de TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de culturas das células não estimuladas e estimuladas por BCG ou PHA, exceção do IFN- γ em células não estimuladas no início da intervenção. Assim como não houve diferença nas concentrações de TGF- β 2 e IL-8 no plasma.

Dessa forma, a suplementação com proteínas do soro de leite não influenciou significativamente a produção de citocinas, de IgA salivar e dos

parâmetros hematológicos, não exercendo nas condições do estudo, ação imunomoduladora importante em pacientes com leucemia mieloide aguda.

Níveis elevados de TNF estão associados com toxicidades não hematológicas. A utilização de agentes inibidores de TNF, como pentoxifilina, reduziu a toxicidade não hematológica em pacientes com transplante de medula óssea (BIANCO *et al.*, 1991). Em relação a mucosite, alguns estudos em modelo animal e com humanos têm demonstrado redução na ocorrência de sua severidade após administração de inibidores de TNF (BIANCO *et al.*, 1991; FERRA *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2005).

A incidência de mucosite em pacientes submetidos ao tratamento de LMA é um efeito secundário comum. Arceci *et al.* (2005) relataram que 3% dos pacientes estudados apresentaram mucosite grau 3 ou 4, dentre outras toxicidades. Outro estudo demonstrou que a mucosite é bastante frequente no tratamento da LMA, com a incidência de aproximadamente 50% no grupo estudado (LABAR *et al.*, 1993). Creutzig e colaboradores (2000) encontraram 4, em um total de 17 pacientes, com mucosite grau 3 ou 4, segundo a escala para mucosites da Organização Mundial da Saúde.

Na pesquisa ora apresentada, todos os pacientes ficaram pelo menos 50% do tempo da intervenção nutricional sem apresentar mucosite. Sendo que dos 21 pacientes, 12 (57%) apresentaram mucosite grau 4 durante algum período da avaliação. A classificação da mucosite mais prevalente foi o grau 2 de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (2003).

O herpes simples é frequentemente capaz de complicar uma mucosite existente, mas pode ser tratado com eficácia através do uso de aciclovir (CHAUFFAILLE e CAMPOS, 2005). A presença de mucosite herpética foi verificada em alguns pacientes no decorrer do estudo.

A dor associada a mucosite pode ser suficientemente grave para impedir a ingestão oral de alimentos, líquidos e medicações, e pode exigir alimentação parenteral para evitar a desidratação e a desnutrição dos pacientes. Dependendo

da gravidade da mucosite pode haver a redução ou interrupção da terapia contra o câncer, piorando o resultado previsto para o tratamento (SONIS e FEY, 2002).

Um estudo realizado por YU *et al.* (1994) avaliou a mucosite oral e o estado nutricional de pacientes com leucemia. De acordo com os valores da albumina sérica os pacientes (n = 17) com LLA foram divididos em desnutridos (< 3,5 g/dL) e eutróficos (> 3,5 g/dL). Os autores não observaram diferenças significativas na prevalência e severidade da mucosite oral entre os pacientes desnutridos e eutróficos. Verificaram a presença de mucosite em 15 dos 17 pacientes avaliados, com maior frequência do grau 1.

Os grupos suplementados, placebo e WPC, não diferiram estatisticamente quando comparados em relação à presença e severidade da mucosite dos pacientes com LMA durante os 60 primeiros dias do tratamento quimioterápico. Entretanto, observou-se que as maiores incidências de mucosite para o placebo foram os graus 2 e 3 enquanto para o grupo WPC foram os graus 1 e 2.

Sonis e colaboradores (1997) verificaram que citocinas com ação sobre a proliferação epitelial, como o fator de crescimento e transformação $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) foi capaz de modificar o curso da mucosite oral em animais, atenuando sua severidade. Entretanto, na presente pesquisa, apesar do suplemento WPC ser enriquecido com TGF- β não se comprovou eficazmente seu efeito protetor através da redução da severidade da mucosite em pacientes com leucemia mieloide aguda.

Em artigo de revisão, Barash *et al.* (2006), os autores focaram nos possíveis agentes medicamentosos e suplementos nutricionais para prevenir e tratar a mucosite relacionados apenas em estudos clínicos. As classes de medicamentos empregadas nos ensaios com humanos abrangem antibióticos, anestésicos, analgésicos e agentes de revestimento da mucosa. A maioria dos estudos revelou-se inconclusiva, conflitantes e com falta de evidências tanto na mucosite induzida por quimioterapia e radioterapia como em adultos e crianças. A mesma conclusão foi verificada para os estudos com suplementação de glutamina.

Um dos poucos estudos (THORNLEY, 2004) com suplementação oral e pacientes pediátricos com câncer (n = 37) avaliou a ação da combinação de nutrientes antioxidantes, entre eles vitamina E e ácido fólico em relação a mucosite. Os autores demonstraram diminuição da incidência e severidade da mucosite oral no grupo tratado em comparação com um grupo controle. Porém os dados são preliminares havendo necessidade de ensaios com um maior número de pacientes e melhor delineamento.

Apesar de vários modelos animais terem sido desenvolvidos para investigar a mucosite, os estudos com humanos são escassos. No presente trabalho, não foi encontrado, nas bases de dados pesquisadas, nenhum estudo em humanos de suplementação com proteínas do soro de leite bovino relacionando mucosite e câncer pediátrico (leucemia). Se por um lado este fato evidencia a originalidade e ineditismo desse estudo, por outro dificulta a discussão dos resultados.

Dois conjuntos de fatores dificultam sobremaneira interpretar e entender, em profundidade, porque a suplementação com o WPC enriquecido com TGF- β e lactoferrina, não produziu os efeitos esperados nas crianças e adolescentes portadores de LMA: a) a composição do suplemento somente foi analisada quanto a sua composição centesimal mínima e perfil aminoacídico. Detalhes dos processos de produção, integridade estrutural das proteínas e real concentração do fator TGF- β e da lactoferrina, não foram revelados pelo fabricante pelo fato do produto ter sido objeto de solicitação de patente; b) por motivos éticos e humanitários todas as análises foram realizadas em células do sangue periférico e saliva, o que certamente não reflete a situação do processo inflamatório e infeccioso “in situ”, isto é, nos próprios órgãos e tecidos diretamente afetados na LMA.

Outro fator agravante é a própria doença, uma vez que a LMA ocorre em 90% dos casos em pacientes adultos, a maioria dos trabalhos publicados refere-se a estudos nessa faixa etária, tornando-a uma doença pouco estudada em crianças.

7. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM HUMANOS

No ensaio clínico em pacientes com LMA concluiu-se que:

- 1) Na comparação entre pacientes com LMA e indivíduos saudáveis, os pacientes apresentaram níveis estatisticamente inferiores de albumina, pré-albumina, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- γ (estimuladas por BCG) e produção de IL-6 (estimulada por PHA), ao contrário, níveis estatisticamente superiores foram verificados no grupo LMA em relação à glutathiona (GSH) eritrocitária e produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ ;
- 2) A suplementação com WPC apresentou efeito positivo sobre o EN dos pacientes, evidenciado pelas medianas dos pesos e índices antropométricos;
- 3) Os percentuais de ingestão dos macronutrientes foram adequados nos grupos WPC e placebo em todos os tempos analisados enquanto que os micronutrientes estavam, na maioria, em deficiência (< 90% da adequação);
- 4) Clinicamente, a predominância de mucosite foi mais branda no grupo WPC (graus 1 e 2), que no grupo placebo (graus 2 e 3).

8. DIFICULDADES ENCONTRADAS NA PESQUISA CLÍNICA

Dificuldades foram enfrentadas no desenvolvimento da pesquisa clínica com suplementação nutricional oral em pacientes cujo tratamento prejudica e interfere diretamente na ingestão alimentar dos mesmos, acarretando uma adesão insuficiente em decorrência dos efeitos colaterais promovidos pelo uso de quimioterápicos, especialmente a mucosite.

A baixa prevalência de LMA na faixa etária pediátrica e o elevado número de óbitos no decorrer do estudo limitou sobremaneira o número de pacientes incluídos na pesquisa e a confiabilidade dos resultados.

Apesar dessas dificuldades, o desenvolvimento da presente pesquisa trouxe muito auto-conhecimento, superação e satisfação ao pesquisador responsável. A oportunidade de trabalhar com seres humanos em uma condição tão extrema do processo saúde-doença, em função de um tratamento agressivo e avassalador, como no caso das leucemias, principalmente por envolver crianças e adolescentes, ampliou os objetivos iniciais da pesquisa, promovendo o enriquecimento pessoal através do contato com os pacientes e seus familiares, em momento tão desafiador de suas vidas, muito mais importante que qualquer resultado obtido.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular** 6.ed. Tradução de Claudia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AMERICAN SOCIETY OF PARENTERAL AND ENTERAL NUTRITION **The A.S.P.E.N. Nutrition support core curriculum: a case-based approach – the adult patient**. 2. ed. USA: Managing, 2007.

APPELBAUM, F.R. Leucemias agudas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELO, D. **Tratado de medicina interna**. 22.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ARCECI, R.J.; SANDE, J.; LANGE, B.; SHANNON, K.; FRANKLIN, J.; HUTCHINSON, R.; VIK, T.A.; FLOWERS, D.; APLENC, R.; BERGER, M.S.; SHERMAN, M.L.; SMITH, F.O.; BERNSTEIN, I.; SIEVERS, E.L. Safety and efficacy of gemtuzumab ozogamicin in pediatric patients with advanced CD33+ acute myeloid leukemia. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v.106, n.4, p.1183-8, aug. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington: W. Horwitz; 2005.

AW, T.Y. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. **News in physiological sciences/ International Union of Physiological Sciences**, Maryland v.18, p.201-4, oct. 2003.

BARASCH, A.; ELAD, S.; ATMAN, A.; DAMATO, K. JOEL, E. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis. **Supportive care in cancer / Multinational**

Association of Supportive Care in Cancer, Berlin, v. 14, n.6, p. 528-32, may. 2006.

BAUER, J.; CAPRA, S.; BATTISTUTTA, D.; DAVIDSON, W.; ASHE, S. Compliance with nutrition prescription improves outcomes in patients with unresectable pancreatic cancer. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v.24, n.6, p.998-1004, dec. 2005.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**. New York: Churchill Livingstone, 1986. 126p.

BIANCO, J.A.; APPELBAUM, F.R.; NEMUNAITIS, J.; ALMGREN, J.; ANDREWS, F.; KETTNER, P.; SHIELDS, A.; SINGER, J.W. Phase I – II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v. 78, n. 5, p. 1205-11, sep. 1991.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, aug. 1959.

BORIM, L.N.B.; RUIZ, M.A.; CONTE, A.C.F. ; CAMARGO, B. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças portadoras de leucemia linfocítica aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 1, p. 47-53, jan./apr. 2000.

BOTTONI, A.; OLIVEIRA, G.P.C.; FERRINI, M.T.; WAITZBERG, D.L. Avaliação nutricional: exames laboratoriais. In: WAITZBERG, L.D. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 2000.

BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 103, n. 1, p. 1-19, jan. 1995.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional De Câncer. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional De Câncer. **Consenso nacional de nutrição oncológica**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRASIL. Portaria n. 12, de 10 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001. Disponível em: http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_pesq_consulta.cfm#

CARDOSO, S.P.; MARTINS, C. **Interações droga-nutriente**. Curitiba: Nutroclínica, 1998.

CASCIATO, D.A. **Manual de oncologia clínica**. São Paulo: Tecmedd, 2008.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. ; CAMPOS, M.G.V. Leucemias. In: FORONES, N.M.; FILHO, R.J.; TADOKORO, H.; FREIRE, C.A.R. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar de oncologia**. Barueri: Manole, 2005.

CREUTZIG, U.; KÖRHOLZ, D.; NIEMEYER, C.M.; KABISCH, H.; GRAF, N.; REITER, A.; SCHEEL-WALTER, H.; BENDER-GÖTZE, C.; BEHNISCH, W.; HERMANN, J.; MANN, G.; RITTER, J.; ZIMMERMANN, M. Toxicity and effectiveness of high-dose idarubicin during AML induction therapy: results of a pilot study in children. **Klinische Paediatric**, Stuttgart, v.212, n.4, p.163-8, jul./aug. 2000.

ELMAN, I.; SILVA, M.E.M.P. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v.53, n.3, p.297-303, jul./set. 2007.

ENGIN, A. Differences in blood glutathione levels of patients with advanced or localized carcinoma. **Tumori**, Milano, v.81, n. 2, p.132-134, mar./apr. 1995.

FERRÀ, C.; DE SANJOSÉ, S.; LASTRA, C.F.; MARTÍ, F.; MARIÑO, E.L.; SUREDA, A.; BRUNET, S.; GALLARDO, D.; BERLANGA, J.J.; GARCÍA, J.; GRAÑENA, A. Pentoxifylline, ciprofloxacin and prednisone failed to prevent transplant-related toxicities in boné marrow transplant recipients and were associated with na increased incidence of infectious complications. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 20, n. 12, p. 1075-80, dec.1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation**, Bethesda, USA, 1990.

FRISANCHO, A.R. **Anthropometric Standards for the assessment of growth and nutritional status**. Ann Arbor: University of Michigan Press, 1990. 189p.

GARÓFOLO, A. Diretrizes para terapia nutricional em crianças com cancer em situação crítica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.18, n.4, p.513-27, jul./ago. 2005.

GARÓFOLO, A.; DALL'AGNOL, T.M.; ANCONA, L.F.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; PETRILLI, A.S. Ingestão alimentar de crianças e adolescentes com câncer. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA, 6., 1998, Guarujá.

Anais do VI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica. Guarujá: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 1998. 67 p.

GARÓFOLO, A.; LOPEZ, F.A.; PETRILLI, A.S. Acompanhamento do estado nutricional de pacientes com osteossarcoma. **Acta oncológica brasileira**, São Paulo, v.22, n.1, p. 233-7, jan./mar. 2002.

HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; STUART, R.K. The influence of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 concentrations on non hematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 23, n. 12, p. 1256-60, nov. 1995.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino scoring. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p.74-7, apr. 1994.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes - DRI for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids.** Washington (DC): National Academy Press, 2002/2005.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes - The essential guide to nutrient requirements.** Washington (DC): National Academy Press, 2006.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride.** Washington (DC): National Academy Press, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.** Washington (DC): National Academy Press, 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids.** Washington (DC): National Academy Press, 2000.

KAKIZAWA, T.; NONA, H.; OMORI, K. Evaluation of secretory IgA in human saliva. **Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v. 14, n. 3, p. 125-139, aug. 1973.

KAROLEWSKA, E.; KONOPKA, T.; PUPEK, M.; CHYBICKA, A.; MENDAK, M. Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**, St. Louis, v. 105, n. 6, p. 739-44, jun. 2008.

KENNEDY, R.S.; KNOK, G.P.; BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; LEE, T.D.G. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic

carcinoma: phase I-II clinical study. **Anticancer Research**, Athens, v. 15, n. 6B, p. 2643-2650, nov./dec. 1995.

KENT-SMITH, L.; MARTINS, C. Nutrição da criança com câncer. In: WAITZBERG, L.D. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu; 2004.

LABAR, B.; MRSIC, M.; PAVLETIC, Z.; BOGDANIC, V.; NEMET, D.; AURER, I.; RADMAN, I.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, N.; SERTIĆ, D.; KALENIĆ, S.; Prostaglandin E2 for prophylaxis of oral mucositis following BMT. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.11, n.5, p.379-82, may. 1993.

LAMM, M.E.; NEDRUD, J.G.; KAETZEL C.S.; MAZANEC, M.B. IgA and mucosal defense. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 103, n. 4, p. 241-246, apr. 1995.

LIE, S.O.; ABRAHAMSSON, J.; CLAUSEN, N.; FORESTIER, E.; HASLE, H.; HOVI, L.; JONMUNDSSON, G.; MELLANDER, L.; SIIMES, M.A.; YSSING, M.; ZELLER, B.; GUSTAFSSON, G. Long-term results in children with AML: NOPHO-AML Study Group – report of three consecutive trials. **Leukemia**, New Jersey, v.19, n.12, p.2090-100, dec. 2005.

LIMA, V.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; REBOUÇAS, C.G.; FALCÃO, B.A.; AUGUSTO, R.F.; SOUZA, M.L.; LEITÃO, B.T.; RIBEIRO, R.A. Effects of the tumour necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 113, n. 3, p. 210-7, jun. 2005.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.J.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 33, n. 5, p. 448-460, aug. 2007.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual**. Champaign: Human Kinetics, 1988.

MACHNICKI, M.; ZIMECKI, M.; ZAGULSKI, T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 74, p. 433-9, oct. 1993.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMPS, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998.

MARÍN CARO, M.M.; GÓMEZ CANDELA, C.; CASTILLO RABANEDA, R.; LOURENÇO NOGUEIRA, T.; GARCÍA HUERTA, M.; LORIA KOHEN, V.; VILLARINO SANZ, M.; ZAMORA AUÑÓN, P.; LUENGO PÉREZ, L.; ROBLEDO SÁENZ, P.; LÓPEZ-PORTABELLA, C.; ZARAZAGA MONZÓN, A.; ESPINOSA ROJAS, J.; NOGUÉS BOQUERAS, R.; RODRÍGUEZ SUÁREZ, L.; CELAYA PÉREZ, S.; PARDO MASFERRER, J. Nutritional risk evaluation and establishment of nutritional support in oncology patients according to the protocol of the Spanish Nutrition and Cancer Group. **Nutricion Hospitalaria**, Madrid, v.23, n.5, p.458-68, 2008.

MARSHALL, N.D. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, Saindpoint, v.9, n.2, p. 136-56, june. 2004.

MARTINEZ, K.O.; MENDES, L.L.; ALVES, J.B. Imunoglobulina A secretora, proteínas totais e fluxo de saliva nas ulcerações aftosas recorrentes. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 323-328, mai./jun. 2007.

MERRIT, R.J.; KALSCH, M.; ROUUX, L.D.; ASHLEY-MILLS, J.; SIEGEL, S.S. Significance of hypoalbuminemia in pediatric oncology patients: malnutrition or infection? **JPEN: Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.9, n.3, p.303-6, may./jun.1985.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (N.C.I). **Cancer therapy evaluation program. Common terminology criteria for adverse events**, 2003. Disponível em: <http://ctep.cancer.gov>. Acesso em: 28 set 2006.

PENG, C.T.; WU, K. H.; LAN, S. J.; TSAI, J.P.; TSAI, F.J.; TSAI, C.H. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing chemotherapy. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1158-63, may. 2005.

PENNA, S.P. **Níveis de glutatona reuzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio**. 1995. 77f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

PINHO, N.B.; PACHECO, A.S.; BALUZ, K.G.; NAJMAN, H.L.; SIMMA, F. Suporte nutricional pediátrico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 257-63, 1997.

PINHO, N.B.; PACHECO, A.S.; BALUZ, K.G.; OLIVEIRA, A.G.L. **Manual de nutrição oncológica – Bases clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2004.

RAVINDRANATH, Y. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v. 15, p. 23-35, jan. 2003.

RUSSO, A.; DE GRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; MITCHELL, J.B. Selective modulation of glutathione levels in normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. **Cancer Research**, Baltimore, v. 26, n.6, p. 2845-2848, june.1986.

SALA, A.; PENCHARZ, P.; BARR, R.D. Children, cancer and nutrition – a dynamic triangle in review. **Cancer**, Philadelphia, v.100, n.4, p.677-87, feb. 2004.

SAVARESE, D.M.F.; SAVY, G.; VAHDAT, L.; WISCHMEYER, P.E.; COREY, B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 29, n. 6, p. 501-13, dec. 2003.

SGARBIERI, U.R.; FISBERG, M.; TONE, L.G. Nutritional assessment and serum zinc and copper concentration in leukemic children. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 117, n. 1, p. 13-18, jan. 1999.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.4, p.397-409, oct./dec. 2004.

SGARBIERI, V.C. The role of dietary energy and of macrocomponents of foods in modulating carcinogenesis (an overview). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 51, n.2, p. 104-21, mar./abr.1999.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996, 517 p.

SIGULEM, D.M.; DEVINCENZI, M.U.; LESSA, A.C. Diagnóstico do estado nutricional da criança e adolescente. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.76, n.3, p.S274-84, dez.2000.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, apr. 2002.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews.Cancer**, London, v. 4, n. 4, p. 277-284, apr. 2004.

SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B.N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives in cancer therapy induced mucosal injury:

pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, Philadelphia, v.100, n.9, S1995-2025, may. 2004.

SONIS, S.T.; FEY, E.G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, New York, 2002; v.16, n.5, p.668-95, may.2002.

SONIS, S.T.; VAN VUGT, A.G.; BRIEN, J.P.; MUSKA, A.D.; BRUSKIN, A.M.; ROSE, A.; HALEY, J.D. Transforming growth factor- β 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. **Oral oncology**, Oxford, v.33, n. 1, p. 47-54, jan. 1997.

SONIS, S.; CLARK, J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, New York, v. 5, n. 12, p. 11-18, dec. 1991.

SOUZA, R.M.; LEHN, C.N.; DENARDIN, O.V.P. Níveis sérico e salivar de imunoglobulina A em portadores de câncer da boca e orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.49, n.1, p.40-4, jan./mar.2003.

SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Biochemistry**, New York, v.30, n.9, p.1190-206, 1958.

SQUIER, C.A. Oral complications of cancer therapies. Mucosal alterations. **NCI monographs: a publication of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.9, p.169-72, 1990.

TAZI, I.; HIDANE, Z.; ZAFAD, S.; HARIF, M.; BENCHEKROUN, S.; RIBEIRO, R. Nutritional status at diagnosis of children with malignancies in Casablanca. **Pediatric Blood & Cancer**, Hoboken, v.51, n.4, p.495-8, oct. 2008.

THORNLEY, I. A multiagent strategy to decrease regimen-related toxicity in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v.10, n.9, p. 635-44, sep. 2004.

TISDALE, M.J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, Burbank, v.17, n.5, p.438-42, may.2001.

TREDSSON, L.; BASKIN, B.; PAN, Q.; RABBANI H.; VORECHOVSKY I, SMITH C.I. Genetics of IgA deficiency. **APMIS: Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.103, n.12, p.833-72, dec.1995.

VASCONCELOS, F.A.G. **Avaliação nutricional de coletividades: textos de apoio didático**. Florianópolis: UFSC, 1995.

VIANA, M.B.; CUNHA, K.C.C.M.S.; RAMOS, G.; MURAO, M. Leucemia mieloide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 489-496, nov./dez.2003.

VITOLLO, M.R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Rubio, 2008.

WILLIAMS, W.J.; MORRIS, M.W.; NELSON, D.A. Examination of the blood. In: BEUTLER, E. **Hematology**. 5.ed. New York: Williams; 1995.

WHO: *WORLD HEALTH ORGANIZATION*. **WHO Anthro and WHO Anthro Plus softwares**. Disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>. Acesso em: 05 mar 2009.

WHO: *WORLD HEALTH ORGANIZATION*. DE ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; BORGHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v.85, n.9, p.660-7, sep. 2007.

WHO: *WORLD HEALTH ORGANIZATION*. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-forage, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. **Methods and Development**.. Geneva: WHO, 2006.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.134, n.3, p.489-92, mar.2004.

YOUNG, G.A.; HILL, G.L. Assessment of protein-calorie malnutrition in surgical patients from plasma proteins and anthropometric measurements. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.31, n.3, p.429-35, mar. 1978.

YU, L.C.; KUVIBIDILA, S.; DUCOS, R.; WARRIER, R.P. Nutritional status of children with leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, New York, v.22, n.2, p.73-7, 1994.

CAPÍTULO 3

“Desenvolvimento de um modelo de indução de mucosite gastrointestinal por quimioterápicos, em ratos Wistar, e avaliação da eficácia de proteínas lácteas na proteção da mucosa”

RESUMO

Nesta pesquisa o objetivo inicial foi desenvolver um modelo de mucosite gastrointestinal induzida por quimioterápicos, em ratos da linhagem Wistar, para posteriormente avaliar uma possível ação protetora de um concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) mais lactoferrina e de uma caseína sobre a mucosa gastrointestinal desses animais. Para tal foram avaliados alguns esquemas de protocolos de indução de mucosite com os quimioterápicos 5-Fluoruracila (5-FU) e sulfato de vincristina, testando-se a administração em diferentes concentrações e número de doses. Através de um experimento piloto concluiu-se que o sulfato de vincristina não foi um bom agente indutor de mucosite no trato gastrointestinal (TGI) de ratos Wistar, ao contrário do 5-FU, sendo que a dose recomendada para os demais experimentos deveria ser inferior a 100mg/Kg de peso corporal com intervalo de 3 dias entre cada administração, totalizando 2 ou 3 doses. A partir desses resultados foram realizados 3 experimentos com 5-FU, a saber: experimento 2 (3 doses de 75mg/Kg + WPC, por gavagem); experimento 3 (3 doses de 50mg/Kg + WPC através de dieta peletizada e 2 doses de 30mg/Kg seguida de uma 3ª dose de 60mg/Kg + WPC por dieta peletizada); experimento 4 (curva dose *versus* resposta: 70, 65, 60 e 50mg/Kg + dieta comercial). O 5º experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da peletização, e secagem à 50°C, sobre as proteínas (WPC e caseína) e o possível efeito sobre os níveis de glutatona eritrocitária. Como parâmetros de avaliação utilizaram-se: monitoramento do peso corporal, ingestão de dieta, avaliação clínica, análise anatomopatológica, avaliação bioquímica (índices hematológicos e glutatona eritrocitária), análise histopatológica e análise microbiológica. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”. Concluiu-se que o melhor modelo de indução de mucosite

gastrointestinal resultou dos experimentos 3 e 4, nos quais utilizaram-se 3 doses de 5-FU administradas com um intervalo de 3 dias, nas concentrações entre 30 e 70 mg/Kg. Através dos resultados obtidos, verificou-se que as doses acima descritas não induziram mucosite perceptível macroscopicamente (análise anatomopatológica), entretanto, alterações microscópicas importantes na mucosa das diferentes porções do TGI, compatíveis com mucosite foram encontradas através das análises histopatológicas, confirmando a eficácia do protocolo experimental desenvolvido nesta pesquisa. Essas doses poderão ser recomendadas para futuros experimentos de indução de mucosite por serem menos agressivas aos animais, quando comparadas com as doses acima de 75 mg/Kg. Os índices bioquímicos (hematológicos e glutathiona eritrocitária) não foram influenciados pelo efeito da peletização e, de modo geral não houve diferença significativa entre os grupos tratados com WPC e os grupos com caseína. Ao contrário do esperado, o estímulo imunológico com hemáceas de carneiro não promoveu aumento nos níveis de glutathiona nos eritrócitos. As proteínas do soro do leite (WPC) protegeram a mucosa, promovendo menor intensidade de mucosite, nos períodos mais críticos (72h após a 2ª e a 3ª dose de 5-FU) nas regiões de maior prevalência, duodeno e jejuno, quando se comparou com os resultados obtidos para os grupos tratados com caseína.

1. INTRODUÇÃO

A mucosite representa significativo efeito adverso dose-limitante da quimioterapia e radioterapia, podendo afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, dependendo do tipo de tratamento, promovendo uma ampla sintomatologia, como dor oral, sangramentos e severa diarreia (YEOH *et al.*, 2007).

Pesquisas com o objetivo de investigar a mucosite induzida por quimioterápicos têm sido instrumento para identificar mudanças iniciais na mucosa. Entretanto os mecanismos moleculares da injúria à mucosa ainda não foram completamente entendidos, sendo extremamente complexos em estudos clínicos com humanos (GIBSON *et al.*, 2005).

Dessa forma, estudos *in vivo* com animais têm implicações importantes para o desenvolvimento de um adequado tratamento para a mucosite gastrointestinal humana (LOGAN *et al.*, 2007). Além disso, a caracterização dos eventos biológicos que ocorrem no contexto da mucosite levará inevitavelmente a uma melhora dos resultados da terapia oncológica e da qualidade de vida dos pacientes.

A utilização de modelos com algumas linhagens de hamsters, ratos e camundongos está bem estabelecida na indução da mucosite através da administração de agentes quimioterápicos, incluindo metotrexato, irinotecan e 5-fluoruracila. Esses trabalhos têm demonstrado que os modelos animais de mucosite reproduzem os sintomas e danos na mucosa que ocorrem em humanos (KEEFE *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2005).

O conteúdo protéico do leite bovino é composto principalmente por caseínas e proteínas do soro. De acordo com a literatura essas proteínas, bem como seus peptídeos, são considerados componentes bioativos do leite exercendo propriedades funcionais fisiológicas (STEIJNS, 2001; MARSHALL, 2004; CASTRO, SGARBIERI e ZIEGLER, 2009).

Destacam-se como importantes propriedades fisiológicas para o desenvolvimento desse capítulo a ação imunomoduladora (SGARBIERI, ZIEGLER e CASTRO, 2009), os efeitos antimicrobianos (TOMITA *et al.*, 2002; MARSHALL, 2004; SGARBIERI, 2004) e de proteção da mucosa gastrointestinal (ROSANELI *et al.*, 2002; ROSANELI *et al.*, 2004; MEZZARROBA *et al.*, 2006) exercido pelas proteínas do soro de leite.

2. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um modelo de mucosite gastrointestinal induzida por quimioterápicos, em ratos da linhagem Wistar.

Avaliar a eficácia de um concentrado de proteínas do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β mais lactoferrina e de uma caseína comercial, na proteção da mucosa gastrointestinal de ratos da linhagem Wistar submetidos à administração do quimioterápico 5-Fluoruracila (5-FU).

Para atingir os objetivos do estudo foram realizados 5 experimentos, os quais serão apresentados na forma de sub-capítulos, cada um com seus objetivos específicos, protocolo experimental, resultados e conclusões. O capítulo completo constará ainda de material e métodos, discussão geral e conclusões gerais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os 5 experimentos *in vivo* com ratos machos da linhagem Wistar foram realizados entre junho de 2008 a setembro de 2009.

3.1. Materiais

Utilizaram-se os quimioterápicos 5-Fluoruracila (Registro MS 1.0043.0795), solução injetável de 25mg/mL e Sulfato de Vincristina (Tecnocris[®], registro MS 1.2214.0017), solução injetável de 1mg/mL produzidos pela Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo – SP.

Como fontes proteicas nas dietas experimentais foi utilizado um concentrado de proteína do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina, produzido em planta piloto pela empresa *Hilmar Ingredients* (Cal, USA). A caseína da marca Synthfoi utilizada para os experimentos realizados no ano de 2008 e da marca Multichemie Nardecon[®] nos experimentos desenvolvidos em 2009, ambas adquiridas em Campinas, SP. A dieta comercial da marca Nuvilab[®] adquirida em Campinas – SP foi utilizada em 2 experimentos (1 e 4).

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização físico-química

Composição centesimal das fontes proteicas - Foi determinada conforme especificado no capítulo 2, utilizando metodologia descrita no AOAC (2005) e por Bligh e Dyer (1959). Obteve-se a seguinte composição centesimal para o WPC: 68,85% de proteína, 13,98% de lipídios, 4,26% de cinza (minerais), 6,33% de umidade e 6,58% de carboidrato. A caseína utilizada continha 84,9% de proteína, 2,72% de lipídios, 2% de minerais, 9,34% de umidade e 1,04% de carboidrato.

3.2.2. Avaliação *in vivo*

Todos os experimentos, com exceção do último, foram realizados no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, Campinas-SP. O experimento de nº 5 foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), Campinas-SP.

Foram rigorosamente seguidos todos os aspectos éticos recomendados para pesquisas com animais de laboratório. Os protocolos de todos os experimentos foram enviados e aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp, conforme descrito nos **Anexos 6, 7 e 8**. Foram utilizados ratos adultos, machos da linhagem Wistar livres de patógenos

(SPF), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Após a pesagem inicial, os animais foram aleatoriamente divididos em grupos, identificados individualmente e mantidos em caixas (Experimentos 1 e 2), com no máximo 3 animais; em isoladores, com no máximo 5 animais (Experimentos 3 e 4) e em gaiolas individuais (Experimento 5), contendo dieta e água *ad libitum*. As condições do biotério foram controladas a fim de manter a temperatura entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

- **Composição e preparo das dietas**

Com exceção dos experimentos 1 e 4, nos quais foi utilizada a dieta comercial Nuvilab[®], nos demais experimentos todas as dietas foram preparadas segundo as especificações da AIN-93G (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993), com modificação no teor de proteínas para 12%. No experimento 2 a concentração de proteína foi mantida a 12% apenas para os grupos controle, para os demais grupos preparou-se a dieta retirando-se a quantidade de proteína (dieta aprotéica), pois a mesma foi oferecida através de gavage.

Após a formulação das dietas, as mesmas foram umedecidas, colocadas no peletizador elétrico (Instituto de Biologia), e posteriormente secas em estufa ventilada, usando-se 50°C de temperatura, durante um período de aproximadamente 24hs, conforme Figura 1.

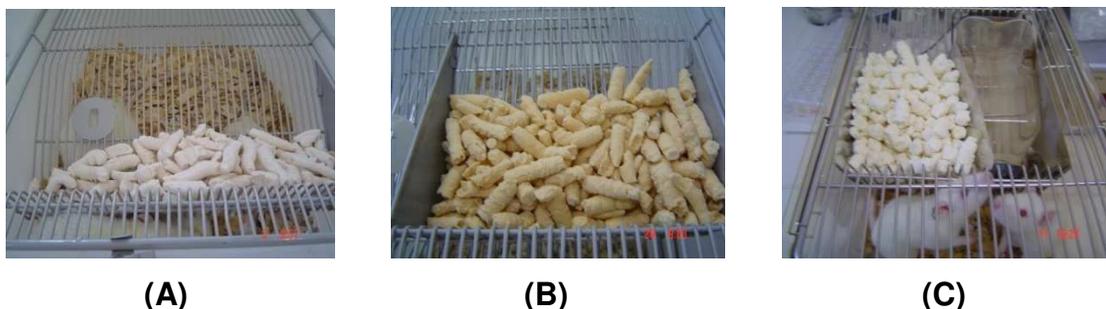


FIGURA 1. Dietas AIN-93G peletizadas. **(A)** Dieta AIN-93G sem adição de proteína; **(B)** Dieta AIN-93G com 12% de WPC; **(C)** Dieta AIN-93G com 12% de caseína.

- **Vias de administração das fontes proteicas**

As proteínas do soro de leite e a caseína foram administradas aos animais como parte da composição das dietas AIN-93G em pó (Experimento 5), dietas AIN-93G peletizadas (Experimento 3) ou através de gavage (Experimento 2).

A gavage consiste na introdução de uma determinada substância teste no aparelho digestório através de um tubo flexível ou agulha, curvado com a ponta arredondada, o qual é introduzido na boca do animal e cuidadosamente empurrado pelo esôfago até o estômago, conforme ilustrado na Figura 2. É preciso realizar corretamente a contensão do animal e ser cauteloso para assegurar que o tubo não penetre a traquéia (GUIMARÃES e MÁZARO, 2004).



FIGURA 2. Ilustração do procedimento de gavage em ratos. Fonte: Guimarães e Mázaró (2004).

Foram realizados testes preliminares para verificar a consistência das proteínas que foram usadas no experimento 2, ou seja, do concentrado de proteínas do leite bovino (WPC) e da caseína, quando as mesmas foram dissolvidas em salina, bem como, para definir a concentração proteica que seria oferecida através da dieta peletizada e por gavage para os grupos experimentais.

Para realização dos testes preliminares, considerou-se um consumo médio de 20g de dieta/dia/animal, a quantidade de proteína presente nas amostras de caseína e WPC e o volume tolerado pelos animais por gavage. Segundo Guimarães e Mázaró (2004), se a administração for de solução aquosa o volume

pode ser de 2mL para cada 100g de peso corporal. Foram testadas as concentrações de 6, 10 e 12% de proteína em volumes de 3, 4 e 5mL.

Os testes demonstraram que 6% de proteína (equivalente a 1,2g de proteína/dia/animal) administrada por gavage poderia ser oferecida em um volume de 4 ou 5mL por apresentar uma consistência adequada. Porém, optou-se por utilizar 12% de proteína, administrada por gavage e presente na dieta AIN-93G dos grupos controle, para garantir que a quantidade proteica oferecida fosse suficiente para se verificar um possível efeito protetor do concentrado de proteínas do soro de leite bovino sobre a mucosa gastrointestinal dos animais, uma vez que os quimioterápicos provocam uma redução no consumo alimentar.

Dessa forma, devido à consistência e a dificuldade de solubilização das proteínas no veículo salina, a administração da caseína e do WPC por gavage, foi realizada duas vezes ao dia com um intervalo de pelo menos 1 hora entre cada administração, totalizando um volume de 10mL.

Os animais dos grupos controle também foram submetidos ao mesmo estresse da gavage que os demais grupos, porém os mesmos receberam salina duas vezes ao dia.

3.2.3. Parâmetros analisados durante os experimentos

- **Monitoramento do peso e do consumo de dieta dos animais**

Foi realizado periodicamente durante os experimentos.

- **Avaliação clínica**

Foi realizada através de ficha de avaliação clínica individual diária a fim de detectar sinais clínicos de estresse ou sofrimento. Para preenchimento das fichas clínicas foram seguidos os critérios para a pontuação (0-3) durante a realização do experimento de acordo com OECD - *Guideline for Testing of Chemicals* (2001):

Aparência (representa o estado geral do animal):

- 0 – normal, pelagem brilhante, olhos claros e brilhantes, mucosas normocoradas;
- 1 – leve alteração no aspecto geral, pêlos sem brilho, com resíduos de fezes e/ou urina, mucosas normocoradas;
- 2 – piloereção moderada, pêlos sem brilho, olhos semicerrados, orelhas pálidas, corrimento nasal e/ou ocular;
- 3 – piloereção acentuada, postura anormal, encurvada, olhos cerrados, orelhas pálidas, intenso corrimento nasal e/ou ocular, caquexia.

Evolução de peso corporal:

- 0 – ganho de peso compatível com a idade;
- 1 – redução inferior a 5% do peso corporal;
- 2 – redução de 10-15% do peso corporal;
- 3 – redução superior a 10-15% do peso corporal, sugerindo inapetência e/ou impossibilidade de acesso à água e ração.

Sinais clínicos:

- 0 – ausência de fezes amolecidas e/ou diarreia;
- 1 – presença de fezes amolecidas e/ou discreta diarreia;
- 2 – moderada diarreia;
- 3 – acentuada diarreia, podendo inclusive apresentar-se com sangue.

Comportamento espontâneo:

- 0 – comportamento normal, exploratório;
- 1 – discretas alterações de comportamento;
- 2 – comportamento anormal: menos ativo e alerta, isolado;
- 3 – vocalização, automutilação, hiperatividade / imobilidade, letargia.

Resposta a estímulos:

- 0 – normal;
- 1 – ligeira diminuição ou exacerbação dos reflexos frente a estímulos;
- 2 – apático, reage tardiamente ao toque, movimenta-se somente após estímulo ou de forma exagerada;

3 – reações violentas ou muito fracas e pré-comatosas (permanece imóvel mesmo quando colocado fora da gaiola).

- **Análise anatomopatológica**

Exame macroscópico dos órgãos bem como eventuais lesões encontradas.

- **Análises bioquímicas**

Foi coletado sangue através do plexo retroorbital dos animais para realização das análises hematológicas e de glutathiona eritrocitária.

O hemograma foi realizado através do equipamento Poch – 100iV Diff, da Beckman Coulter com a utilização de software de uso veterinário. No experimento 5, além da contagem total de leucócitos, também foi realizada a contagem diferencial de leucócitos, com leituras no microscópio óptico de 50 células por campo analisado, totalizando 150 células em 3 campos diferentes.

A glutathiona reduzida (GSH) nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria através do método descrito por Beutler (1986) e com modificação proposta por Penna (1995). Neste método, os eritrócitos de sangue periférico, coletados em tubos com EDTA (Vacuette, Brasil), foram lisados com água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas com solução de ácido metafosfórico glacial. Após incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. Foram acrescentados a 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foram adicionados 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e, obtida uma segunda densidade ótica (DO2). As densidades óticas foram obtidas, em duplicata, no espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-70, Fullerton, EUA).

O volume de todos os reagentes foi diminuído pela metade; substituiu-se a etapa de filtração por centrifugação e as leituras foram efetuadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNCTM, Dinamarca) no aparelho VersaMax microplate reader, da Molecular Devices, usando-se o software SoftMAX Pro versão 4.0. Testes de validação foram realizados e

verificou-se que não houve diferença significativa nos resultados de glutathiona eritrocitária obtida pela modificação de Penna (1995) e pela alteração introduzida nessa pesquisa. Dessa forma, esse método foi alterado para diminuir o volume de sangue a ser coletado periodicamente ao longo dos experimentos.

A concentração de GSH (mg/dL) nos eritrócitos foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{(\text{DO2} - \text{DO1}) \times 31040}{\text{hematócrito}}$$

Onde: o valor 31040 é o coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido pela GSH, multiplicado pelas diluições.

No experimento 5 realizou-se um estímulo imunológico previamente à análise de glutathiona eritrocitária. Para a imunização dos animais foram utilizadas suspensões de hemácias de carneiro padronizadas, obtidas em solução de Alséver, do Biotério Boa Vista, Campinas, SP. Após 16 dias recebendo a dieta, os animais foram imunizados com 5×10^6 hemácias de carneiro lavadas em salina. Os animais foram submetidos a eutanásia 5 dias após a imunização quando, de acordo com a literatura e confirmado em testes laboratoriais, acontece o pico de resposta.

- **Análise histopatológica**

Foram coletadas e mantidas em solução fixadora de formol porções dos seguintes órgãos para a histopatologia: esôfago, estômago; duodeno (região do piloro); jejuno (região das placas de Peyer) e intestino grosso (saída do ceco e na chegada do reto). As porções foram desidratadas e colocadas em parafina. As seções foram cortadas, coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e examinadas por microscopia óptica (fotomicrografias com aumento de 40x, 100x e 400x). Essa análise foi realizada pelo Laboratório CITOCAMP, Campinas – SP, para os experimentos 3 e 4.

Na Tabela 1 encontram-se os diagnósticos histopatológicos (LEWIN, RIDDELL e WEINSTEIN, 1992) para cada porção da mucosa gastrointestinal avaliada durante os experimentos 3 e 4.

TABELA 1. Descrição dos possíveis diagnósticos histopatológico na mucosa gastrointestinal de cada porção avaliada nos experimentos 3 e 4.

Porção	Diagnóstico Final	Descrição
Esôfago	Normal	Mucosa revestida por epitélio plano estratificado queratinizado íntegro. Ulceração ausente.
	Mucosite Leve	Leve infiltrado linfocítico no córion, coilocitoses focais, alterações reativas com células basalóides, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes e mitoses. Ulceração ausente.
Estômago	Normal	Arquitetura preservada. Sem particularidades histológicas. Ulceração ausente.
	Mucosite Leve	<u>Região glandular:</u> leve infiltrado linfocítico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares intensas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração ausente. <u>Região escamosa:</u> leve infiltrado linfocítico no córion, alterações reativas com células basalóides no primeiro terço epitelial, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes e algumas mitoses. Ulceração ausente.
	Mucosite Moderada	<u>Região glandular:</u> moderado infiltrado linfocítico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares intensas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração ausente. <u>Região escamosa:</u> moderado infiltrado linfocítico no córion, alterações reativas moderadas, com células basalóides no primeiro terço epitelial, núcleos vesiculosos, nucléolos evidentes e algumas mitoses. Ulceração ausente.

Duodeno	Normal	Arquitetura preservada. Sem particularidades histológicas. Ulceração ausente.
	Mucosite Leve	Leve infiltrado linfocítico, neutrofílico e eosinofílico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses.
	Mucosite Moderada	Leve infiltrado linfocítico, neutrofílico e eosinofílico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares moderadas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração ausente.
	Mucosite Intensa	Moderado infiltrado linfocítico, neutrofílico e eosinofílico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares reativas intensas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração focal.
Jejuno	Normal	Arquitetura preservada. Sem particularidades histológicas. Ulceração ausente.
	Mucosite Leve	Leve infiltrado linfocítico, neutrofílico e eosinofílico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração ausente.
	Mucosite Moderada	Moderado infiltrado inflamatório com predomínio linfocítico no córion; alterações celulares epiteliais glandulares reativas intensas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses. Ulceração ausente.
	Mucosite Intensa	Moderado infiltrado linfocítico no córion, alterações celulares epiteliais glandulares moderada com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e frequentes mitoses e eosinófilos. Ulceração ausente. Agregado linfóide focal. Focos de erosão.
Intestino Grosso / Reto	Normal	Arquitetura preservada. Sem particularidades histológicas. Ulceração ausente.
	Mucosite Leve	Leve infiltrado linfocítico no córion. Agregados linfóides focais.
	Mucosite Moderada	Moderado infiltrado linfocítico no córion.

- **Análise microbiológica**

Amostras de sangue total de cada grupo de animais, devidamente identificadas, foram coletadas assepticamente, via punção venosa retro-orbital com uso de microcapilares de vidro, em tubos cônicos com volume de 2 mL, contendo 20 uL de solução anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 10%.

As amostras foram enviadas ao laboratório de controle de qualidade animal - controle de qualidade sanitária do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para posterior avaliação da presença de microorganismos mesófilos aeróbicos.

Cada amostra enviada foi semeada imediatamente após o seu recebimento por esgotamento superficial com auxílio de alça bacteriológica, em placas de Petri contendo meio de cultivo bacteriano Agar Sangue. Os meios foram incubados à temperatura de 37 °C pelos períodos de 24h, 48h e 72h em condições aeróbicas para crescimento e isolamento de colônias de possíveis microrganismos contaminantes.

As colônias de microrganismos isolados foram identificados por meio de sua análise morfológica, características morfo-tintoriais por meio de coloração pelo método de Gram e semeadura em meios seletivos diferenciais Agar Mac Conkey e Agar Manitol Salgado, Agar Rugai-Araujo e complementação com prova bioquímica simplificada: pesquisa de oxidase, catalase e MILI (motilidade, produção de indol e descarboxilação da lisina) e utilização de Citrato Simmons (BUCHANAN e GIBBONS, 1974; BIER, 1977).

3.2.4. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, (GOMES, 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”.

4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

4.1. EXPERIMENTO 1 (Piloto)

4.1.1. Objetivos Específicos

- Testar um esquema de doses repetidas com intervalo de tempo para desenvolvimento de um modelo de mucosite gastrointestinal em ratos Wistar;
- Avaliar a eficácia na indução de mucosite dos quimioterápicos 5-fluoruracila e sulfato de vincristina, através da avaliação do peso corporal, análise clínica e anatomopatológica.

4.1.2. Protocolo Experimental

O ensaio teve a duração de 2 semanas, com 4 grupos experimentais totalizando 27 animais para o quimioterápico 5-Fluoruracila (5-FU) e 4 grupos com um total de 33 animais para o quimioterápico sulfato de vincristina, conforme protocolo descrito nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Em relação ao quimioterápico 5-FU foram testadas doses de 150mg/Kg e 100mg/Kg de peso, testando, ainda, esquema de doses repetidas com intervalo de três dias (pico máximo da resposta da mucosa GI ao quimioterápico) entre cada dose, conforme descrito por Mauger *et al.* (2007). O mesmo esquema foi adotado para o quimioterápico sulfato de vincristina, exceto pelas doses administradas que foram de 1,5; 0,75; 0,5 e 0,25mg/Kg de peso.

Ao longo do experimento, em intervalos de 3 dias e após cada dose de quimioterápico administrada, foram realizadas eutanásias de alguns animais de cada grupo para avaliação da mucosite gastrointestinal e após a última dose de quimioterápico administrada estipulou-se esperar 1 semana para a realização da eutanásia dos animais restantes em cada grupo para avaliação da recuperação espontânea. Os grupos experimentais testados com 5-FU estão descritos na Figura 3.

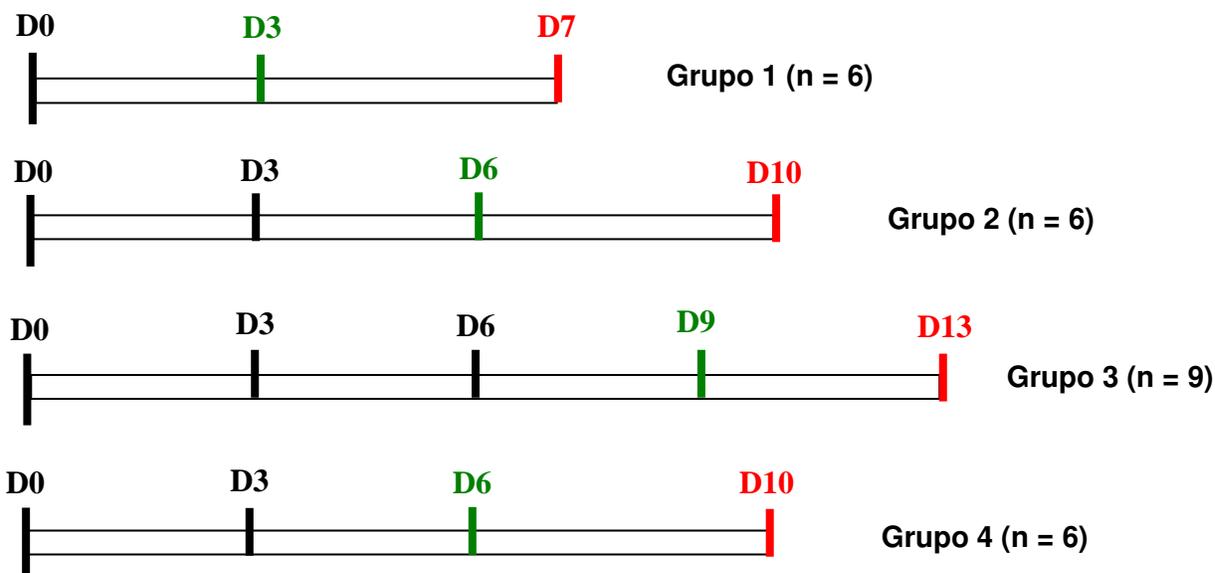


FIGURA 3. Protocolo experimental do ensaio biológico com ratos Wistar para o quimioterápico 5-Fluoruracila (5-FU). Eutanásias para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação espontânea da mucosa estão demonstradas em verde e vermelho, respectivamente.

Grupo 1: administração de dose única de 150mg/Kg de peso para 6 animais no primeiro dia do experimento (D0). Após 3 dias (D3) foram submetidos a eutanásia 3 animais para avaliação da presença ou não de mucosite gastrointestinal e após 7 dias da administração do 5-FU (D7) o restante dos animais foram mortos.

Grupo 2: administração de duas doses (D0 e D3) de 150mg/Kg de peso para 6 animais. Três dias após a 2ª dose de 5-FU (D6) foram submetidos a eutanásia 3 animais e no D10 foram mortos os animais restantes.

Grupo 3: administração de três doses (D0, D3 e D6) de 100mg/Kg de peso para 9 animais. Três dias após a 3ª dose de 5-FU (D9) foram submetidos a eutanásia 3 animais e no D13 foram mortos os animais restantes.

Grupo 4: administração de duas doses (D0 e D3) de 100mg/Kg de peso para 6 animais. Três dias após a 2ª dose de 5-FU (D6) foram submetidos a eutanásia 3 animais e no D10 foram mortos os animais restantes.

Para o quimioterápico sulfato de vincristina a descrição dos grupos experimentais testados encontra-se na Figura 4.

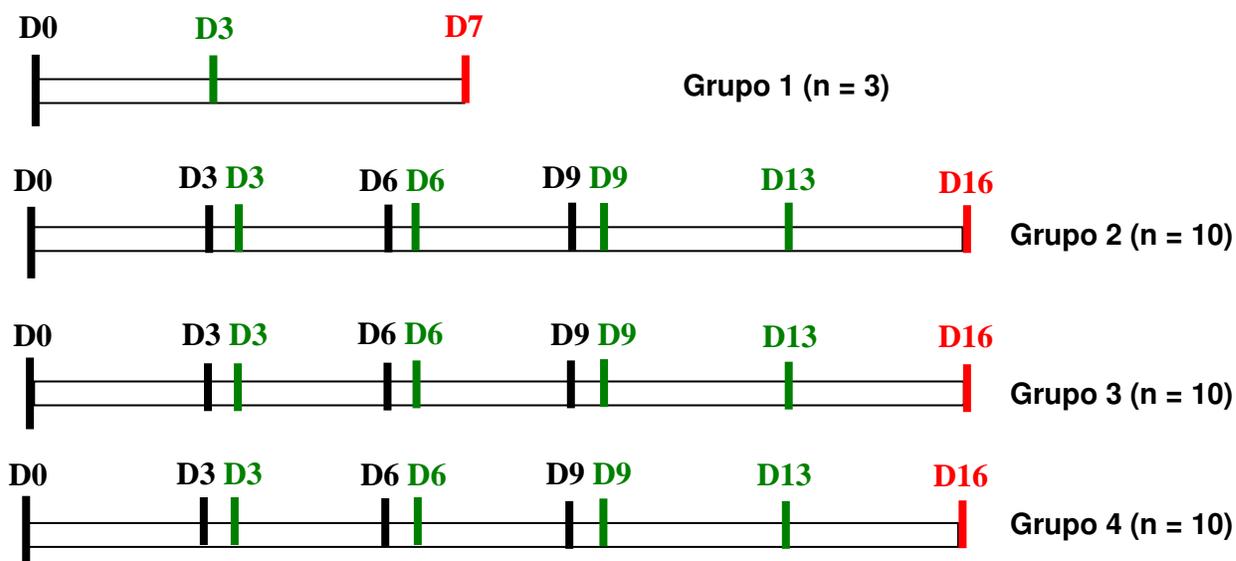


FIGURA 4. Protocolo experimental do ensaio biológico com ratos Wistar para o quimioterápico sulfato de vincristina. Eutanásias para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação espontânea da mucosa estão demonstradas em verde e vermelho, respectivamente.

Grupo 1: administração de dose única de 1,5mg/Kg de peso para 3 animais no primeiro dia do experimento (D0). Após 3 dias (D3) foram submetidos a eutanásia 2 animais para avaliação da presença ou não de mucosite gastrointestinal e após 7 dias da administração do 5-FU (D7) o animal restante foi morto.

Grupo 2: administração de quatro doses (D0, D3, D6 e D9) de 0,25mg/Kg de peso para 10 animais.

Grupo 3: administração de quatro doses (D0, D3, D6 e D9) de 0,5mg/Kg de peso para 10 animais.

Grupo 4: administração de quatro doses (D0, D3, D6 e D9) de 0,75mg/Kg de peso para 10 animais.

Para os grupos 2, 3 e 4 as eutanásias ao longo do experimento foram realizadas da seguinte forma: no D3 foi morto 1 animal de cada grupo e em D6, D9 e D13 foram submetidos a eutanásia 3 animais por grupo. Após 7 dias da administração da última dose de sulfato de vincristina (D16) os 3 animais restantes foram mortos.

É importante salientar que os protocolos experimentais acima descritos foram estabelecidos antes do início do experimento. Entretanto, durante o curso do mesmo foi realizada a avaliação clínica diária dos animais e, por motivos éticos e de bem-estar, algumas administrações de quimioterápicos foram alteradas. Tais modificações no delineamento experimental original foram detalhadas em resultados obtidos.

4.1.3. Resultados

- **Peso corporal**

A partir dos dados de peso corporal foi realizada a construção de curvas de peso ao longo do experimento (Figura 5 e 7), bem como, a comparação entre os pesos iniciais e finais de cada grupo, ilustradas nas Figura 6 e 8.

Não houve diferença significativa no peso de todos os grupos que receberam 5-FU ao final do experimento (Figura 5). O experimento foi finalizado antes do preconizado através do protocolo experimental (Figura 1) por motivo de óbito dos animais restantes nesses grupos.

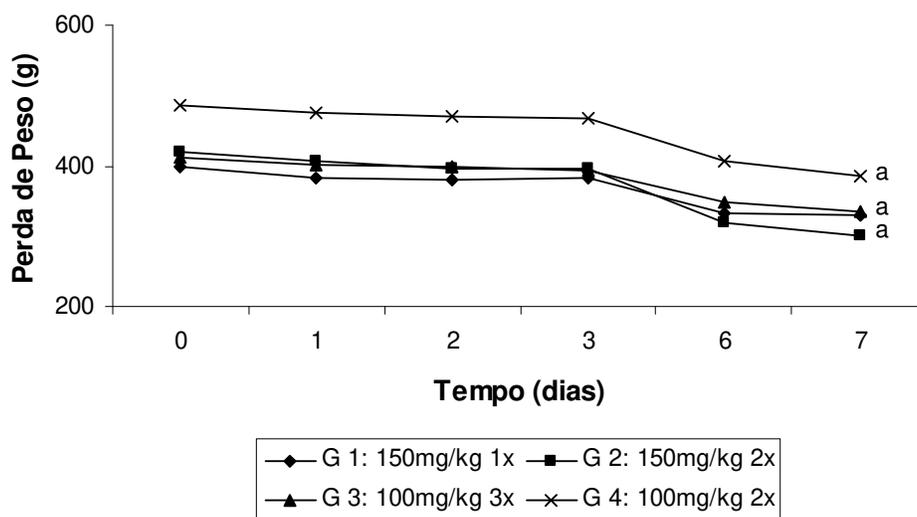


FIGURA 5. Curvas de peso dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico 5-FU. G 1: dose única de 150mg/Kg; G 2: 2 doses de 150mg/Kg; G 3: 3 doses de 100mg/Kg e G 4: 2 doses de 100mg/Kg.

Em relação à comparação entre o peso inicial e o final ao longo do estudo, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o grupo 2 e 4. Dessa forma os percentuais de perda de peso para esses dois grupos foram de 28,6 e 20,9%, respectivamente, conforme Figura 6.

É importante ressaltar que os animais do grupo 3, que receberam 3 doses de 100mg/Kg de peso, foram a óbito entre 24 a 48h após a administração da 3ª dose de 5-FU, não tendo seu peso verificado nesse período, sendo que a última pesagem desse grupo foi 24h após a 3ª dose, tempo insuficiente para verificar-se uma perda acentuada de peso.

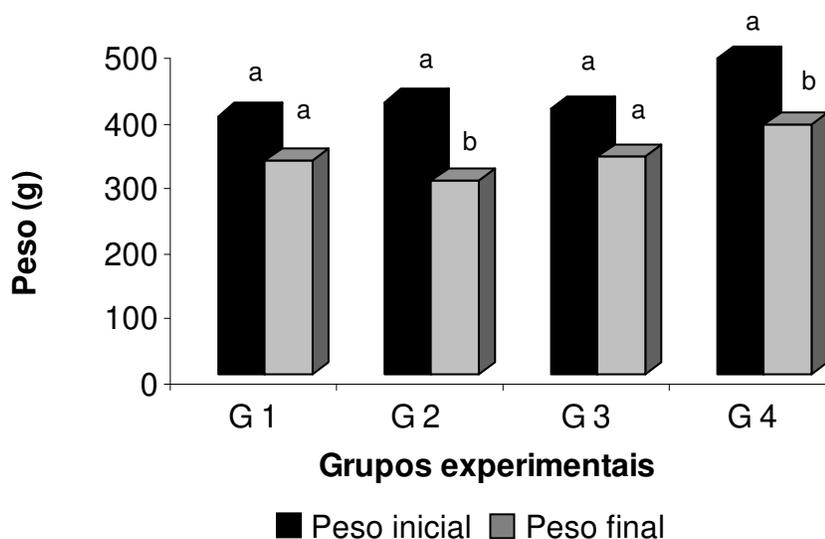


FIGURA 6. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico 5-FU ao longo do estudo. G 1: dose única de 150mg/Kg; G 2: 2 doses de 150mg/Kg; G 3: 3 doses de 100mg/Kg e G 4: 2 doses de 100mg/Kg. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Para os grupos experimentais 2, 3 e 4 que foram tratados com sulfato de vincristina constatou-se também que os pesos ao final do experimento não diferiram entre si estatisticamente (Figura 7). Assim como ocorreu com os animais tratados com 5-FU, os animais tratados com sulfato de vincristina também foram a óbito antes do final do experimento pré-estabelecido conforme protocolo (Figura 4).

Outra modificação realizada no protocolo experimental (grupo 2) foi administração de uma 5ª dose (0,25mg/Kg) de sulfato de vincristina, respeitando-se o intervalo de 3 dias entre cada administração.

Os grupos 3 (dose de 0,5mg/Kg) e 4 (dose de 0,75mg/Kg) não receberam a 3ª dose de quimioterápico no 6º dia, porque grande parte dos animais foram a óbito. Dessa forma, por motivos éticos e de bem-estar animal, optou-se por esperar uma semana após a 2ª dose para administrar a 3ª aos animais restantes desses grupos, para que os mesmos pudessem recuperar-se.

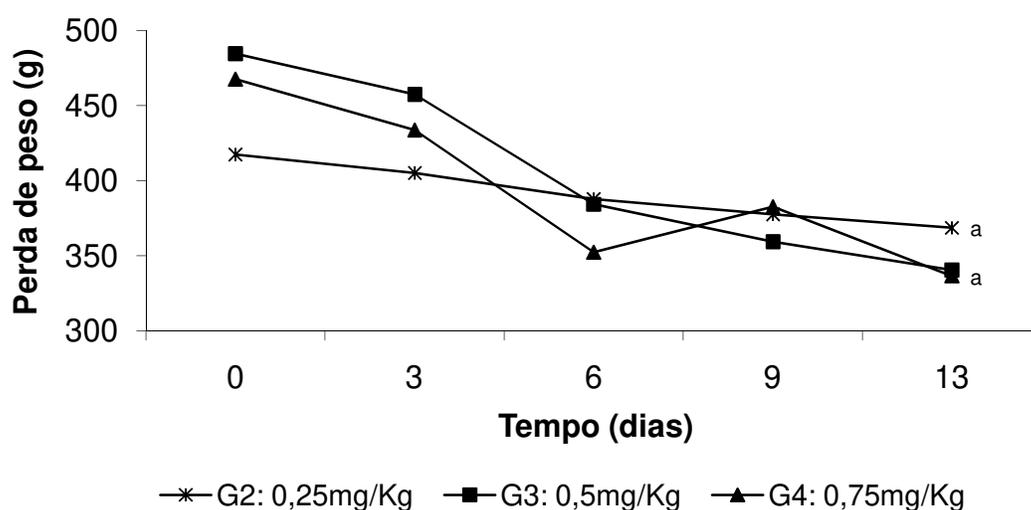


FIGURA 7. Curvas de perda de peso dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina. G 2: 5 doses de 0,25mg/Kg; G 3: 3 doses de 0,5mg/Kg e G 4: 3 doses de 0,75mg/Kg.

O grupo 1 que recebeu dose única de 1,5mg/Kg de peso não foi representado nas Figuras 7 e 8 porque a dose administrada foi tóxica, levando a óbito 2 animais após 48h da administração. No animal sobrevivente foi realizada a eutanásia no 3º dia do experimento, sendo que o mesmo não apresentou clinicamente sinais e lesões compatíveis com mucosite ao longo do seu trato gastrointestinal.

Na Figura 8 faz-se a comparação entre o peso inicial e final dos animais dos grupos G2, G3 e G4. Pode-se observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) para o grupo 3 e para o grupo 4. O percentual de perda de peso para esses dois

grupos foi de 29,7 e 28%, respectivamente, enquanto que para o grupo de animais tratados com doses mais baixas de quimioterápico (G 2) verificou-se que não houve diferença estatística entre seu peso inicial e final.

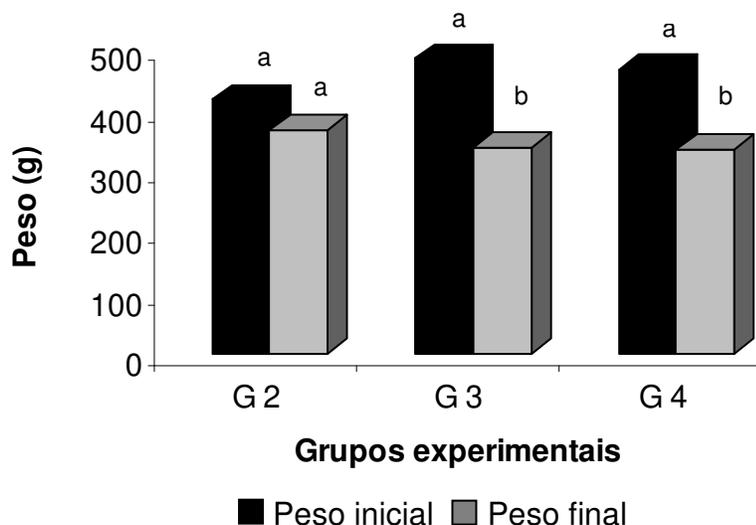


FIGURA 8. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina ao longo do estudo. G 2: 5 doses de 0,25mg/Kg; G 3: 3 doses de 0,5mg/Kg e G 4: 3 doses de 0,75mg/Kg.

- **Avaliação Clínica**

De maneira geral observaram-se nos animais durante o curso do experimento, aparência geral (pêlos), evolução do peso, sinais clínicos (presença de diarreia), comportamento espontâneo e seu comportamento provocado. Esses parâmetros foram avaliados diariamente (com exceção dos finais de semana) e individualmente obedecendo-se um escore entre 0 a 3 pontos para cada item, podendo totalizar um escore máximo de 15 pontos, conforme a ficha de avaliação clínica.

Na Tabela 2 encontram-se os escores médios diários dos grupos experimentais tratados com 5-FU ao longo dos dias do ensaio, os quais foram obtidos através da avaliação individual de cada animal no seu respectivo grupo.

TABELA 2. Escores médios da avaliação clínica realizada com os grupos tratados com 5-FU ao longo do experimento.

Grupos	Tempo (dias)					
	D0	D1	D2	D3	D6	D7
G 1	0,0	1,0	3,3	4,5	7,3	9,7
G 2	0,0	1,0	2,8	4,7	10,3	11,7
G 3	0,0	1,0	1,7	4,2	7,0	10,0
G 4	0,0	1,0	1,7	4,1	6,8	10,7

G 1: dose única de 150mg/Kg; G 2: 2 doses de 150mg/Kg; G 3: 3 doses de 100mg/Kg e G 4: 2 doses de 100mg/Kg.

Pode-se observar que o escore começa a diferenciar-se entre os grupos a partir de 48h após a 1ª administração de 5-FU (D2), sendo mais acentuado para os grupos 1 e 2 que receberam as maiores doses. No D3, os grupos 2, 3 e 4 receberam a 2ª dose de 5-FU verificando-se uma elevação dos escores da avaliação clínica em D6 e D7. No D6, o grupo 3 recebeu a 3ª dose de 5-FU, o que debilitou bastante os animais, verificando-se importantes alterações nas primeiras 24h, e o óbito entre 24 e 48h após essa 3ª dose.

No experimento com sulfato de vincristina verificou-se uma relação dependente da dose e do número de administrações, ou seja, quanto maior a dose e o número de administrações, maiores os escores da avaliação clínica e, portanto mais acentuada as alterações observadas nos animais (Tabela 3).

TABELA 3. Escores médios da avaliação clínica realizada com os grupos tratados com sulfato de vincristina ao longo do experimento.

Grupos	Tempo (dias)											
	D0	D1	D2	D3	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
G 1	0,0	4,0	8,0	11,0								
G 2	0,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0
G 3	0,0	1,0	3,0	5,0	10,0	10,0	10,0	7,0	7,0	7,0	10,0	10,0
G 4	0,0	1,0	4,0	5,0	12,0	12,0	12,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

G 1: dose única de 1,5mg/Kg; G 2: 5 doses de 0,25mg/Kg cada; G 3: 3 doses de 0,5mg/Kg cada e G 4: 3 doses de 0,75mg/Kg cada.

A avaliação clínica (presença de diarreia e de piloereção) também pode ser evidenciada através de fotos, conforme demonstrado nas Figuras 9 e 10.

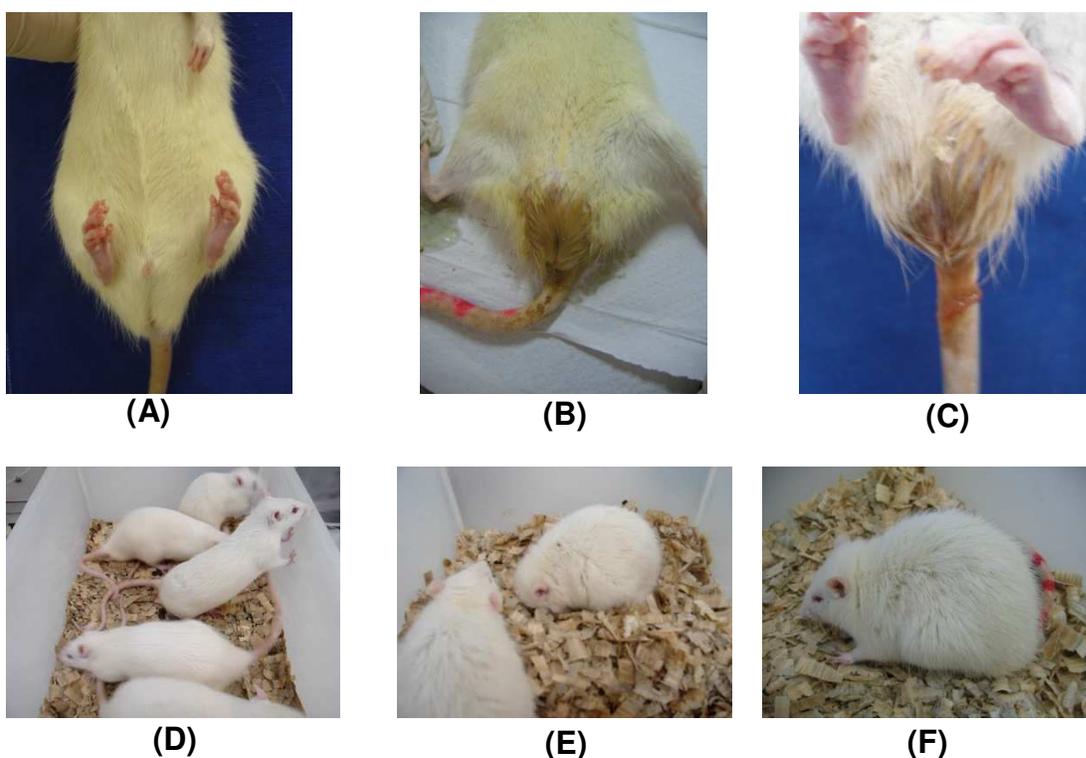


FIGURA 9. Avaliação clínica da presença de diarreia e piloereção dos grupos tratados com 5-FU. **(A)** Animal hígido; **(B)** Animal do G 2, 72h após a 2ª dose de 150mg/Kg; **(C)** Animal do G 3, 72h após a 3ª dose de 100mg/Kg; **(D)** Animais hígidos; **(E)** Animal do G 4, 72h após a 2ª dose de 100mg/Kg e **(F)** Animais do G 3, 24h após a 3ª dose de 100mg/Kg.

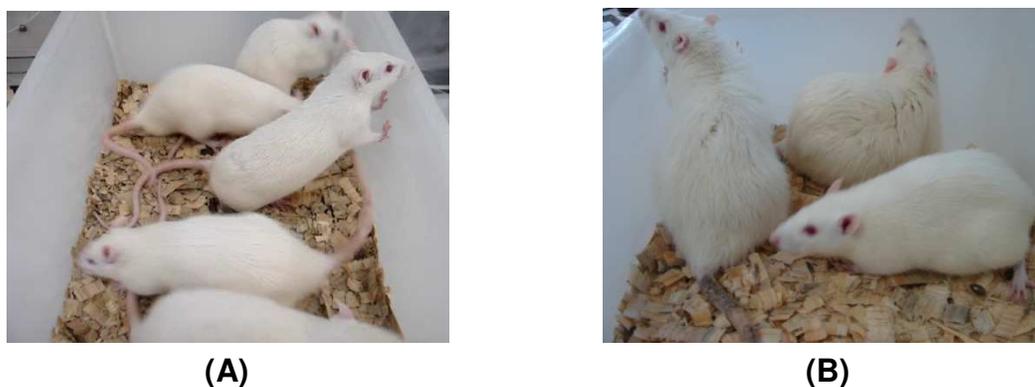


FIGURA 10. Avaliação clínica da presença de piloereção dos grupos tratados com sulfato de vincristina. **(A)** Animais hígidos; **(B)** Animal à esquerda do G 4 (0,75mg/Kg), animal ao centro e no fundo do G 3 (0,5mg/Kg) e animal à direita do G 2 (0,25mg/Kg).

- **Análise Anatomopatológica**

Tanto no experimento realizado com 5-FU como com sulfato de vincristina não foram evidenciadas macroscopicamente lesões compatíveis com mucosite oral.

No D6 foi realizada a eutanásia para avaliação anatomopatológica após 3 dias da 2ª administração de 5-FU para os animais dos grupos 2 e 4 tratados com 150mg/Kg e 100mg/Kg, respectivamente.

Tanto no grupo que recebeu a dose de 100mg/Kg (Figura 11) como no grupo tratado com doses de 150mg/Kg (Figura 12) verificou-se a presença de diarreia intensa; estômago dilatado; conteúdo intestinal líquido (ausência de bolo fecal); ulceração na região duodenal e lesões hemorrágicas no TGI (predominantemente no duodeno e no reto).

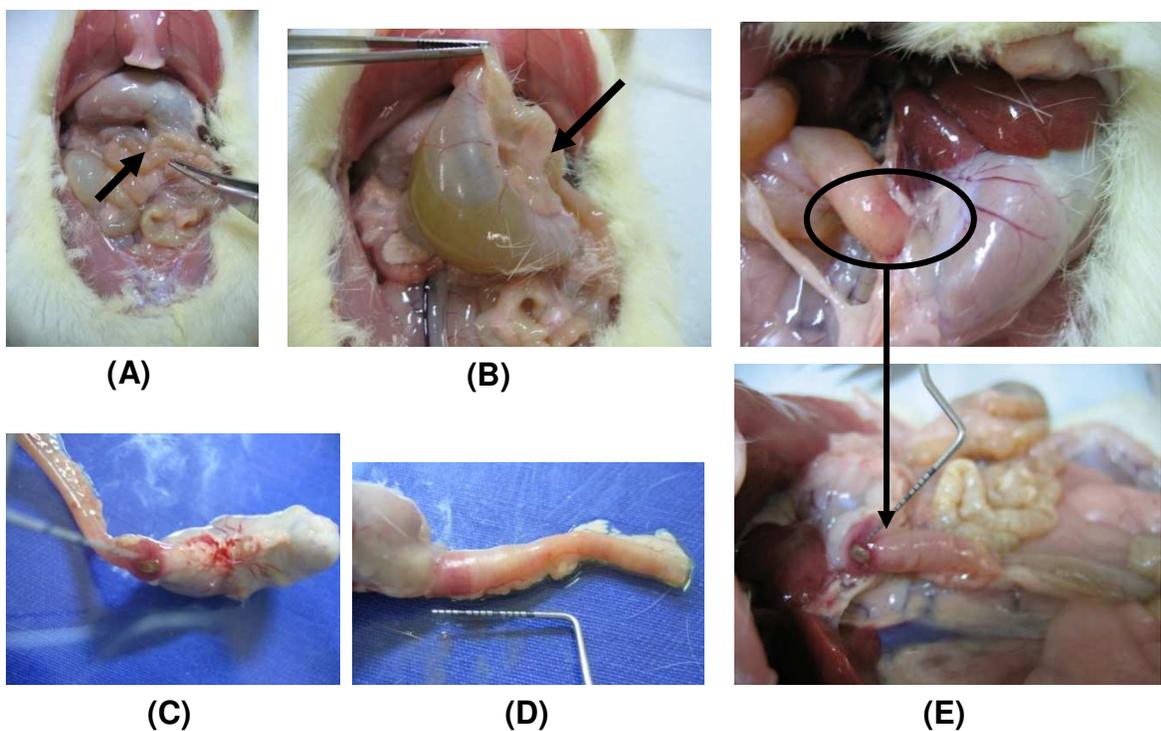


FIGURA 11. Avaliação anatomopatológica após 3 dias da 2ª administração de 5-FU para o grupo 4 tratado com a dose de 100mg/Kg. **(A)** Estômago dilatado e conteúdo líquido; **(B)** Conteúdo intestinal líquido; **(C)**, **(D)** e **(E)** Ulceração na região duodenal.

Verificou-se 24h após a 3ª dose de 100mg/Kg de 5-FU para os animais do grupo 3 sinais de estresse, sendo que os mesmos foram a óbito durante o final de semana (entre 24 e 48h após 3ª dose) e dessa forma, não pode ser realizada a análise anatomopatológica desse grupo experimental.

No experimento com sulfato de vincristina não foram encontradas lesões compatíveis com mucosite mesmo nos grupos tratados com as maiores doses e depois de repetidas administrações.

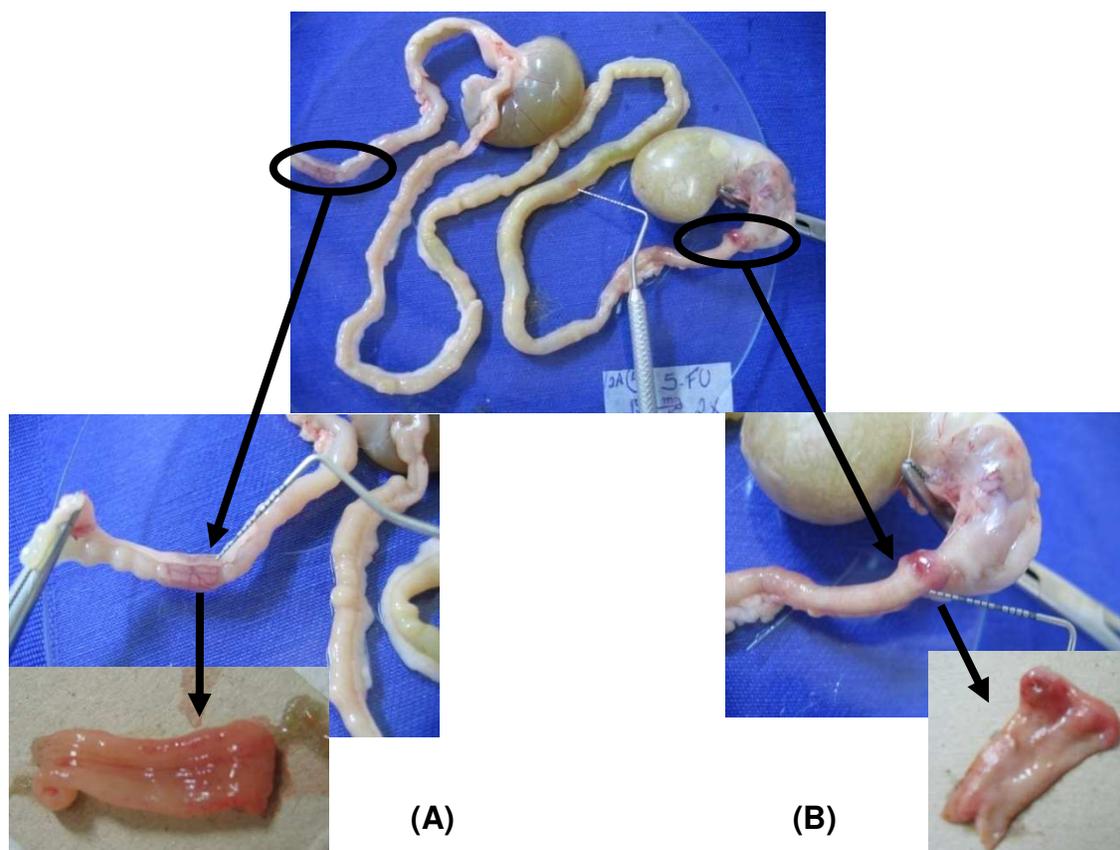


FIGURA 12. Avaliação anatomopatológica do trato gastrointestinal após 3 dias da 2ª administração de 5-FU para o grupo 2 tratado com a dose de 150mg/Kg. **(A)** Região do reto; **(B)** Região duodenal.

4.1.4. Conclusões do Experimento 1 (Piloto)

Os dados obtidos através desse experimento piloto permitiram concluir que:

- 1) O quimioterápico sulfato de vincristina não foi um bom agente indutor de mucosite gastrointestinal em ratos Wistar;
- 2) Pode-se comprovar a eficiência do quimioterápico 5-Fluoruracila na indução de mucosite gastrointestinal de ratos Wistar, sendo que doses recomendadas para os demais experimentos devem ser inferiores a 100 mg/Kg com intervalo de 3 dias entre cada administração, não devendo ultrapassar 2 ou 3 doses.

Portanto, o quimioterápico 5-Fluoruracila foi o agente escolhido para posterior avaliação do efeito preventivo e/ou protetor de proteínas lácteas sobre a mucosa gastrointestinal de ratos Wistar .

4.2. EXPERIMENTO 2

4.2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o esquema de 3 doses de 75mg/Kg de 5-FU, com intervalo de 3 dias entre cada administração, sobre a indução de mucosite gastrointestinal;
- Comparar os possíveis efeitos sobre a proteção da mucosa gastrointestinal do WPC e da caseína;
- Avaliar a influência do período de início da ingestão de proteínas lácteas: administradas prévia ou simultaneamente ao quimioterápico;
- Avaliar a via de administração das proteínas por gavagem (consumo induzido).

4.2.2. Protocolo Experimental

O ensaio teve a duração de 16 dias, utilizando-se 6 grupos experimentais, conforme protocolo descrito na Figura 13.

Ao longo do experimento, especificamente 3 dias após a 2ª e a 3ª dose de 5-FU administradas, foram realizadas eutanásias de 02 animais de cada grupo para avaliação da mucosite gastrointestinal e após a última dose de quimioterápico administrada estipulou-se esperar 1 semana para a realização da eutanásia dos animais restantes em cada grupo para avaliação da recuperação espontânea, porém os animais não resistiram 1 semana após a 3ª dose, o que pode ser avaliado durante a análise clínica, sendo o experimento finalizado no D16, conforme protocolo experimental da Figura 13. Os grupos experimentais testados foram:

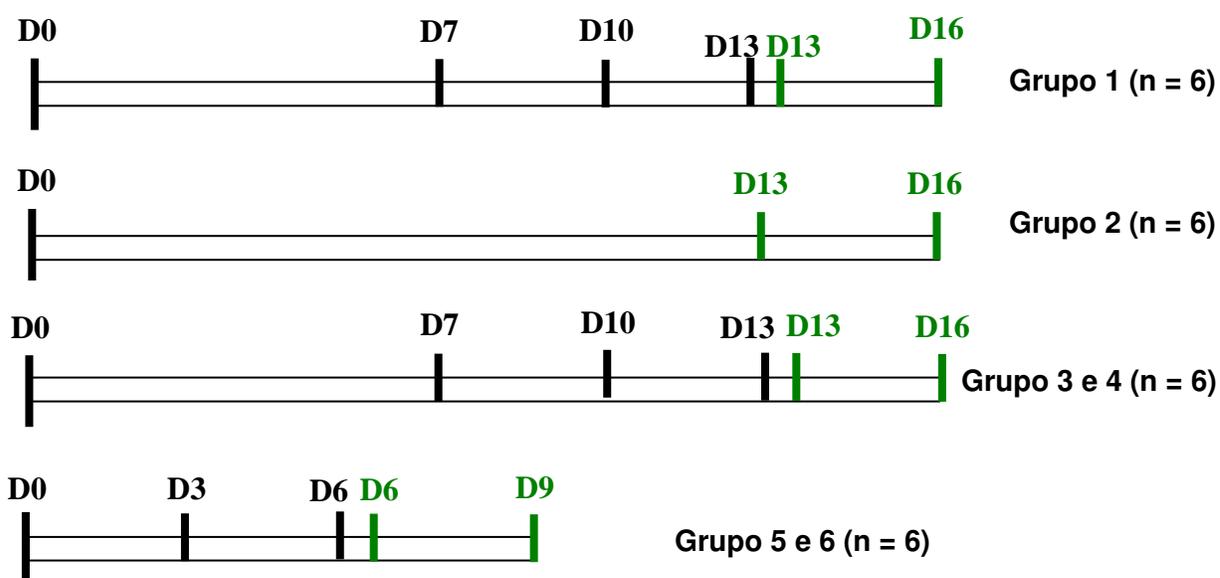


FIGURA 13. Protocolo do experimento 2. Eutanásias para avaliação da mucosite estão demonstradas em verde.

Grupo 1: Controle que recebeu dieta AIN-93 com 12% de WPC, gavagem de salina e administração do quimioterápico 5-FU a partir do 7º dia de experimento (D7). Foi realizada a administração de três doses (D7, D10 e D13) de 75mg/Kg de peso para 6 animais. Três dias após a 2ª dose de 5-FU (D13) foram submetidos a eutanásia 2 animais e no D16 foram mortos os animais restantes.

Grupo 2: Controle que recebeu dieta AIN-93 com 12% de WPC e gavagem de salina. No D13 foram submetidos a eutanásia 2 animais e no D16 foram submetidos a eutanásia os animais restantes.

Grupo 3: Recebeu dieta AIN-93 aprroteica, gavage de caseína na concentração de 12% por sete dias antes do início da administração da 1ª dose de 5-FU (75mg/Kg de peso). Foi realizada a administração de três doses (D7, D10 e D13) de 75mg/Kg de peso para 6 animais. As eutanásias foram realizadas conforme descrito para os animais do grupo 1.

Grupo 4: Recebeu dieta AIN-93 aprroteica, gavage de WPC na concentração de 12% por sete dias antes do início da administração da 1ª dose de 5-FU (75mg/Kg de peso). Procedeu-se da mesma forma que para os animais dos grupos 1 e 3.

Grupo 5: Recebeu dieta AIN-93 aprroteica, gavage de caseína na concentração de 12% simultaneamente com o início da administração da 1ª dose de 5-FU. Foi realizada a administração de três doses (D0, D3 e D6) de 75mg/Kg de peso para 6 animais. No D6 foram submetidos a eutanásia 2 animais e no D9 foram mortos os animais restantes.

Grupo 6: Recebeu dieta AIN-93 aprroteica, gavage de WPC na concentração de 12% simultaneamente com o início da administração da 1ª dose de 5-FU (75mg/Kg de peso). As eutanásias foram realizadas da mesma forma que para os animais do grupo 5.

4.2.3. Resultados

- **Peso corporal**

Uma vez que os animais dos grupos 5 e 6 foram pesados em dias diferentes e também devido a duração ter sido inferior aos demais grupos optou-se por fazer duas curvas de evolução do peso (Figura 14 e 15).

De acordo com a Figura 14, pode-se observar que durante a 1ª semana de experimento os animais de todos os grupos mostraram uma tendência de ganho ou manutenção do peso, uma vez que nesse período os animais estavam apenas recebendo a dieta AIN-93 completa com 12% de WPC, no caso dos grupos 1 e 2, ou dieta AIN-93 aprroteica e gavage com proteína equivalente a 12% para os grupos 3 e 4.

A partir do sétimo dia (D7), no qual os grupos 1, 3 e 4 receberam a 1ª administração de 5-FU pode-se verificar o início da perda do peso corporal dos animais desses grupos. A 2ª dose de 5-FU foi administrada no D10 e a 3ª dose no D13. Nesse período verificou-se diminuição no peso dos animais, porém não houve diferença estatística entre os grupos ao final do experimento (Figura 14).

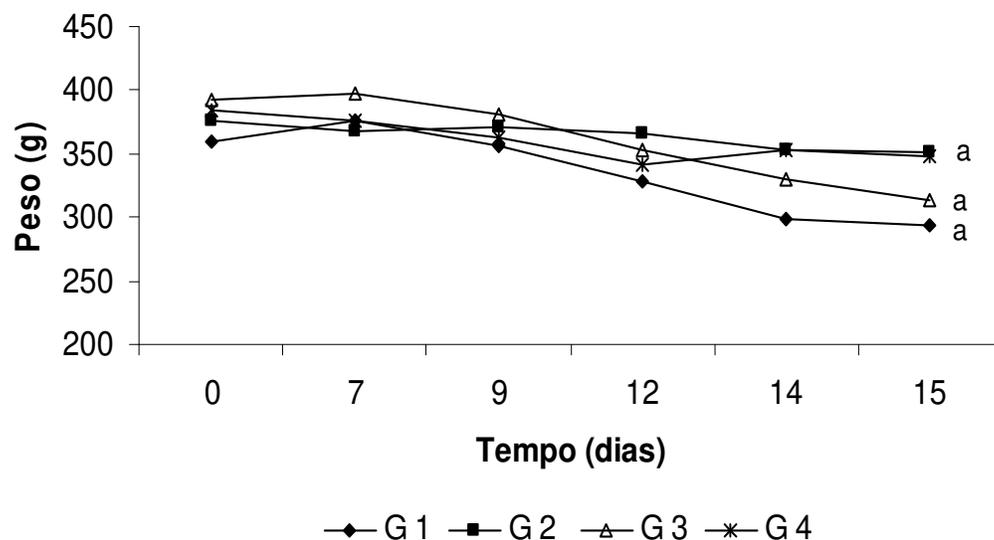


FIGURA 14. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais: G 1: Controle salina + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 2: Controle salina; G 3: Caseína Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 4: WPC Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU.

Para os grupos 5 e 6, os quais não receberam um tratamento prévio e iniciaram o experimento recebendo as proteínas por gavagem simultaneamente às administrações de 5-FU nos dias D0, D3 e D6, verificou-se um comportamento de perda de peso semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao final do experimento, conforme Figura 15.

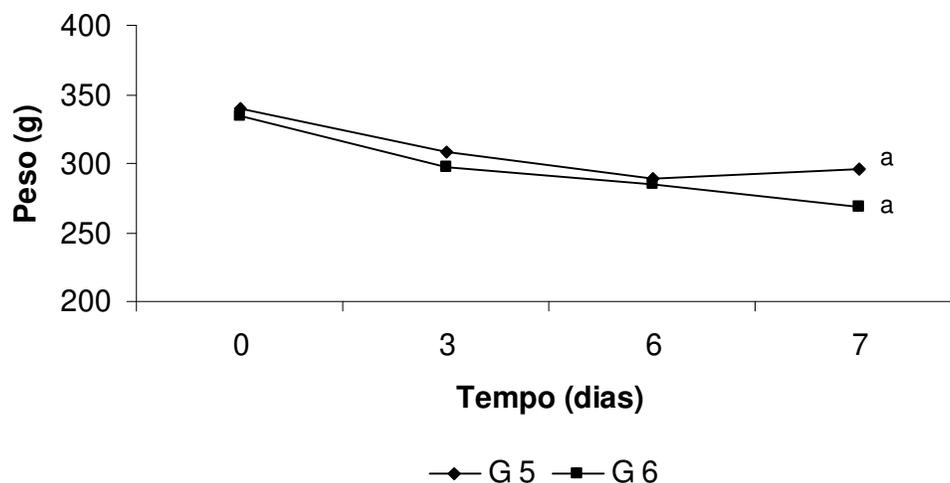


FIGURA 15. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais: G 5: Caseína + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 6: WPC + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU.

Através da Figura 16 pode-se verificar a comparação entre os pesos iniciais e finais de todos os grupos ao longo do experimento.

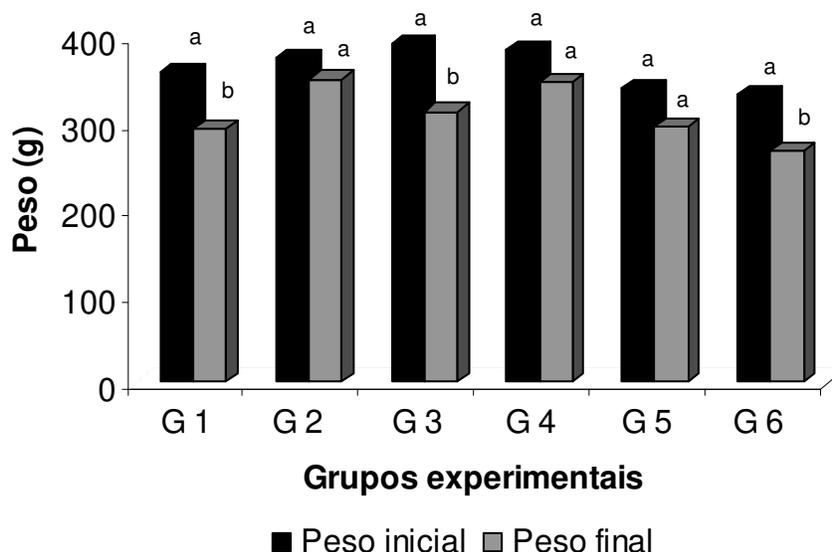


FIGURA 16. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais: G 1: Controle salina + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 2: Controle salina; G 3: Caseína Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 4: WPC Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 5: Caseína + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 6: WPC + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Destaca-se nesse experimento que não houve diferença significativa entre o peso inicial e final para o grupo 4, que recebeu WPC previamente, quando comparado com a perda de peso de 20% do grupo 3, que recebeu caseína prévia à administração do 5-FU. Observou-se também, redução significativa no peso corporal para os grupos 1 (perda de 18,4%) e 6 (perda de 19,5%).

- **Consumo de dieta**

Os resultados obtidos na Tabela 4 mostraram haver diferença significativa ($p < 0,05$) na ingestão da dieta entre todos os tratamentos estudados. Observou-se um consumo decrescente na seguinte ordem: controle salina, controle salina + 5-FU, caseína pré + 5-FU e WPC pré + 5-FU.

Esses resultados de certa forma já eram esperados, uma vez que os animais dos grupos 3, 4, 5 e 6 receberam uma dieta AIN-93G apteica, tendo seu aporte de proteínas administrado por gavagem.

TABELA 4. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 2.

Grupos experimentais	Ingestão de Dieta (g/grupo)	Ingestão de Dieta (g/animal/dia)
G 1: Controle salina + 5-FU	322,38 ^b	3,35 ^b
G 2: Controle salina	672,50 ^a	7,0 ^a
G 3: Caseína Pré + 5-FU	279,07 ^c	2,90 ^c
G 4: WPC Pré + 5-FU	254,60 ^c	2,65 ^c
G 5: Caseína + 5-FU	6,77 ^d	0,16 ^d
G 6: WPC + 5-FU	6,50 ^d	0,15 ^d

Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 5-FU = 5-Fluoruracila.

Os animais dos grupos 3 e 4 tratados previamente por gavagem com caseína e WPC, respectivamente, apresentaram uma ingestão da dieta AIN-93G apteica intermediária quando comparada com a ingestão do grupo 1 (controle) e a ingestão pelos grupos 5 e 6.

Destaca-se a baixíssima ingestão para esses dois últimos grupos que receberam as proteínas por gavagem ao mesmo tempo que foi administrada a 1^a

dose de 5-FU, lembrando-se que o tempo de experimento para os grupos 5 e 6 foi de apenas uma semana ao contrário dos demais grupos que foi de 16 dias.

- **Avaliação Clínica**

Na Tabela 5 encontram-se os escores médios diários dos grupos experimentais ao longo dos dias do ensaio, os quais foram obtidos através da avaliação individual de cada animal do seu respectivo grupo, podendo totalizar até 15 pontos.

TABELA 5. Escores médios da avaliação clínica realizada ao longo do experimento.

Grupos	Tempo (dias)																
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
G 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	3,0	3,0	7,0	10,0
G 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0
G 3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	4,0	4,0	6,0	11,0
G 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	3,0	4,0	5,0	9,0
G 5	0,0	0,0	2,0	4,0	4,0	4,0	6,0	7,0	10,0								
G 6	0,0	0,0	1,0	4,0	4,0	4,0	7,0	9,0	10,0								

G 1: Controle salina + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 2: Controle salina; G 3: Caseína Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 4: WPC Pré + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU; G 5: Caseína + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU e G 6: WPC + 3 doses de 75mg/Kg 5-FU.

Pode-se observar que as primeiras alterações clínicas dos grupos 1, 3 e 4 começaram a aparecer no D11, ou seja, 24h após a 2ª administração de 5-FU, e intensificaram-se a partir de 48h após a 3ª dose de 5-FU. De uma maneira geral, verificou-se que em 48h após 3ª dose de 75mg/Kg de 5-FU (D15) os animais do grupo 3, que receberam caseína previamente, estavam mais debilitados clinicamente que os animais do grupo 1 (controle), que receberam o WPC através da dieta, e que os animais do grupo 4, que receberam WPC por gavagem, respectivamente. Este fato foi confirmado no D16 quando os 4 animais restantes do grupo 3 foram a óbito.

No entanto para os grupos 5 e 6 as primeiras alterações clínicas foram verificadas com apenas 48h após a 1ª administração de 5-FU, acentuando-se principalmente entre 24 e 48h após a 3ª dose de quimioterápico.

A avaliação clínica, principalmente no que se refere à presença de piloereção, também pode ser evidenciada através de fotos, conforme demonstrado na Figura 17.

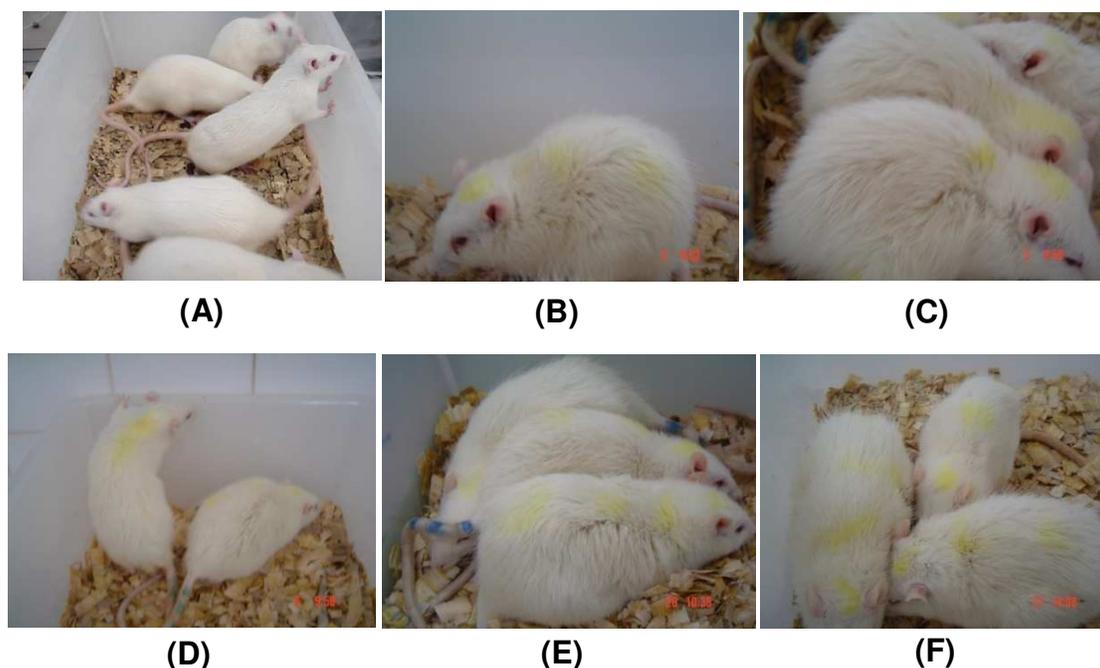


FIGURA 17. Avaliação clínica da presença de piloereção entre animais dos grupos experimentais 48h após a administração da 3ª dose de 5-FU. **(A)** G 2: controle salina; **(B)** G 1: Controle salina + 5-FU; **(C)** G 3: Caseína Pré + 5-FU; **(D)** G 4: WPC Pré + 5-FU; **(E)** G 5: Caseína + 5-FU e **(F)** G 6: WPC + 5-FU.

- **Análise Anatomopatológica**

Na eutanásia realizada 3 dias (D6) após a administração da 2ª dose de 75mg/Kg de 5-FU para os grupos 5 e 6 tratados com caseína e WPC, respectivamente, foi verificado a presença de conteúdo intestinal líquido (ausência de bolo fecal), diarreia de moderada a intensa e ulcerações compatíveis com mucosite na região do duodeno.

No D8, ou seja, 48h após a administração da 3ª dose de 5-FU, foram a óbito 2 animais do grupo 5, estando os demais animais desse grupo e também do grupo 6 extremamente debilitados clinicamente, apresentando estômago dilatado, conteúdo intestinal líquido, diarreia intensa, inclusive com presença de sangue, e

ulcerações compatíveis com mucosite em várias regiões do TGI, de acordo com a Figura 18.

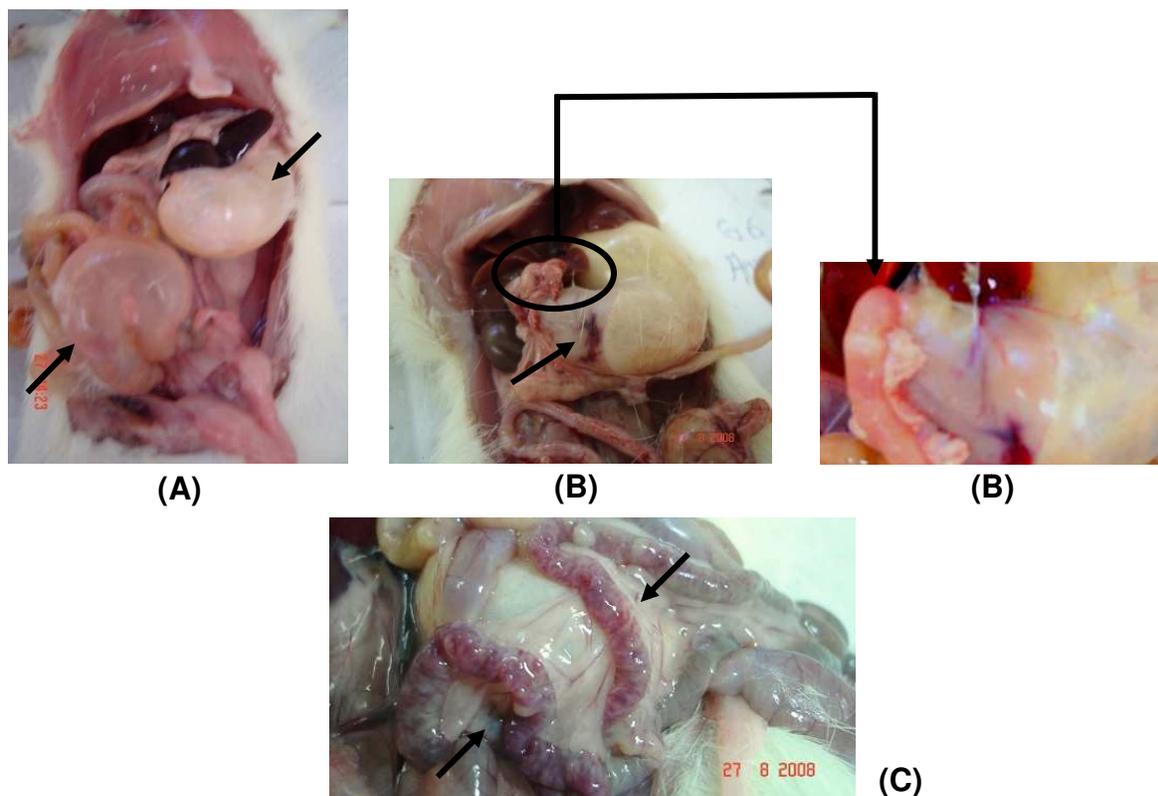


FIGURA 18. Avaliação anatomopatológica 48h após a administração da 3^a dose de 5-FU para o grupo 5, tratado com caseína; e para o grupo 6, tratado com WPC. **(A)** Grupo 5: Estômago dilatado e conteúdo intestinal líquido; **(B)** Grupo 6: Ulceração na região do estômago e do duodeno; **(C)** Grupo 6: Ulcerações espalhadas na região do intestino.

Dessa forma, optou-se por realizar a eutanásia para avaliação anatomopatológica de todos os animais desses dois grupos.

Para os grupos 1, 3 e 4 observou-se que clinicamente as alterações nos animais intensificaram-se a partir de 48h após a 3^a dose de 5-FU, o que também foi encontrado na análise anatomopatológica.

No último dia do experimento (D16), 72h após a 3^a dose de 5-FU, foi realizada a eutanásia nos animais restantes dos grupos 1, 3 e 4 (um animal de

cada grupo), bem como, a eutanásia dos animais controle (grupo 2), conforme Figura 19.

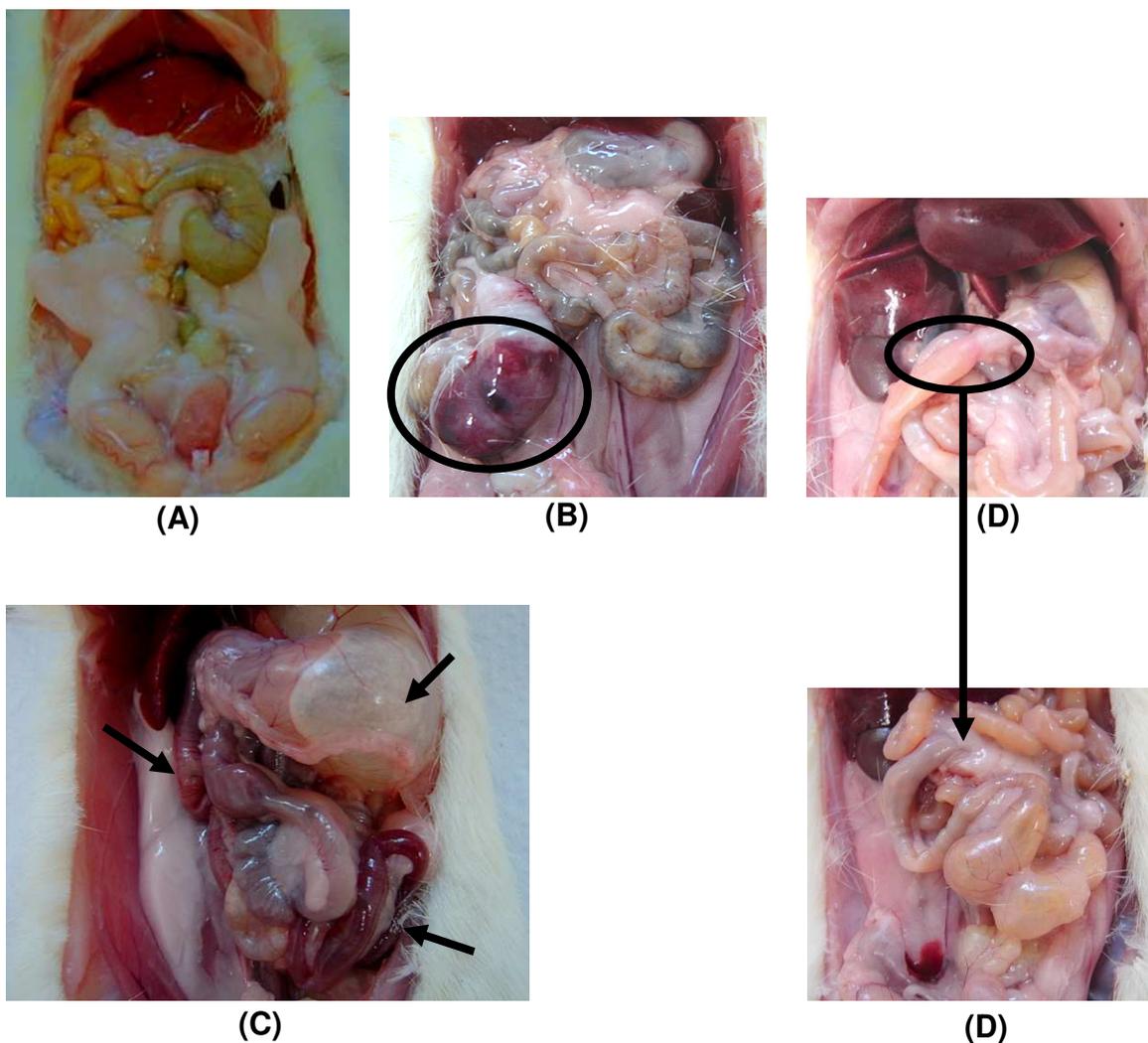


FIGURA 19. Avaliação anatomopatológica 72h após a administração da 3ª dose de 5-FU dos grupos experimentais: 1, 2, 3 e 4. **(A)** Animal hígido do controle; **(B)** Animal do controle + 5-FU com ulceração no ceco; **(C)** Animal Caseína Pré + 5-FU com ulcerações ao longo do intestino; **(D)** Animal WPC Pré + 5-FU aparentemente sem ulcerações importantes.

Através da Figura 19 pode-se comparar a cavidade abdominal, bem como, a presença de ulcerações compatíveis com mucosite entre: (A) um animal hígido do grupo controle, que recebeu dieta AIN-93G com 12% de WPC mais gavage com salina e os animais dos demais grupos. Em (B) destaca-se uma ulceração bem evidenciada na região do ceco do animal pertencente ao grupo 1,

denominado também como controle, mas que recebeu tratamento com 3 doses de 5-FU na mesma concentração dos grupos 3 e 4. Em (C) demonstra-se o estômago dilatado e a presença de importantes ulcerações ao longo do intestino, ressaltadas pela intensificação da coloração, no animal pertencente ao grupo 3, que recebeu dieta AIN-93G apteica + caseína por gavagem previamente ao início do tratamento com 5-FU.

Ao contrário dos animais dos demais grupos, o animal que recebeu dieta AIN-93G apteica + WPC por gavagem previamente ao início do tratamento com 5-FU clinicamente não apresentou ulcerações importantes compatíveis com mucosite de acordo com (D), onde se evidenciou a cavidade abdominal e as regiões do duodeno e do ceco.

- **Análises Bioquímicas**

Foram coletadas amostras nos seguintes dias para a realização do hemograma e da glutatona eritrocitária: D0, D7, D8, D11 e D14 para os grupos 1, 2, 3 e 4 e D0, D1, D4 e D7 para os grupos 5 e 6. Esses dias foram selecionados para análise por representarem períodos importantes, a saber:

D0 - leitura basal para o início do experimento;

D1 - 24h após a administração da 1ª dose de 5-FU para os grupos 5 e 6;

D4 - 24h após a administração da 2ª dose de 5-FU;

D7 - leitura uma semana após tratamento com as proteínas e antes da 1ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4 e, 24h após a administração da 3ª dose de 5-FU para os grupos 5 e 6;

D8 - 24h após a administração da 1ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4;

D11 - 24h após a administração da 2ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4;

D14 - 24h após a administração da 3ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4.

Hemograma

Os parâmetros hematológicos de ratos são influenciados por vários fatores, entre eles: local de coleta de amostra, idade, sexo, linhagem, anestesia, método de contenção e estresse. Entretanto, existe disponibilidade de valores de referência publicados, sendo utilizados no presente estudo os valores

determinados pelo software do equipamento de hemograma do CPQBA e também os limites estabelecido de acordo com Thrall *et al.* (2006).

Leucócitos - Os limites de referência de leucócitos para ratos são de 7,3 a $12,66 \times 10^3$ células/uL, de acordo com Thrall *et al.* (2006). Ao longo do experimento verificou-se que houve uma diminuição nos níveis de leucócitos abaixo do valor inferior de referência para os grupos 1, 3 e 4, a partir de 24h após a administração da 2ª dose de 5-FU (D11) intensificando com 24h após a 3ª dose de 5-FU (D14), sendo estatisticamente significativa quando se compara com o início do experimento (D0), conforme Figura 20 (A).

Ao se comparar os grupos entre si em cada tempo de análise, constatou-se que apenas os valores de leucócitos no D11 e D14 dos grupos 1, 3 e 4 diferiram estatisticamente nos respectivos dias de análise do grupo 2 (controle).

Para o grupo 5, que recebeu caseína simultaneamente ao quimioterápico, observou-se diferença estatística no D4 (24h após a 2ª dose de 5-FU) e no D7 (24h após a 3ª dose de 5-FU) quando se comparou com D0. Para o grupo 6, que recebeu WPC, houve redução significativa entre D0 e D7. Comparado esses dois grupos em cada tempo de estudo, verificou-se que apenas em D4 houve diferença significativa ($p < 0,05$), com níveis inferiores para o grupo 5 (Figura 20 B).

É importante ressaltar que os valores nos níveis de leucócitos 24h após a 3ª dose de 5-FU foram muito inferiores aos limites de referência para todos os grupos experimentais: grupo 1 ($1,7 \times 10^3$ /uL), grupo 3 ($2,3 \times 10^3$ /uL), grupo 4 ($2,8 \times 10^3$ /uL), grupo 5 ($2,2 \times 10^3$ /uL) e grupo 6 ($2,8 \times 10^3$ /uL), comparados com $7,3 \times 10^3$ células/uL (THRALL *et al.*, 2006).

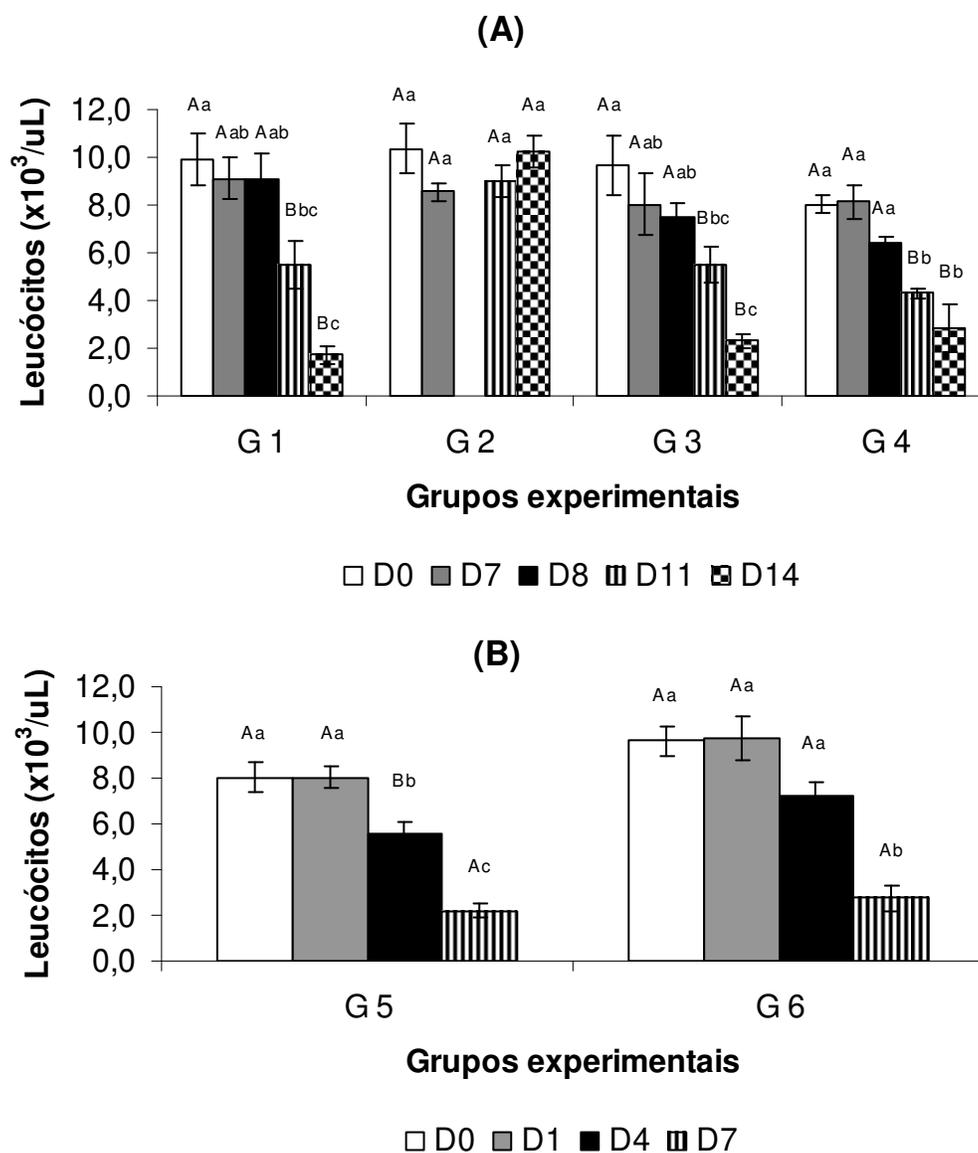


FIGURA 20. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Eritrócitos - Através da Figura 21 A e B, pode-se verificar que os valores de eritrócitos não foram significativamente afetados ao longo do experimento para cada grupo avaliado e quando se compara os grupos experimentais entre si em cada tempo analisado.

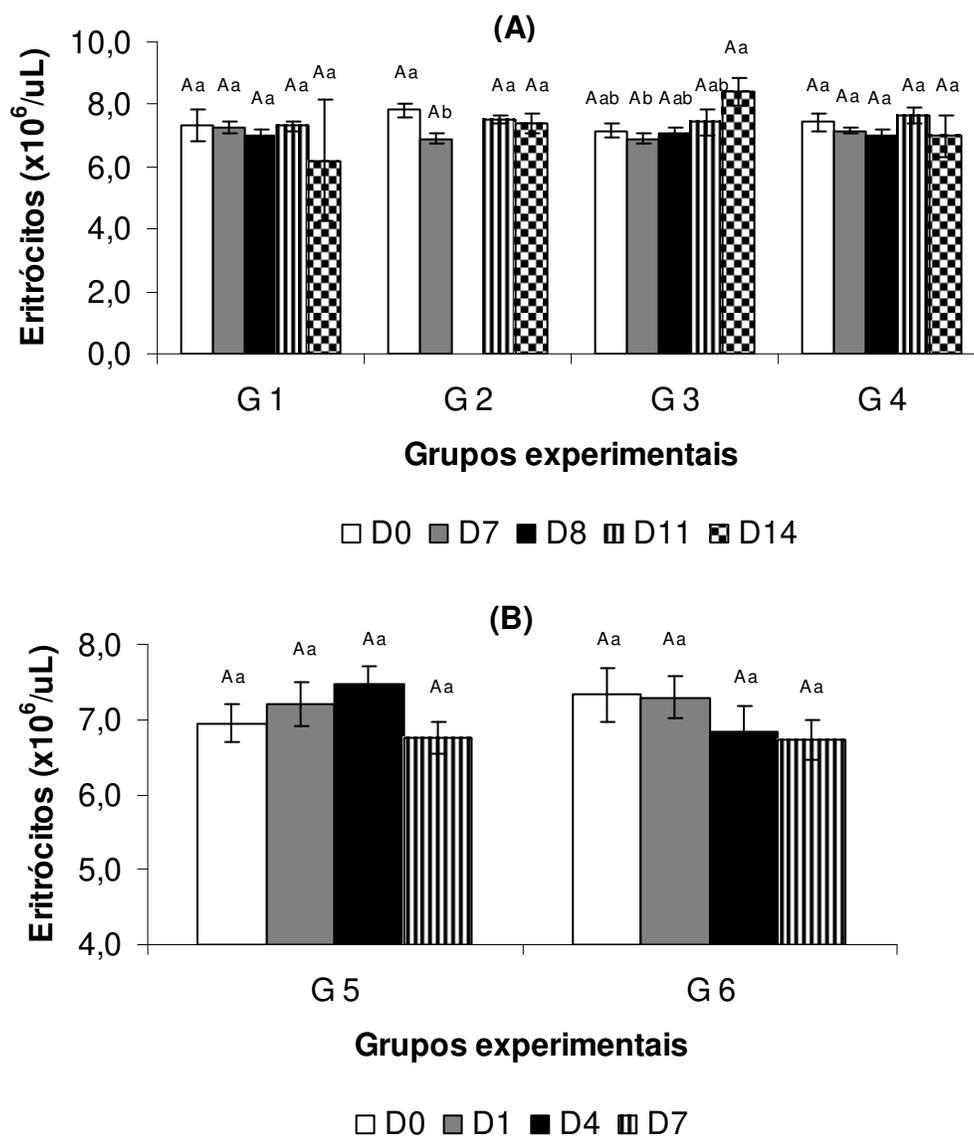


FIGURA 21. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Sendo os limites de referência de eritrócitos para ratos de $6,6$ a $9,0 \times 10^6$ células/uL (THRALL *et al.*, 2006), praticamente todos os grupos experimentais em todos os tempos apresentaram valores superiores a $6,6 \times 10^6$ células/uL com exceção do grupo 1 no D14 ($6,2 \times 10^6$ células/uL).

Hemoglobina e Hematócrito - Os valores de hemoglobina e hematócrito estão representados na Tabela 6 para os grupos 1, 2, 3 e 4 e na Tabela 7 para os grupos 5 e 6. Segundo Thrall *et al.* (2006) os limites de referência para hemoglobina e hematócrito para ratos são de 13,2 a 16,4 g/dL e 41,1 a 51,1 %, respectivamente. Já o software do equipamento onde foram realizadas as análises de hemograma fornecem como limites de referência para ratos: 11,0 a 18,0 g/dL para hemoglobina e 36 a 48% para hematócrito.

De acordo com esses últimos valores de referência podemos observar tanto na Tabela 6 como na Tabela 7 que a maioria dos valores de hemoglobina e hematócrito estão adequados. Foram exceções apenas os valores de hematócrito para os grupos 1 no D14 (31,6%) e grupo 6 no D7 (35,3%).

TABELA 6. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais 1, 2, 3 e 4.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)					Hematócrito (%)				
	D0	D7	D8	D11	D14	D0	D7	D8	D11	D14
Grupo 1	11,5 ± 0,86 ^{Aa}	13,1 ± 0,32 ^{Aa}	12,9 ± 0,26 ^{Aa}	13,1 ± 0,37 ^{Aa}	11,3 ± 3,47 ^{Aa}	39,0 ± 2,88 ^{Aa}	38,5 ± 1,16 ^{Aa}	37,6 ± 0,82 ^{Aa}	38,0 ± 0,72 ^{Aa}	31,6 ± 9,94 ^{Aa}
Grupo 2	12,7 ± 0,38 ^{Aa}	12,7 ± 0,21 ^{Aa}	-----	13,5 ± 0,20 ^{Aa}	13,4 ± 0,38 ^{Aa}	42,3 ± 1,37 ^{Aa}	37,2 ± 0,65 ^{Ab}	-----	39,7 ± 0,62 ^{Aa}	38,9 ± 1,30 ^{Aa}
Grupo 3	11,5 ± 0,30 ^{Ab}	12,6 ± 0,26 ^{Aab}	12,9 ± 0,24 ^{Aab}	13,2 ± 0,74 ^{Aab}	14,8 ± 0,62 ^{Aa}	38,5 ± 1,08 ^{Aa}	36,7 ± 0,80 ^{Aa}	37,6 ± 0,79 ^{Aa}	38,6 ± 2,21 ^{Aa}	43,1 ± 1,91 ^{Aa}
Grupo 4	12,7 ± 0,50 ^{Aa}	13,0 ± 0,10 ^{Aa}	12,8 ± 0,40 ^{Aa}	13,6 ± 0,43 ^{Aa}	12,6 ± 1,16 ^{Aa}	40,8 ± 1,67 ^{Aa}	38,8 ± 0,43 ^{Aa}	37,7 ± 1,25 ^{Aa}	40,3 ± 1,19 ^{Aa}	36,2 ± 3,42 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Grupo 1: Controle salina + 5-FU; Grupo 2: Controle; Grupo 3: Caseína Pré + 5-FU e Grupo 4: WPC Pré + 5-FU.

Ao contrário dos demais grupos, o grupo 3, que recebeu caseína previamente, apresentou uma elevação estatística significativa no valor de hemoglobina entre D0 e D14.

TABELA 7. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais 5 e 6.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)				Hematócrito (%)			
	D0	D1	D4	D7	D0	D1	D4	D7
Grupo 5	12,4± 0,49 ^{Aa}	13,1± 0,49 ^{Aa}	13,8± 0,33 ^{Aa}	12,1± 0,41 ^{Aa}	37,8± 1,40 ^{Aa}	39,2± 1,46 ^{Aa}	40,2± 1,12 ^{Aa}	36,3± 1,34 ^{Aa}
Grupo 6	13,3± 0,51 ^{Aa}	13,1± 0,42 ^{Aa}	12,6± 0,60 ^{Aa}	12,0± 0,37 ^{Aa}	39,2± 1,62 ^{Aa}	39,3± 1,19 ^{Aa}	36,6± 1,78 ^{Aa}	35,3± 1,11 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Grupo 5: Caseína + 5-FU e Grupo 6: WPC + 5-FU.

Plaquetas - Os limites de referência de plaquetas para ratos são de 500 a 1300 x 10³ células/uL, de acordo com o software do equipamento onde foram realizadas as análises de hemograma. Na Figura 22 A e B, verificou-se que os valores de plaquetas foram influenciados ao longo do experimento 2 ocorrendo uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir do D11 para os grupos 1, 3 e 4 e a partir do D7 para os grupos 5 e 6.

Ao se avaliar cada tempo isoladamente, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos 1, 3 e 4 e o controle, nos tempos D0 e D7. As diferenças ocorreram no grupo 1 (controle que recebeu 5-FU) apenas no D14 e nos grupos 3 (caseína pré + 5-FU) e 4 (WPC pré + 5-FU) no D11 e D14 quando comparado com o controle que não recebeu quimioterápico. Não houve diferença significativa para os grupos 5 e 6 quando comparados em cada tempo analisado (Figura 22 B).

Os valores de plaquetas verificados 24h após a administração da 3^a dose de 5-FU estavam abaixo de 200 x 10³ células/uL para todos os grupos experimentais.

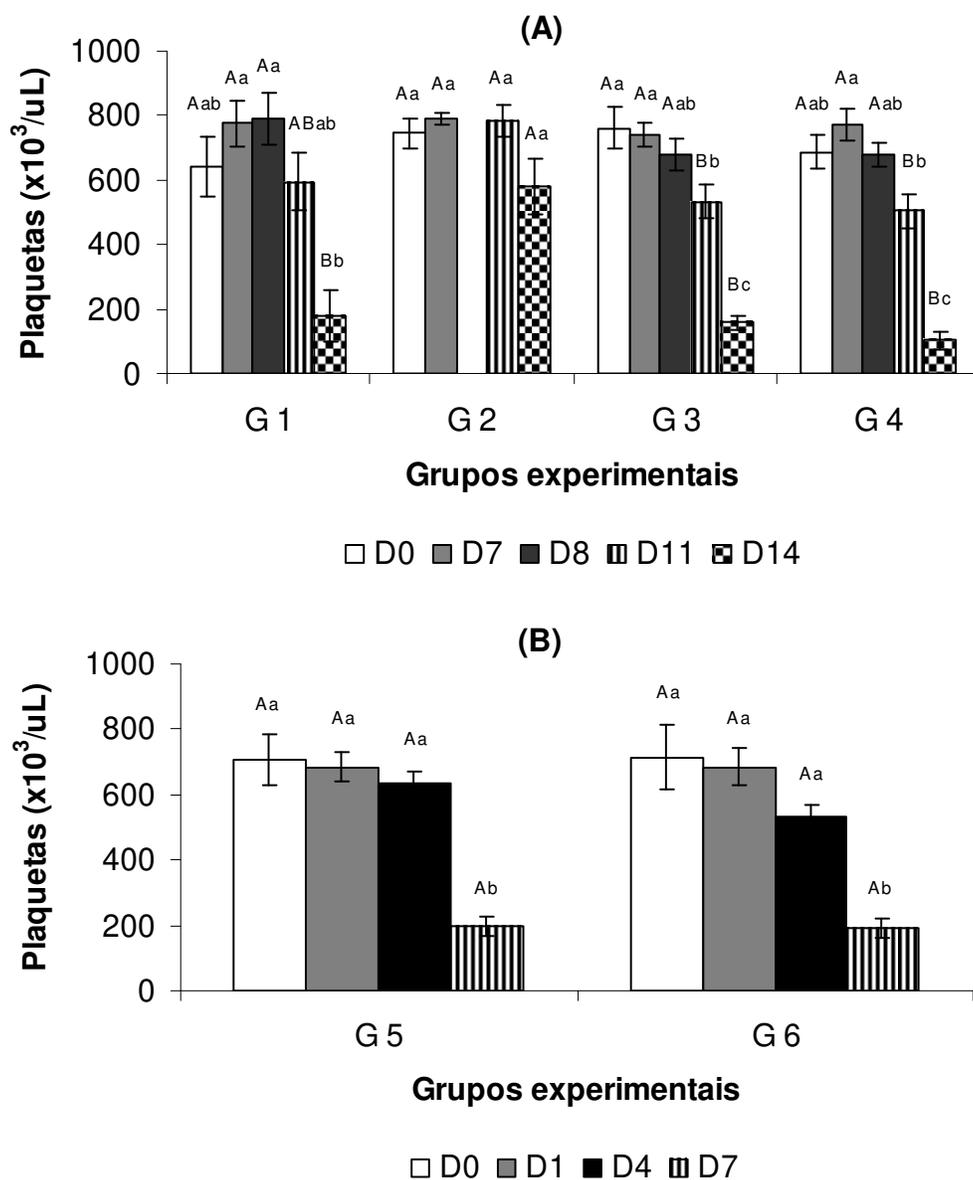


FIGURA 22. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Glutaciona eritrocitária

Não houve diferença estatística significativa no decorrer do experimento nos níveis de GSH para os grupos 1 e 3. O grupo 4 apresentou valores estatisticamente inferiores em D7 e D8 (Figura 23 A).

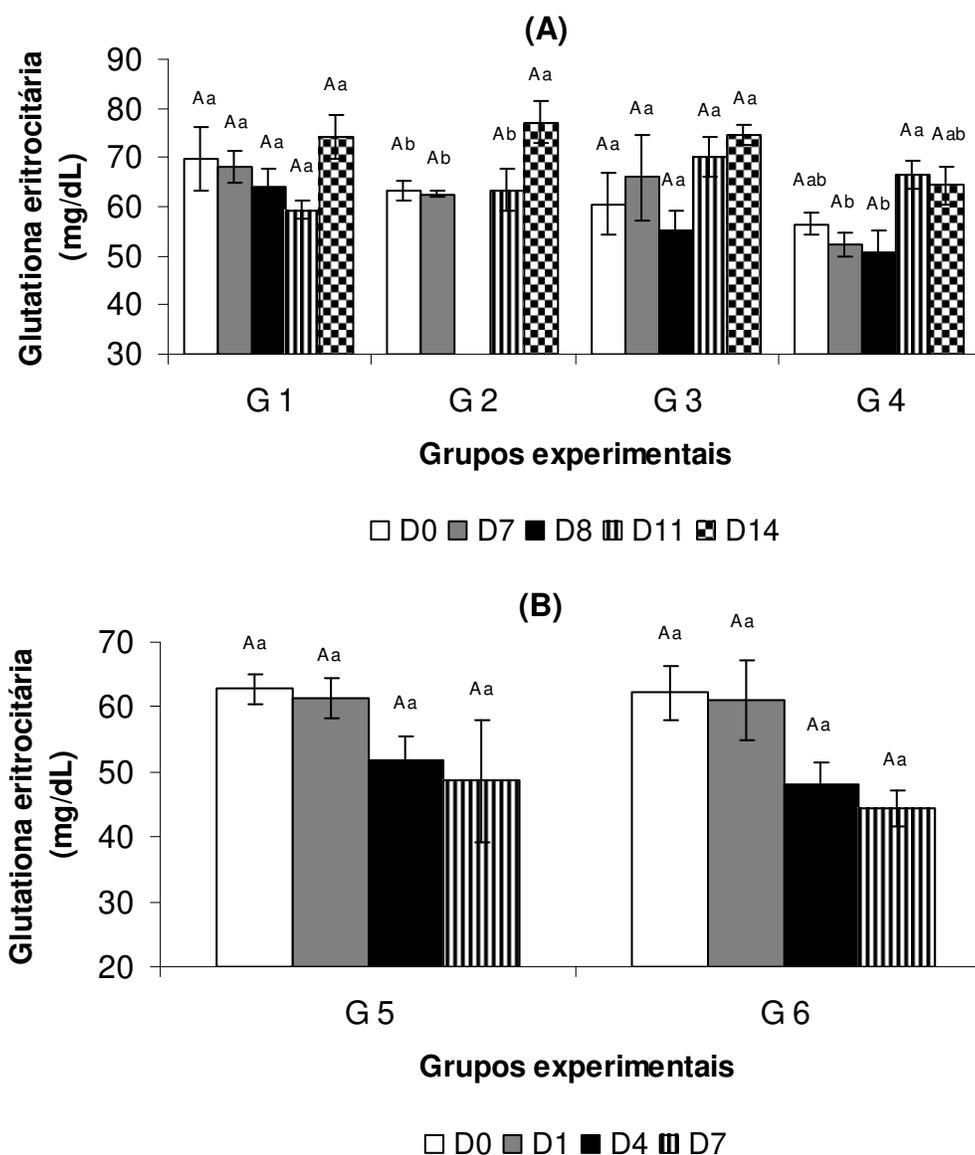


FIGURA 23. Valores de glutaciona (mg/dL) do experimento 2. **(A)** G 1: Controle salina + 5-FU; G 2: Controle; G 3: Caseína Pré + 5-FU e G 4: WPC Pré + 5-FU; **(B)** G 5: Caseína + 5-FU e G 6: WPC + 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 5 e 6 nos tempos avaliados e ao longo do experimento, embora se tenha observado uma tendência decrescente nos valores de glutathiona para esses grupos que não receberam proteínas previamente ao tratamento com quimioterápico (Figura 23 B).

É importante ressaltar a comparação entre os grupos 4 e 6, os quais receberam por gavagem as proteínas do soro de leite com a diferença que o grupo 4 recebeu o WPC uma semana antes da 1ª dose de 5-FU e o grupo 6 recebeu a proteína simultaneamente, ao 5-FU. É interessante observar os valores de glutathiona nos tempos mais críticos para os animais, ou seja, 24h após a administração da 2ª dose e 24h após a administração da 3ª dose de 5-FU. No primeiro caso os resultados obtidos de glutathiona para o grupo 4 foi de 66,36 mg/dL e para o grupo 6 foi de 48,22 mg/dL. Após a administração da 3ª dose de 5-FU foi de 64,28 mg/dL para o grupo 4 e de 44,49 mg/dL para o grupo 6.

4.2.4. Conclusões do Experimento 2

As análises realizadas nesse experimento permitiram concluir que:

- 1) A dose de 75mg/Kg de peso corporal ainda foi considerada tóxica, especialmente após a 3ª administração;
- 2) Ficou evidenciada a importância de se oferecer as proteínas (WPC ou caseína) por um período prévio à administração do quimioterápico, para melhor manutenção do peso corporal e da glutathiona eritrocitária;
- 3) Observou-se que a administração das proteínas lácteas por gavagem (consumo induzido) evidenciou certa vantagem no peso e avaliação clínica dos animais quando comparado com o consumo espontâneo;
- 4) Na série sanguínea houve uma diminuição significativa nos níveis de leucócitos e plaquetas.

4.3. EXPERIMENTO 3

4.3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o esquema de 3 doses de 50mg/Kg de 5-FU, com intervalo de 3 dias entre cada administração, sobre a indução de mucosite gastrointestinal;
- Avaliar o esquema de 2 doses de 30mg/Kg e uma dose de 60mg/Kg de 5-FU, com intervalo de 3 dias entre cada administração, sobre a indução de mucosite gastrointestinal;
- Comparar os possíveis efeitos sobre a proteção da mucosa gastrointestinal do WPC e da caseína;
- Avaliar a via de administração das proteínas através de dietas peletizadas (consumo espontâneo).

4.3.2. Protocolo Experimental

O experimento 3 teve a duração de 38 dias, utilizando-se 6 grupos experimentais, totalizando 76 ratos, machos da linhagem Wistar livres de patógenos (SPF), recém-desmamados com 21 dias de idade conforme protocolo ilustrado na Figura 24.

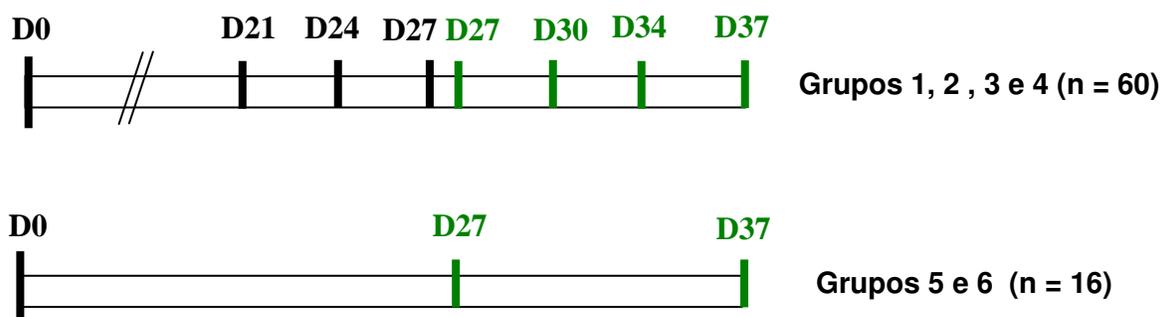


FIGURA 24. Protocolo do experimento 3. Eutanásias para avaliação da mucosite estão demonstradas em verde.

Grupo 1: Pré-tratamento com dieta AIN-93G completa com 12% de WPC durante 3 semanas. Após esse período continuou recebendo dieta AIN-93 completa com

WPC e administração de 5-FU a partir do 21º dia (D21). Administraram-se 3 doses (D21, D24 e D27) de 50mg/Kg de peso para 15 animais. Foram submetidos a eutanásia 3 animais para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação da mucosa nos seguintes dias: D27, D30, D34 e D37.

Grupo 2: Pré-tratamento com dieta AIN-93G completa com 12% de WPC durante 3 semanas. Após esse período continuou recebendo dieta AIN-93 completa com WPC e administração de 5-FU a partir do D21. Administraram-se 2 doses (D21, D24) de 30mg/Kg e uma 3ª dose (D27) de 60mg/Kg de peso para 15 animais. Foram submetidos a eutanásia 3 animais para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação da mucosa nos seguintes dias: D27, D30, D34 e D37.

Grupo 3: Pré-tratamento com dieta AIN-93G completa com 12% de CASEÍNA durante 3 semanas. Após esse período continuou recebendo dieta AIN-93 completa com caseína e administração de 5-FU a partir do D21. Administraram-se 3 doses (D21, D24 e D27) de 50mg/Kg de peso para 15 animais. Foram submetidos a eutanásia 3 animais para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação da mucosa nos seguintes dias: D27, D30, D34 e D37.

Grupo 4: Pré-tratamento com dieta AIN-93G completa com 12% de CASEÍNA durante 3 semanas. Após esse período continuou recebendo dieta AIN-93 completa com caseína e administração de 5-FU a partir do D21. Administraram-se 2 doses (D21, D24) de 30mg/Kg e uma 3ª dose (D27) de 60mg/Kg de peso para 15 animais. Foram submetidos a eutanásia 3 animais para avaliação da mucosite e para avaliação da recuperação da mucosa nos seguintes dias: D27, D30, D34 e D37.

Grupo 5: Controle sem administração de 5-FU que recebeu dieta AIN-93G completa com 12% de WPC. Foram utilizados 8 animais, dos quais 2 animais foram submetidos a eutanásia para comparação com os demais grupos no final do experimento D37.

Grupo 6: Controle sem administração de 5-FU que recebeu dieta AIN-93G completa com 12% de CASEÍNA. Foram utilizados 8 animais, dos quais 2 animais foram submetidos a eutanásia para comparação com os demais grupos no final do experimento D37.

4.3.3. Resultados

- **Composição centesimal das dietas AIN-93G**

Na Tabela 8 está apresentada a composição centesimal das dietas AIN-93G formuladas com caseína e WPC antes da peletização. Através desses resultados verificou-se que as dietas foram formuladas corretamente estando com o percentual protéico muito próximo de 12%, conforme preconizado teoricamente.

TABELA 8. Composição centesimal das dietas AIN-93G formuladas com caseína ou WPC.

Componentes (%)	Dieta AIN-93G Caseína	Dieta AIN-93G WPC
<i>Proteína (N x F)¹</i>	11,91 ± 0,00 ^a	12,33 ± 0,37 ^a
<i>Proteína (base seca)</i>	12,94	13,31
<i>Lipídios totais</i>	7,73 ± 0,38 ^a	7,66 ± 0,17 ^a
<i>Cinzas</i>	2,28 ± 0,17 ^a	2,65 ± 0,09 ^a
<i>Umidade</i>	7,99 ± 0,25 ^a	7,35 ± 0,21 ^b
<i>Carboidrato²</i>	70,09	70,01

¹F: Caseína e WPC = 6,38. ² Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinza + umidade). Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão. Médias seguidas letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve diferença estatística entre as duas dietas formuladas para os teores de proteína, lipídios e cinzas, havendo diferença apenas nos teores de umidade.

- **Peso corporal**

De acordo com a Figura 25, pode-se observar que durante as três primeiras semanas de experimento os animais de todos os grupos experimentais apresentaram um ganho de peso normal, uma vez que nesse período os animais estavam apenas recebendo as respectivas dietas AIN-93G com 12% de WPC ou caseína.

De acordo com o protocolo as doses de quimioterápico foram administradas no 21º, 24º e 27º dia de experimento para todos os grupos experimentais exceto para os dois grupos controle. A partir do D24, ou seja, após a 2ª dose de 5-FU, pode-se verificar o início da perda do peso corporal dos animais dos grupos que

receberam a dose de 50mg/Kg de 5-FU. Essa perda de peso acentuou-se no D30, período em que a 3ª dose havia sido administrada há 72h, para esses grupos experimentais.

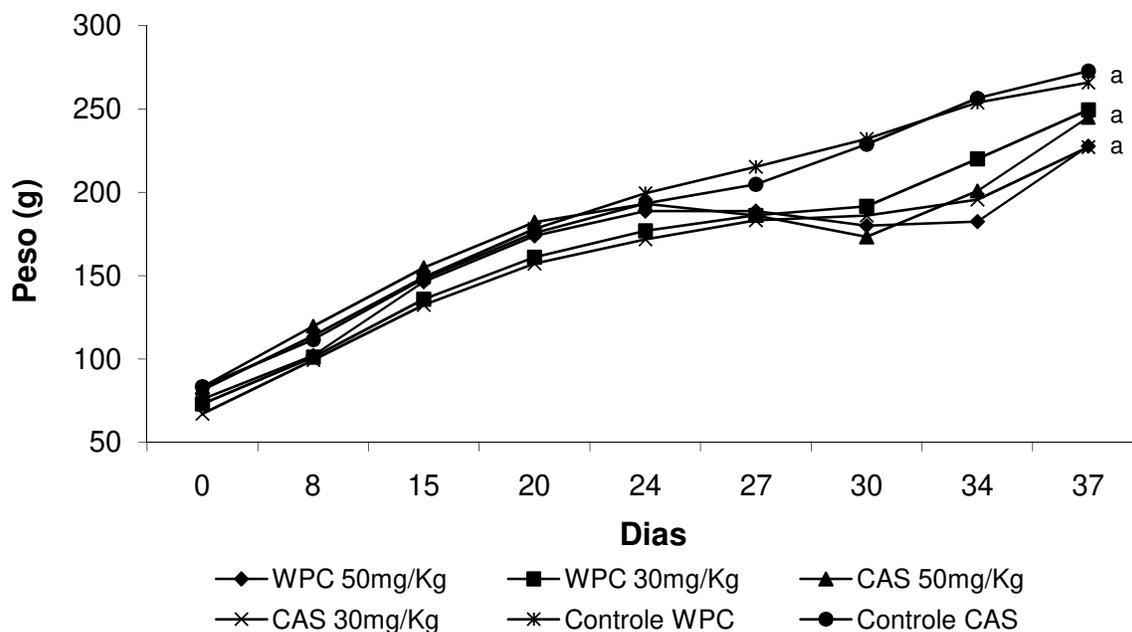


FIGURA 25. Curvas de evolução de peso dos grupos experimentais.

Verificou-se que nos grupos que receberam duas doses de 30mg/Kg e a 3ª dose de 60mg/Kg de 5-FU não ocorreu uma perda de peso durante o período crítico (D24 ao D30), havendo apenas uma diminuição na evolução do ganho de peso quando comparado com os grupos controle.

Todos os grupos experimentais mostraram uma retomada no ganho de peso 10 dias (D37) após a administração da última dose de 5-FU não apresentando diferença estatística em relação aos grupos controle (Figura 25).

- **Consumo de dieta**

Os resultados obtidos na Tabela 9 mostraram haver diferença significativa ($p < 0,05$) na ingestão da dieta por grupo durante o experimento. É importante ressaltar que nos grupos 1, 2, 3 e 4 haviam 15 animais/grupo e nos grupos 5 e 6 (controles) havia apenas 8 animais, justificando assim a menor ingestão da dieta por esses dois grupos.

Quando se analisou a ingestão de dieta por animal entre os diferentes grupos verificou-se que a maior ingestão ocorreu justamente com os animais dos grupos controle, os quais não diferiram estatisticamente da ingestão do grupo 2. As menores ingestões ocorreram exatamente com os animais dos grupos 1 e 3 que receberam as maiores doses de 5-FU (50mg/Kg).

TABELA 9. Ingestão de dieta dos grupos experimentais durante o experimento 3.

Grupos experimentais	Ingestão de Dieta (g)/ Grupo	Ingestão de Dieta (g)/ Animal
G 1: WPC + 50mg/Kg 5-FU	785,90 ^{bc}	52,39 ^c
G 2: WPC + 30/60mg/Kg 5-FU	1224,64 ^a	81,64 ^{ab}
G 3: Caseína + 50mg/Kg 5-FU	825,33 ^{bc}	55,02 ^c
G 4: Caseína + 30/60mg/Kg 5-FU	1016,24 ^{ab}	67,75 ^{bc}
G 5: Controle WPC sem 5-FU	756,32 ^{bc}	94,54 ^a
G 6: Controle Caseína sem 5-FU	718,13 ^c	89,77 ^a

Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 5-FU = 5-Fluoruracila.

- **Avaliação Clínica**

Na Tabela 10 encontram-se os escores médios diários dos grupos experimentais ao longo dos dias do ensaio 3. Pode-se observar que as primeiras alterações clínicas dos grupos 1 e 2, que receberam WPC na dieta, começaram a aparecer no D27 e D28, respectivamente. As alterações clínicas intensificaram-se a partir de 48h (D29) após a 3ª dose de 5-FU para os animais do grupo 1 e 3, os quais receberam as maiores doses de 5-FU.

De uma maneira geral, verificou-se que no período crítico do experimento (D29 a D31), ou seja, 48h a 96h após 3ª dose de 50mg/Kg de 5-FU os animais do grupo 3, que receberam caseína, estavam mais debilitados clinicamente que os animais do grupo 1 que receberam o WPC e a mesma dose de 5-FU. Este fato foi confirmado pelo maior número de óbitos dos animais do grupo 3 que ocorreu antes do período programado para a eutanásia.

Para os grupos 2 e 4, que receberam doses menores de 5-FU as alterações clínicas foram pequenas quando comparadas com as alterações verificadas nos grupos 1 e 3. Para os animais dos grupos 5 e 6 (controles) recebendo dieta AIN-

93 sem administração de quimioterápico, não foram verificadas alterações clínicas.

TABELA 10. Escores médios da avaliação clínica realizada durante o experimento.

Grupos	D0																
	a	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34	D35	D36	D37
	D21																
G 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,0	3,7	5,7	5,7	5,7	4,0	4,0	1,5	1,0	1,0
G 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0
G 3	0,0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	2,7	2,7	5,7	8,0	9,0	4,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0
G 4	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	1,3	2,0	1,7	2,0	1,7	1,3	1,3	1,3	1,0	0,3
G 5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G 6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

G 1: WPC + 3 doses de 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC + 2 doses de 30mg/Kg e 1 dose de 60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína + 3 doses de 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína + 2 doses de 30mg/Kg e 1 dose de 60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

No final do experimento constatou-se uma melhora geral dos parâmetros clínicos avaliados em todos os grupos estudados.

• Análise Anatomopatológica

Na eutanásia realizada 3 dias (D27) após a administração da 2ª dose de 50mg/Kg de peso de 5-FU, 3 animais dos grupos 1 e 3 tratados com WPC e caseína, respectivamente, foram submetidos a eutanásia. Dos 6 animais avaliados, apenas 2 animais do grupo 3 apresentaram uma leve alteração na coloração da mucosa na região do duodeno, o que poderia ser indicativo de mucosite.

De acordo com o verificado nos animais dos grupos 1 e 3 que receberam a maior dose de 5-FU optou-se por não sacrificar nenhum animal dos grupos 2 e 4, os quais haviam recebido 2 doses de 30mg/Kg de peso, uma vez que clinicamente os animais desses grupos estavam bem e possivelmente não apresentariam nenhuma alteração macroscópica na mucosa do TGI.

No D30, ou seja, 3 dias após a 3ª dose de 5-FU foram submetidos a eutanásia 3 animais de cada grupo, exceto dos grupos controle. Nos animais dos

grupos 2 e 4 nenhuma alteração macroscópica foi encontrada. Apesar dos animais dos grupos 1 e 3, os quais receberam 3 doses de 50mg/Kg de peso, estarem clinicamente debilitados (pêlos moderadamente eriçados, diminuição do comportamento espontâneo e da resposta ao estímulo, perda de peso moderada, porém ausência de diarreia) não foram encontradas alterações na mucosa do TGI compatíveis com mucosite na maioria dos animais, havendo apenas diminuição na coloração dos rins e fígado de alguns animais.

Nas demais eutanásias programadas de acordo com o protocolo experimental (D34 e D37) não foram encontradas alterações macroscópicas na mucosa do trato GI em nenhum animal dos grupos estudados. Porém, foram verificadas alterações na coloração dos rins e fígado, os quais encontravam-se esbranquiçados/pálidos em boa parte dos animais de todos os grupos, inclusive naqueles que receberam a menor dose de 5-FU.

- **Análises Bioquímicas**

Foram coletadas amostras nos seguintes dias para a realização do hemograma e da glutatona eritrocitária: D1, D21, D25, D28 e D35. Esses dias foram selecionados para análise por representarem períodos importantes, segundo protocolos estabelecidos:

D1 - leitura basal para o início do experimento;

D21 - três semanas após tratamento com as proteínas e antes da 1ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4;

D28 - 24h após a administração da 3ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4;

D35 - uma semana após a administração da 3ª dose de 5-FU para os grupos 1, 2, 3 e 4.

Hemograma

Leucócitos - Levando-se em consideração que os grupos experimentais ficaram 3 semanas recebendo, como pré-tratamento, as proteínas WPC ou caseína através da dieta, observou-se que para todos os grupos que receberam WPC (grupos 1 e 2) houve aumento estatisticamente significativo nos níveis de

leucócitos entre o D1 e o D21, sendo que comparando-se esse mesmo período para os grupos (3 e 4) que receberam caseína não se observou um aumento significativo ($p > 0,05$).

Verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de leucócitos, 24h após a 3ª dose (D28), abaixo do limite mínimo de referência ($7,30 \times 10^3$ células/uL), para todos os grupos experimentais, exceto os grupos controles, conforme Figura 26.

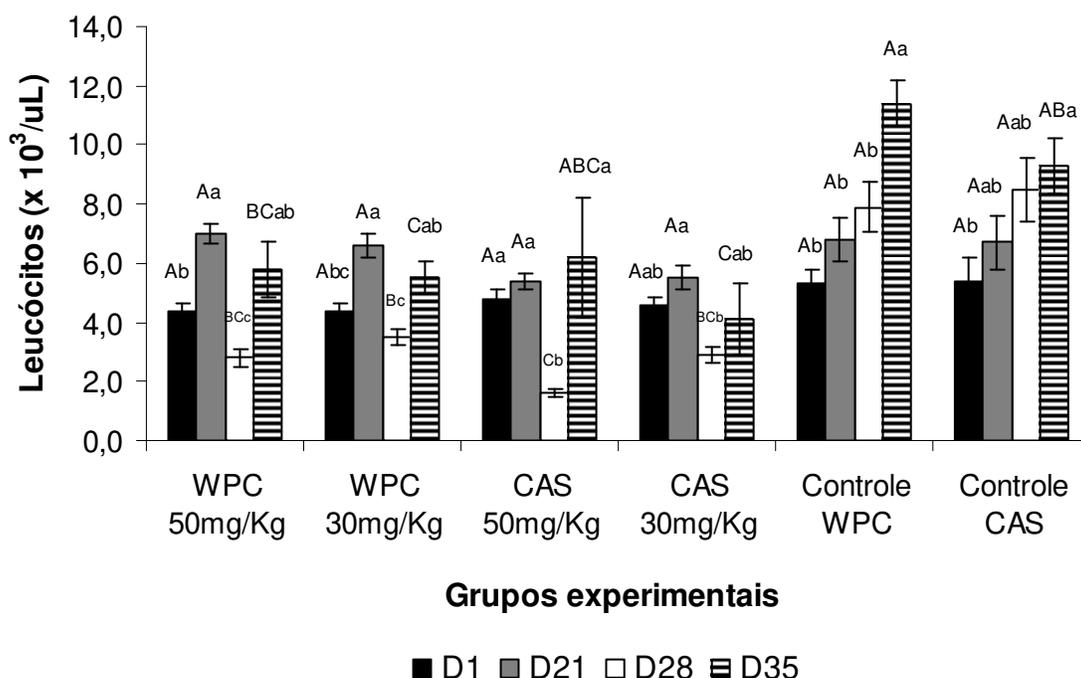


FIGURA 26. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\text{uL}$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Os grupos que sofreram maior redução nos níveis de leucócitos no D28 foram os que receberam a dose de 50mg/Kg de peso, sendo que para o grupo 1 (WPC) obteve-se $2,8 \times 10^3$ células/uL e para o grupo 3 (caseína) $1,6 \times 10^3$ células/uL, os quais não diferem estatisticamente entre si. Já para os grupos que receberam a menor dose de 5-FU observou-se também uma diminuição estatística

significante quando comparados com o controle WPC ($7,9 \times 10^3/\mu\text{L}$) e com o controle caseína ($8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$): grupo 2 ($3,5 \times 10^3/\mu\text{L}$) e grupo 4 ($2,9 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Comparando-se os grupos em cada tempo de análise, constatou-se que os valores de leucócitos apenas no D28 dos grupos 1, 2, 3 e 4 diferiram estatisticamente dos grupos 5 e 6 (controles).

Ao se comparar os valores de D35 com de D28, quando se encontrou os menores valores de leucócitos, verificou-se que houve um aumento nos níveis de leucócitos para todos os grupos experimentais: grupo 1 ($5,8 \times 10^3/\mu\text{L}$), grupo 2 ($5,5 \times 10^3/\mu\text{L}$), grupo 3 ($6,2 \times 10^3/\mu\text{L}$), grupo 4 ($4,1 \times 10^3/\mu\text{L}$), grupo 5 ($11,4 \times 10^3/\mu\text{L}$) e grupo 6 ($9,3 \times 10^3/\mu\text{L}$). Apesar desse aumento os valores encontrados para os grupos 1, 2, 3 e 4 foram inferiores aos valores de referência.

Eritrócitos – Os dados da Figura 27 mostram que os valores de eritrócitos oscilaram nos diferentes dias de análise para todos os grupos experimentais, inclusive os grupos controle. Comparando-se os grupos nos diferentes tempos analisados, constatou-se que os valores de eritrócitos foram significativamente inferiores aos dos grupos controle apenas para o grupo 1 no D35 ($5,1 \times 10^3$).

Uma vez que os limites de referência de eritrócitos para ratos variam entre $6,6$ a $9,0 \times 10^6$ células/ μL (THRALL *et al.*, 2006), a maioria dos grupos experimentais apresentou valores superiores ou muito próximos a $6,6 \times 10^6$ células/ μL com exceção do grupo 1 no D35 ($5,1 \times 10^6$ células/ μL).

Ao contrário da redução que ocorreu com os níveis de leucócitos para todos os grupos experimentais 24h após a 3ª dose de 5-FU (D28), os níveis de eritrócitos aumentaram significativamente para todos os grupos nesse período, de acordo com a Figura 27.

Analisando-se os níveis de eritrócitos entre o D35 (final) e o D1 (inicial), verificou-se que para os grupos controle e para aqueles que receberam as menores doses de 5-FU não houve diferença significativa nesse período. Já para os grupos que receberam a dose de 50mg/Kg de peso observou-se valores

inferiores estatisticamente no D35 quando comparados com os valores obtidos no D1.

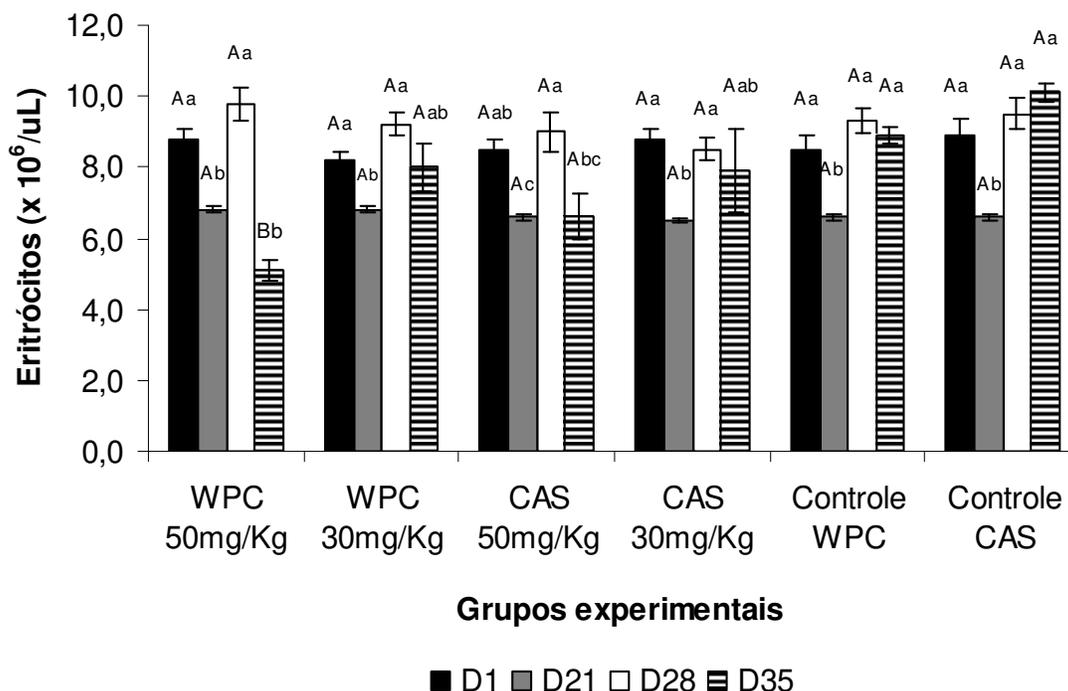


FIGURA 27. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Hemoglobina e Hematócrito - Os valores de hemoglobina e hematócrito estão representados nas Tabela 11 e 12.

De acordo com os valores de referência para hemoglobina (13,2 a 16,4 g/dL) podemos observar na Tabela 11 que no D21 houve redução estatística para todos os grupos e no D28 houve aumento significativo, ultrapassando inclusive o limite máximo de referência.

TABELA 11. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) para os grupos experimentais.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)			
	D1	D21	D28	D35
G 1	18,6 ± 0,58 ^{Aa}	13,3 ± 0,19 ^{Ab}	19,0 ± 0,95 ^{Aa}	9,7 ± 0,62 ^{Bb}
G 2	17,5 ± 0,47 ^{Aa}	13,0 ± 0,13 ^{Ab}	17,9 ± 0,71 ^{Aa}	16,0 ± 1,32 ^{ABa}
G 3	18,3 ± 0,61 ^{Aa}	13,5 ± 0,21 ^{Ab}	18,1 ± 1,11 ^{Aa}	13,7 ± 1,95 ^{ABab}
G 4	19,0 ± 0,59 ^{Aa}	13,4 ± 0,15 ^{Ab}	17,4 ± 0,59 ^{Aa}	16,0 ± 2,28 ^{ABab}
G 5	22,6 ± 4,38 ^{Aa}	13,2 ± 0,13 ^{Ab}	18,3 ± 0,73 ^{Aab}	17,2 ± 0,52 ^{ABab}
G 6	19,3 ± 1,03 ^{Aa}	13,4 ± 0,16 ^{Ab}	19,2 ± 0,76 ^{Aa}	19,9 ± 0,52 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. . G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg /60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

Em relação aos resultados obtidos para o hematócrito, verificou-se que quando os grupos foram comparados individualmente no decorrer da pesquisa, todos apresentaram níveis de hematócrito inferiores estatisticamente no D21 em relação aos demais tempos.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 11 e 12 observa-se que a maioria dos valores de hemoglobina e hematócrito estão adequados para os grupos em estudo.

TABELA 12. Valores obtidos de hematócrito (%) para os grupos experimentais.

Grupos	Hematócrito (%)			
	D1	D21	D28	D35
G 1	54,8 ± 1,82 ^{Aa}	38,5 ± 0,53 ^{Ab}	53,6 ± 2,55 ^{Aa}	28,6 ± 1,69 ^{Bb}
G 2	51,0 ± 1,37 ^{Aa}	37,5 ± 0,32 ^{Ab}	50,4 ± 1,99 ^{Aa}	44,9 ± 3,55 ^{ABab}
G 3	52,9 ± 1,79 ^{Aa}	38,5 ± 0,54 ^{Ab}	52,0 ± 3,68 ^{Aa}	39,1 ± 5,55 ^{ABab}
G 4	54,4 ± 1,58 ^{Aa}	38,1 ± 0,36 ^{Ab}	49,3 ± 1,62 ^{Aa}	45,4 ± 6,37 ^{ABab}
G 5	54,8 ± 2,72 ^{Aa}	37,9 ± 0,36 ^{Ab}	52,6 ± 2,01 ^{Aa}	49,5 ± 1,45 ^{ABa}
G 6	56,1 ± 2,84 ^{Aa}	38,5 ± 0,36 ^{Ab}	54,7 ± 2,20 ^{Aa}	57,3 ± 1,39 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. . G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg /60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

Plaquetas - Na Figura 28 verifica-se que os níveis de plaquetas para cada grupo individualmente foram influenciados ao longo do estudo, ocorrendo diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no D28 para os grupos 1, 2, 3 e 4, sendo mais intensa nos grupos que receberam as maiores doses de 5-FU.

No final do experimento (D35) observa-se que os níveis de plaquetas continuaram abaixo do valor mínimo recomendado (840×10^3 células/uL): grupo 1 ($364,3 \times 10^3$ células/uL), grupo 2 ($543,9 \times 10^3$ células/uL), grupo 3 ($607,5 \times 10^3$ células/uL) e grupo 4 ($265,6 \times 10^3$ células/uL).

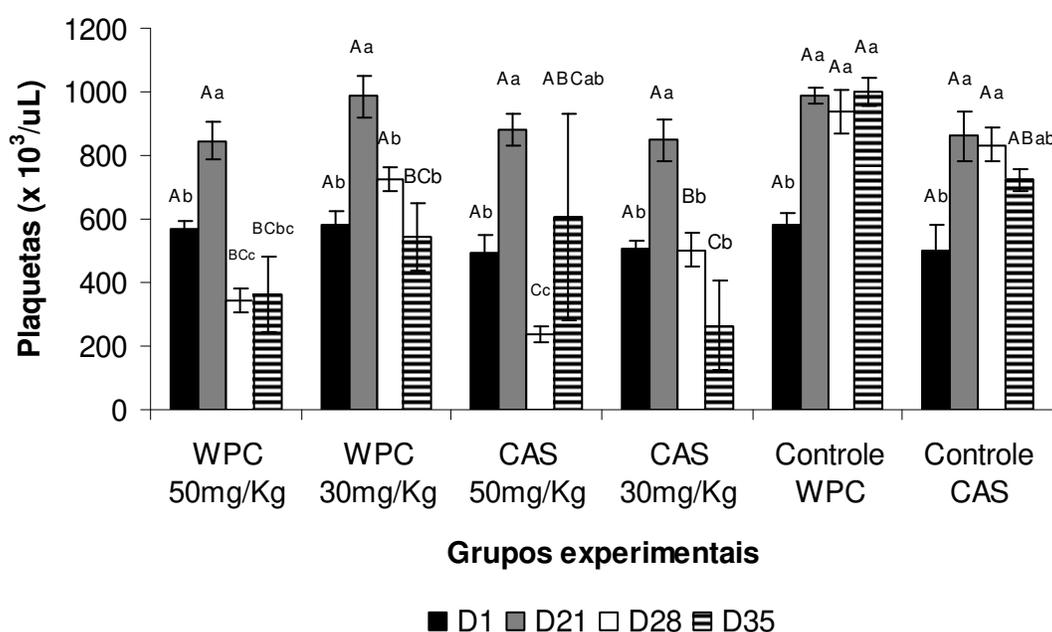


FIGURA 28. Valores de plaquetas ($\times 10^3/uL$) do experimento 3. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Glutaciona eritrocitária

Os resultados de glutaciona eritrocitária analisada no decorrer do experimento 3 estão apresentados na Figura 29. Os valores de glutaciona oscilaram ao longo do experimento para todos os grupos estudados. Em D1 não houve diferença estatística entre os grupos avaliados, sendo os mesmos considerados comparáveis. Comparando-se os valores do D21 com os valores iniciais (D1) verifica-se um aumento estatisticamente significativo para todos os grupos.

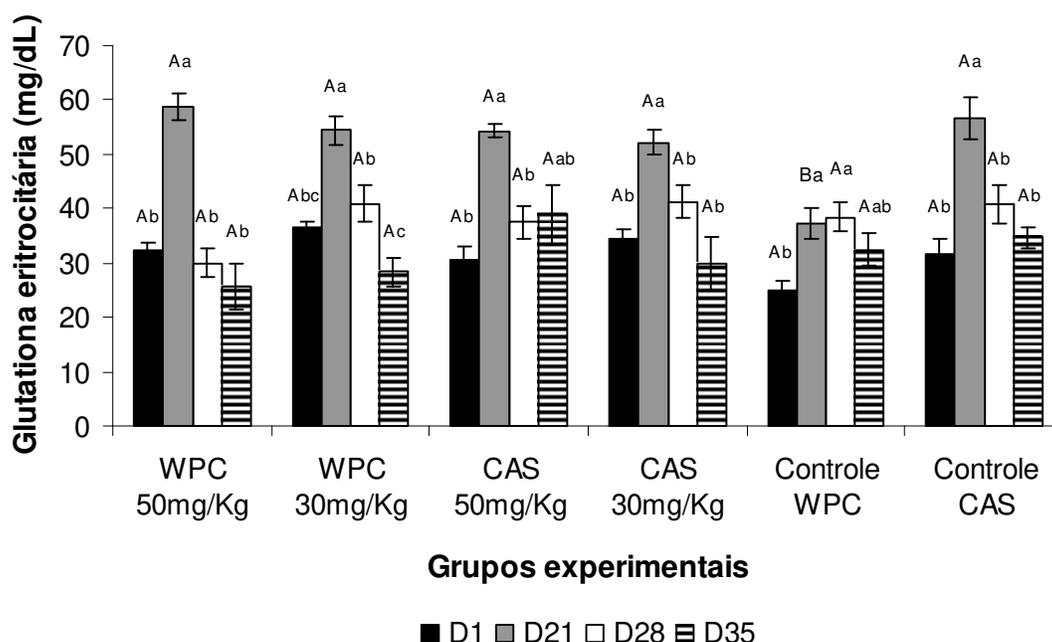


FIGURA 29. Valores de glutaciona (mg/dL) do experimento 3 G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

No D28, 24h após a 3ª dose de 5-FU, houve diminuição significativa para todos os grupos, exceto para o controle WPC. Verificou-se que no D35 os valores de glutaciona continuaram a diminuir para todos os grupos, inclusive para os animais controle.

- **Análise Histopatológica**

Os resultados histopatológicos confirmaram em nível microscópico, a presença de mucosite em diferentes intensidades (leve, moderada e intensa) nas diversas porções da mucosa gastrointestinal de ratos Wistar machos tanto nas doses do quimioterápico 5-FU de 50 mg/Kg como nas doses de 30mg/Kg (Tabela 13).

TABELA 13. Resultados da análise histopatológica para avaliação da mucosite gastrointestinal em ratos Wistar adultos.

Tempo ¹	Porção	Grupo 1 WPC 50	Grupo 2 WPC 30	Grupo 3 CAS 50	Grupo 4 CAS 30
D27	Esôfago	Normal (100%)	ND	Normal (66,7%) Mucosite L (33,3%)	ND
	Estômago	Normal (100%)	ND	Normal (100%)	ND
	Duodeno	Mucosite L/M (100%)	ND	Normal (33,3%) Mucosite I (66,7)	ND
	Jejuno	Mucosite L/M (100%)	ND	Normal (33,3%) Mucosite M/I (66,7%)	ND
	IG/Reto	Normal (100%)	ND	Normal (100%)	ND
D30	Esôfago	Normal (100%)	Normal (100%)	Normal (66,7%) Mucosite L (33,3%)	Normal (33,3%) Mucosite L (66,7%)
	Estômago	Normal (100%)	Normal (100%)	Normal (100%)	Normal (100%)
	Duodeno	Normal (100%)	Mucosite L/M (100%)	Mucosite L/M (66,7%) Mucosite M/I (33,3%)	Normal (33,3%) Mucosite M (33,3%) Mucosite M/I (33,3%)
	Jejuno	Normal (33,3%) Mucosite L/M (66,7%)	Mucosite L/M (100%)	Mucosite L/M (66,7%) Mucosite M/I (33,3%)	Normal (33,3%) Mucosite M (33,3%) Mucosite M/I (33,3%)
	IG/Reto	Normal (100%)	Normal (100%)	Normal (100%)	Normal (100%)

¹D27 = 72h após 2ª dose de 5-FU; D30 = 72h após 3ª dose de 5-FU. Mucosite: L = leve; M = moderada; I = intensa; L/M = leve a moderada; M/I = moderada a intensa. ND = Não Determinado. Foram avaliados 3 animais/grupo em cada tempo. O percentual refere-se ao número de animais avaliados em cada eutanásia para cada classificação de mucosite ou de normalidade da mucosa.

A presença de mucosite foi constatada 72h após a 2ª dose de 50mg/Kg de 5-FU, tanto no grupo que recebeu proteína do soro de leite quanto no grupo que

recebeu caseína (Tabela 13). Nessa análise (D27) constatou-se presença de mucosite leve na mucosa do esôfago de 1 animal do grupo caseína, o que não foi verificado no grupo que recebeu WPC. Além disso, a intensidade da mucosite foi mais acentuada na região do duodeno e do jejuno para o grupo caseína quando comparada com os achados para os grupos que receberam WPC.

Com 72h após a 3ª dose de 5-FU, a mucosa do esôfago apresentou mucosite leve apenas para os grupos tratados com caseína. As mucosas das porções do estômago e do intestino grosso/reto de todos os grupos não foram afetadas.

As porções do duodeno e do jejuno foram as que apresentaram maior incidência de mucosite em todos os grupos. Em D30, na mucosa duodenal, dos 6 animais avaliados dos grupos tratados com WPC verificou-se que: 3 apresentaram mucosa normal e 3 mucosite leve a moderada. Já nos animais tratados com caseína de ambos os grupos (dose de 50 e dose de 30mg/Kg de 5-FU) constatou-se que: 1 animal apresentou mucosa normal, 2 mucosite leve a moderada, 1 mucosite moderada e 2 mucosite moderada a intensa.

Assim como para o duodeno, a mucosa do jejuno apresentou incidência de mucosite mais acentuada (D30) entre os grupos tratados com caseína, a saber: mucosite leve a moderada (n = 2), mucosite moderada (n = 1) e mucosite moderada a intensa (n = 2). Enquanto que para os grupos tratados com WPC houve predomínio de mucosite leve a moderada (n = 5), conforme Tabela 13.

Para avaliar a possível recuperação da mucosa realizou-se as eutanásias 7 dias (D34) e 10 (D37) dias após a administração da última dose de 5-FU conforme dados da literatura, porém esses períodos mostraram-se insuficientes para a recuperação da mucosa de algumas porções (Tabela 14).

No D34 o grupo tratado com caseína apresentou mucosite nas porções de maior incidência: duodeno (moderada e intensa) e jejuno (moderada). Ao contrário, o grupo WPC apresentou mucosite no esôfago (leve), estômago (leve e moderada) e jejuno (moderada), porém a mucosa do duodeno estava normal.

TABELA 14. Resultados da análise histopatológica para avaliação da recuperação da mucosa gastrointestinal em ratos Wistar adultos.

Período ¹	Porção	Grupo 1 WPC 50 (n = 2)	Grupo 3 CASEÍNA 50 (n = 2)
D34	Esôfago	Mucosite L (100%)	Normal (100%)
	Estômago	Mucosite L (50%) Mucosite M (50%)	Normal (100%)
	Duodeno	Normal (100%)	Mucosite M (50%) Mucosite I (50%)
	Jejuno	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)
	IG/Reto	Normal (100%)	Normal (100%)
D37	Esôfago	Normal (100%)	Normal (100%)
	Estômago	Normal (100%)	Normal (100%)
	Duodeno	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)
	Jejuno	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)
	IG/Reto	Mucosite L (100%)	Mucosite L (50%) Mucosite L/M (50%)

¹D34 = 7 dias após 3ª dose de 5-FU; D37 = 10 dias após 3ª dose de 5-FU. Mucosite: L = leve; M = moderada; I = intensa; L/M = leve a moderada; M/I = moderada a intensa. O percentual refere-se ao número de animais avaliados em cada eutanásia para cada classificação de mucosite ou de normalidade da mucosa.

No D37 persistiu a presença de mucosite nas porções do duodeno, jejuno e intestino grosso/reto dos dois grupos avaliados. A diferença de intensidade de mucosite foi verificada nessa última porção, para o grupo WPC foi leve enquanto para o grupo caseína obteve-se a classificação de leve a moderada.

Os resultados histopatológicos também podem ser visualizados através de figuras de imagens digitalizadas de microscopia óptica da mucosa das porções avaliadas. Na Figura 30 encontram-se as imagens da presença de mucosite em diferentes intensidades.

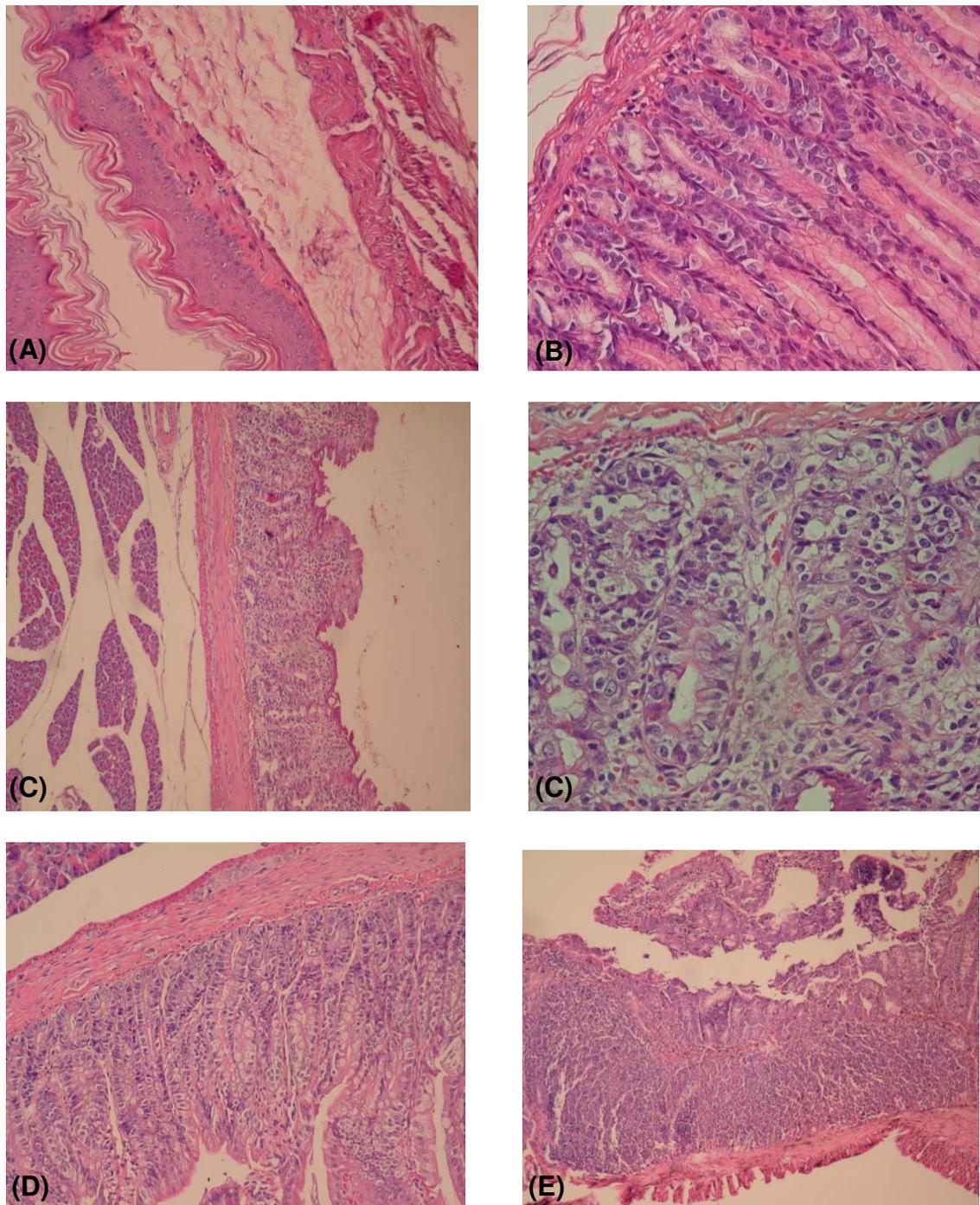


FIGURA 30. Imagens de microscopia óptica da mucosa das porções do TGI: **(A)** Esôfago (mucosite leve); **(B)** Estômago região glandular (mucosite intensa); **(C)** Duodeno (mucosite intensa); **(D)** Jejuno (mucosite moderada); **(E)** Jejuno (mucosite intensa). Coloração HE, aumento de 100x e 400x.

- **Análise microbiológica**

Foi realizada antes da administração da 1ª dose de 5-FU (D21), 24h após administração da 2ª dose de 5-FU (D25) e 8 dias após a administração da 3ª dose de 5-FU (D35), conforme Tabelas 15, 16 e 17, respectivamente.

TABELA 15. Análise microbiológica dos grupos experimentais antes da administração da 1ª dose de 5-FU (D21).

Grupos	Amostras	Período de incubação			Observações
		24h	48h	72h	
Grupo 1	403	NEG	NEG	NEG	
	404	POS	POS	POS	Significativo: bacilos Gram negativos
	408	NEG	NEG	NEG	
	411	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	412	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
Grupo 2	417	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	419	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	422	POS	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	425	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	431	POS	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
Grupo 3	432	NEG	NEG	NEG	
	433	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	443	POS	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	444	NEG	NEG	NEG	
	478	NEG	NEG	NEG	
Grupo 4	451	NEG	NEG	NEG	
	456	NEG	NEG	NEG	
	457	NEG	NEG	NEG	
	459	NEG	NEG	NEG	
Grupo 5	462	NEG	NEG	NEG	
	465	NEG	NEG	NEG	
	467	NEG	NEG	NEG	
	469	NEG	NEG	NEG	
Grupo 6	472	NEG	NEG	NEG	
	475	NEG	NEG	NEG	
	477	NEG	POS	POS	Sugestivo contaminação durante a coleta
	83	NEG	NEG	NEG	

NEG = negativo; POS = positivo. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg /60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

TABELA 16. Análise microbiológica dos grupos experimentais 24h após administração da 2ª dose de 5-FU (D25).

Grupos	Amostras	Período de incubação			Observações
		24h	48h	72h	
Grupo 1	403	NEG	NEG	NEG	Significativo: bacilos Gram negativos
	404	POS	POS	POS	
	407	NEG	NEG	NEG	
	408	NEG	NEG	NEG	
	415	NEG	NEG	NEG	
Grupo 2	418	NEG	NEG	NEG	
	419	NEG	NEG	NEG	
	420	NEG	NEG	NEG	
	425	NEG	NEG	NEG	
	430	NEG	NEG	NEG	
Grupo 3	436	NEG	NEG	NEG	
	439	NEG	NEG	NEG	
	90	NEG	NEG	NEG	
	444	NEG	NEG	NEG	
	480	NEG	NEG	NEG	
	979	NEG	NEG	NEG	
Grupo 4	450	NEG	NEG	NEG	
	453	NEG	NEG	NEG	
	455	NEG	NEG	NEG	
	457	NEG	NEG	NEG	
	460	NEG	NEG	NEG	
Grupo 5	466	NEG	NEG	NEG	
	467	NEG	NEG	NEG	
	468	NEG	NEG	NEG	
	89	NEG	NEG	NEG	
Grupo 6	471	NEG	NEG	NEG	
	472	NEG	NEG	NEG	

NEG = negativo; POS = positivo. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg /60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

TABELA 17. Análise microbiológica dos grupos experimentais 8 dias após a administração da 3ª dose de 5-FU (D35).

Grupos	Amostras	Período de incubação			Observações
		24h	48h	72h	
Grupo 1	403	NEG	NEG	NEG	Sugestivo contaminação durante a coleta
	412	POS	POS	POS	
	413	NEG	NEG	NEG	
Grupo 2	416	NEG	NEG	NEG	
	82	NEG	NEG	NEG	
	425	NEG	NEG	NEG	
	429	NEG	NEG	NEG	
	431	NEG	NEG	NEG	
Grupo 3	432	NEG	NEG	NEG	
	434	NEG	NEG	NEG	
Grupo 4	449	POS	POS	POS	Significativo: cocos Gram positivos
	450	NEG	NEG	NEG	
	455	NEG	NEG	NEG	
	457	NEG	NEG	NEG	
Grupo 5	89	NEG	NEG	NEG	
	467	NEG	NEG	NEG	
	468	NEG	NEG	NEG	
	469	NEG	NEG	NEG	
Grupo 6	470	NEG	NEG	NEG	
	472	NEG	NEG	NEG	
	474	NEG	NEG	NEG	
	475	NEG	NEG	NEG	

NEG = negativo; POS = positivo. G 1: WPC 50mg/Kg 5-FU; G 2: WPC 30mg/Kg /60mg/Kg 5-FU; G 3: Caseína 50mg/Kg 5-FU; G 4: Caseína 30mg/Kg/60mg/Kg 5-FU; G 5: Controle WPC sem 5-FU e G 6: Controle Caseína sem 5-FU.

Através dos resultados das Tabelas 15 e 16 verifica-se que apenas a amostra 404 (grupo 1) apresentou contaminação por bacilos Gram negativos comprovada pelo crescimento de grande nº de colônias de *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* no Agar sangue. Como houve presença desse microrganismo antes da administração da 1ª dose de 5-FU (D21), este achado sugere que a contaminação é própria do animal e não efeito do quimioterápico. As demais amostras apresentaram presença de raras colônias de *Staphylococcus* sp,

coagulase negativos no Agar sangue, não sendo indicativo de bacteremia ou septicemia e sim sugestivo de contaminação durante a coleta.

Na Tabela 17 a amostra 449 (grupo 4) apresentou crescimento de grande nº de colônias de cocos Gram positivos *Micrococcus luteus* no Agar sangue, porém esse microorganismo normalmente não causa bacteremia ou septicemia.

4.3.4. Conclusões do Experimento 3

Os resultados desse experimento permitiram concluir que:

- 1) As doses de 5-FU aplicadas (3 doses de 50mg/Kg ou 2 doses de 30mg mais 1 dose de 60mg//Kg de peso), não permitiram identificar, macroscopicamente, presença de mucosite;
- 2) A análise histopatológica mostrou que os dois protocolos experimentais de dosagens de 5-FU provocaram mucosite em diferentes intensidades nas diversas porções do TGI avaliadas, tendo sido mais intensas nas concentrações de 50mg/Kg de peso;
- 3) Comparativamente, a intensidade de mucosite foi menos intensa nos tratamentos com WPC, particularmente nas regiões do jejuno e duodeno, mas susceptíveis à mucosite;
- 4) O período de 10 dias após a 3ª dose de 5-FU, não foi suficiente para a completa recuperação da mucosa gastrointestinal;
- 5) As proteínas do soro de leite (WPC) estimularam significativamente os níveis de leucócitos durante os 21 dias de pré-tratamento, o que não ocorreu no grupo caseína;
- 6) Os níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito não sofreram influência dos tratamentos;
- 7) As concentrações de glutathiona eritrocitária variaram para as duas fontes proteicas, ao longo do experimento, sem diferença estatística entre ambas.

4.4. EXPERIMENTO 4

4.4.1. Objetivos Específicos

- Definir a melhor dose x resposta utilizando 3 doses de 5-FU, com intervalo de 3 dias entre cada administração para a indução de mucosite gastrointestinal nas seguintes concentrações: 50; 60; 65 e 70 mg/Kg de peso corporal.

4.4.2. Protocolo Experimental

O ensaio teve duração de 10 dias, utilizando-se 4 grupos experimentais, totalizando 20 animais, os quais receberam dieta comercial Nuvilab[®] durante 7 semanas antes do início da administração do 5-FU, continuando com dieta comercial até o fim do experimento.

Os animais de cada tratamento receberam 3 doses de 5-FU com intervalo de 3 dias entre cada administração, a saber: grupo 1 (50mg/Kg); grupo 2 (60mg/Kg); grupo 3 (65mg/Kg) e grupo 4 (70mg/Kg). Ao longo do experimento, especificamente 3 dias após a 2^a dose (D6) e 4 dias após a 3^a dose (D10) do quimioterápico, foram realizadas eutanásias de 2 e 3 animais, respectivamente de cada grupo para avaliação da mucosite, conforme protocolo da Figura 31.

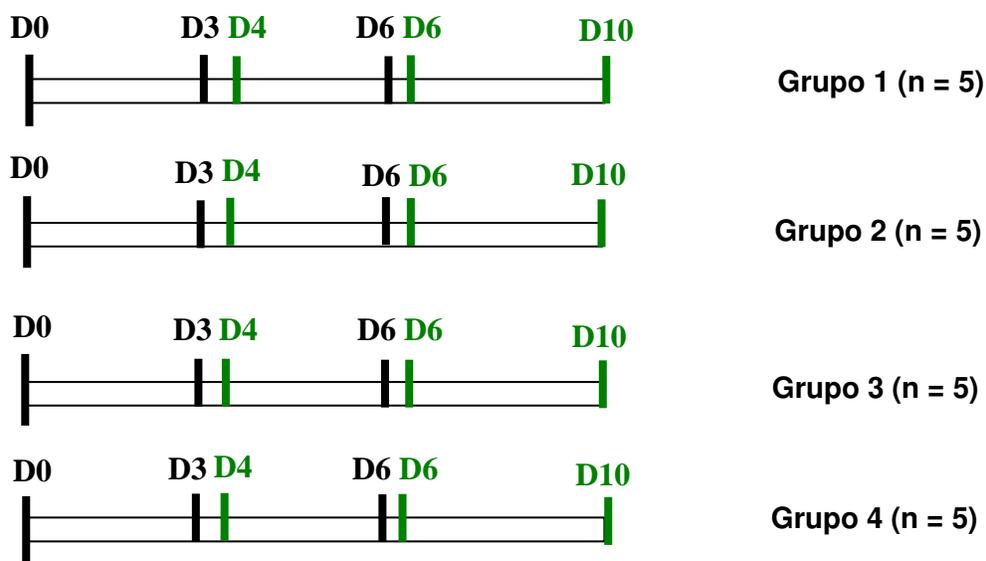


FIGURA 31. Protocolo do experimento 4. Eutanásias para avaliação da mucosite estão demonstradas em verde.

4.4.3. Resultados

- **Peso corporal**

Pode-se observar (Figura 32) que no início do experimento apenas o peso dos animais do grupo que recebeu 60 mg/Kg de 5-FU foi inferior estatisticamente ($p < 0,05$) aos demais grupos, não ocorrendo diferença no peso dos animais entre os grupos avaliados ao final do experimento.

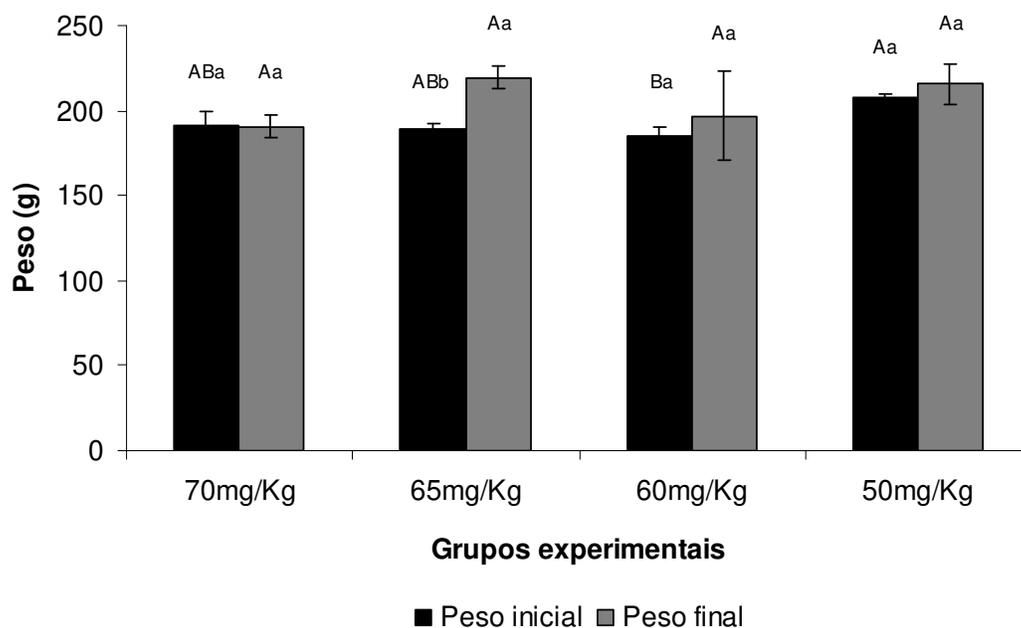


FIGURA 32. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais que receberam tratamento com diferentes doses de 5-FU. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey. Letras minúsculas comparam o mesmo grupo e letras maiúsculas comparam os diferentes grupos nos tempos analisados.

É importante ressaltar que as doses de 5-FU testadas não promoveram perda de peso dos animais ao longo do estudo. Ao contrário, quando se comparou cada grupo individualmente verificamos uma manutenção no peso dos animais entre o início e o fim do experimento, havendo aumento significativo apenas para o grupo que recebeu a dose de 65 mg/Kg de 5-FU.

- **Consumo de dieta**

Os resultados da Tabela 18 mostraram que não houve diferença significativa na ingestão da dieta entre os grupos durante o experimento. Por outro lado, na ingestão de dieta por animal houve diferença significativa ($p < 0,05$), sendo inferior no grupo que recebeu 60 mg/Kg de 5-FU.

TABELA 18. Ingestão de dieta dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Ingestão de Dieta (g)/ Grupo	Ingestão de Dieta (g)/ Animal
G 1: 50 mg/Kg 5-FU	340,10 ^a	84,98 ^a
G 2: 60 mg/Kg 5-FU	220,66 ^a	55,50 ^b
G 3: 65 mg/Kg 5-FU	264,50 ^a	68,17 ^{ab}
G 4: 70 mg/Kg 5-FU	256,49 ^a	66,60 ^{ab}

Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 5-FU = 5-Fluoruracila.

- **Avaliação Clínica**

Na Tabela 19 encontram-se os escores médios diários dos grupos experimentais ao longo dos 10 dias do ensaio 4.

TABELA 19. Escores médios da avaliação clínica realizada ao longo do experimento.

Grupos	Tempo (dias)											
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	
G 1: 50 mg/Kg 5-FU	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	4,0	3,0	2,0	0,0	
G 2: 60 mg/Kg 5-FU	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	2,0	4,0	4,0	1,0	1,0	
G 3: 65 mg/Kg 5-FU	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	
G 4: 70 mg/Kg 5-FU	0,0	0,0	1,0	1,0	2,0	2,0	4,0	5,0	3,0	2,0	2,0	

O grupo que recebeu a dose de 70 mg/Kg de 5-FU apresentou as primeiras alterações clínicas 48h após a 1^a administração, enquanto os demais grupos que receberam doses inferiores apresentaram alterações clínicas apenas após a 2^a administração de 5-FU.

No intervalo de doses testado (50 a 70 mg/Kg de peso) as alterações clínicas foram semelhantes entre todos os grupos, não se tendo grandes

modificações dos parâmetros de aparência geral do animal, evolução de peso corporal, sinais clínicos (presença de fezes amolecidas e/ou diarreia), comportamento espontâneo e resposta a estímulos.

- **Análise Anatomopatológica**

Na eutanásia realizada 3 dias (D6) após a administração da 2ª dose de 5-FU, 2 animais de cada grupo foram mortos. Nos 8 animais avaliados, não foram verificadas alterações macroscópicas na mucosa que poderiam ser indicativo de mucosite.

No D10, ou seja, 4 dias após a 3ª dose de 5-FU foram submetidos a eutanásia 3 animais de cada grupo. Apesar dos animais de todos os grupos estarem clinicamente debilitados não foram encontradas alterações na mucosa do TGI compatíveis com mucosite na maioria dos animais, havendo apenas leve vermelhidão na região do duodeno e também diminuição na coloração nos rins e fígado de alguns animais.

- **Análises Bioquímicas**

Foram coletadas amostras nos seguintes dias para a realização do hemograma e da glutathiona eritrocitária: D0 (leitura basal inicial) e D7 (24hs após a administração da 3ª dose de 5-FU).

Hemograma

Leucócitos - Observou-se uma tendência de diminuição nos níveis de leucócitos entre o D0 e o D7, inclusive abaixo do limite mínimo de referência, para todos os grupos, porém apenas para o grupo que recebeu a dose de 60 mg/Kg de 5-FU essa redução foi significativa ($p < 0,05$). Na Figura 33 verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos em cada tempo avaliado.

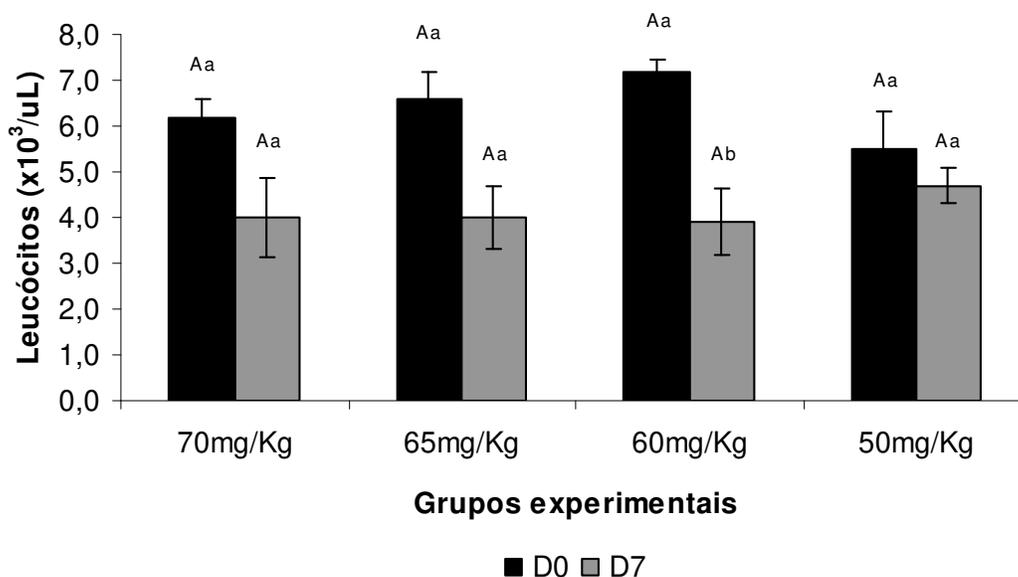


FIGURA 33. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\text{uL}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento.

Eritrócitos - No início do experimento, os níveis de eritrócitos do grupo que recebeu 50 mg/Kg de 5-FU estavam estatisticamente superiores aos valores dos demais grupos (Figura 34). Porém, no final do estudo não houve diferença significativa entre os grupos.

Todos os grupos avaliados em todos os tempos apresentaram níveis de eritrócitos dentro dos limites de normalidade que podem variar entre $6,6$ a $9,0 \times 10^6$ células/uL (THRALL *et al.*, 2006).

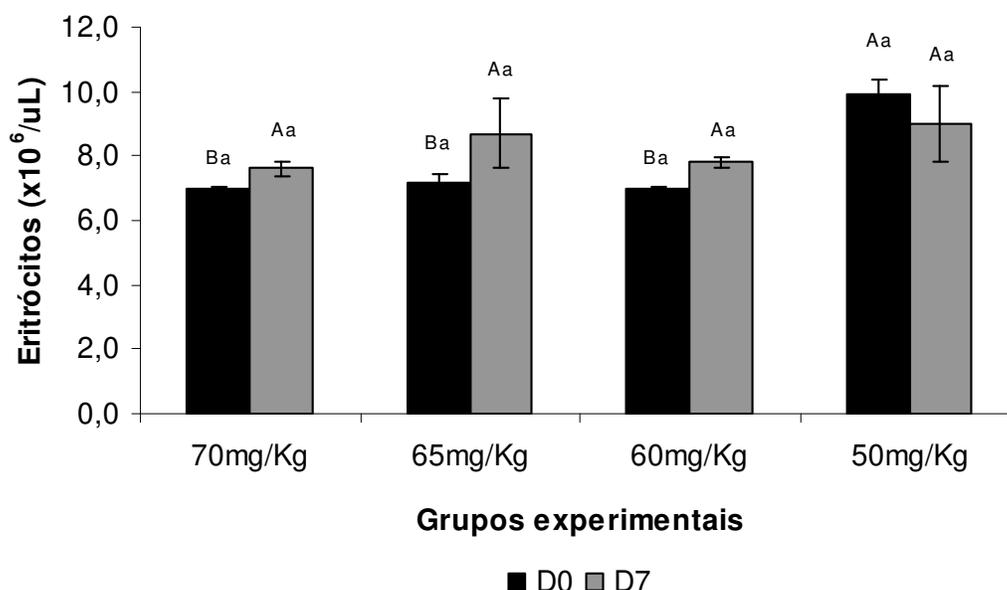


FIGURA 34. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento.

Hemoglobina e Hematócrito - Assim como para os valores de eritrócitos, os resultados de hemoglobina e hematócrito revelaram que no início do experimento houve diferença estatística entre o grupo que recebeu a dose de 50 mg/Kg de 5-FU e os demais grupos, porém no final (D7) essa diferença não foi verificada. Também não foi observada diferença significativa entre os tempos para nenhum grupo estudado.

TABELA 20. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)	
	D0	D7	D0	D7
G 1: 50 mg/Kg 5-FU	20,5 ± 0,95 ^{Aa}	18,3 ± 2,15 ^{Aa}	58,3 ± 2,82 ^{Aa}	51,9 ± 6,21 ^{Aa}
G 2: 60 mg/Kg 5-FU	14,8 ± 0,18 ^{Ba}	16,3 ± 0,29 ^{Aa}	42,5 ± 0,37 ^{Ba}	44,9 ± 0,88 ^{Aa}
G 3: 65 mg/Kg 5-FU	14,9 ± 0,49 ^{Ba}	17,9 ± 2,40 ^{Aa}	42,8 ± 1,36 ^{Ba}	50,4 ± 6,55 ^{Aa}
G 4: 70 mg/Kg 5-FU	14,7 ± 0,18 ^{Ba}	16,2 ± 0,61 ^{Aa}	42,4 ± 0,46 ^{Ba}	45,4 ± 2,18 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Plaquetas - Na Figura 35 observa-se que os valores de plaquetas foram influenciados ao longo do experimento pelo uso de 5-FU, ocorrendo uma diminuição entre o início e o final do estudo, porém apenas para a dose de 70 mg/Kg essa redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

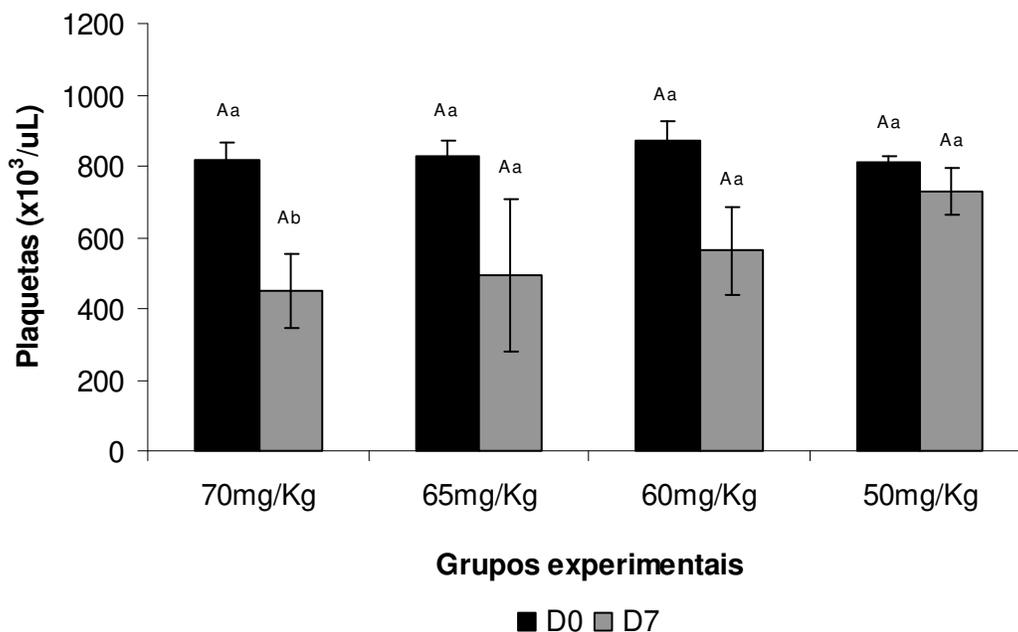


FIGURA 35. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\text{uL}$) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento.

Em D7 observou-se que os níveis de plaquetas continuaram abaixo do valor mínimo recomendado (840×10^3 células/uL) para todos os grupos: 70 mg/Kg ($449,3 \times 10^3$ células/uL), 65 mg/Kg ($492,7 \times 10^3$ células/uL), 60 mg/Kg ($562,3 \times 10^3$ células/uL) e 50 mg/Kg ($728,7 \times 10^3$ células/uL).

Glutaciona eritrocitária

Os resultados de glutaciona eritrocitária analisada no decorrer do experimento 4 estão apresentados na Figura 36.

Não houve diferença significativa nos valores médios de glutaciona no decorrer do estudo para todas as doses de 5-FU testadas.

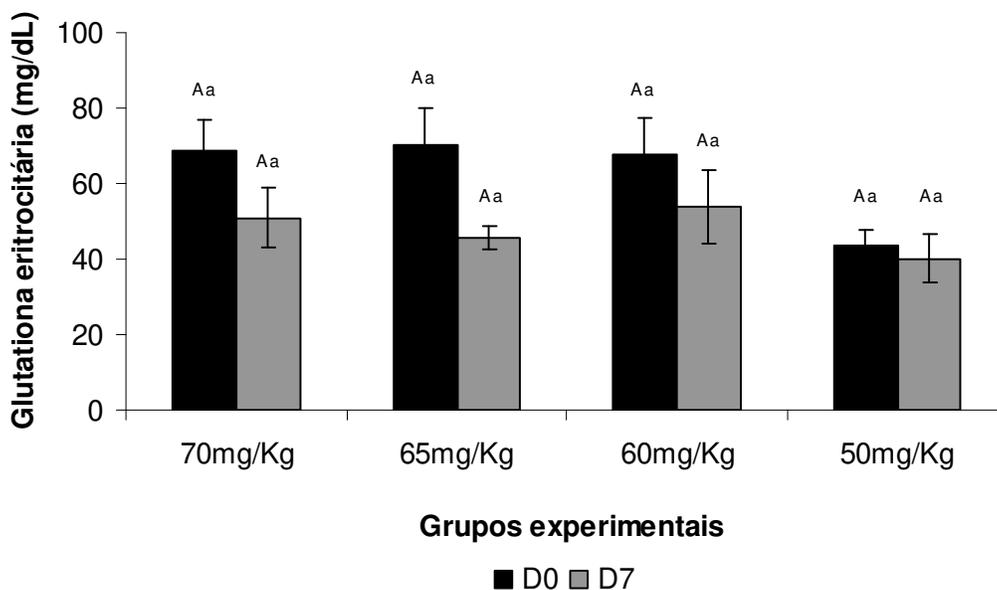


FIGURA 36. Valores de glutathione (mg/dL) do experimento 4. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos em cada tempo e letras minúsculas comparam o mesmo grupo ao longo do experimento.

- **Análise Histopatológica**

Os resultados histopatológicos confirmaram em nível microscópico, a presença de mucosite em diferentes intensidades (leve, moderada e intensa) nas diversas porções da mucosa gastrointestinal de ratos Wistar machos em todas as doses de 5-FU testadas, com exceção da porção de mucosa do estômago para a dose de 50 mg/Kg (Tabela 21).

A presença de mucosite foi constatada 72h após a 2ª dose de 5-FU, intensificando-se em algumas porções 96h após a 3ª dose.

Tanto no D6 como no D10 verificou-se que para as porções do esôfago, estômago e intestino grosso/reto de todas as doses de 5-FU testadas houve predomínio de mucosite leve. Para as porções do duodeno e jejuno foram encontrados diagnósticos de mucosite moderada e intensa.

TABELA 21. Resultados da análise histopatológica para avaliação da mucosite gastrointestinal em ratos Wistar adultos.

Período ¹	Porção	Grupo 1 50 mg/Kg	Grupo 2 60 mg/Kg	Grupo 3 65 mg/Kg	Grupo 4 70 mg/Kg
D6	Esôfago	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)
	Estômago	Normal (100%)	Mucosite L (50%) Normal (50%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)
	Duodeno	Mucosite M (100%)	Mucosite I (100%)	Mucosite M/I (100%)	Mucosite I (100%)
	Jejuno	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)	Mucosite M/I (100%)	Mucosite I (100%)
	IG/Reto	Normal (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)
D10	Esôfago	Mucosite L (33,3%) Normal (66,7%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)
	Estômago	Normal (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)
	Duodeno	Mucosite M (66,7%) Mucosite I (33,3%)	Mucosite I (100%)	Mucosite I (100%)	Mucosite I (100%)
	Jejuno	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)	Mucosite M (100%)
	IG/Reto	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)	Mucosite L (100%)

¹D6 = 72h após 2ª dose de 5-FU (2 animais/grupo); D10 = 96h após 3ª dose de 5-FU (3 animais/grupo). Mucosite: L = leve; M = moderada; I = intensa; M/I = moderada a intensa. O percentual refere-se ao número de animais avaliados em cada eutanásia para cada classificação de mucosite ou de normalidade da mucosa.

4.4.4. Conclusões do Experimento 4

Houve confirmação dos resultados obtidos em experimentos anteriores:

1) Confirmou-se a eficácia do esquema de doses de 5-FU entre 50 a 70 mg/Kg de peso corporal do animal; 2) Alterações microscópicas importantes, compatíveis com mucosite, foram reveladas pelas análises histopatológicas, em diferentes porções do TGI, confirmando a eficácia do protocolo experimental desenvolvido no presente estudo.

4.5. EXPERIMENTO 5

4.5.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da peletização da proteína do soro de leite e da caseína presentes na formulação da dieta AIN-93G;
- Analisar o possível efeito do estímulo imunológico com hemáceas de carneiro sobre os níveis de glutathiona eritrocitária.

4.5.2. Protocolo Experimental

O ensaio teve duração de 21 dias, 8 grupos experimentais foram avaliados, totalizando 40 ratos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados com 21 dias de idade. O protocolo experimental está resumido na Figura 37.

Grupo 1: Dieta AIN-93G peletizada com 12% de WPC sem estímulo imunológico.

Grupo 2: Dieta AIN-93G peletizada com 12% de CASEÍNA sem estímulo imunológico.

Grupo 3: Dieta AIN-93G em pó com 12% de WPC sem estímulo imunológico.

Grupo 4: Dieta AIN-93G em pó com 12% de CASEÍNA sem estímulo imunológico.

Grupo 5: Dieta AIN-93G peletizada com 12% de WPC com estímulo imunológico.

Grupo 6: Dieta AIN-93G peletizada com 12% de CASEÍNA com estímulo imunológico.

Grupo 7: Dieta AIN-93G em pó com 12% de WPC com estímulo imunológico.

Grupo 8: Dieta AIN-93G em pó com 12% de CASEÍNA com estímulo imunológico.

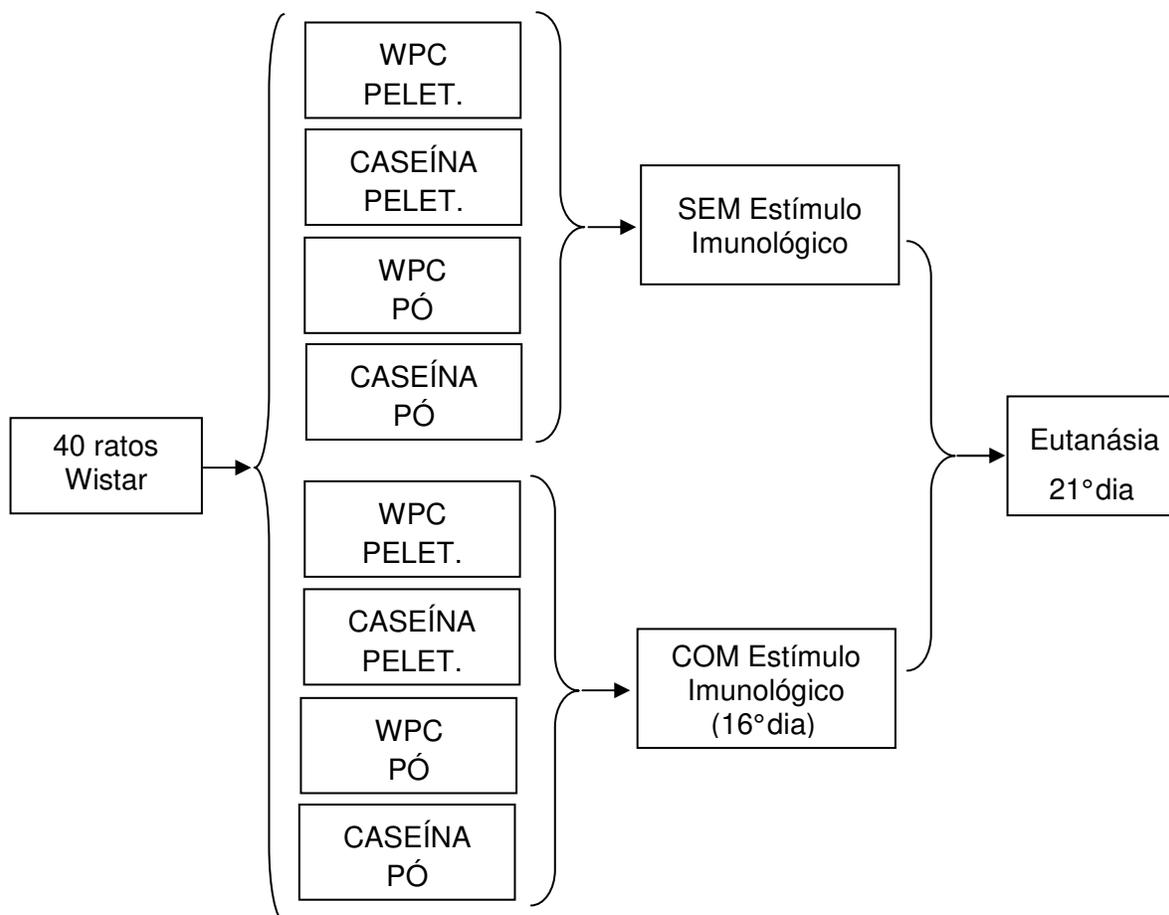


FIGURA 37. Protocolo do experimento 5. Estímulo imunológico: injeção peritoneal de 5×10^6 hemáceas de carneiro (SRBC). PELET. = dieta com WPC ou caseína peletizada.

4.5.3. Resultados

- **Consumo de dieta e ganho de peso**

O consumo de dieta e ganho de peso corporal dos grupos experimentais foram apresentados na Tabela 22.

O consumo foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre os grupos que receberam dieta peletizada e/ou na forma de pó, sendo superior para os animais que receberam as dietas em pó, com exceção da dieta peletizada contendo caseína (grupo 2). Os menores consumos ($p < 0,05$) foram registrados para os

grupos 1 e 5 (dietas peletizadas com WPC), os quais não diferiram das dietas peletizadas com caseína dos grupos 2 e 6. Os resultados de consumo refletiram-se da mesma forma no ganho de peso dos grupos experimentais.

TABELA 22. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 5.

Grupos experimentais	Ingestão de Dieta (g)/ Grupo	Ganho de peso (g)
G1: WPC peletizado sem estímulo	217,18 ± 24,95 ^c	77,98 ± 10,9 ^c
G2: CASEÍNA peletizada sem estímulo	274,50 ± 10,95 ^{abc}	114,14 ± 3,87 ^{abc}
G3: WPC pó sem estímulo	306,44 ± 11,25 ^{ab}	121,78 ± 7,09 ^{ab}
G4: CASEÍNA pó sem estímulo	309,84 ± 1,83 ^{ab}	127,44 ± 0,63 ^a
G5: WPC peletizado com estímulo	231,52 ± 22,67 ^c	84,24 ± 10,43 ^c
G6: CASEÍNA peletizada com estímulo	233,25 ± 10,73 ^{bc}	91,10 ± 3,6 ^{bc}
G7: WPC pó com estímulo	281,36 ± 9,84 ^{abc}	112,60 ± 5,97 ^{abc}
G8: CASEÍNA pó com estímulo	324,34 ± 7,06 ^a	129,44 ± 2,87 ^a

Média ± EPM (erro padrão da média). Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 5-FU = 5-Fluoruracila.

• Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no início (D1) e ao final do experimento (D21).

Hemograma

Leucócitos Totais - Através dos resultados da Figura 38, observa-se aumento estatisticamente significativo nos níveis de leucócitos entre D0 e D21 para os grupos 3 (dieta em pó WPC sem estímulo), 4 (dieta em pó caseína sem estímulo) e 8 (dieta em pó caseína com estímulo).

No final do estudo, os níveis de leucócitos dos grupos 2 e 8 (ambos em dieta de caseína) foram significativamente superiores aos níveis do grupo 1 (dieta WPC peletizada sem estímulo), não diferindo dos demais. Para o mesmo parâmetro hematológico em D21, apenas o grupo 1 ficou abaixo do limite mínimo de referência ($7,30 \times 10^3$ células/uL) de acordo com Thrall *et al.* (2006).

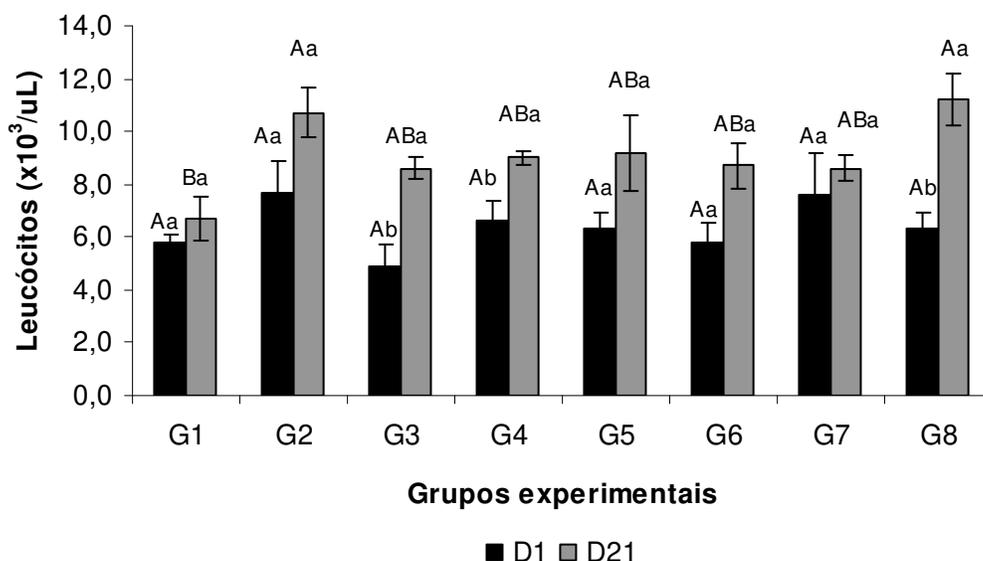


FIGURA 38. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Leucócitos diferenciais - Os dados de contagem diferencial de leucócitos (Tabela 23) revelaram não haver diferença significativa entre os grupos para nenhuma das subpopulações avaliadas.

Os valores de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de todos os grupos estão adequados aos valores de referência (EVANS, 2009).

TABELA 23. Contagem diferencial de leucócitos de ratos *Wistar* adultos após 21 dias de experimento.

Grupos experimentais	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Eosinófilos (%)
G1:WPC pelet. sem estímulo	18,5 ^a (6,5 - 30,5)	76,0 ^a (65,6 - 85,8)	5,5 ^a (2,7 - 7,7)	0 ^a (0 - 0)
G2:CAS pelet. sem estímulo	14,9 ^a (10,0 - 28,0)	81,3 ^a (65,3 - 87,3)	3,6 ^a (0,7 - 6,7)	0,3 ^a (0 - 0,7)
G3:WPC pó sem estímulo	15,1 ^a (5,3 - 29,3)	78,9 ^a (64,7 - 88,0)	5,7 ^a (4,7 - 6,7)	0,3 ^a (0 - 0,7)
G4:CAS pó sem estímulo	15,4 ^a (10,0 - 23,0)	81,2 ^a (73,3 - 88,7)	3,4 ^a (1,3 - 6,0)	0 ^a (0 - 0)
G5:WPC pelet. com estímulo	22,0 ^a (8,5 - 35,3)	74,0 ^a (58,0 - 88,2)	3,9 ^a (2,7 - 6,0)	0,1 ^a (0 - 0,7)
G6:CAS pelet. com estímulo	16,5 ^a (6,5 - 25,3)	81,2 ^a (67,3 - 90,8)	4,2 ^a (2,0 - 7,3)	0,2 ^a (0 - 0,7)
G7:WPC pó com estímulo	16,0 ^a (9,3 - 21,9)	80,2 ^a (74,2 - 86,0)	3,6 ^a (1,3 - 5,2)	0,3 ^a (0 - 1,3)
G8:CAS pó com estímulo	13,0 ^a (10,7 - 17,3)	80,2 ^a (75,3 - 85,3)	6,8 ^a (4,0 - 8,0)	0 ^a (0 - 0)
Valores de referência*	<i>5 - 30</i>	<i>65 - 90</i>	<i>1 - 6</i>	<i>0 - 3</i>

* (Evans, 2009). Resultados apresentados como média (mínimo e máximo). Pelet. = dieta com WPC ou caseína peletizada. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Eritrócitos - Assim como para os níveis de leucócitos, os valores de eritrócitos aumentaram significativamente ($p < 0,05$) entre D0 e D21 para todos os grupos, exceto o grupo 1. Não houve diferença entre os grupos nos tempos analisados.

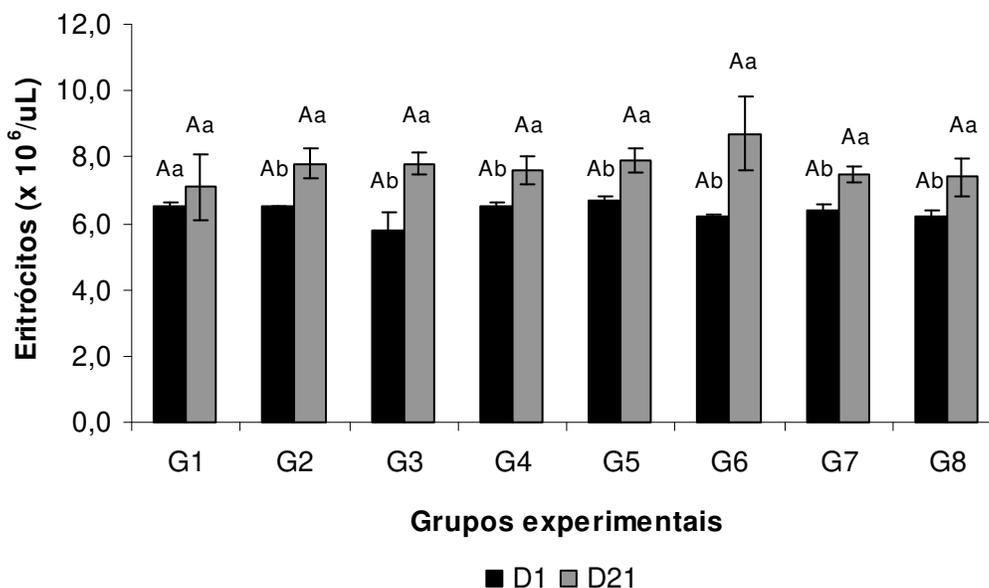


FIGURA 39. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Hemoglobina e Hematócrito - Os valores de hemoglobina e hematócrito estão representados na Tabela 24. Esses parâmetros hematológicos não foram influenciados de maneira significativa entre os grupos nem no decorrer do estudo.

TABELA 24. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)	
	D1	D21	D1	D21
G1:WPC pelet. sem estímulo	13,5±0,26 ^{Aa}	13,3±,79 ^{Aa}	40,9±0,64 ^{Aa}	38,5±5,12 ^{Aa}
G2:CAS pelet. sem estímulo	13,3±0,15 ^{Aa}	14,7±0,76 ^{Aa}	39,3±0,53 ^{Aa}	42,7±2,36 ^{Aa}
G3:WPC pó sem estímulo	12,1±1,03 ^{Aa}	14,6±0,95 ^{Aa}	36,5±3,14 ^{Aa}	42,8±2,64 ^{Aa}
G4:CAS pó sem estímulo	13,6±0,26 ^{Aa}	14,9±1,31 ^{Aa}	40,7±0,74 ^{Aa}	42,4±3,73 ^{Aa}
G5:WPC pelet. com estímulo	13,7±0,31 ^{Aa}	14,6±0,80 ^{Aa}	40,9±0,80 ^{Aa}	42,9±2,40 ^{Aa}
G6:CAS pelet. com estímulo	12,8±0,27 ^{Aa}	16,3±2,24 ^{Aa}	38,4±0,81 ^{Aa}	47,0±6,84 ^{Aa}
G7:WPC pó com estímulo	13,5±0,35 ^{Aa}	14,0±0,77 ^{Aa}	41,0±1,03 ^{Aa}	41,4±2,09 ^{Aa}
G8:CAS pó com estímulo	12,9±0,46 ^{Aa}	14,4±1,26 ^{Aa}	38,2±1,25 ^{Aa}	47,1±2,11 ^{Aa}

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Pelet. = dieta com WPC ou caseína peletizada. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Plaquetas - A Figura 40 mostra que os níveis de plaquetas não sofreram alterações significativas quando se compara os diferentes grupos entre si, porém no decorrer do estudo houve aumento significativo para todos os grupos, exceto para os grupos 1 e 6.

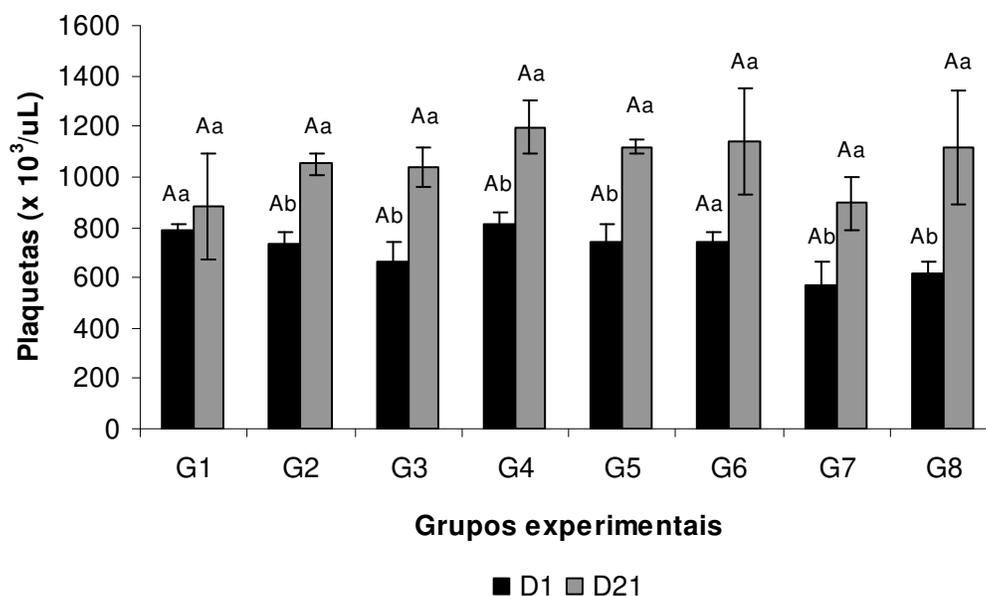


FIGURA 40. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

Glutationa eritrocitária

Os resultados de glutaciona eritrocitária analisada ao longo do experimento 5 com e sem estímulo imunológico estão apresentados na Figura 41.

Verificou-se que houve redução significativa nos níveis de glutaciona eritrocitária para os grupos 1 e 3 (sem estímulo) e 8 (com estímulo) entre D1 e D21. Efeito esse contrário ao esperado, pois os grupos que receberam o estímulo com hemáceas de carneiro não diferiram do comportamento apresentado pelos grupos que não foram estimulados.

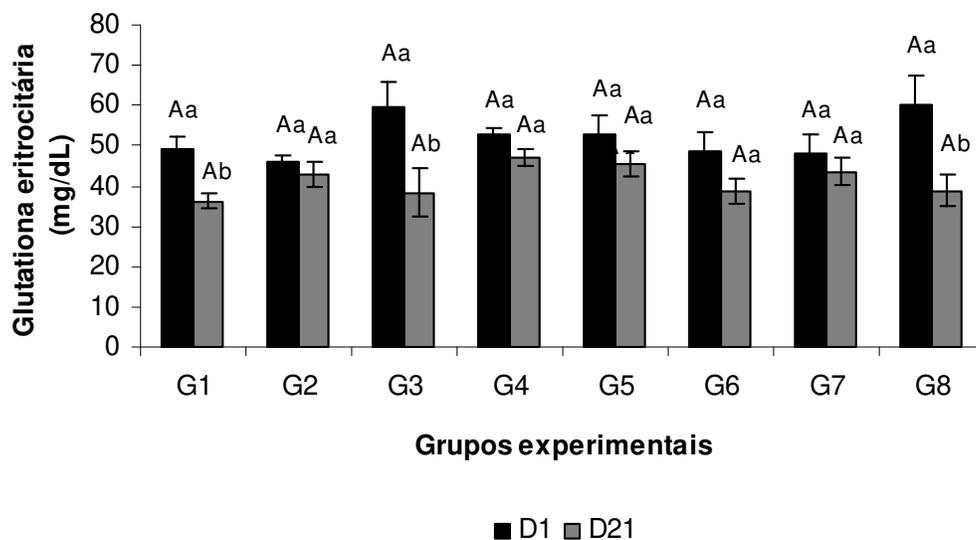


FIGURA 41. Valores de glutathiona eritrocitária (mg/dL) do experimento 5. Grupos experimentais: G1 e G5, WPC pelet. sem estímulo e com est.; G3 e G7, WPC pó sem estímulo e com est.; G2 e G6, CAS pelet. sem estímulo e com est.; G4 e G8, CAS pó sem estímulo e c/ est. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os diferentes grupos entre si e letras minúsculas comparam o mesmo grupo nos tempos analisados.

4.5.4. Conclusões do experimento 5

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) A peletização da dieta AIN-93G promoveu menor consumo pelos animais quando comparada com sua forma em pó, fato que refletiu diretamente no menor ganho de peso dos animais desses grupos;
- 2) Os parâmetros bioquímicos (hematológicos e glutathiona eritrocitária) não foram influenciados pela peletização e secagem das dietas a 50 °C;
- 3) Ao contrário do esperado, o estímulo imunológico com hemáceas de carneiro não promoveu aumento nos níveis de glutathiona nos eritrócitos dos ratos que receberam dietas com WPC, peletizada ou em pó.

5. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM RATOS

A mucosite é o maior problema para pacientes em tratamento quimioterápico e radioterápico, portanto, conhecimento de seus mecanismos de desenvolvimento para a utilização de tratamento adequado para sua prevenção torna-se extremamente importante.

Vários modelos animais têm sido desenvolvidos para investigar a mucosite com respeito às mudanças morfológicas que ocorrem na mucosa após a administração de agentes citotóxicos, bem como, para determinar a ação de substâncias medicamentosas e nutricionais na proteção da mucosa (LOGAN *et al.*, 2007).

O primeiro modelo animal para investigar a mucosite induzida por quimioterápicos envolveu a utilização de hamsters *Golden Syrian* que receberam 5-fluoruracila (5-FU). Análises clínicas e histológicas indicaram que as mudanças que ocorreram na mucosa dos animais foram similares ao verificado em humanos com mucosite. Adicionalmente, as mudanças foram influenciadas também pelo grau de mielossupressão verificado nos animais (SONIS *et al.*, 1990).

Outro modelo comumente usado com animais para investigar aspectos da mucosite é através do modelo murino. Esses protocolos com camundongos têm sido usados para testar estratégias de tratamento relacionadas à toxicidade associadas com drogas específicas. Estudos com ratos também têm sido amplamente realizados para investigar a fisiopatologia e possíveis tratamentos da mucosite, bem como, para determinar métodos não invasivos para detecção de mucosite intestinal. Um dos modelos mais extensivamente usados para investigar a mucosite induzida por quimioterápicos emprega a utilização de ratas fêmeas da linhagem Dark Agouti. Este modelo demonstra eficazmente um paralelo com o desenvolvimento da mucosite humana, além do benefício adicional dos ratos desenvolverem tumores, assim os efeitos tumorais podem ser estudados conjuntamente com o dano à mucosa gastrointestinal. As drogas citotóxicas mais investigadas com esse modelo incluem irinotecan, metotrexato e 5-FU (LOGAN, *et al.*, 2007).

Para o desenvolvimento do modelo de indução de mucosite em ratos Wistar na presente pesquisa, inicialmente se baseou em protocolo de indução de acordo com Mauger *et al.* (2007). Esses autores utilizaram ratos Dark Agouti administrando via intraperitoneal uma dose única de 150 mg/Kg de peso do 5-FU no 7º dia do experimento, sendo que a eutanásia dos animais foi realizada no 10º dia. Esses autores por sua vez basearam-se em estudos prévios de Xiam *et al.* (2004) com ratos Sprague-Dawley, nos quais os danos na mucosa intestinal ficaram evidentes dentro de 2 dias de tratamento e os sintomas gastrointestinais tiveram seu pico máximo 3 dias após a administração do quimioterápico.

A partir do exposto um estudo piloto (experimento 1) foi realizado para testar diferentes concentrações e nº de doses dos quimioterápicos 5-FU e sulfato de vincristina em ratos da linhagem Wistar. Quando se comparou o peso inicial e o final de cada grupo tratado com 5-FU, pode-se observar uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os grupos que receberam 2 doses de 150mg/Kg e para os que receberam 2 doses de 100mg/Kg, apresentando percentual de perda de peso de 28,6 e 20,9%, respectivamente.

Em relação à comparação dos pesos inicial e final dos grupos experimentais tratados com sulfato de vincristina, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) para o grupo que recebeu 3 doses de 0,5 mg/Kg e para o grupo que recebeu 3 doses de 0,75mg/Kg. O percentual de perda de peso para esses dois grupos foi de 29,7 e 28%, respectivamente, enquanto que para o grupo de animais tratados com doses mais baixas (0,25mg/Kg) não houve perda de peso significativa. Dessa forma, a variável perda de peso foi observada para os dois quimioterápicos avaliados.

Na avaliação clínica dos experimentos de indução de mucosite com os quimioterápicos 5-FU e sulfato de vincristina verificou-se uma relação dependente da dose e do número de administrações, ou seja, quanto maior a concentração da dose e o número de administrações, maiores os escores da avaliação clínica e, portanto mais acentuadas as alterações observadas nos animais de cada grupo.

Tanto no experimento realizado com 5-FU como com sulfato de vincristina não foram evidenciadas macroscopicamente lesões compatíveis com mucosite oral. Por outro lado, lesões compatíveis com mucosite gastrointestinal foram verificadas nos animais 96h após a 2ª dose de 5-FU, tanto para os grupos tratados com doses de 100mg/Kg como doses de 150mg/Kg. Verificou-se presença de diarreia intensa; estômago dilatado e conteúdo líquido; ausência de bolo fecal; ulceração na região duodenal e lesões hemorrágicas no TGI (predominantemente no duodeno e no reto).

No experimento com sulfato de vincristina não foram encontradas lesões compatíveis com mucosite mesmo nos grupos tratados com as maiores doses e depois de repetidas administrações.

A partir dos resultados do experimento piloto constatou-se a eficiência do 5-FU na indução de mucosite gastrointestinal em ratos Wistar, e que as doses testadas deveriam ser inferiores a 100 mg/Kg de peso para evitar efeitos tóxicos letais nos animais. Dessa forma, o experimento 2 foi realizado com aplicação de 3 doses na concentração de 75mg/Kg de peso para cada grupo, conforme protocolo experimental detalhado na Figura 13.

O 5-FU é uma droga análoga à pirimidina, agindo na inibição do metabolismo da uracila. Agentes quimioterápicos citotóxicos, como 5-FU estão associados com mucosite mais severa (RUBENSTEIN *et al.*, 2004). Acredita-se que o fator nuclear NF- κ B possa estar envolvido na indução de mucosite pelo 5-FU, porém vias alternativas que promovem apoptose parecem também estar envolvidas no dano à mucosa originado pela ação do 5-FU. Entretanto, o exato mecanismo responsável pela indução de mucosite pelo 5-FU não foi ainda totalmente elucidado (LOGAN *et al.*, 2007).

A perda de peso observada no experimento 2 para o grupo tratado previamente com caseína (grupo 3) foi de 20%. No entanto, não houve redução significativa no peso dos animais tratados com WPC (grupo 4), indicando um provável efeito benéfico na preservação do peso corporal pelas proteínas do soro do leite quando administradas previamente ao 5-FU, pois quando administradas

simultaneamente o efeito não foi tão marcante, uma vez que a perda de peso foi de 19,5% (grupo WPC).

Outra consideração a ser feita é que quando se comparou o grupo 4 e o grupo 1, os quais diferiram apenas pela forma de administração da proteína, o grupo 4 recebeu o WPC através de gavagem (ingestão induzida), o grupo 1 recebeu em dieta peletizada (ingestão espontânea). Pelos percentuais de perda de peso verificou-se que a administração através da gavagem foi mais eficiente, uma vez que o quimioterápico interfere no metabolismo geral dos animais, diminuindo sua ingestão alimentar como comprovado através dos dados do consumo de dieta. Este resultado confirma o que foi verificado no estudo com humanos (capítulo 2) sobre a influência do tratamento quimioterápico em relação a ingestão alimentar dos pacientes.

É importante ressaltar que os grupos controle 1 (com 5-FU) e 2 (sem 5-FU) receberam a proteína de forma convencional através de dieta peletizada contendo 12% de proteína, observando-se uma diferença significativa na ingestão da dieta entre esses dois grupos. Evidenciando-se dessa forma, os efeitos colaterais provocados pela administração de 5-FU nos animais do grupo 1, em que se observou uma redução da ingestão alimentar com consequente perda de peso (18,4%) em relação ao grupo 2. Esses dados justificam a utilização da gavagem como forma de se garantir que a proteína seja melhor utilizada pelos animais e possa exercer sua ação benéfica.

Também se verificou que administração simultânea das proteínas e do 5-FU promoveu baixíssima ingestão alimentar, sendo estatisticamente inferior à ingestão dos grupos que receberam tratamento prévio com as proteínas do leite.

Através da análise anatomopatológica realizada no experimento 2 constatou-se a presença de alterações compatíveis com mucosite gastrointestinal na maioria dos animais tratados com 5-FU, especialmente na região do duodeno. Evidenciou-se toxicidade por parte do 5-FU 48h após a administração da 3ª dose. Este fato foi observado através do óbito de alguns animais e das observações

clínicas, como presença de diarreia intensa, piloereção acentuada, perda do comportamento espontâneo e diminuição da resposta a estímulos.

Em relação aos parâmetros hematológicos verificou-se que o 5-FU promoveu, de maneira geral, nos experimentos realizados no presente capítulo, redução significativa nos níveis de leucócitos e plaquetas para todos os grupos experimentais, exceto os grupos controle. Os níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito foram menos afetados, inclusive apresentando, em muitos casos, valores dentro da normalidade para ratos.

Embora tenha ocorrido variações nos níveis de GSH entre o início e o final do experimento 2 para todos os grupos avaliados, não houve diferença significativa entre WPC e caseína. Para os grupos que não receberam as proteínas previamente à administração de 5-FU, verificou-se uma tendência progressiva na redução dos níveis de GSH eritrocitária.

Na comparação entre os grupos 4 (recebeu WPC por gavagem uma semana antes da 1ª dose de 5-FU) e 6 (recebeu WPC por gavagem simultaneamente ao 5-FU) 24h após a 2ª dose (D11) e 24h após a 3ª dose de 5-FU (D14), verificou-se superioridade nos níveis de GSH para o grupo 4 de 37,8% (66,4 *versus* 48,2 mg/dL) em D11 e de 44,5% (64,3 *versus* 44,5 mg/dL) em D14. Também foi verificada essa mesma relação entre os grupos que receberam caseína. Esses resultados evidenciam a importância da administração prévia das proteínas do leite para que ocorra estímulo na produção de glutatona.

Entretanto, quando se comparou os valores de GSH eritrocitária entre o D1 e o D21 (período de pré-tratamento com as proteínas do leite) do experimento 3, verificou-se aumento estatisticamente significativo para todos os grupos, não se evidenciando a superioridade do WPC. No experimento 4 não houve diferença significativa dos níveis de GSH eritrocitária em nenhum grupo avaliado.

Através do experimento 2 foi possível verificar a eficácia do quimioterápico 5-FU na indução de ulcerações compatíveis com mucosite no trato gastrointestinal dos animais na dose de 75mg/Kg, porém não foi possível avaliar a ação protetora

das proteínas do soro de leite bovino sobre a mucosa dos ratos Wistar sendo necessária à realização de novos experimentos.

Dessa forma, para avaliação da possível proteção das proteínas do soro de leite bovino sobre a mucosa de ratos Wistar o experimento 3 foi realizado testando-se um protocolo de indução de mucosite com concentrações de 50 mg/Kg, 3 aplicações e 30/60 mg/Kg, 2 aplicações de 30 e 1 de 60 de 5-FU. Nesse 3º experimento utilizou-se um período de pré-tratamento com as proteínas do leite por 3 semanas antes da administração da 1ª dose de 5-FU, tendo em vista os resultados obtidos no experimento anterior. Porém dessa vez as proteínas foram oferecidas através da dieta AIN-93G peletizada com objetivo de se reproduzir a ingestão espontânea como praticada no capítulo 2 com os pacientes portadores de LMA.

Durante as 3 primeiras semanas do experimento 3 houve ganho de peso normal para todos os grupos. Porém, após a 2ª dose de 5-FU verificou-se o início da perda do peso corporal dos animais dos grupos que receberam 50mg/Kg com aumento dessa perda 72h após a 3ª dose (D30), o mesmo não ocorreu com os grupos que receberam duas doses de 30mg/Kg e uma 3ª de 60mg/Kg de 5-FU.

Todos os grupos experimentais mostraram uma retomada no ganho de peso 10 dias (D37) após a administração da última dose de 5-FU não apresentando diferença estatística em relação aos grupos controle.

Verificou-se em todos os experimentos realizados no presente capítulo (exceto experimento 5), que o consumo de dieta e as alterações clínicas foram inversamente proporcionais às doses de 5-FU testadas. Adicionalmente os animais tratados com caseína mostraram-se mais debilitados clinicamente que os animais que receberam WPC.

Não foram encontradas alterações na mucosa do TGI compatíveis com mucosite na maioria dos animais tratados com doses de 50 e 30/60mg/Kg de peso de 5-FU. Este fato sugeriu uma possível proteção da mucosa por parte das proteínas do leite administradas nas dietas. Porém, os resultados do experimento

4 demonstraram que não houve, macroscopicamente, lesões na mucosa do TGI dos animais tratados com as mesmas condições do experimento 3, mas recebendo dieta comercial. Portanto, a administração de 3 doses de 50mg/Kg de peso com um intervalo de 3 dias entre cada dose não foi suficiente para provocar alterações macroscópicas na mucosa sugestivas de mucosite.

Observou-se aumento significativo nos níveis de leucócitos entre o início e o 21º dia do experimento 3 para os grupos tratados com WPC. Como não foi verificado esse efeito nos grupos tratados com caseína, sugere-se que o WPC estimulou a produção de linfócitos *in vivo*.

Os resultados histopatológicos do experimento 3 confirmaram em nível microscópico, a presença de mucosite em diferentes intensidades (leve, moderada e intensa) nas diversas porções da mucosa gastrointestinal de ratos Wistar machos tanto nas doses do 5-FU de 50 mg/Kg como nas doses de 30mg/Kg.

A presença de mucosite foi constatada 72h após a 2ª dose de 50mg/Kg de 5-FU, para os grupos WPC e caseína. A intensidade da mucosite foi mais acentuada na região do duodeno e do jejuno para o grupo caseína quando comparada com os achados para os grupos que receberam WPC.

Com 72h após a 3ª dose de 5-FU (D30), a mucosa do esôfago apresentou mucosite leve apenas para os grupos tratados com caseína. As porções do duodeno e do jejuno foram as que apresentaram maior incidência de mucosite em todos os grupos. Assim como para o duodeno, a mucosa do jejuno apresentou incidência de mucosite mais acentuada entre os grupos tratados com caseína.

Para avaliar a possível recuperação da mucosa realizou-se as eutanásias 7 dias (D34) e 10 (D37) dias após a administração da última dose de 5-FU conforme dados da literatura (CLARKE *et al.*, 2002), porém esses períodos mostraram-se insuficientes para a recuperação da mucosa de algumas porções gastrointestinais avaliadas.

No experimento 3 foi realizada análise microbiológica antes da administração da 1ª dose de 5-FU (D21), 24h após administração da 2ª dose de 5-

FU (D25) e 8 dias após a administração da 3ª dose de 5-FU (D35). A maioria dos resultados revelou que os animais não apresentaram contaminação por microorganismos, indicando que as condições ambientais (isoladores, maravalha, água e dieta) não foram fontes de contaminação, uma vez que a indução de mucosite pelo uso de quimioterápico provoca diminuição nos níveis dos leucócitos deixando os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções.

Dessa forma, descarta-se a hipótese dos animais que foram a óbito antes da eutanásia terem sido contaminados por condições ambientais, atribuindo-se, especialmente, este fato aos efeitos tóxicos do próprio quimioterápico. Esse resultado pode ser estendido aos demais experimentos realizados sob as mesmas condições ambientais, inclusive naqueles com utilização de doses mais altas de 5-FU.

No experimento 4 testou-se as doses de 50, 60, 65 e 70 mg/Kg de peso de 5-FU em ratos Wistar machos com 6 semanas de idade e recebendo dieta comercial Nuvilab®. Esse estudo foi realizado com o objetivo de se definir as doses ótimas de 5-FU para indução de mucosite garantindo que os efeitos tóxicos do quimioterápico não promova óbito dos animais e com isso desenvolver um modelo de indução de mucosite em ratos da linhagem Wistar, eficiente para futuros estudos com possíveis agentes protetores da mucosa.

As doses de 5-FU testadas no experimento 4 não promoveram perda de peso dos animais ao longo do estudo, não houve diferença significativa na ingestão de dieta entre os grupos, as alterações clínicas foram semelhantes no intervalo de doses testadas.

Apesar dos animais de todos os grupos estarem clinicamente debilitados não foram encontradas através da análise anatomopatológica alterações macroscópicas na mucosa do TGI compatíveis com mucosite na maioria dos animais. Porém, os resultados histopatológicos confirmaram a presença de mucosite em todas as doses de 5-FU testadas no experimento 4, com exceção da mucosa do estômago para a dose de 50 mg/Kg. Para as porções do duodeno e jejuno foram encontrados diagnósticos de mucosite moderada e intensa,

demonstrando que essas duas porções apresentaram maior incidência e severidade de mucosite, estando de acordo com resultados obtidos no experimento 3.

Um 5º experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da peletização sobre as proteínas lácteas e também se um estímulo imunológico poderia influenciar os níveis de GSH nos eritrócitos.

A evolução do peso foi mais acentuada para os grupos que receberam dieta AIN-93G na forma de pó em detrimento da dieta AIN-93G peletizada. Estes resultados estão de acordo com o verificado através do consumo de dieta pelos animais, o qual foi significativamente ($p < 0,05$) superior para os animais que receberam as dietas em pó.

Observou-se aumento para a maioria dos grupos nos níveis de leucócitos e eritrócitos entre D0 e D21. Verificou-se que os níveis de plaquetas também aumentaram significativamente para a maioria dos grupos, exceto para os grupos 1 e 6.

Os dados de contagem diferencial de leucócitos revelaram não haver diferença significativa entre os grupos para nenhuma das sub-populações avaliadas. Os valores de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de todos os grupos estavam adequados aos valores de referência (EVANS, 2009), com exceção para os níveis de monócitos do grupo 8.

Ao contrário do esperado para o experimento 5, o estímulo imunológico com hemáceas de carneiro não promoveu aumento nos níveis de GSH nos eritrócitos, assim como a proteína do soro de leite administrada nas dietas na forma de pó ou peletizada.

Tendo em conta que os mecanismos moleculares de injúria da mucosa ainda não foram completamente esclarecidos, inúmeros estudos com diversos protocolos em modelos animais de indução de mucosite vêm sendo realizados. Além do esclarecimento dos mecanismos envolvidos, esses trabalhos também objetivam avaliar possíveis substâncias protetoras da mucosa. Dessa forma serão

descritos a seguir trabalhos reportados na literatura científica com esses propósitos e que estão relacionados com o presente estudo.

Alguns dos primeiros estudos com modelo de hamsters investigaram a utilização do fator de crescimento epidermal - FCE (SONIS *et al.*, 1992), do fator de crescimento e transformação $\beta 3$ -TGF- $\beta 3$ (SONIS *et al.*, 1994; SONIS *et al.*,1997) e da IL-11 recombinante humana (SONIS *et al.*, 1995). Enquanto o FCE aumentou a injúria da mucosa, não promovendo benefícios, a IL-11 evidenciou melhora do dano na mucosa após o uso de 5-FU.

O TGF- β é um fator de crescimento com capacidade reguladora da proliferação celular, fazendo com que as células permaneçam na fase G1 do ciclo celular. Sonis *et al.* (1994) demonstraram que a aplicação tópica de TGF- $\beta 3$ na mucosa oral de hamsters previamente à administração de 5-FU reduziu vários parâmetros relacionados com a mucosite incluindo incidência, severidade e duração, bem como fatores relacionados com a ação do quimioterápico como a perda de peso.

Em estudo realizado por Harsha *et al.* (2006) os efeitos citoprotetores de uma dieta enriquecida com glutamina, fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e aminoácidos de cadeia curta (Modulen) foram avaliados em ratos da linhagem Fischer 344 expostos ao metotrexato. Os autores verificaram que quando administrado antes e durante o tratamento com metotrexato, a suplementação com Modulen foi estatisticamente significativa na proteção contra a perda de peso, hipoalbuminemia, acidose e dano gastrointestinal em ratos.

Ramos *et al.* (1997) avaliaram a adição de aminoácidos de cadeia curta na dieta de camundongos tratados com o quimioterápico Ara-C (citarabina). Os autores verificaram que as características histológicas na mucosa do intestino delgado, como a altura das vilosidades, foram aumentadas e que a inflamação e necrose foi reduzida.

Vários estudos têm demonstrado que infecções podem exacerbar a severidade de lesões na mucosa, embora o papel de agentes antimicrobianos e antifungos no tratamento da mucosite ainda é discutível (BARASCH *et al.*, 2006).

O uso tópico de fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (FEC-GM) também tem sido pesquisado em modelo de mucosite oral em hamsters. Em estudo realizado por CHO e colaboradores (2006), os autores demonstraram além do efeito benéfico sobre a mucosite, suporte adicional para o papel de citocinas pró-inflamatórias no seu desenvolvimento. A administração do FEC-GM sugeriu causar uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e IL-2 na mucosa oral de hamsters.

Farrell *et al.* (1998) investigaram, através do uso de modelo com camundongos, a injúria induzida por quimioterápicos e o possível benefício de um fator de crescimento de queratinócitos (Palifermin[®]). O Palifermin[®] foi administrado previamente aos quimioterápicos 5-FU ou metotrexato, demonstrando que a sobrevivência foi melhorada, bem como, os parâmetros histológicos no intestino delgado apresentaram aumento na altura das vilosidades e profundidade das criptas.

No entanto, o efeito da administração desse mesmo fator de crescimento de queratinócitos em relação a mucosite intestinal induzida por metotrexato também foi testado em ratos Dark Agouti por Gibson *et al.* (2002), não apresentando benefícios para a proteção da mucosa dos animais frente ao desenvolvimento e severidade da mucosite.

Em outro estudo foi realizado a investigação do papel do fator de crescimento epidermal (FCE) no tratamento da injúria da mucosa intestinal induzida por quimioterápicos em camundongos. Não se demonstrou nenhum efeito na redução do dano à mucosa quando comparado com os animais do grupo controle, no que se refere às características histológicas da mucosa e a perda de peso (HUANG *et al.*, 2002).

Estudos relatam a importância da utilização de fatores de crescimento presentes no leite bovino na proteção da mucosa gastrointestinal. O fator de crescimento epidermal melhorou o reparo da mucosa intestinal danificada por metotrexato em ratos (HIRANO *et al.*, 1995) e o uso de preparações do soro de leite bovino reduziu a injúria intestinal induzida por metotrexato em camundongos (HOWARTH *et al.*, 1996).

Estudo em modelo com hamsters (CLARKE *et al.*, 2002) demonstrou que frações do soro de leite bovino protegeram a mucosa oral dos animais por prevenir o desenvolvimento de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-fluoruracila.

6. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM RATOS

Os experimentos realizados nessa pesquisa permitiram concluir que:

- 1) O quimioterápico sulfato de vincristina não se revelou um bom agente indutor de mucosite gastrointestinal em ratos Wistar, ao contrário do 5-Fluoruracila (5-FU), que se mostrou bastante eficaz;
- 2) Três doses de 75 mg/Kg de 5-FU, com intervalo de 3 dias entre cada administração, mostrou-se eficaz no desenvolvimento de mucosite detectável, tanto macroscopicamente (análise anatomopatológica) como microscopicamente (análise histopatológica), contudo, nessas doses ainda se produziu efeitos tóxicos indesejáveis;
- 3) O melhor modelo de indução de mucosite gastrointestinal foi desenvolvido nos experimentos 3 e 4, nos quais se utilizaram 3 doses de 5-FU (30 a 70 mg/Kg de peso corporal) com intervalos de 3 dias;
- 4) Recomenda-se que a via de administração das proteínas seja através do consumo oral espontâneo da dieta, uma vez que nos pacientes com LMA a intervenção nutricional ocorreu dessa forma;
- 5) Observaram-se maiores reduções nos níveis de leucócitos e plaquetas após a administração da 3ª dose de 5-FU;

6) O WPC estimulou significativamente os níveis de leucócitos durante 3 semanas de pré-tratamento à aplicação do 5-FU (experimento 3), o que não foi verificado nos grupos que receberam caseína;

7) Observou-se que tanto o WPC como a caseína promoveram aumento nos níveis de glutathiona eritrocitária na fase prévia ao tratamento com 5-FU, sem diferença estatística entre as mesmas;

8) O WPC mostrou-se mais eficaz que a caseína na proteção das mucosas, principalmente nas regiões do duodeno e jejuno que revelaram-se mais susceptíveis ao desenvolvimento de mucosite;

9) O período de 10 dias após a administração da 3ª dose de 5-FU foi insuficiente para a avaliação de uma plena recuperação da mucosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington: W. Horwitz; 2005.

BARASCH, A.; ELAD, S.; ATMAN, A.; DAMATO, K. JOEL, E. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis. **Supportive care in cancer / Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, Berlin, v. 14, n.6, p. 528-32, may. 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**. New York: Churchill Livingstone, 1986.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, aug. 1959.

BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: William & Wilkins Co, 1974.

CASTRO, G.A.; SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F. O efeito dos constituintes do leite na carcinogênese. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos – Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

CHO, S.A.; PARK, J.H.; SEOK, S.H.; JUHN, J.H.; KIM, S.J.; JI, H.J., CHOO, Y.S.; PARK, J.H. Effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) on 5-FU-induced ulcerative mucositis in hamster buccal pouches. **Experimental and toxicologic pathology**, Jena, v. 57, n. 4, p. 321-328, mar. 2006.

CLARK, J.; BUTLER, R.; HOWARTH, G.; READ, L.; REGESTER, G. Exposure of oral mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy-induced mucositis in the hamsters. **Oral Oncology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 478-485, jul. 2002.

EVANS, G.O. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. Boca Raton: CRC Press – Taylor e Francis Group, 2009.

FARRELL, C.L.; BREADY, J.V.; REX, K.L.; CHEN, J.N.; CHRISTOPHER R. DIPALMA, C.R.; WHITCOMB, K.L.; YIN, S.; HILL, D.C.; WIEMANN, B.; STARNES, C.O.; HAVILL, A.M.; LU, Z.N.; AUKERMAN, S.L.; PIERCE, G.F.; THOMASON, A.; POTTEN, C.S.; ULICH, T.R.; LACEY, D.L. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, n.5, p.933-939, mar. 1998.

GIBSON, R.J.; KEEFE, D.M.; CLARKE, J.; REGESTER, G.O.; THOMPSON, F.M.; GOLAND, G.J.; EDWARDS, B.G.; CUMMINS, A.G. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 53-58, jul. 2002.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; INGLIS, M.R.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 18, n.9, p.1095-1100, sep. 2003.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p. 53/p.21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 4, n.4, p. 188-195, mar. 2005.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 10.ed., São Paulo: Nobel, 1982.

GUIMARÃES, M.A.; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

HARSHA, W.T.; KALANDAROVA, E.; MCNUTT, P.; IRWIN, R.; NOEL, J. Nutritional supplementation with transforming growth factor-beta, glutamine, and short chain fatty acids minimizes methotrexate-induced injury. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 42, n. 1, p. 53-58, jan. 2006.

HIRANO, M.; IWEAKIRI, R.; FUJIMOTO, K.; SAKATA, H.; OHYAMA, T.; SAKAI, T.; JOH, T.; ITOH, M. Epidermal growth factor enhances repair of rat intestinal mucosa damaged after oral administration of methotrexate. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 30, n.2, p.169 - 176, apr. 1995.

HOWARTH, G.S.; FRANCIS, G.L.; COOL, J. C.; BALLARD, R.W.; READ, L.C. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 126, n.10, p. 2519-2530, oct.1996.

HUANG, F.S.; KEMP, C.J.; WILLIAMS, J.L.; ERWIN, C.R.; WARNER, B.W. Role of epidermal growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 282, n. 3, p. G432-442, mar. 2002.

KEEFE, D.M.; BREALEY, J.; GOLAND, G.J., CUMMINS, A.G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, London, v. 47, n.5, p. 632–637, nov. 2000.

LEWIN, K.J.; RIDDELL, R.H.; WEINSTEIN, W.M. **Gastrointestinal pathology and its clinical implications**. New York: Igaku-Shoin Medical Publishers, 1992.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.J.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, New York, v. 33, n. 5, p. 448-460, aug. 2007.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review : a Journal of Clinical Therapeutic**, Saindpoint, v.9, n.2, p.136-56, jun. 2004.

MAUGER, C.A.; BUTLER, R.N.; GEIER, M.S.; TOOLEY, K.L.; HOWARTH, G.S. Probiotic effects on 5-fluoruracil-induced mucositis assessed by the sucrose breath

test in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 52, n. 3, p. 612-619, mar. 2007.

MEZZARROBA, L.F.H.; CARVALHO, J.E.; PONEZI, A.N.; ANTONIO, M.A.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p.1005-1012, sep. 2006.

OECD. **Guideline for testing of chemicals. Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures**. Paris: OECD Series on Testing and Assessment, 2001.

PENNA, S.P. **Níveis de glutatona reuzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio**. 1995. 77f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

RAMOS, M.G.; BAMBIRRA, E.A.; CARA, D.C.; VIEIRA, E.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Oral administration of short-chain fatty acids reduces the intestinal mucositis caused by treatment with Ara-C in mice fed commercial or elemental diets. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 28, n. 2, p. 212-217, 1997.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, J.G.C. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the Amercian Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 5, n. 4, p. 221-228, winter. 2002.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTONIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesins caused by subcutaneons administration of indomethacin. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, n. 3, p. 309-314, fall. 2004.

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L.S.; FOX, P.C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S.T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, Philadelphia, v. 100, suppl. 9, p. 2026-2046, may. 2004.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.4, p. 397-409, oct./dec. 2004.

SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F.; CASTRO, G.A. Componentes do leite e sistema imune. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos – Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

SONIS, S.T.; TRACEY, C.; SHKLAR, G.; JENSON, J.; FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, St. Louis, v. 69, n. 4, p. 437-443, apr. 1990.

SONIS, S.T.; COSTA, J.W. JR, EVITTS, S.M.; LINDQUIST, L.E.; NICOLSON, M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, St. Louis, v. 74, n. 6, p. 749-755, dec. 1992.

SONIS, S.T.; LINDQUIST, L.; VAN VUGT, A.; STEWART, A.A.; STAM, K.; QU, G.Y.; IWATA, K.K.; HALEY, J.D. Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n.5, p. 1135 - 1138, mar.1994.

SONIS, S.T.; MUSKA, A.; O'BRIEN, J.; VAN VUGT, A.; LANGER-SAFER, P.; KEITH, J. Alteration in the frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. **European Journal of Cancer - Part B - Oral Oncology**, London, v. 31B, n. 4, p. 261-266, jul. 1995.

SONIS, S.T.; VAN VUGT, A.G.; BRIEN, J.P.; MUSKA, A.D.; BRUSKIN, A.M.; ROSE, A.; HALEY, J.D. Transforming growth factor- β 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. **Oral Oncology**, Oxford, v.33, n. 1, p. 47-54, jan. 1997.

STEIJNS, J.M. Milk ingredients as nutraceuticals. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, n. 3, p. 81-88, dec. 2001.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAPBELL, T.W.; DE NICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S.; HAYASAWA, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 109- 112, 2002.

XIAM, C.J.; HOWARTH, G.S.; COOL, J.C.; FOSTER, B.K. Effects of acute 5-fluorouracil chemotherapy and insulin-like growth factor-I pretreatment on growth plate cartilage and metaphyseal bone in rats. **Bone**, New York, v. 35, n.3, p. 739-749, sep. 2004.

YEOH, A.S.J.; GIBSON, R.J.; YEOH, E.E.K.; BOWEN, J.M.; STRINGER, A.M.; GIAM, K.A.; KEEFE, D.M.K. A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor- κ B, COX-1, and COX-2. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 6, n. 8, p. 2319-2327, aug. 2007.

CAPÍTULO 4

“Avaliação, *in vivo* e *in vitro*, dos efeitos de proteínas lácteas sobre células leucêmicas humanas transplantadas em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e em cultura de células”

RESUMO

Os objetivos foram avaliar a influência de um concentrado de soro de leite bovino (WPC) enriquecido com o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) mais lactoferrina e de uma caseína comercial sobre a evolução da leucemia em camundongos imunodeficientes NOD/SCID para posteriormente investigar um possível efeito sinérgico entre essas proteínas e o tratamento quimioterápico. Determinar *in vitro* a citotoxicidade e o efeito do WPC na produção de glutathione total em células leucêmicas humanas. Os experimentos foram realizados no laboratório de experimentação animal do Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas da Infância (CIPOI), UNICAMP, Campinas-SP. Para os experimentos *in vivo* utilizaram-se células de Leucemia Linfóide Aguda (LLA) pediátrica humana, isolada de pacientes do Centro Infantil Boldrini, as quais foram inoculadas por injeção na veia caudal de camundongos NOD/SCID. Após 60 dias da inoculação, foram isoladas do baço 90×10^6 células leucêmicas e inoculadas nos animais dos experimentos 1 e 2. Todos os animais foram monitorados a cada 7 dias quanto ao implante da leucemia através da coleta de 100 μ L de sangue do plexo retrocular. As amostras foram marcadas com o antígeno CD45 humano e analisadas por citometria de fluxo. Após a confirmação da presença de células blásticas no sangue, os animais foram divididos nos grupos experimentais, recebendo diferentes dietas. Experimento 1: dieta AIN-93G com 20% de WPC; dieta AIN-93G com 20% de caseína e dieta comercial da marca Nuvilab. Experimento 2: dieta AIN-93G com 12% de WPC e quimioterápico (QT) ARA-C, dieta AIN-93G com 12% de caseína e QT, dieta AIN-93G com 12% de WPC, dieta comercial e grupo controle formado por animais livre de doença recebendo dieta comercial. Foram avaliados: peso corporal, consumo de dieta, razão entre o peso dos órgãos coletados (fígado, baço e rins) pelo peso corporal, evolução da leucemia, tempo de sobrevivência e parâmetros bioquímicos (hemograma e glutathione

reduzida). Nos experimentos *in vitro* foram usadas 6 linhagens celulares: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B), Jurkat (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), CEM (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), RAMOS (Linfoma Burkitt) e HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda). No experimento 1 determinou-se a citotoxicidade (IC_{50}) do WPC em relação às células leucêmicas K562, Nalm-6, CEM e RAMOS, utilizando-se as concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 mg/mL. No experimento 2 a viabilidade celular e os níveis de glutathiona total nas células leucêmicas estudadas foram avaliados testando-se 4 tempos (0; 24; 48 e 72 horas) e 4 condições diferenciadas: 1) Controle, meio só com as células; 2) Células e WPC (10 mg/mL); 3) Células e WPC (10 mg/mL) e QT (5 ng/mL); 4) Células mais QT (5 ng/mL). Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”. Através dos dados obtidos nos experimentos *in vivo* pode-se concluir que não houve diferença entre o WPC e a caseína em relação aos parâmetros avaliados, exceto na análise de Doença Residual Mínima (DRM), na qual a caseína foi mais efetiva que o WPC. Não foi possível verificar um efeito sinérgico entre o WPC e o quimioterápico sulfato de vincristina no experimento 2. No que se refere aos experimentos *in vitro*, o WPC apresentou IC_{50} para Nalm-6 de 6,72 mg/mL e para a linhagem CEM de 11,84 mg/mL. Verificou-se que as três linhagens celulares K562, Nalm-6 e HL-60 apresentaram perfis semelhantes em relação à viabilidade celular. No entanto em relação à produção de glutathiona total cada linhagem comportou-se de maneira diferenciada: para K562 houve redução significativa entre o início e o final do experimento em todas as condições testadas; para Nalm-6 não houve diferença estatística entre os tempos com exceção da condição controle. Já para a linhagem HL-60 houve aumento significativo de glutathiona nas condições controle e QT; redução estatística na presença de WPC e não houve diferença significativa para WPC mais QT. Destaca-se também que a maior produção de glutathiona total, em todas as condições e tempos estudados, foi da linhagem HL-60 seguida pela K562.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas do soro de leite vêm sendo utilizadas frequentemente devido ao seu alto valor nutritivo, uma vez que as mesmas possuem proporcionalmente maior teor de aminoácidos sulfurados que a caseína e um excedente de aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina, leucina e isoleucina, os quais estão constantemente limitados em proteínas vegetais (SLOAN, 2002).

Além de apresentarem alto valor nutricional, as proteínas lácteas possuem relevantes propriedades funcionais fisiológicas bem fundamentadas, principalmente, através de estudos *in vivo* e *in vitro*. Dentre essas propriedades o presente capítulo destaca seu efeito anticâncer e imunomodulador.

A superioridade das proteínas de soro foi observada a partir de pesquisas efetuadas para analisar os efeitos de diferentes proteínas alimentares no sistema imune de animais, quando se verificou que o isolado protéico de soro de leite (WPI) contém altas quantidades de cistina/cisteína e do dipeptídeo γ -glutamilcistina, precursor eficiente para a síntese de glutathiona, importante antioxidante celular, detoxificante e imunomodulador (BOUNOUS; KONGSHAVN, 1978; SGARBIERI, ZIEGLER e CASTRO, 2009).

Adicionalmente estudos com animais comprovaram que a redução dos níveis de glutathiona está associada com a diminuição da resposta imune (BOUNOUS e GOLD, 1991).

Pesquisas *in vitro* demonstraram que o WPI, quando comparado com a caseína, aumentou a síntese de glutathiona e protegeu as células da próstata em humanos contra oxidantes que induzem a morte celular (KENT, HARPER e BOMSER, 2003). Em outro trabalho *in vitro* a albumina do soro bovino inibiu o crescimento de células cancerígenas de mama humana (LAURSEN, BRIAND e LYKKESFELDT, 1990).

Modelos com camundongos imunodeficientes têm sido utilizados extensivamente nos últimos anos para estudar os aspectos da biologia celular das células-tronco humanas que não podem ser facilmente analisadas *in vitro*. Os

modelos mais comumente utilizados para serem transplantados com células humanas são camundongos imunodeficientes como por exemplo NOD / SCID (diabéticos não obesos – NOD combinada com imunodeficiência grave – SCID). Esses modelos não exigem muita manipulação nem cirurgia, sendo que a inoculação do transplante nos animais geralmente é realizada por injeções intraperitoneais. A utilização desses modelos também está sendo realizada para analisar as propriedades de células-tronco leucêmicas (DAO e NOTA, 1999).

Esses estudos em modelos de animais imunodeficientes são fundamentais para o melhor entendimento e esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas leucemias, objetivando-se produzir agentes terapêuticos mais eficientes e menos agressivos, bem como, avaliar possíveis agentes coadjuvantes ao tratamento quimioterápico dos pacientes garantindo melhora na sua qualidade de vida.

2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a influência de um concentrado de soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina sobre a evolução da leucemia em camundongos imunodeficientes NOD/SCID para posteriormente verificar um possível efeito sinérgico entre essas proteínas e o tratamento quimioterápico.

Determinar *in vitro* a citotoxicidade e o efeito na produção de glutathiona total do WPC em relação às células leucêmicas humanas.

Para atingir os objetivos do estudo foram realizados 4 experimentos, os quais serão apresentados a seguir, cada um com seus objetivos específicos, protocolo experimental, resultados e conclusões. O capítulo completo constará de materiais e métodos, discussão e conclusões gerais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizados um concentrado de proteína do soro de leite bovino (WPC) enriquecido com TGF- β e lactoferrina produzido em planta piloto pela empresa Hilmar Cheese Company (Cal, USA), caseína comercial da marca Synth e dieta comercial da marca Nuvilab[®] fabricada pela Nuvital Nutrientes Prodvét Ltda de Curitiba-PR, adquiridas em Campinas, SP. Além disso, utilizou-se o quimioterápico sulfato de vincristina (Tecnocris[®], registro MS 1.2214.0017) na forma de solução injetável de 1mg/mL produzido pela Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo – SP e Citarabina- ARA-C (Aracytin[®], registro MS 1.0216.0143) na forma de pó liofilizado 100mg em embalagem contendo 1 frasco-ampola + ampola com 5mL de solução diluente (20mg/mL) produzido pelo Laboratório Pfizer Ltda, Guarulhos – SP.

Nos experimentos *in vitro* foram usadas 6 linhagens celulares designadas como leucemias/linfoma humano: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B), Jurkat (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), CEM (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), RAMOS (Linfoma Burkitt) e HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda). Foram obtidas do banco de células do Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas da Infância (CIPOI), UNICAMP.

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização físico-química

Composição centesimal e perfil de aminoácidos das fontes proteicas -

Foram determinados conforme especificado no capítulo 2, utilizando metodologia descrita no AOAC (2005) e por Bligh e Dyer (1959).

Obteve-se a seguinte composição centesimal para o WPC: 68,85% de proteína, 13,98% de lipídios, 4,26% de cinza (minerais), 6,33% de umidade e 6,58% de carboidrato. A caseína utilizada apresentava 84,9% de proteína, 2,72% de lipídios, 2% de minerais, 9,34% de umidade e 1,04% de carboidrato.

3.2.2. Avaliação *in vivo*

Foram realizados 2 experimentos no laboratório de experimentação animal do Centro Integrado de Pesquisas Onco-hematológicas da Infância (CIPOI), UNICAMP, Campinas-SP, sendo aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp com protocolo nº 1521-1 (**Anexo 9**).

Utilizaram-se camundongos livres de patógenos (SPF), com aproximadamente 9 semanas de idade, entre 18 a 25g de peso da linhagem NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID) fêmeas, adquiridos do criador “*The Jackson Laboratory*” (Bar Harbor, ME, USA) e criados no Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) da UNICAMP, Campinas-SP.

Os animais passaram por adaptação de 7 dias em gaiolas de policarbonato com maravalha autoclavada, dieta comercial e água filtrada e autoclavada, *ad libitum*, com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Após a verificação da viabilidade celular, as células leucêmicas humanas - LLA (20 milhões), foram injetadas na veia caudal de cinco animais. Após 60 dias da inoculação, foram isoladas do baço 90×10^6 células leucêmicas e inoculadas nos animais pertencentes aos grupos experimentais. Com o auxílio de citometria de fluxo e usando o anticorpo humano específico (CD45h) para marcação de células humanas (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Todos os animais foram monitorados a cada 7 dias quanto ao implante da leucemia através da coleta de 100 μL de sangue do plexo retroorbital.

Após a confirmação da leucemia linfóide aguda (LLA) com índices inferiores a 10% de células blásticas no sangue, os animais foram aleatoriamente divididos em grupos, identificados individualmente e mantidos em gaiolas, com 5 animais em cada gaiola, contendo dieta e água à vontade.

- **Composição e preparo das dietas**

Com exceção dos grupos que receberam dieta comercial Nuvilab® com 22% de proteína (especificações do fabricante), os demais receberam dietas

preparadas segundo as especificações da AIN-93G (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993), com modificação no teor de proteínas para 12%.

- **Variáveis analisadas nos experimentos *in vivo*:**

Monitoramento do peso corporal - Foi realizado diariamente durante os experimentos.

Consumo de dieta dos animais - Foi avaliado periodicamente durante o experimento 2.

Razão peso do órgão em relação ao peso corporal - Durante a eutanásia dos animais foram coletados os rins, baço e fígado e calculadas as razões do percentual do peso desses órgãos em relação ao peso final de cada animal.

Evolução da leucemia linfóide aguda (LLA tipo B) - Cada animal foi periodicamente monitorado quanto ao percentual de células blásticas através da coleta de 100 μ L de sangue pela via retrocular, sendo que as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, usando-se o marcador CD45 humano.

No experimento 2 também foi realizada análise da doença residual mínima (DRM) utilizando-se a medula óssea do fêmur dos animais. As células foram lavadas com salina e posteriormente marcadas com anticorpo CD45 humano. Percentuais das células expressando CD45+ foram determinados por citometria de fluxo.

Avaliação do tempo de sobrevivência global dos animais - Os animais foram monitorados diariamente até a data de seu óbito.

Análises bioquímicas - Foi coletado sangue no início e no final do experimento 2 para realização das análises hematológicas e de glutatona eritrocitária reduzida.

O hemograma foi realizado através do equipamento Poch – 100iV Diff, da Beckman Coulter com a utilização de software de uso veterinário.

A glutatona reduzida foi determinada nos eritrócitos por espectrofotometria através do método descrito por Beutler (1986) e com modificação proposta por Penna (1995). Neste método, os eritrócitos de sangue periférico, coletados em tubos com EDTA (Vacuette, Brasil), foram lisados com água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas com solução de ácido metafosfórico glacial. Após incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. Foram acrescentados a 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foram adicionados 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e, obtida uma segunda densidade ótica (DO2). As densidades óticas foram obtidas, em duplicata, no espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU-70, Fullerton, EUA).

No presente estudo, o volume de cada reagente foi diminuído pela metade; substituindo-se a etapa de filtração por centrifugação e as leituras foram efetuadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuclon, NUNC™, Dinamarca) no aparelho VersaMax microplate reader, da Molecular Devices, usando-se o software SoftMAX Pro versão 4.0. Testes de validação foram realizados e verificando-se que não houve diferença nos resultados de glutatona eritrocitária reduzida obtida pela modificação de Penna (1995) e pela alteração praticada nessa pesquisa. Dessa forma, esse método foi alterado para diminuir o volume de sangue a ser coletado periodicamente ao longo do experimento 2.

A concentração de GSH (mg/dL) nos eritrócitos foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{(\text{DO2} - \text{DO1}) \times 31040}{\text{hematócrito}}$$

Onde: o valor 31040 é o coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido pela GSH multiplicado pelas diluições.

3.2.3. Avaliação *in vitro*

No experimento 1 a citotoxicidade ou inibição da proliferação celular em 50% (IC₅₀) do WPC foi determinada com as linhagens celulares: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B), CEM (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T) e RAMOS (Linfoma Burkitt).

No experimento 2 as linhagens de células neoplásicas foram plaqueadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e aminoácidos não-essenciais, sendo mantidas em estufa umidificada (97%), a 37°C com 5% de CO₂. Após se obter um número de pelo menos 160 x 10⁶ células/linhagem foi iniciado o experimento adicionando-se às culturas celulares as soluções do concentrado de proteína do soro de leite bovino (10 mg/mL) e do quimioterápico (QT) Ara-C (5 ng/mL), bem como, a combinação entre os mesmos, conforme o protocolo experimental a ser descrito posteriormente.

- **Parâmetros analisados nos experimentos *in vitro*:**

Citotoxicidade (IC₅₀) - Foi avaliada através da redução do sal de coloração amarela MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide*] (Sigma) pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis resultando no produto chamado *formazam*, um precipitado azul, liberado no meio de cultura e quantificado por espectrofotometria de acordo com Mosmann (1983).

Viabilidade celular - A viabilidade de células isoladas foi determinada usando o teste com azul de Tripán para quantificação total de células e dentre estas localizar as não viáveis. Uma amostra contendo células foi misturada ao corante azul de Tripán. As células viáveis e não viáveis foram colocadas na câmara de Neubauer e contadas em microscópio óptico de acordo com a metodologia estabelecida por Freshney (1987). As células viáveis não se coram, pois não permitem a penetração do composto devido à integridade de sua membrana, enquanto as células não viáveis se coram de azul.

Glutathiona total - Foi determinada por espectrofotometria através do método enzimático descrito por Sies e Akerboom (1984) e leitura em microplacas no aparelho Bio-Tek Power Wave XS, usando-se o software KC Júnior.

Adicionaram-se 20 μL de amostra (suspensão citosólica de células) em 4 poços (triplicata e branco), considerando-se o número equivalente de células padronizado ($1,6 \times 10^5$ células para as linhagens HL 60, Jurkat, K562 e Nalm-6), 5 μL de glutathiona redutase e tampão fosfato de potássio 0,1M q.s.p para 175 μL . A curva padrão foi construída da usando-se um padrão Sigma de glutathiona oxidada (GSSG). Com a placa posicionada no leitor, adicionaram-se 15 μL da mistura de NADPH 2:1 DTNB em cada poço, exceto um que serviu como branco. As leituras foram realizadas em 412 nm.

3.2.4. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey, (GOMES, 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”.

Para a análise de sobrevida global utilizou-se o teste de Mantel Cox (Log do rank) calculado através do programa Graph Pad versão 5.0, considerando $p < 0,05$ como significativo.

4. APRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

4.1. EXPERIMENTO 1, *in vivo*

4.1.1. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito das proteínas lácteas (WPC ou caseína) na evolução da leucemia em camundongos imunodeficientes NOD/SCID, para tal avaliaram-se: peso corporal; razão de diferentes órgãos pelo peso corporal; percentual de células blásticas no sangue periférico e tempo de sobrevivência global.

4.1.2. Protocolo Experimental

Este ensaio teve a duração de 6 semanas a partir da confirmação de LLA no sangue dos animais, tendo-se utilizado 3 grupos experimentais totalizando 15 animais, a saber:

Grupo 1 - animais com LLA + dieta AIN-93G com 20% de caseína;

Grupo 2 - animais com LLA + dieta AIN-93G com 20% de WPC;

Grupo 3 - animais com LLA + dieta comercial com 22% de proteína (trigo, soja e milho).

4.1.3. Resultados

- **Peso corporal**

A partir do registro do peso corporal foram construídas curvas para o acompanhamento da evolução dessa variável ao longo do experimento 1 (Figura 1), bem como, a comparação entre os pesos iniciais e finais de cada grupo, Figura 2.

Verificou-se através da evolução ponderal (Figura 1) que a variação do peso corporal ocorreu de forma semelhante entre os grupos 1 (caseína) e 2 (WPC), não havendo diferença significativa entre os mesmos. Porém, o grupo 3 (dieta comercial) apresentou redução do peso no decorrer do estudo, o que também pode ser constatado através da Figura 2.

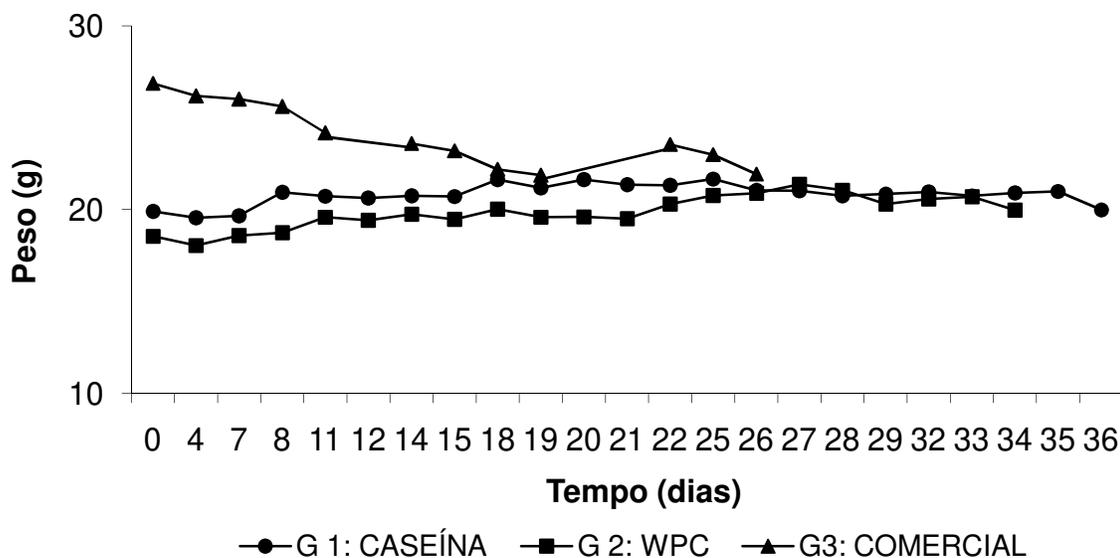


FIGURA 1. Evolução do peso dos animais durante o experimento.

Comparando-se peso inicial e final dos animais de cada grupo verifica-se que não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2. Ao contrário no grupo que recebeu dieta comercial, observou-se perda significativa ($p < 0,05$) de 18,3% entre seu peso inicial e final.

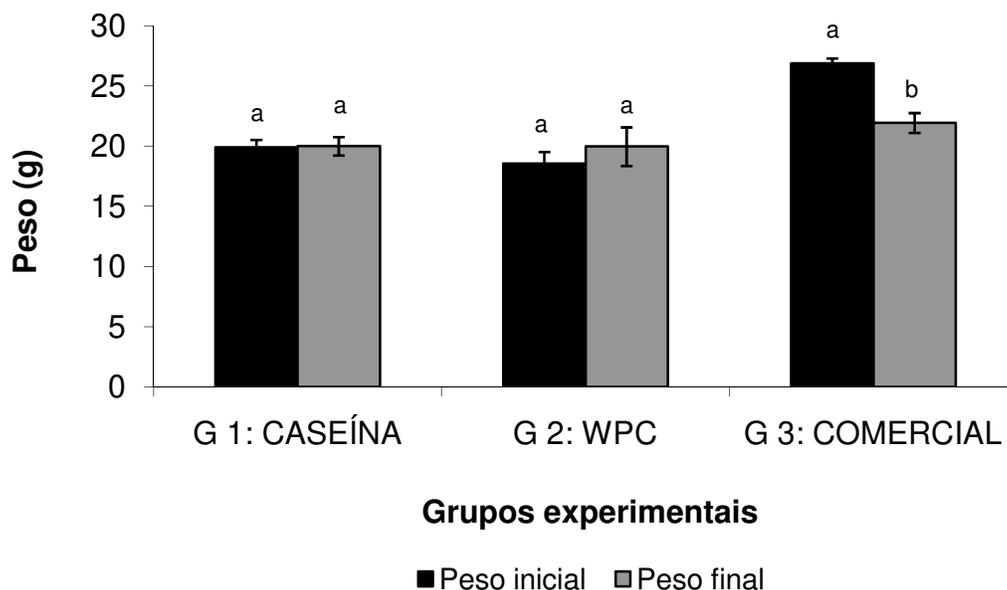


FIGURA 2. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos experimentais. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

- **Razão peso do órgão pelo peso corporal**

Foi realizado o cálculo da razão entre o peso do fígado, rins e baço e seu respectivo peso final, expressos em percentual, de acordo com a Tabela 1.

TABELA 1. Valores obtidos para a razão do peso do órgão pelo peso corporal (%) dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Peso corporal	20,51 ± 0,84 ^a	18,77 ± 0,87 ^a	21,49 ± 0,70 ^a
Rins	1,33 ± 0,19 ^b	1,80 ± 0,17 ^{ab}	2,29 ± 0,17 ^a
Baço	1,50 ± 0,31 ^b	1,70 ± 0,39 ^b	4,34 ± 0,26 ^a
Fígado	7,85 ± 0,22 ^a	8,39 ± 0,60 ^a	9,29 ± 0,16 ^a

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra (linha) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. G 1: dieta com caseína; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta comercial.

Observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais apenas para a razão do fígado em relação ao peso final. Entretanto, verificou-se que para o grupo 3 (dieta comercial) ocorreu aumento no peso dos rins e baço, em relação ao seu peso final, quando comparado com os grupos WPC e caseína, apresentado diferença estatística, exceto para os rins no grupo 2 (WPC).

- **Evolução da Leucemia Linfóide Aguda (LLA tipo B)**

Na Tabela 2 encontram-se os resultados referentes à evolução da LLA dos grupos experimentais. Verificou-se um crescente aumento no percentual de células blásticas no decorrer do experimento, não havendo diferença estatística entre os grupos caseína e WPC.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na evolução da leucemia entre o grupo dieta comercial e o grupo WPC nos dias 0, 4 e 25 e, com o grupo caseína nos dias 0 e 25. Destacam-se maiores percentuais de células blásticas do grupo 3 nesses tempos, especialmente no 25º dia de estudo, sendo esse percentual (82,2%) superior aos dos grupos WPC (71,1%) e caseína (71,2%) no 32º dia.

TABELA 2. Evolução da Leucemia Linfóide Aguda (% células blásticas) em camundongos NOD/SCID.

Tempo (dias)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0	0,0 ^b	0,16 ^b	1,8 ^a
4	1,02 ^{ab}	0,76 ^b	5,6 ^a
14	22,4 ^a	24,38 ^a	39,3 ^a
21	43,72 ^a	51,13 ^a	48,9 ^a
25	50,4 ^b	53,57 ^b	82,2 ^a
30	ND	ND	91,7
32	71,2 ^a	71,1 ^a	---

Médias seguidas por uma mesma letra (linha) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. G 1: dieta com caseína; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta comercial. ND = não determinado.

- **Avaliação do tempo de sobrevivência global dos animais**

Os animais foram monitorados diariamente para avaliação da data exata de seu óbito e posterior construção do gráfico de sobrevivência global (Figura 3). A média e o desvio padrão do tempo dos óbitos dos grupos 1, 2 e 3 foi de $30,6 \pm 7,1$; $30,2 \pm 6,3$ e $21 \pm 9,2$ dias, respectivamente.

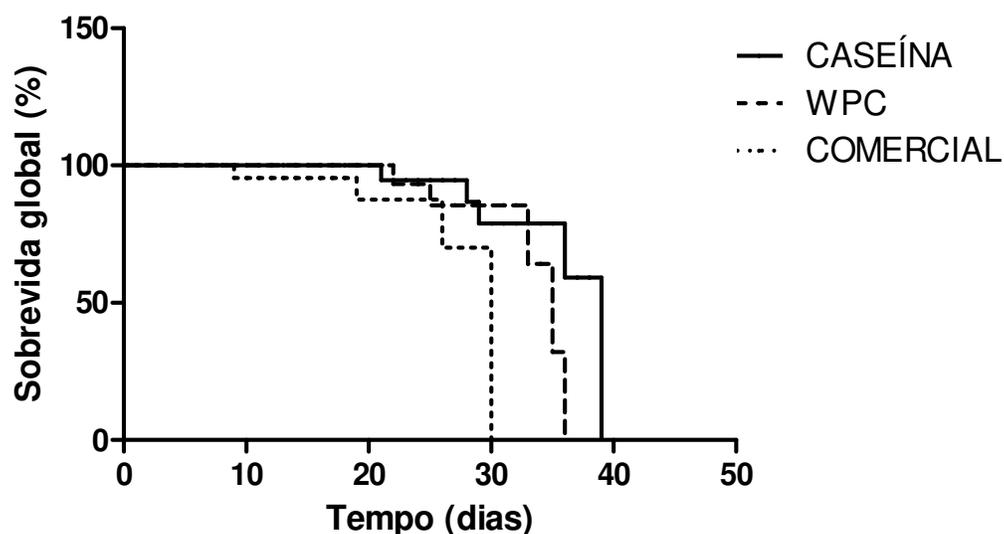


FIGURA 3. Sobrevivência global dos animais dos grupos experimentais. G 1: dieta com CASEÍNA; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta COMERCIAL.

Através da Figura 3 observa-se que o percentual de sobrevivência global dos grupos em dieta comercial, caseína e WPC apresentaram pequenas variações, porém sem diferença estatística ($p = 0,080$).

4.1.4. Conclusões do Experimento 1, *in vivo*

De acordo com os dados obtidos neste experimento pode-se concluir que:

- 1) Não houve diferença entre o WPC enriquecido com TGF- β mais lactoferrina e a caseína em relação aos parâmetros avaliados;
- 2) Verificou-se superioridade das dietas contendo proteínas do leite sobre a dieta comercial, especialmente: a) no grupo dieta comercial ocorreu redução significativa no peso corporal, o que não foi verificado nos grupos WPC e caseína; b) razões dos rins e baço pelo peso corporal estatisticamente superiores para o grupo dieta comercial; c) maior percentual de células blásticas (LLA tipo B) em menor tempo de estudo para o grupo dieta comercial, ou seja, tanto o WPC como a caseína apresentaram uma influência positiva retardando a evolução da doença;
- 3) Na sobrevida global não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

4.2. EXPERIMENTO 2, *in vivo*

4.2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar um possível efeito sinérgico entre as proteínas lácteas (WPC ou caseína) e o tratamento quimioterápico na inibição da evolução de leucemia em camundongos imunodeficientes NOD/SCID;
- Comparar os parâmetros hematológicos e glutaciona eritrocitária com um grupo controle de animais livre de doença.

4.2.2. Protocolo Experimental

Este ensaio teve a duração de 9 semanas a partir da confirmação de LLA, sendo utilizado 4 grupos experimentais totalizando 20 animais:

Grupo 1 - animais com LLA + dieta AIN-93G (12% de WPC) + quimioterápico (QT) sulfato de vincristina;

Grupo 2 - animais com LLA + dieta AIN-93G (12% de WPC);

Grupo 3 - animais com LLA + dieta AIN-93G (12% de caseína) + QT;

Grupo 4 - animais com LLA + dieta comercial (22% de proteína);

Grupo 5 - animais livre de doença (controle) que receberam dieta comercial.

Os animais dos grupos 1 e 3 foram tratados diariamente com o quimioterápico sulfato de vincristina recebendo uma dose de 0,5 mg/Kg via intraperitoneal. O peso foi registrado como forma de avaliação para o tratamento quimioterápico, quando os animais perdiam 1 grama ou mais de um dia para o outro não se administrava o quimioterápico até recuperação do peso do animal. Essa medida foi tomada para evitar que os efeitos tóxicos do quimioterápico provocassem o óbito dos animais.

4.2.3. Resultados

- **Peso corporal**

Curvas de evolução do peso corporal foram apresentadas na Figura 4 e a comparação entre os pesos iniciais e finais de cada grupo na Figura 5.

Na Figura 4 constata-se a diferença na evolução do peso entre os grupos tratados com quimioterápico (grupos 1 e 3) e os grupos que receberam apenas as dietas WPC (grupo 2) e comercial (grupo 4).

Verifica-se que os pesos dos grupos 1 e 3 mantiveram-se no decorrer do estudo, ao contrário dos grupos 2 e 4, nos quais houve redução estatística do peso de 22,1% e 18,4%, respectivamente (Figura 5).

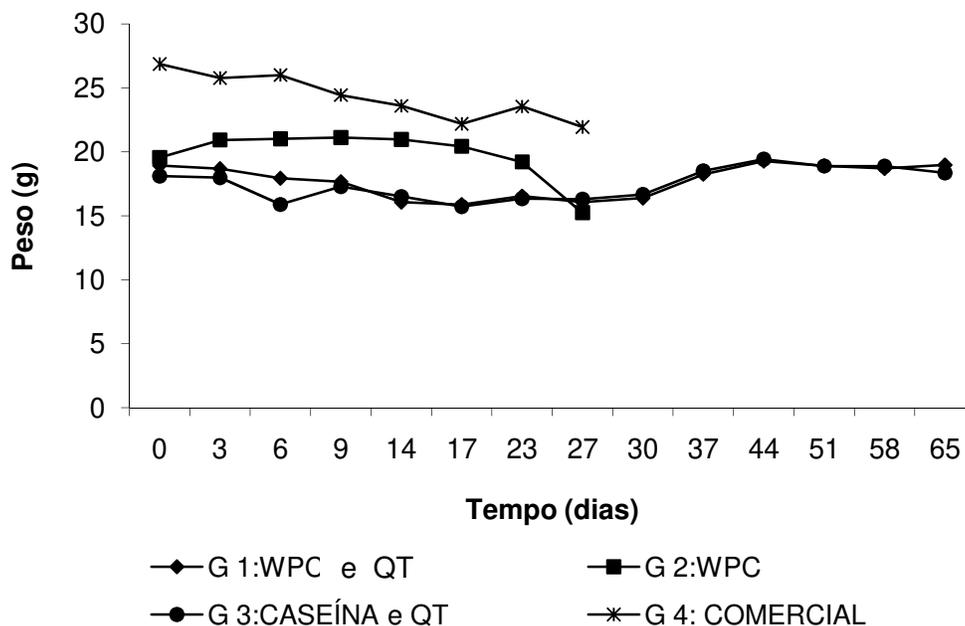


FIGURA 4. Evolução do peso dos animais durante o experimento. G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL.

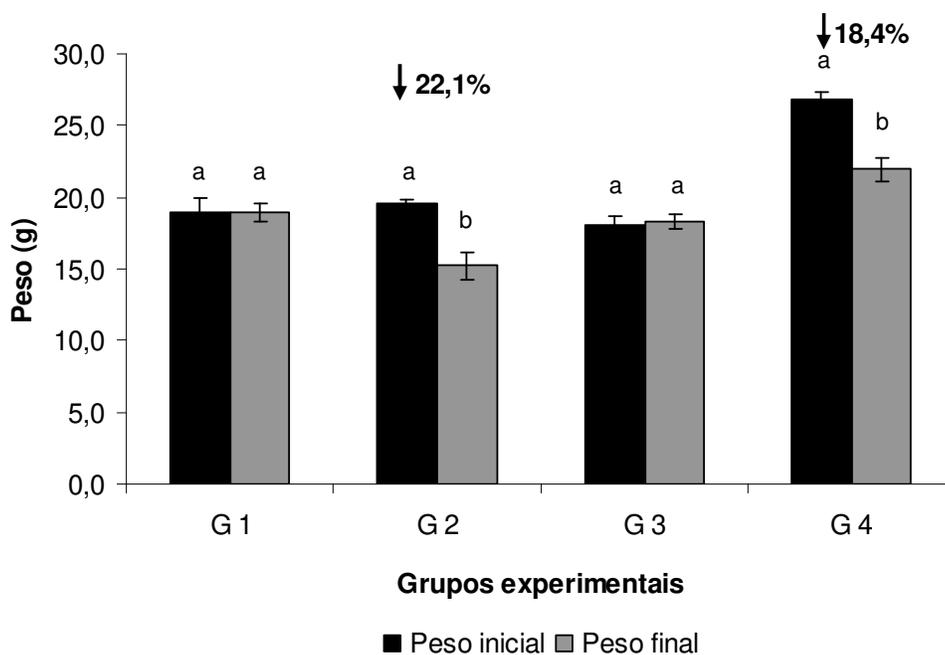


FIGURA 5. Comparação entre o peso inicial e o peso final dos grupos G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT e G 4: dieta COMERCIAL. Letras iguais não diferem ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

- **Consumo de dieta**

A Tabela 3 mostra o consumo de dieta no decorrer do experimento para os grupos experimentais.

TABELA 3. Ingestão de dieta dos grupos durante o experimento 2.

Grupos experimentais	Tempo (dias)	Ingestão (g/grupo)	Ingestão (g/animal/dia)
G 1: AIN-93G WPC e QT	65 dias	1043,65	3,61 ^a
G 2: AIN-93G WPC	30 dias	368,42	3,10 ^a
G 3: AIN-93G CASEÍNA e QT	65 dias	1122,90	3,46 ^a
G 4: COMERCIAL	30 dias	344,70	2,87 ^a

Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Analisando-se o consumo de dieta por animal (g/dia) verificou-se que o mesmo foi muito semelhante entre todos os grupos, não havendo diferença estatística significativa.

- **Razão peso do órgão pelo peso corporal**

A razão entre o peso do fígado, rim e baço e o respectivo peso corporal final dos animais de cada grupo, expressos em %, estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Valores obtidos para a razão do peso do órgão pelo peso corporal (%) dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Peso corporal	18,35 ± 0,78 ^b	14,77 ± 0,57 ^c	18,36 ± 0,50 ^b	21,49 ± 0,70 ^a
Rins	1,11 ± 0,05 ^c	1,85 ± 0,06 ^b	1,03 ± 0,04 ^c	2,29 ± 0,17 ^a
Baço	0,26 ± 0,02 ^c	1,70 ± 0,22 ^b	0,24 ± 0,01 ^c	4,34 ± 0,26 ^a
Fígado	5,44 ± 0,12 ^c	7,72 ± 0,49 ^b	4,79 ± 0,14 ^c	9,29 ± 0,16 ^a

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra (linha) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com caseína e QT; G 4: dieta comercial.

O grupo que recebeu dieta comercial apresentou razões estatisticamente superiores para todos os órgãos avaliados, em relação ao grupo WPC e aos grupos tratados com quimioterápico (grupos 1 e 3).

- **Evolução da leucemia linfóide aguda (LLA tipo B)**

Na Tabela 5 encontra-se os resultados referentes à evolução da LLA dos grupos experimentais, obtida através da análise do sangue periférico.

TABELA 5. Evolução da Leucemia Linfóide Aguda (% células blásticas) em camundongos NOD/SCID.

Tempo (dias)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0	9,26 ^a	3,33 ^a	9,46 ^a	1,8 ^a
5	ND	ND	ND	5,6
8	2,04 ^b	24,05 ^a	0,20 ^b	---
14	0,24 ^b	50,88 ^a	0,16 ^b	39,3 ^a
22	0,24 ^b	69,75 ^a	0,42 ^b	48,9 ^a
26	ND	ND	ND	82,2
30	ND	ND	ND	91,07
65	0,13 ^a	---	0,20 ^a	---

Médias seguidas por uma mesma letra (linha) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com caseína e QT; G 4: dieta comercial. ND = não determinado.

Nesse experimento não houve diferença significativa no percentual de células blásticas no sangue periférico dos animais no decorrer do estudo entre os grupos sem tratamento quimioterápico: WPC e dieta comercial. Assim como não foi possível verificar efeito sinérgico entre o WPC e o quimioterápico, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os grupos 1 e 3.

Na Tabela 6 estão os dados de doença residual mínima (DRM) analisados na medula óssea dos animais tratados com o quimioterápico sulfato de vincristina.

Embora no sangue periférico não tenha ocorrido diferença estatística no percentual de células leucêmicas entre as proteínas WPC e caseína (grupos 1 e 3), quando se avaliou na medula óssea a doença residual mínima (DRM) dos animais, verificou-se que no grupo caseína a média de células blásticas foi de 0,03% enquanto para o grupo WPC a média foi de 23,61%.

TABELA 6. Resultados da doença residual mínima (DRM) dos grupos tratados com quimioterápico.

Grupos	Animais	DRM (%)	Nº de eventos/100.000*
G 1: WPC + QT	A1	24,2	17384
	A2	0,03	33
	A3	---	---
	A4	70,1	68788
	A5	0,1	103
G 3: CASEÍNA + QT	A1	0,04	43
	A2	0,03	34
	A3	0,05	49
	A4	0,01	15
	A5	0,003	3

* N° de eventos/100.000 = n° de células blásticas r emanentes em relação a 100.000 células analisadas.

- **Avaliação do tempo de sobrevida global dos animais**

Os animais foram monitorados diariamente para avaliação da data exata de seu óbito e posterior construção do gráfico de sobrevida global (Figura 6). A média e o desvio padrão do tempo dos óbitos dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram de $57,4 \pm 17,0$; $28,5 \pm 1,0$; $65 \pm 0,0$ e $21 \pm 9,2$ dias, respectivamente.

É importante ressaltar que os animais dos grupos 1 e 3 tratados com quimioterápico foram submetidos a eutanásia no 65º dia de experimento, ou seja, não morreram anteriormente em função da leucemia devido ao tratamento.

Verificou-se diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os 4 grupos experimentais. Porém, analisando separadamente os grupos sem quimioterápico dos grupos tratados com sulfato de vincristina, não se verificou diferença estatística entre WPC vs dieta comercial nem entre WPC+ QT vs caseína + QT.

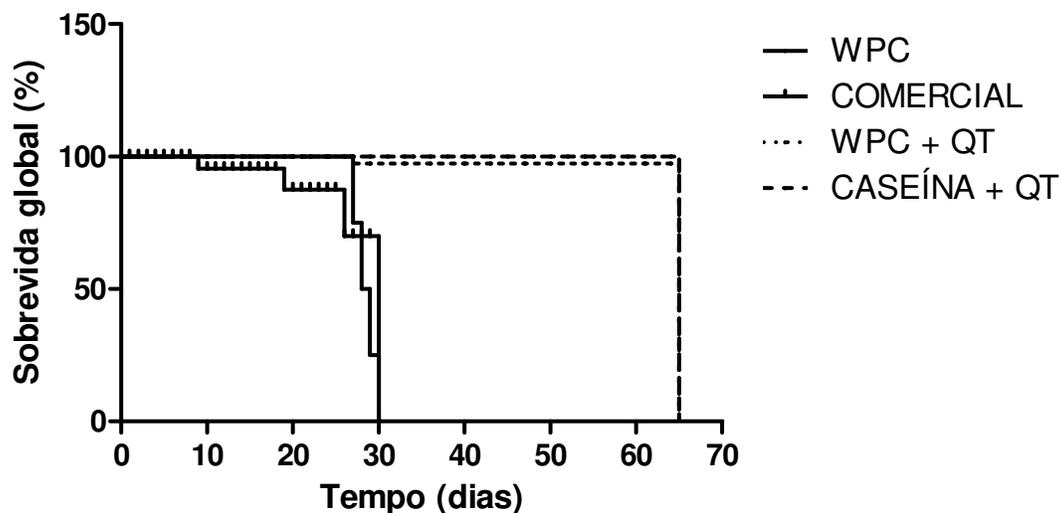


FIGURA 6. Sobrevivência global dos animais dos grupos experimentais. G1: dieta com WPC + QT; G 2: dieta com WPC; G3: dieta com CASEÍNA + QT; G 4: dieta COMERCIAL.

- **Análises Bioquímicas**

Hemograma

Leucócitos - Os limites de referência de leucócitos para camundongos são de $2,61$ a $10,05 \times 10^3$ células/uL, de acordo com Thrall *et al.* (2006). No entanto, os valores encontrados na presente pesquisa para camundongos NOD/SCID livres de doença (grupo controle) estavam entre $4,2$ a $6,3 \times 10^3$ células/uL.

Em relação aos níveis de leucócitos no início do experimento (Figura 7), apenas o grupo 1 foi estatisticamente inferior ($2,2 \times 10^3$ células/uL) ao grupo controle livre de doença. No final do estudo, constatou-se que os grupos que receberam WPC, independente do uso do quimioterápico, foram os únicos que mantiveram os níveis de leucócitos dentro dos limites de normalidade segundo Thrall *et al.* (2006) e dados obtidos para o grupo controle, não diferindo estatisticamente desse grupo.

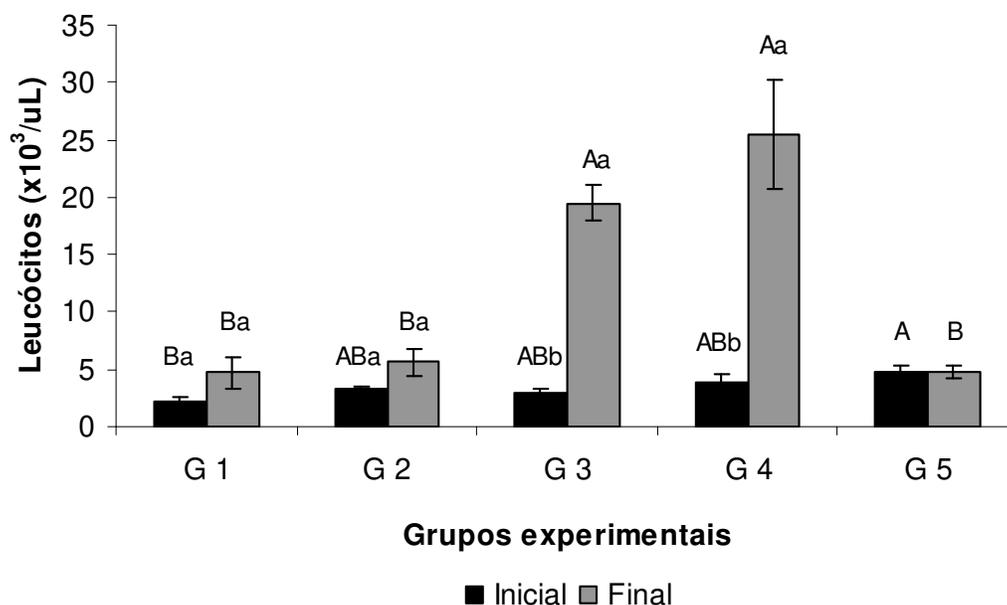


FIGURA 7. Valores de leucócitos ($\times 10^3/\text{uL}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.

Os níveis de leucócitos aumentaram significativamente no grupo que recebeu caseína na dieta e tratamento com quimioterápico ($19,5 \times 10^3$ células/uL) e no grupo que recebeu dieta comercial ($25,5 \times 10^3$ células/uL) entre o início e o final do estudo, diferindo também do grupo controle livre de doença.

Eritrócitos - Os limites de referência de eritrócitos para camundongos são de $6,5$ a $10,1 \times 10^6$ células/uL (Thrall *et al.*, 2006) e os valores encontrados para camundongos NOD/SCID livres de doença (grupo controle) estavam entre $7,4$ a $10,3 \times 10^6$ células/uL.

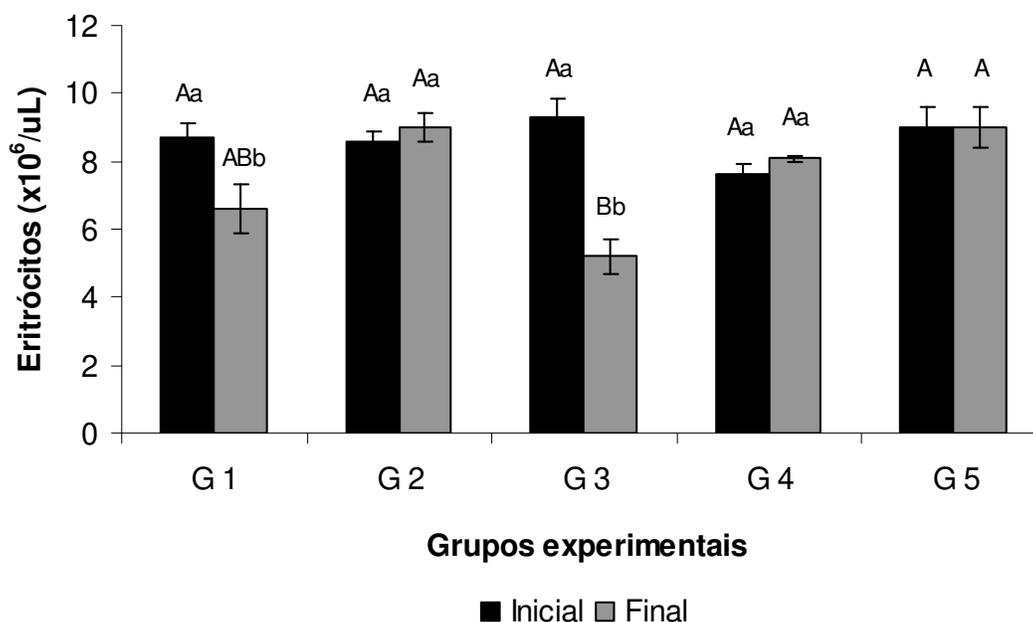


FIGURA 8. Valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.

Verificou-se (Figura 8) que houve diferença significativa entre o início e o fim do experimento apenas para os grupos G1 e G3, sendo que o G3 (caseína e QT) mostrou redução mais acentuada ficando bem abaixo dos níveis do controle livre de doença.

Hemoglobina e Hematócrito - Os valores de hemoglobina e hematócrito estão apresentados na Tabela 7. Segundo Thrall *et al.* (2006) os limites de referência para hemoglobina e hematócrito para camundongos são de 10,1 a 16,1 g/dL e 32,8 a 48,0 %, respectivamente. Já os valores encontrados na presente pesquisa para camundongos NOD/SCID livres de doença (grupo controle) foram de 11,3 a 16,6 g/dL e 40 a 55,3%, respectivamente.

TABELA 7. Valores obtidos de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) para os grupos experimentais.

Grupos	Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
G 1:	14,2 ± 0,62 ^{Aa}	9,9 ± 1,18 ^{BCb}	48,7 ± 2,57 ^{Aa}	33,2 ± 4,03 ^{BCb}
G 2:	14,2 ± 0,47 ^{Aa}	13,8 ± 0,54 ^{ABa}	49,9 ± 1,60 ^{Aa}	44,2 ± 1,97 ^{ABa}
G 3:	15,0 ± 0,78 ^{Aa}	8,5 ± 0,79 ^{Cb}	51,5 ± 2,98 ^{Aa}	29,5 ± 3,12 ^{Cb}
G 4:	12,7 ± 0,46 ^{Aa}	13,9 ± 0,03 ^{ABa}	43,9 ± 1,86 ^{Aa}	49,7 ± 0,48 ^{Aa}
G 5:	14,5 ± 1,13 ^A	14,5 ± 1,13 ^A	48,3 ± 3,18 ^A	48,3 ± 3,18 ^A

Resultados são média ± EPM (Erro Padrão da Média). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com caseína e QT; G 4: dieta comercial; G 5: controle livre de doença.

Apenas para os grupos tratados com quimioterápico houve redução significativa entre o início e o final do experimento nos níveis de hemoglobina e hematócrito, estando abaixo dos limites mínimos de normalidade nos dois grupos que receberam quimioterapia. Para os grupos que não receberam tratamento com quimioterápico os valores desses parâmetros não foram afetados, inclusive sem diferir estatisticamente do grupo controle no início e no fim do estudo.

Plaquetas - Os limites de referência de plaquetas para camundongos são de 780 a 1540 x 10³ células/uL, de acordo com Thrall *et al.* (2006). Já os valores encontrados na presente pesquisa para camundongos NOD/SCID livres de doença (grupo controle) foram de 618 a 1605 x 10³ células/uL.

No início do estudo todos os grupos foram estatisticamente inferiores ao grupo controle. No final, observou-se que apenas os grupos 1 e 3 (com quimioterápico) não diferiram do grupo 5 (controle).

Considerando-se os grupos individualmente, verificou-se na Figura 9 que houve aumento significativo nos valores de plaquetas para os grupos 1 e 3 (com QT) e redução significativa para os grupos 2 e 4. Este fato demonstra o efeito do quimioterápico sobre a elevação dos níveis das plaquetas, assim como foi verificado sua influência nos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

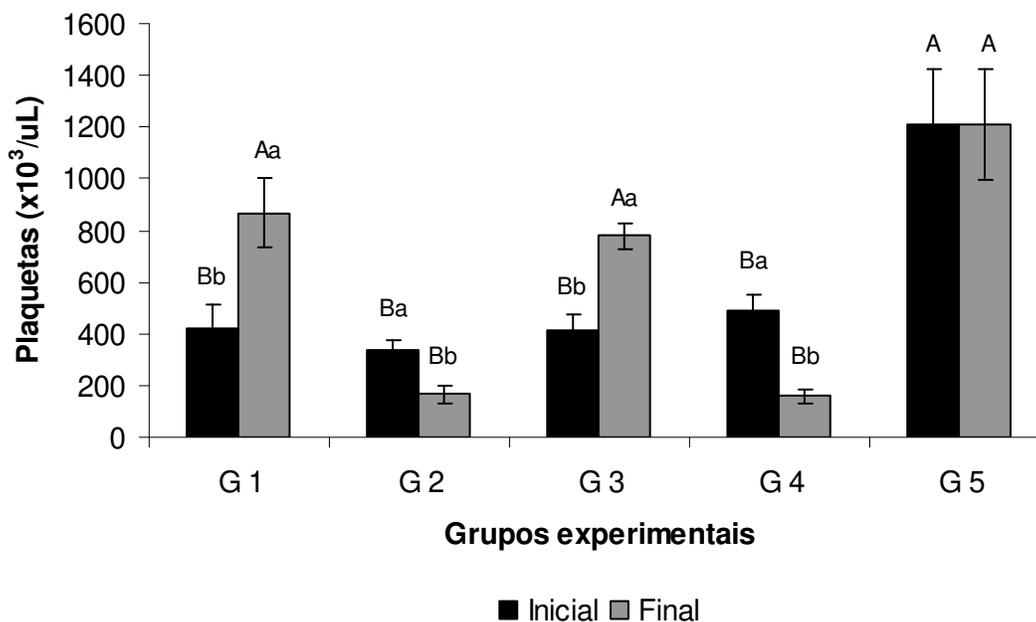


FIGURA 9. Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.

Glutationa eritrocitária

Os valores de glutationa eritrocitária estão apresentados na Figura 10. No início do experimento o grupo 4 foi estatisticamente superior aos grupos 1, 2 e 3, porém nenhum diferiu do controle livre de doença no início e também ao final do estudo.

Comparando os grupos individualmente entre o início e o final do experimento verificou-se que houve diminuição significativa dos níveis de glutationa para os grupos 1 e 4.

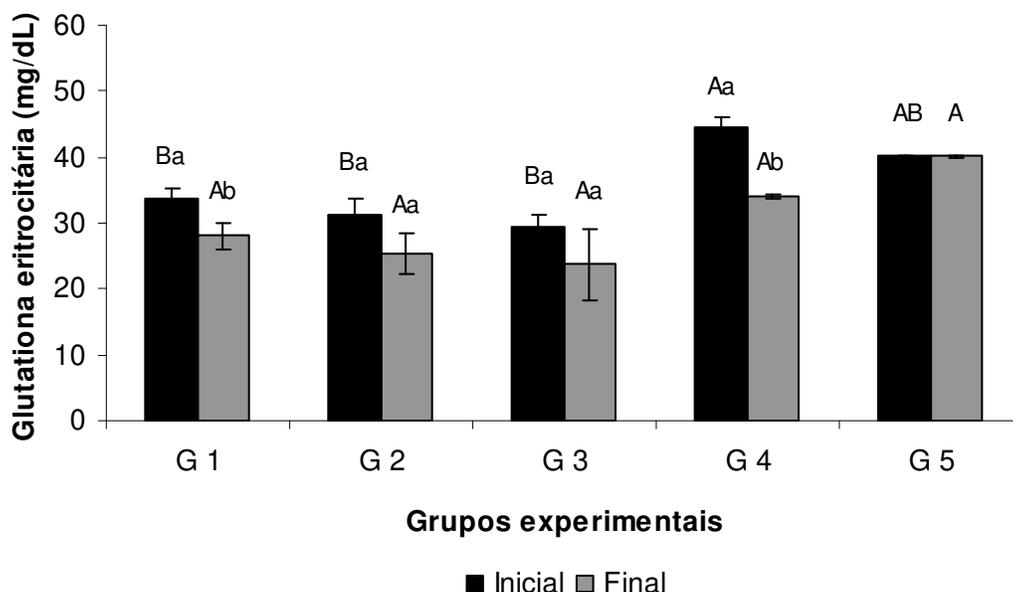


FIGURA 10. Valores de glutathione peroxidase (mg/dL). G 1: dieta com WPC e QT; G 2: dieta com WPC; G 3: dieta com CASEÍNA e QT; G 4: dieta COMERCIAL; G 5: controle livre de doença. Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam os grupos entre si em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam o mesmo grupo no tempo inicial e final.

4.2.4. Conclusões do Experimento 2, *in vivo*

Os resultados desse estudo permitiram concluir que:

- 1) Não houve diferença estatística no que se refere aos parâmetros de peso e consumo de dieta para os grupos tratados com WPC e caseína (tratamento com quimioterápico) e os grupos WPC e dieta comercial (sem tratamento quimioterápico);
- 2) O grupo em dieta comercial sem o tratamento com quimioterápico apresentou quocientes de peso dos órgãos sobre o peso corporal, estatisticamente superiores aos demais tratamentos com ou sem quimioterápico;

- 3) A análise do sangue periférico não mostrou diferença significativa entre os vários tratamentos, contudo, na avaliação da medula óssea para doença residual mínima (DRM) a caseína mostrou-se mais efetiva;
- 4) Não houve diferença estatística para a variável sobrevida global entre os tratamentos: dieta com WPC vs dieta comercial ou caseína + quimioterápico vs WPC + quimioterápico;
- 5) Os grupos que receberam o WPC, com ou sem quimioterápico, foram os únicos que mantiveram os níveis de leucócitos dentro dos limites de normalidade, não diferindo estatisticamente do grupo controle livre de doença;
- 6) As dietas com proteínas lácteas (WPC + QT e caseína + QT) promoveram redução significativa de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos, com efeito contrário sobre os níveis de plaquetas;
- 7) Os níveis de glutathione nos eritrócitos não foram estatisticamente significativos entre os grupos experimentais e o controle livre de doença.

4.3. EXPERIMENTO 1, *in vitro*

4.3.1. Objetivos Específicos

- Determinar a citotoxicidade (IC₅₀) do WPC em relação às células leucêmicas: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B), CEM (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T), RAMOS (Linfoma Burkitt).

4.3.2. Protocolo Experimental

As linhagens de células neoplásicas foram plaqueadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e aminoácidos não-essenciais, sendo mantidas em estufa umidificada (97%), a 37°C com 5% de CO₂. Uma alíquota de cada linhagem foi misturada ao corante azul de Tripán, colocada na câmara de Neubauer e contadas em microscópio óptico para a quantificação total de cada linhagem de células de acordo com metodologia estabelecida por

Freshney (1987). Centrifugou-se por 10 min a 1600 rpm, descartando o sobrenadante e adicionando-se meio RPMI enriquecido com soro fetal bovino, antibióticos e aminoácidos não-essenciais, homogeneizou-se e foram adicionados 100 μ L contendo $0,03 \times 10^6$ células/poço.

O concentrado de proteína do soro de leite (WPC) foi diluído em meio RPMI em 7 concentrações diferentes, filtrado com Millipore 0,22 μ m e adicionados 100 μ L/poço na placa. As concentrações testadas foram: 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,12 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL e 0,39 mg/mL.

A placa foi colocada na estufa por 48h. Após esse período, foi centrifugada por 5 min a 700 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Foram adicionados 10 μ L de MTT/poço na concentração de 5 mg/mL mais 100 μ L de tampão PBS. A placa foi incubada por 3hs a 37 °C e após esse período centrifugada novamente por 5 min a 700 rpm desprezando-se o sobrenadante, e finalmente adicionaram-se 150 μ L/poço de isopropanol. A leitura foi realizada em triplicata a 570nm no equipamento Bio-Tek Power Wave XS.

4.3.3. Resultados

- **Inibição da proliferação celular em 50% (IC₅₀)**

A inibição da proliferação das 4 linhagens de células na presença das diferentes concentrações de WPC está apresentada na Tabela 8.

Observou-se que 3 linhagens avaliadas apresentaram um crescimento ao invés de inibição em algumas concentrações testadas, especialmente nas concentrações mais baixas de WPC. De todas as linhagens a CEM foi a que promoveu maior proliferação a partir da concentração de 6,12 mg/mL de WPC. Já a Nalm-6 apresentou proliferação a partir da concentração de 1,56 mg/mL e a RAMOS somente na mais baixa concentração de WPC avaliada (0,39 mg/mL). A única linhagem que não apresentou nenhum efeito proliferativo em todas as concentrações de WPC testadas foi a K562, apresentando uma relação direta entre a concentração de WPC no meio e o percentual de inibição.

TABELA 8. Percentual de inibição do WPC em relação às células leucêmicas/linfoma: K562, Nalm-6, CEM e RAMOS.

Concentrações de WPC (mg/mL)	% de inibição celular*			
	K562	Nalm-6	CEM	RAMOS
25,00	45,2 ^b	68,9 ^a	68,5 ^a	48,8 ^b
12,50	36,0 ^{ab}	53,5 ^a	32,3 ^b	25,2 ^b
6,25	27,1 ^a	23,6 ^{ab}	-5,3 ^b	19,9 ^{ab}
3,12	24,3 ^a	6,1 ^a	-24,0 ^b	14,4 ^a
1,56	21,4 ^a	-16,7 ^c	-24,0 ^c	7,4 ^b
0,78	22,7 ^a	-5,5 ^{bc}	-18,5 ^c	6,7 ^{ab}
0,39	15,3 ^a	-7,0 ^{ab}	-15,8 ^b	-4,0 ^{ab}

*Análises realizadas em triplicata. Médias seguidas por uma mesma letra minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as linhagens estudadas apresentaram uma relação entre o percentual de inibição e as concentrações de WPC avaliadas. Obteve-se os maiores percentuais de inibição para a concentração 25mg/mL de WPC para Nalm-6 (68,9%) e CEM (68,5%), as quais não diferiram entre si, porém foram superiores estatisticamente às linhagens RAMOS (48,8%) e K562 (45,2%). Para a menor concentração de WPC testada, a maior inibição (15,3%) ocorreu para a linhagem K562, que não diferiu estatisticamente da Nalm-6 e RAMOS, as quais apresentaram, nessa concentração, proliferação celular ao invés de inibição.

Na Figura 11 foram apresentados os resultados obtidos para as maiores concentrações (25; 12,5 e 6,25 mg/mL) avaliadas, para as quais se encontraram os maiores percentuais de inibição da proliferação celular.

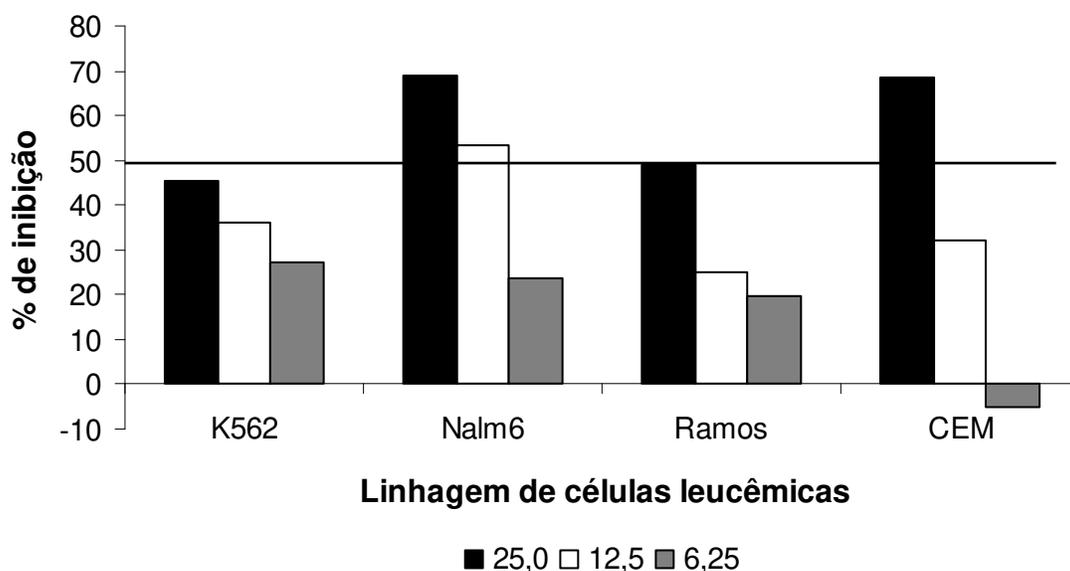


FIGURA 11. Percentual de inibição do WPC em relação às células leucêmicas: K562, Nalm-6, CEM e RAMOS para as concentrações de 25; 12,5 e 6,25 mg/mL de WPC.

De todas as linhagens testadas apenas a Nalm-6 e a CEM sofreram 50% de inibição na proliferação celular, ou seja, IC_{50} conforme ilustrado nas Figuras 12 e 13. A linhagem Nalm-6 apresentou IC_{50} de 6,72 mg/mL e a linhagem CEM um IC_{50} de 11,84 mg/mL.

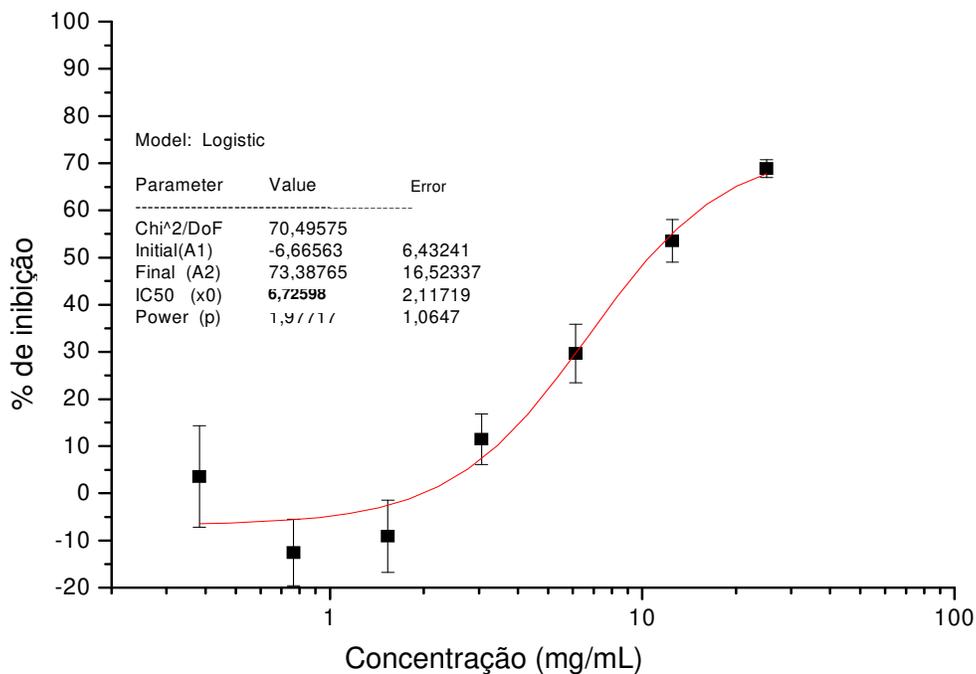


FIGURA 12. Curva do percentual de inibição da linhagem Nalm-6.

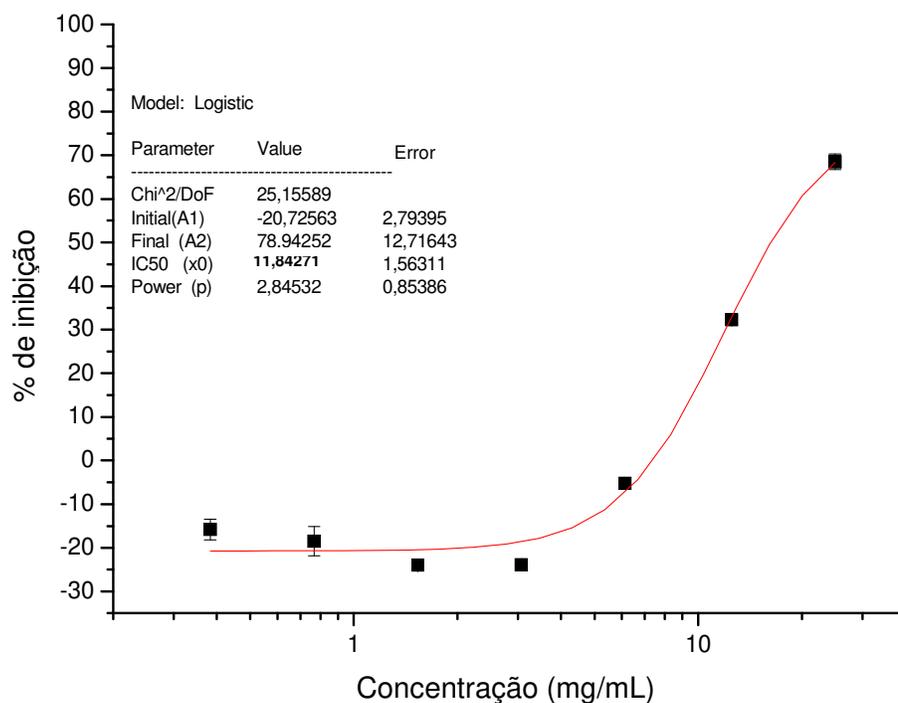


FIGURA 13. Curva do percentual de inibição da linhagem CEM.

4.3.4. Conclusões do Experimento 1, *in vitro*

Os dados obtidos permitiram concluir que o WPC apresentou baixa citotoxicidade, sendo que na faixa de concentrações testadas para as 4 linhagens de células o IC₅₀ foi alcançado apenas para Nalm-6 e CEM nas concentrações de 6,72 mg/mL e 11,84 mg/mL, respectivamente.

4.4. EXPERIMENTO 2, *in vitro*

4.4.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do WPC sobre a viabilidade celular e os níveis de glutathiona total, bem como, possível sinergismo com o quimioterápico Ara-C, em relação às células leucêmicas: K562 (Leucemia Mieloide Crônica), Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B) e HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda).

4.4.2. Protocolo Experimental

Os níveis de glutathiona total entre as linhagens de células leucêmicas estudadas foram avaliados testando-se 4 tempos de incubação (0; 24; 48 e 72 horas) e 4 condições diferenciadas (Figura 14): 1) Controle só com as células e meio; 2) Células e WPC; 3) Células, WPC e QT e 4) Células e QT.

Após a cultura de cada linhagem celular ter atingido 160×10^6 células/linhagem, ou seja, 40×10^6 células/condição para se obter células viáveis ao final do experimento (72h), dissolveu-se o WPC e o quimioterápico Ara-C em meio RPMI na concentração de 10 mg/mL e 5 ng/mL, respectivamente.

Após preparo de todas as condições retirou-se uma alíquota para a contagem da viabilidade celular. Com o número de células definido, calculou-se o volume necessário de cada condição para se obter 10^7 células, quantidade utilizada no preparo das células para a análise de glutathiona total. Essa quantidade de células foi centrifugada a 1600 rpm por 10 min, descartou-se o meio e acrescentaram-se 5 mL de tampão PBS e centrifugou-se novamente (1600 rpm; 10 min), descartando o sobrenadante e suspendendo as células em 5 mL de

tampão PBS para a sonicação das amostras (4 pulsos de 30 segundos cada) no equipamento de ultrassom. Centrifugou-se a 3.000 x g por 3 min, utilizando-se o sobrenadante como conteúdo do citoplasma para as análises de glutathiona total como descrito a seguir.

No tempo zero (0h) foi realizada a análise de glutathiona total apenas da condição controle e nos demais tempos 24, 48 e 72h a análise foi realizada em todas as condições testadas.

Testes preliminares foram realizados como forma de treinamento para o preparo das células, das condições testadas, da escolha da concentração ótima de WPC e do quimioterápico, bem como, análise do melhor tempo de armazenamento das amostras à -20 °C para posterior dosagem de glutathiona total. Utilizaram-se para esses testes as linhagens K562 (Leucemia Mieloide Aguda), Nalm-6 (Leucemia Linfóide do tipo B) e Jurkat (Leucemia Linfóide Aguda do tipo T). Essa última linhagem celular foi substituída no experimento pela linhagem HL-60, uma vez que não se obteve quantidade suficiente da mesma para os experimentos.

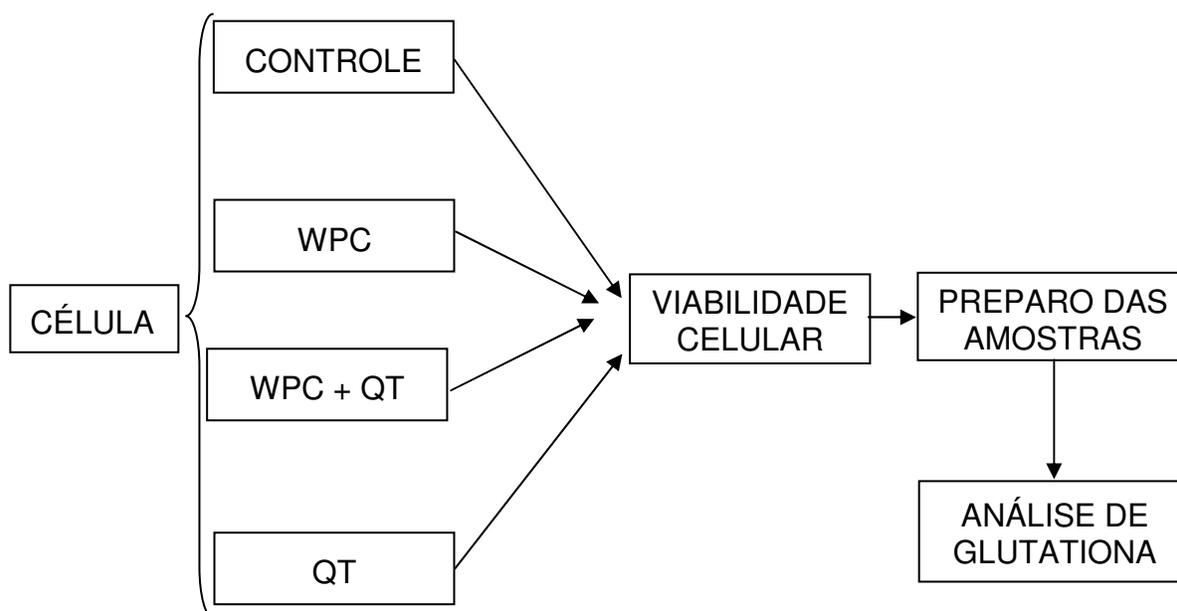


FIGURA 14. Protocolo geral do experimento 2 *in vitro*. QT = quimioterápico Ara-C.

4.4.3. Resultados

• Testes Preliminares

Na Tabela 9 estão apresentados os dados obtidos de glutathiona total em pmol/célula, para as linhagens testadas inicialmente, comparando os valores obtidos imediatamente após o preparo das amostras e depois de 48h armazenadas à -20 °C.

TABELA 9. Quantidade de glutathiona total (pmol/célula) das linhagens K562, Nalm-6 e Jurkat, realizadas em tempos diferentes após o preparo das amostras.

Células	Glutathiona total (pmol/célula)	
	0h	48 h
K562	$15,85 \times 10^{-4}$	$12,77 \times 10^{-4}$
Nalm-6	$3,51 \times 10^{-4}$	$2,86 \times 10^{-4}$
Jurkat	$7,12 \times 10^{-4}$	$5,72 \times 10^{-4}$

Na análise de glutathiona total realizada imediatamente após o preparo das amostras encontraram-se os maiores valores para a linhagem K562 ($15,85 \times 10^{-4}$ pmol/célula). Valores intermediários para a linhagem Jurkat ($7,12 \times 10^{-4}$) e os valores inferiores aos demais foram verificados para a linhagem Nalm-6 ($3,51 \times 10^{-4}$). Porém, quando essa mesma análise foi realizada nas amostras congeladas à -20 °C durante 48hs, verificaram-se uma reduções nos níveis de glutathiona total para todas as linhagens celulares estudadas. Essas reduções foram de 19,4% para K562, 19,7% para Jurkat e 18,5% para a linhagem Nalm-6.

De acordo com os dados desses testes preliminares verificou-se que as amostras deveriam ser analisadas imediatamente após serem preparadas, não devendo ser armazenadas.

• **Experimento com a linhagem celular K562 (Leucemia Mieloide Crônica Humana)**

Viabilidade Celular

Na Tabela 10 estão apresentados os dados referentes à viabilidade celular ao longo do experimento com a linhagem K562.

TABELA 10. Quantidade de células viáveis, não viáveis e n° de células/mL da linhagem K562 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Controle			WPC			WPC / QT			QT		
	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N
0h	50	---	0,62	52	---	0,65	48	---	0,60	50	---	0,62
24h	33	2	0,41	30	1	0,38	25	5	0,31	18	4	0,22
48h	44	9	0,55	31	7	0,39	40	12	0,50	31	6	0,39
72h	69	4	0,86	45	4	0,56	46	1	0,58	43	1	0,54

QT = quimioterápico (Citosina-Arabinosídeo - ARA-C); V = N° de células viáveis; NV = N° de células não viáveis; N = N° de células/mL.

Verificou-se que houve um aumento relativo no número de células/mL entre 0 e 72h apenas para a condição controle. Nas demais condições observou-se efeito contrário, ou seja, redução no número total de células/mL.

Quantidade de Glutationa Total

A Tabela 11 apresenta os valores obtidos para glutathione total em pmol/célula para a linhagem K562 em todas as condições testadas.

Para todas as condições testadas com a linhagem K562 encontrou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de glutathione total. Os maiores níveis de glutathione total foram verificados para a condição em que se utilizou apenas o quimioterápico Ara-C, diferindo estatisticamente das demais condições. Em 48 e 72h não houve diferença estatística entre as condições controle, WPC e WPC/QT.

TABELA 11. Quantidade de glutatona total (pmol/célula) da linhagem K562 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Glutaciona total (pmol/célula)			
	Controle	WPC	WPC / QT	QT
0h	$8,66 \times 10^{-4} \text{ A}$	ND	ND	ND
24h	$8,67 \times 10^{-4} \text{ Ac}$	$9,76 \times 10^{-4} \text{ Ac}$	$14,09 \times 10^{-4} \text{ Ab}$	$21,5 \times 10^{-4} \text{ Aa}$
48h	$6,78 \times 10^{-4} \text{ Bb}$	$6,72 \times 10^{-4} \text{ Bb}$	$5,55 \times 10^{-4} \text{ Bb}$	$10,08 \times 10^{-4} \text{ Ba}$
72h	$6,13 \times 10^{-4} \text{ Bb}$	$5,35 \times 10^{-4} \text{ Cb}$	$4,85 \times 10^{-4} \text{ Bb}$	$8,04 \times 10^{-4} \text{ Ba}$

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e mesma letra minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ND = não determinado.

- **Experimento com a linhagem celular Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda Humana do tipo B)**

Viabilidade Celular

A Tabela 12 mostra os dados referentes à viabilidade celular ao longo do experimento com a linhagem Nalm-6.

Verificou-se que a condição WPC (10 mg/mL) apresentou um aumento no número de células/mL ao final do experimento (72h) de forma semelhante à condição controle. Já para as condições WPC/QT e apenas o quimioterápico observou-se redução no número de células/mL ao longo do experimento.

TABELA 12. Quantidade de células viáveis, não viáveis e n° de células/mL da linhagem Nalm-6 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Controle			WPC			WPC / QT			QT		
	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N
0h	23	0	0,29	----	----	----	----	----	----	----	----	----
24h	28	0	0,35	28	0	0,35	19	0	0,24	29	0	0,36
48h	62	1	0,78	87	2	1,09	10	6	0,13	12	6	0,15
72h	70	2	0,88	68	1	0,85	9	6	0,12	5	22	0,06

QT = quimioterápico (Citosina-Arabinosídeo - ARA-C); V = N° de células viáveis; NV = N° de células não viáveis; N = N° de células/mL.

Quantidade de Glutathiona Total

Na Tabela 13 estão apresentados os dados obtidos para glutathiona total em pmol/célula para a linhagem Nalm-6 em todas as condições testadas.

TABELA 13. Quantidade de glutathiona total (pmol/célula) da linhagem Nalm-6 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Glutathiona total (pmol/célula)			
	Controle	WPC	WPC e QT	QT
0h	$2,82 \times 10^{-4}$ C	----	----	----
24h	$3,57 \times 10^{-4}$ Ba	$4,17 \times 10^{-4}$ Aa	$3,36 \times 10^{-4}$ Ba	$4,51 \times 10^{-4}$ Aa
48h	$3,97 \times 10^{-4}$ ABa	$3,72 \times 10^{-4}$ Aa	$5,01 \times 10^{-4}$ Aa	$5,54 \times 10^{-4}$ Aa
72h	$4,58 \times 10^{-4}$ Ab	$4,74 \times 10^{-4}$ Ab	$3,96 \times 10^{-4}$ ABb	$5,94 \times 10^{-4}$ Aa

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e mesma letra minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se comparou o início e o final do experimento verificou-se que houve variação nos níveis de glutathiona total para todas as condições, embora com diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para a condição controle.

Assim como ocorreu para a linhagem K562, os maiores níveis de glutathiona total em 72 h foram encontrados para a condição em que se utilizou apenas o quimioterápico Ara-C, diferindo estatisticamente das demais condições.

• Experimento com a linhagem celular HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda Humana)

Viabilidade Celular

Na Tabela 14 estão apresentados os dados referentes à viabilidade celular ao longo do experimento com a linhagem HL-60.

TABELA 14. Quantidade de células viáveis, não viáveis e nº de células/mL da linhagem HL-60 para todas as condições testadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Controle			WPC			WPC / QT			QT		
	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N	V	NV	N
0h	21	0	0,26	----	----	----	----	----	----	----	----	----
24h	25	0	0,31	14	0	0,18	18	0	0,22	20	0	0,25
48h	46	0	0,58	40	1	0,50	9	4	0,12	10	4	0,15
72h	57	0	0,71	37	0	0,46	6	5	0,08	6	7	0,08

QT = quimioterápico (Citosina-Arabinosídeo - ARA-C); V = N° de células viáveis; NV = N° de células não viáveis; N = N° de células/mL

Da mesma forma como ocorreu com a linhagem Nalm-6, para a linhagem HL-60 houve um aumento no número de células/mL para as condições controle e WPC e uma redução para as condições WPC/QT e apenas QT.

Quantidade de Glutaciona Total

Na Tabela 15 estão apresentados os dados obtidos de glutaciona total em pmol/célula para a linhagem HL-60 em todas as condições testadas.

TABELA 15. Quantidade de glutaciona total (pmol/célula) da linhagem HL-60 para todas as condições avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.

Tempos	Glutaciona total (pmol/célula)			
	Controle	WPC	WPC / QT	QT
0h	$6,43 \times 10^{-4} C$	----	----	----
24h	$26,49 \times 10^{-4} Ab$	$39,15 \times 10^{-4} Aa$	$22,28 \times 10^{-4} Ab$	$17,35 \times 10^{-4} Bc$
48h	$15,05 \times 10^{-4} Bb$	$10,82 \times 10^{-4} Bc$	$23,80 \times 10^{-4} Aa$	$26,95 \times 10^{-4} Aa$
72h	$16,38 \times 10^{-4} Ba$	$9,85 \times 10^{-4} Bb$	---	----

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e mesma letra minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao contrário do que foi verificado para a linhagem K562 (origem mieloide), encontrou-se um aumento significativo nos níveis de glutaciona para o controle e QT. Houve redução significativa para a condição WPC e manutenção nos níveis de glutaciona total para as condições WPC/QT.

4.4.4. Conclusões do Experimento 2, *in vitro*

Os dados experimentais permitiram concluir que:

- 1) As três linhagens celulares K562, Nalm-6 e HL-60 apresentaram perfis semelhantes em relação à viabilidade celular;
- 2) Houve aumento no número de células para a condição controle e redução nas condições WPC mais QT e apenas QT;
- 3) O WPC promoveu aumento da viabilidade celular nas linhagens Nalm-6 e HL-60, contrariamente à diminuição da viabilidade na linhagem K562;
- 4) Os níveis de glutathiona total diminuíram estatisticamente em todas as condições testadas para a linhagem K562;
- 5) Para Nalm-6 não houve diferença estatística nos níveis de glutathiona entre os tempos, inicial e final, com exceção da condição controle;
- 6) Para a linhagem HL-60 houve aumento significativo de glutathiona nas condições controle e QT; redução na condição WPC, não havendo diferença estatística para a condição WPC/QT.

5. DISCUSSÃO GERAL: PESQUISA COM CÉLULAS LEUCÊMICAS

Segundo Samuels e colaboradores (2010) modelos pré-clínicos que efetivamente reproduzem doenças humanas são fundamentais para a expansão do conhecimento da biologia do câncer e dos mecanismos de resistência às drogas. Para neoplasias hematológicas, como as leucemias, o modelo com camundongos NOD/SCID (diabéticos não-obesos com grave imunodeficiência combinada) é um dos mais bem sucedidos.

De acordo com Lock *et al.* (2002) a cinética da implantação das células de LLA em modelo xenográfico de camundongos NOD/SCID reflete a doença humana com infiltração da medula óssea, seguida pela migração para o baço, sangue periférico e outros órgãos hematopoiéticos.

Para cânceres pediátricos os modelos xenográficos têm sido particularmente precisos na identificação de agentes ativos clinicamente e eficazes combinações de drogas. Nesta pesquisa realizaram-se ensaios com modelo xenográfico e estudos *in vitro* para avaliar um possível benefício das proteínas lácteas como coadjuvante ao tratamento quimioterápico de pacientes pediátricos com leucemia.

No 1º ensaio *in vivo* não houve diferença na evolução do peso corporal entre o grupo que recebeu dieta AIN-93G com 20% de caseína e o grupo que recebeu dieta com 20% de WPC tendo havido manutenção do peso nos dois grupos. Em oposição, o grupo que recebeu dieta comercial apresentou perda significativa ($p < 0,05$) de 18,3% entre seu peso inicial e final.

No 2º ensaio *in vivo* verificou-se também manutenção nos pesos dos animais tratados com o quimioterápico sulfato de vincristina. A manutenção do peso corporal foi importante para evitar que a toxicidade da droga pudesse levar os animais ao óbito. Nos grupos sem quimioterápico, houve redução estatística do peso de 22,1% para o grupo que recebeu dieta AIN-93G com 12% de WPC e de 18,4% para o grupo que recebeu dieta comercial.

Comparando os dois experimentos *in vivo* em relação à evolução do peso dos animais observou-se que ao contrário do 1º ensaio, no 2º houve perda de peso do grupo tratado com WPC. Levando-se em consideração que no 1º ensaio utilizou-se 20% de proteína e no 2º ensaio a contribuição dessa proteína foi de 12%, evidencia-se que a quantidade de proteína na dieta está diretamente relacionada ao ganho/perda de peso dos animais.

As proteínas do soro contêm todos os aminoácidos essenciais e são classificadas como proteínas de alta qualidade nutricional. O quociente de eficiência proteica (PER), que reflete o ganho de peso de animais jovens, por grama de proteína consumida é elevado para as proteínas do soro (3,2), superior à caseína (2,6) (HOFFMAN e FALVO, 2004).

Apenas no 2º experimento foi avaliado o consumo de dieta. Observou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o grupo WPC + QT e o grupo caseína + QT, assim como não houve diferença entre o grupo WPC e o grupo em dieta comercial sem tratamento com quimioterápico.

De maneira geral foi observado em ambos experimentos *in vivo* que o grupo que recebeu dieta comercial apresentou o pior desempenho em relação ao parâmetro peso dos órgãos (fígado, baço e rins) pelo peso corporal, revelando uma maior organomegalia em relação aos demais grupos avaliados, provavelmente em função da diferença de composição (não determinada) em relação às dietas experimentais.

Em vários estudos, a infiltração leucêmica tem sido observada não apenas na medula óssea, baço e sangue de camundongos, mas também no timo, fígado, cérebro, pulmões e rins (CESANO *et al.*, 1991).

Camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) fornecem um sistema modelo para examinar *in vivo* o implante de células leucêmicas, bem como, os padrões de crescimento de células hematopoiéticas normais e malignas. As células leucêmicas de 42 crianças com diagnóstico recente de alto risco de leucemia linfoblástica aguda da linhagem B foram inoculados em camundongos SCID CB.17. Os animais foram mortos na 12ª semana ou quando se tornaram moribundo em função da leucemia. Os autores concluíram que crescimento de células leucêmicas em camundongos SCID é um preditor forte e independente de recaída em pacientes com recente diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) da linhagem B (UCKUN *et al.*, 1995).

Em outro estudo, amostras da medula óssea de pacientes com LLA do tipo B, tanto no diagnóstico como na recaída, foram transplantadas para camundongos SCID para determinar se essas células leucêmicas recentemente obtidas poderiam proliferar *in vivo* e se haveria alguma diferença em suas características de crescimento. Verificou-se que as células dos pacientes com recaída proliferaram rapidamente na medula óssea, baço e timo, invadindo órgãos

periféricos, resultando em morbidade e mortalidade dos animais dentro de 4 a 16 semanas. Ao contrário, as células leucêmicas de pacientes no momento do diagnóstico, ou seja, que ainda não tinham apresentado recaída, não foram detectadas nos animais. Estes resultados mostraram aumento da capacidade das células leucêmicas de pacientes com agressiva leucemia linfoblástica representam mau prognóstico para a proliferação em camundongos SCID (KAMEL-REID *et al.*, 1991).

Na pesquisa apresentada neste capítulo, verificou-se um crescente aumento no percentual de células blásticas no decorrer do experimento 1, não havendo diferença estatística entre o grupo WPC (grupo 1) e caseína (grupo 2).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na evolução da leucemia entre o grupo dieta comercial e o grupo WPC nos dias 0, 4 e 25 e, com o grupo caseína nos dias 0 e 25. Destacou-se o maior percentual de células blásticas do grupo 3 (dieta comercial) nesses tempos, especialmente no 25º dia de estudo, sendo inclusive esse percentual (82,2%) superior aos dos grupos WPC (71,1%) e caseína (71,2%) no 32º dia. Esses dados sugerem que a evolução da LLA no grupo dieta comercial ocorreu mais rapidamente do que nos animais que receberam 20% de proteínas do leite em suas dietas.

Esses resultados de superioridade das proteínas do soro do leite em relação à evolução da LLA tipo B não foram confirmados através do 2º experimento (12% de proteína), entre os grupos sem tratamento quimioterápico, ou seja, WPC e dieta comercial. Não foi possível verificar efeito sinérgico entre o WPC e o quimioterápico, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos WPC + QT e caseína + QT.

A doença residual mínima (DRM) é definida como um pequeno número de células leucêmicas, que não podem ser detectadas por morfologia ou análise citogenética. Possui valor prognóstico considerável em muitas malignidades hematológicas, incluindo LLA, LMA, linfomas, mieloma múltiplo e LMC (RADICH, 1999), uma vez que, atingida a remissão hematológica completa, uma grande

proporção de células leucêmicas permanece em níveis abaixo do limite de detecção do microscópio ótico (LOWENBERG, 2003).

A doença residual mínima (DRM) foi avaliada no 2º e ensaio *in vivo* da presente pesquisa. Embora no sangue periférico não tivesse ocorrido diferença estatística no percentual de células leucêmicas entre as proteínas WPC e caseína nos grupos tratados com quimioterápico (grupos 1 e 3), quando se avaliou a DRM na medula óssea, verificou-se que no grupo caseína a média de células blásticas na medula dos animais foi de 0,03% enquanto para o grupo WPC a média foi de 23,61%. Esses dados indicaram um melhor desempenho da caseína sobre as células leucêmicas, porém são resultados preliminares com pequeno número de animais, necessitando de estudos mais aprofundados para confirmação dos resultados e esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos.

Em relação à sobrevivência global dos animais do 1º ensaio, observou-se que não houve diferença estatística ($p = 0,080$) no percentual dos dias de sobrevivência dos grupos em dieta comercial, caseína e WPC. No 2º ensaio verificou-se diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os 4 grupos experimentais. Porém, analisando separadamente os grupos sem tratamento com quimioterápico e os tratados com sulfato de vincristina, não se verificou diferença estatística entre WPC (28,5 dias) vs dieta comercial (21 dias) nem entre WPC+ QT (57,4 dias) vs caseína + QT (65 dias).

Em estudo realizado por Nijmeijer *et al.* (2001) com camundongos NOD/SCID inoculados com células LLA primárias, os autores ressaltaram que embora as características observadas da progressão leucêmica tivessem sido semelhantes à doença em humanos, não foi observada citopenia. Durante a progressão leucêmica, a média da contagem de leucócitos e hemácias murinos permaneceram normais, considerando que o compartimento da medula óssea dos camundongos foi quase totalmente substituído por células leucêmicas. A aparente perda de capacidade hematopoiética na medula óssea de camundongos, provavelmente, é compensada por uma mudança de atividade hematopoiética para o baço dos animais. Nesse estudo a contagem de leucócitos no sangue variou entre 0,5 e $5,0 \times 10^6$ células/mL.

Em relação aos níveis de leucócitos no início do experimento realizado no presente estudo, apenas o grupo WPC + QT foi estatisticamente inferior ($2,2 \times 10^3$ células/uL) ao grupo controle livre de doença ($4,2$ a $6,3 \times 10^3$ células/uL). No final do estudo, os grupos que receberam WPC, independente do uso do quimioterápico, foram os únicos que mantiveram os níveis de leucócitos dentro dos limites de normalidade segundo Thrall *et al.* (2006), e do grupo controle livre de doença.

Apenas nos grupos tratados com quimioterápico houve redução significativa entre o início e o final do experimento *2 in vivo* nos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, estando abaixo dos limites mínimos de normalidade nos dois grupos que receberam quimioterapia. Nos demais grupos os valores desses parâmetros não foram afetados, inclusive sem diferir estatisticamente do grupo controle no início e no fim do estudo.

Considerando-se os grupos individualmente, houve aumento significativo nos valores de plaquetas para os grupos com quimioterápico e redução significativa para os grupos sem quimioterápico. Este fato demonstra o efeito do quimioterápico e da doença sobre os níveis de plaquetas, assim como foi verificado esse efeito para os níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

Vários ensaios com animais demonstram que o concentrado de proteínas de soro exerce efeito anticarcinogênico. Esse efeito foi correlacionado com o aumento nas concentrações de GSH nos tecidos, podendo exercer efeito inibidor de tumores menores, via estimulação da imunidade por meio da produção de GSH. A produção de radicais de oxigênio é um passo crítico na carcinogênese e, assim, a eliminação desses radicais é importante para inibir a doença (BOUNOUS, 2000).

No presente trabalho os valores de glutathiona eritrocitária não diferiram do controle livre de doença para nenhum grupo testado nem no início nem ao final do estudo. Comparando os grupos individualmente entre o início e o final do experimento verificou-se que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de glutathiona para os grupos WPC + QT e dieta comercial.

Hum, Koski e Hoffer (1992) testaram a possibilidade de que o consumo de proteínas acima do necessário para um crescimento ótimo de ratos jovens e adultos poderia aumentar os níveis de glutathiona hepática e o turnover da GSH plasmática. Ratos Sprague Dawley receberam dietas contendo 0, 5, 10, 20 ou 40% de caseína. Os autores verificaram que os níveis de GSH hepática e do turnover da GSH plasmática aumentaram entre 0 a 20% de caseína, não ocorrendo o mesmo efeito estimulador nas dietas com 40% de caseína. Este estudo revela que tanto a quantidade quanto a origem da fonte proteica podem influenciar o metabolismo da glutathiona.

Embora a lactoferricina bovina tenha atraído um considerável interesse devido suas propriedades antimicrobianas (JONES *et al.*, 1994), recentes evidências indicam que esse peptídeo também possui potente atividade contra células cancerígenas *in vivo* (YOO *et al.*, 1997; TSUDA *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2004). Estudo em camundongos com administração subcutânea de lactoferricina um dia após a inoculação do tumor por via intravenosa revelaram uma significativa inibição de metástase no pulmão e fígado de células de linfoma murino L5178Y-ML25, bem como, inibiu a metástase pulmonar de células de melanoma murino B16-BL6. Além disso, a lactoferricina inibiu a angiogênese induzida pelo tumor e o crescimento tumoral em camundongos inoculados com células de melanoma B16-BL6 (MADER *et al.*, 2005).

Poucos estudos avaliaram o efeito das proteínas do soro de leite bovino sobre o crescimento de células cancerígenas *in vitro*. Bourtourault e colaboradores (1991) demonstraram que essas proteínas reduziram o crescimento da linhagem MCF-7 de células de câncer de mama e da linhagem PC-3 de células de câncer de próstata. Em outra pesquisa o WPC inibiu o crescimento de células cancerígenas mamárias de ratos e células Jurkat derivadas de leucemia (BARUCHEL e VIAUX, 1996).

No presente estudo o percentual de inibição do WPC, em relação às células leucêmicas K562, Nalm-6, CEM e as células de linfoma RAMOS, foi testado na faixa entre 0,39 a 25,0 mg/mL. As linhagens CEM, Nalm-6 e RAMOS revelaram ação dupla de estímulo ao crescimento celular, especialmente nas concentrações

mais baixas de WPC avaliadas e inibição em concentrações mais elevadas. A única linhagem que não apresentou nenhum estímulo à proliferação em todas as concentrações de WPC testadas foi a K562, cujo percentual de inibição ocorreu de maneira dose-dependente da concentração de WPC.

Os maiores percentuais de inibição foram obtidos para a concentração de WPC de 25mg/mL para Nalm-6 (68,9%) e CEM (68,5%), as quais não diferiram entre si, porém foram superiores estatisticamente às linhagens RAMOS (48,8%) e K562 (45,2%). Já para a menor concentração de WPC testada, a linhagem K562 apresentou maior inibição que as demais (15,3%), embora não tenha diferido estatisticamente da Nalm-6 e RAMOS, as quais apresentaram proliferação celular.

De todas as linhagens, nas concentrações testadas, apenas a Nalm-6 e a CEM alcançaram inibição de 50% de proliferação celular. A linhagem Nalm-6 apresentou IC₅₀ de 6,72 mg/mL e a linhagem CEM um IC₅₀ de 11,84 mg/mL.

A linhagem de células leucêmicas mieloides humana HL-60 tem sido bem caracterizada em modelos *in vitro* de proliferação celular (ROY *et al.*, 2002). Esses autores estudaram o efeito de peptídeos, obtidos através da hidrólise proteolítica com pepsina sobre a lactoferrina, em células leucêmicas HL-60, verificando que os 4 peptídeos formados inibiram sua proliferação através da indução de apoptose. O peptídeo 1, correspondente aos resíduos 17 a 38 da lactoferrina, apresentou maior atividade apoptótica com IC₅₀ de 6,3 µg/mL.

Em estudo *in vitro* com células de melanoma B16F10 foi avaliada a faixa de concentração entre 0,15 a 100mg/mL de um isolado de proteínas do soro de leite bovino (WPI). A autora encontrou uma concentração de 6,89 mg/mL para o percentual de 50% de inibição das células (CASTRO, 2007).

Em células mononucleares do sangue periférico humano também foi demonstrado aumento dos níveis de GSH quando cultivadas *in vitro* com WPC (BARUCHEL e VIAUX, 1996). No mesmo estudo, testou-se o WPC em culturas de células cancerígenas de tumor mamário de ratos e células Jurkat derivadas de

leucemia, ao contrário do que ocorreu nas células mononucleares, os níveis de GSH foram diminuídos nas células leucêmicas.

Em estudo *in vitro* com células epiteliais de próstata humana (RWPE-1) tratadas com WPI hidrolisado, na concentração de 500 mg/mL, houve aumento significativo nos níveis de GSH em 64%, quando comparado com células controles não tratadas com WPI ($p < 0,05$). Em oposição, o tratamento com hidrolisado de caseinato de sódio (500 mg/mL), uma proteína pobre em cisteína, a GSH intracelular não aumentou significativamente. Adicionalmente houve proteção significativa do WPI hidrolisado sobre as células RWPE-1 contra a morte celular induzida por oxidantes (KENT, HARPER e BOMSER, 2003).

Russo e colaboradores (1986) demonstraram que os níveis de GSH foram 7 vezes superiores em linhagem de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) do que em linhagem de células de fibroblastos pulmonares humanos (CCL-210). Foi utilizado uma droga estimulante da síntese de GSH (oxotiazolidina-4-carboxilato – OTZ) e outra inibidora (butioninasulfoximina – BSO). Os autores constataram que o tratamento com o estimulante (OTZ) não promoveu efeito sobre as células tumorais, entretanto os níveis de GSH da linhagem normal foram elevados entre 140 a 170%. Com BSO (inibidor) as células normais foram depletadas de GSH mais rapidamente que as células tumorais. Em 7h, 5% de GSH permanecia na linhagem normal enquanto aproximadamente 40% a GSH foi verificado na linhagem A549.

Na pesquisa relatada nesse capítulo avaliou-se a viabilidade celular da linhagem K562 (Leucemia Mieloide Crônica) verificando-se aumento no número de células/mL entre 0 e 72h apenas para a condição controle (células + meio RPMI). Nas demais condições houve redução no número total de células/mL.

Em estudos com cultura de leite fermentado por várias bactérias ácido lácticas, e leveduras, verificou-se supressão do crescimento de células HL-60 (ITO *et al.*, 1998). Já no presente estudo para as linhagens Nalm-6 (Leucemia Linfóide Aguda do tipo B) e HL-60 (Leucemia Mieloide Aguda) o WPC (10 mg/mL) promoveu aumento no número de células/mL ao final do experimento (72h) de

forma semelhante à condição controle. Nas condições WPC + QT ou apenas o quimioterápico (Ara-C) observou-se redução no número de células/mL no decorrer do experimento.

Estudos para investigar os possíveis mecanismos de ação entre as proteínas do soro de leite e seus peptídeos sobre linhagens de células leucêmicas são necessários. Na pesquisa aqui relatada conseguiu-se evidenciar que as linhagens de células leucêmicas comportam-se de maneira diferenciada frente à ação do WPC, além da origem das células outros fatores poderão estar associados.

O fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) é considerado uma citocina multifuncional, apresentando numerosas atividades sobre as células e tecidos, incluindo controle do ciclo celular, regulação no desenvolvimento inicial, diferenciação, formação da matriz extracelular, hematopoiese, angiogênese, quimiotaxia, funções imune e indução de apoptose. A inibição do crescimento e apoptose mediadas pelo TGF- β pode estar correlacionada com a sua função como supressor de tumor. Dados de experimentos em cultura de células e estudos *in vivo* suportam um papel central na apoptose mediada por TGF- β na manutenção da homeostase de células T e B (SCHUSTER E KRIEGLSTEIN, 2002).

Brown e colaboradores (1998) verificaram que a linhagem celular WEHI 231 de linfoma tipo B de camundongos respondeu ao tratamento com TGF- β de maneira dose-dependente. O tratamento com TGF- β inibiu o crescimento celular, mas quando utilizado em altas doses promoveu a apoptose de um número substancial de células.

O TGF- β promoveu uma permanência parcial de células leucêmicas L1210 entre as fases G1/S do ciclo celular e induziu a apoptose dessas células. O processo de apoptose foi acompanhado de 2 fases de geração de ROS, uma rápida (60 min) e outra retardada (24h e 48h) após a administração de TGF- β (MOTYL *et al.*, 1998). Em outro estudo com uma linhagem de linfoma (linhagem RAMOS), o tratamento com TGF- β também promoveu apoptose (SALTZMAN *et al.*, 1998).

Vários estudos demonstraram que a ingestão de proteínas de soro de leite ou a adição deste em cultura de células foi capaz de elevar de forma eficiente a glutathiona celular (BOUNOUS *et al.*, 1993; MICKE *et al.*, 2001; KENT, HARPER e BOMSER, 2003).

No presente estudo verificou-se efeito contrário ao mencionado na literatura, pois a concentração de glutathiona total (pmol/célula) sofreu diminuição significativa ($p < 0,05$) em todas as condições testadas com a linhagem K562. Por outro lado, com a linhagem Nalm-6 verificou-se que houve um aumento significativo nos níveis de glutathiona total apenas para a condição controle. Assim como ocorreu para a linhagem K562, os maiores níveis de glutathiona total em 72 h foram encontrados para a condição em que se utilizou apenas o quimioterápico Ara-C, diferindo estatisticamente das demais, condições.

Ao contrário do que foi verificado para a linhagem K562 (origem mieloide) para a HL-60 encontrou-se um aumento significativo nos níveis de glutathiona para as condições controle e QT. Houve redução significativa para a condição WPC e manutenção nos níveis de glutathiona total para as condições WPC/QT.

Os efeitos do isolado protéico de soro na citotoxicidade de uma potente droga anticâncer foram avaliados em células de hepatoma humano, cultivadas em meios diferentes (TSAI *et al.*, 2000): basal, com o isolado protéico, com a droga ou em meio contendo droga e isolado protéico. As células que cresceram em meio combinado apresentaram menor taxa de sobrevivência do que aquelas que cresceram em meio contendo somente a droga. Há indicativos de que o isolado protéico de soro aumentou a citotoxicidade da droga, induzindo mais apoptose. O aumento de células em apoptose poderia estar associado com a diminuição da GSH nos hepatomas.

O tratamento com doses de até 50 µg/mL de lactoferricina bovina, peptídeo formado durante a hidrólise da lactoferrina, em relação a uma linhagem de células leucêmicas humanas (THP-1) induziu apoptose celular de maneira dose e tempo dependentes. Porém a indução de apoptose pela lactoferricina foi completamente inibida pela adição de antioxidantes como a GSH. Os autores também postulam

que essa ação apoptótica da lactoferricina está associada com a produção intracelular de espécies reativas do O₂ (ERO) e ativação de endonucleases dependentes de Ca²⁺/Mg²⁺ (YOO *et al.*, 1997).

Em outro estudo Mader *et al.* (2005) verificaram *in vitro* que a lactoferricina rapidamente induziu apoptose em várias linhagens celulares de leucemia humana e carcinomas. Além disso, o tratamento com lactoferricina não afetou adversamente a viabilidade de linfócitos humanos, fibroblastos e células endoteliais normais. Os autores concluíram que o mecanismo de ação é via mitocondrial de ativação de caspases e pelo menos em parte devido à geração de ROS.

6. CONCLUSÕES GERAIS: PESQUISA COM CÉLULAS LEUCÊMICAS

De acordo com dados obtidos nos experimentos *in vivo* pode-se concluir que: 1) As dietas com WPC ou com caseína não conseguiram impedir ou retardar a proliferação de células leucêmicas humanas, posterior à implantação das mesmas em camundongos imunodeficientes da linhagem NOD/SCID, avaliadas no sangue periférico, sem diferença para os dois grupos de proteínas lácteas; 2) A avaliação da doença residual mínima (DRM) na medula sugeriu superioridade da caseína (menor percentual de células blásticas residual) em relação ao grupo WPC, ambos com tratamento quimioterápico; 3) Não houve diferença estatística nos parâmetros variação de peso e consumo de dieta para WPC ou caseína, com ou sem o uso de quimioterápico; 4) Na comparação com o grupo em dieta comercial, as dietas AIN-93G com WPC ou caseína foram mais eficientes na manutenção do peso dos animais; 5) Não houve diferença estatística na sobrevivência global entre os tratamentos; 6) As dietas, com WPC, com ou sem quimioterápico foram as únicas que mantiveram os níveis de leucócitos, não diferindo do controle livre de doença; 7) A associação do quimioterápico nos grupos tanto com WPC como com caseína promoveu redução significativa de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos, contrariamente à elevação das plaquetas; 8) Os níveis de glutatona nos eritrócitos ao final do experimento 2 não mostraram variações estatísticas entre os tratamentos.

Dos experimentos *in vitro* pode-se concluir que: 1) O WPC apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações estudadas, tendo o IC₅₀ sido alcançado apenas para as linhagens Nalm-6 (6,72 mg/mL) e CEM (11,84 mg/mL); 2) O WPC promoveu aumento da viabilidade celular nas linhagens Nalm-6 e HL-60, contrariamente à diminuição da viabilidade na linhagem K562; 3) Constatou-se comportamento variável das linhagens celulares dependendo das condições de cultivo, para produção de glutathiona total.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Washington: DC; 2005.

BARUCHEL, S.; VIAUX, G. In vitro selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in mammal cells and rat mammary carcinoma model. **Anticancer Research**, Athens, v. 16, n. 3A, p. 1095-1100, may./june.1996.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**. New York: Churchill Livingstone, 1986. 126p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, aug. 1959.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, Athens, v. 20, n. 6C, p. 4785-4792, nov/dec. 2000.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, Quebec, v. 16, n.3, p. 204-209, jun.1993.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 296-309, aug.1991.

BOUNOUS, G.; LETORNEAU, L.; KONGSHAVN, P.A.L. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 7, p. 1415-1421, jul.1983.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A.L. The effect of dietary amino acid on immune reactivity. **Immunology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 257-266, aug.1978.

BOURTOURAUULT, M.; BULÉON, R.; SAMPÉREZ, S.; JOUAN, P. Effect of proteins from bovine milk serum on the multiplication of human cancerous cells. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales**, Paris, v. 185, n. 5, p. 319-23, may.1991.

BROWN, T.L.; PATIL, S.; BASNETT, R.K.; HOWE, P.H. Caspase inhibitor BD-fmk distinguishes transforming growth factor beta-induced apoptosis from growth inhibition. **Cell Growth and Differentiation**, Philadelphia, v. 9, n.10, p. 869-875, oct.1998.

CASTRO, G.A. **Efeitos de derivados de colágeno e de um isolado protéico de soro de leite bovino na inibição de lesões ulcerativas gástricas e tumorigênese, *in vitro* e *in vivo***. 2007. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CESANO, A.; O'CONNOR, R.; LANGE, B.; FINAN, J.; ROVERA, G.; SANTOLI, D. Homing and progression patterns of childhood acute lymphoblastic leukemias in severe combined immunodeficiency mice. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v. 77, n. 11, p.2463-74, june 1991.

CHO, E.; SMITH-WARNER, S.A.; SPIEGELMAN, D.; BEESON, W.L.; VAN DEN BRANDT, P.A.; COLDITZ, G.A.; FOLSOM, A.R.; FRASER, G.E.; FREUDENHEIM, J.L.; GIOVANNUCCI, E.; GOLDBOHN, R.A.; GRAHAM, S.; MILLER, A.B.; PIETINEN, P.; POTTER, J.D.; ROHAN, T.E.; TERRY, P.; TONIOLO, P.; VIRTANEN, M.J.; WILLETT, W.C.; WOLK, A.; WU, K.; YAUN, S.S.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; HUNTER, D.J. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 96, n.13, p. 1015-1022, jul. 2004.

DAO, M.A.; NOTA, J.A. Immunodeficient mice as models of human hematopoietic stem cell engraftment. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 11, n.5, p. 532-537, oct. 1999.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 10 ed. São Paulo: Nobel, 1982.

HOFFMAN, J.R.; FALVO, M.J. Protein - which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, Bursa, v. 3, p.118–130, sep. 2004.

HUM, S.; KOSKI, K.G.; HOFFER, L.J. Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n 10, p. 2010-2018, oct. 1992.

ITO, M. ; ROY, M. K. ; KURIHARA, T.; WATANABE, Y. ; KUWABARA, Y. ; NAGAI, S. ; TAMAI, Y. Effects of bovine milk fermented by culturing with lactic acid bacteria and a yeast on the proliferation activity of human carcinoma cells. **Food Science and Technology International**, Tokyo, v. 4, n.2, p.125–129, 1998.

JONES, E.M.; SMART, A.; BLOOMBERG, G.; BURGESS, L.; MILLAR, M.R. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. **The Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 77, n. 2, p. 208-214, aug. 1994.

KAMEL-REID, S.; LETARTE, M.; DOEDENS, M.; GREAVES, A.; MURDOCH, B.; GRUNBERGER, T.; LAPIDOT, T.; THORNER, P.; FREEDMAN, M.H.; PHILLIPS, R.A.; DICK, J.E. Bone marrow from children in relapse with pre-b acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in *scid* mice. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v. 78, n. 11, p. 2973-2981, dec. 1991.

KENT, K.D.; HARPER, W.J.; BOMSER, J.A. Effect of whey protein isolate in intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cell. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 17, n. 1, p. 27-33, feb. 2003.

LAUERSEN, I.; BRIAND, P.; LYEKESFELDT, A.E. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. **Anticancer Research**, Athens, v. 10, n. 2A, p. 343-352, mar./apr. 1990.

LOCK, R.B.; LIEM, N.; FARNSWORTH, M.L.; MILROSS, C.G., XUE, C.; TAJBAKHSH, M.; HABER, M.; NORRIS, M.D.; MARSHALL, G.M.; RICE, A.M. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v. 99, n. 11, p. 4100-4108, jun. 2002.

LOWENBERG, B. Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, n. 15, p. 1399-401, oct. 2003.

MADER, J.S.; SALSMAN, J.; CONRAD, D.M.; DAVID, W.; HOSKIN, D.W. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell

line. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 612-624, apr. 2005.

MICKE, K.M.; BEEH, J. F.; SCHLAA K.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 31, n. 2, p. 171-178, feb. 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dec.1983.

MOTYL, T.; GRZELKOWSKA, K.; ZIMOWSKA, W.; SKIERSKI, J.; WARESKI, P.; PLOSZAJ, T.; TRZECIAK, L. Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 75, n.4, p. 367-374, apr. 1998.

NIJMEIJERA, B.A.; MOLLEVANGERB, P.; VAN ZELDEREN-BHOLAB, S.L.; KLUIN-NELEMANS, H.C.; WILLEMZEA, R.; FALKENBURGA, J.H.F. Monitoring of engraftment and progression of acute lymphoblastic leukemia in individual NOD/SCID mice. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 29, n.3, p. 322–329, mar. 2001.

PENNA, S.P. **Níveis de glutathiona reuzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio.** 1995. 77f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

RADICH, J.P. The use of PCR technology for detecting minimal residual disease in patients with leukemia. **Reviews in Immunogenetics**, Copenhagen, v. 1, n. 2, p. 265-78, 1999.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, J. G. C. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the Amercian Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993.

ROY, M.K.; KUWABARA, Y.; HARA, K.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Peptides from N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2065-2074, sep. 2002.

RUSSO, A.; DEGRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; MITCHELL, J.B. Selective Modulation of Glutathione Levels in Human Normal versus Tumor Cells and Subsequent Differential Response to Chemotherapy Drugs. **Cancer Research**, Baltimore, v. 46, n.6, p. 2845-2848, jun. 1986.

SALTZMAN, A.; MUNRO, R.; SEARFOSS, G.; FRANKS, C.; JAYE, M.; IVASHCHENKO, Y. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation. **Experimental Cell Research**, New York, v. 242, n.1, p. 244-254, jul.1998.

SAMUELS, A.L.; PEEVA, V.K.; PAPA, R.A.; FIRTH, M.J.; FRANCIS, R.W.; BEESLEY, A.H.; LOCK, R.B.; KEES, U.R. Validation of a mouse xenograft model system for gene expression analysis of human acute lymphoblastic leukaemia. **BMC Genomics**, London, v.11, p.256, 2010.

SCHUSTER, N.; KRIEGLSTEIN, K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 307, n.1, p.1-14, jan. 2002.

SGARBIERI, V.C.; ZIEGLER, F.L.F.; CASTRO, G.A. Componentes do leite e sistema imune. In: ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos – Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

SIES, H.; AKERBOOM, T.P.M. Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 445-451, 1984.

SLOAN, A.E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2002.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAPBELL, T.W.; DE NICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

TSAI, W.Y.; CHANG, W.H.; CHEN, C.H.; LU, F.J. Enhancing effect of patented whey protein isolate (immunocal) on cytotoxicity of an anticancer drug. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 38, n. 2, p. 200-208, 2000.

TSUDA, H.; SEKINE, K.; NAKAMURA, J.; USHIDA, Y.; KUHARA, T.; TAKASUKA, N.; KIM, D.J.; ASAMOTO, M.; BABA-TORIYAMA, H.; MOORE, M.A.; NISHINO, H.; KAKIZOE, T. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 273-284, 1998.

UCKUN, F.M.; SATHER, H.; REAMAN, G.; SHUSTER, J.; LAND, V.; TRIGG, M.; GUNTHER, R.; CHELSTROM, L.; BLEYER, A.; GAYNON, P.; CRIST, W. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk b-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood: The Journal of Hematology**, New York, v.85, n.4, p.873-878, feb. 1995.

YOO, Y.C.; WATANABE, R.; KOIKE, Y.; MITOBE, M.; SHIMAZAKI, K.; WATANABE, S.; AZUMA, I. Apoptosis in Human Leukemic Cells Induced by Lactoferricin, a Bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 237, n.4, p. 624–628, feb.1997.

APÊNDICE 1: PROTOCOLO DE PESQUISA**1. IDENTIFICAÇÃO**

DATA: _____

Nome:	Prontuário:	Plano:
Data de Nascimento:	Idade:	
Nome do responsável pai:	Profissão:	
Nome do responsável mãe:	Profissão:	
Endereço:		
Cidade:	Estado:	Telefone:

2. HISTÓRIA FAMILIAR

Mãe:
Pai:
Irmãos:
Observações:

3. HISTÓRIA CLÍNICA

Data 1ª consulta:	1º diagnóstico:	
Data início quimioterapia:	Diagnóstico final:	Protocolo QT:
Outros Medicamentos em uso:		
Suplementos vitamínicos/minerais: () Sim () Não	Qual?	Tempo de uso:
Alergias alimentares:		
Vacina BCG? () Sim () Não		

3.1 REVISÃO SISTEMA DIGESTÓRIO

Consulta	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
Data			
Apetite	() Bom () Regular () Ruim	() Bom () Regular () Ruim	() Bom () Regular () Ruim
Dificuldade de mastigação	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Disfagia	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Odinofagia	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Náuseas	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Vômitos	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Pirose	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não
Flatulência	() Sim () Não	() Sim () Não	() Sim () Não

3.4 ATIVIDADE FÍSICA

Praticar atividade física? () Sim () Não	
Atividade realizada:	Local:
Frequência semanal:	

3.5 DISPONIBILIDADE PARA CONSUMO ALIMENTAR

Grupos de Alimentos	Diariamente	Semanal	Mensal	Nunca
Leite e derivados				
Carne e substitutos				
Leguminosas				
Pão e cereais				
Frutas				
Hortaliças (folhosas)				
Hortaliças (legumes)				
Óleos e substitutos				
Guloseimas*				

* Balas, chicletes, chocolates, sorvetes, refrigerantes, doces, salgadinhos, bolachas recheadas.

Nº de pessoas no domicílio: _____

Renda: _____

3.6 RECORDATÓRIO 24 HORAS – 1ª Consulta (DIAGNÓSTICO)

Refeição	Alimento/Preparação	Quantidade
<i>DESJEJUM</i> Horário:		
LANCHE Horário:		
ALMOÇO Horário:		
LANCHE Horário:		
JANTAR Horário:		
CEIA Horário:		

2º Consulta (30 dias)

Refeição	Alimento/Preparação	Quantidade
<i>DESJEJUM</i> Horário:		
LANCHE Horário:		
ALMOÇO Horário:		
LANCHE Horário:		
JANTAR Horário:		
CEIA Horário:		

3º Consulta (60 dias)

Refeição	Alimento/Preparação	Quantidade
<i>DESJEJUM</i> Horário:		
LANCHE Horário:		
ALMOÇO Horário:		
LANCHE Horário:		
JANTAR Horário:		
CEIA Horário:		

3.7 ESTIMATIVA DA INGESTÃO ALIMENTAR

Ingestão Alimentar	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
Data			
Energia (kcal)			
Recomendado DRI (2002) (kcal)			
Adequação DRI (2002) (%)			
Proteína (g/dia)			
Recomendado DRI (2002) (g/dia)			
Adequação DRI (2002) (%)			
Distribuição % dos Macronutrientes			
Proteína (%)			
Carboidratos (%)			
Gorduras (%)			
Ingestão Micronutrientes			
Minerais: Ca, Fe, Zn, Se			
Vitaminas: E e C			
Adequação DRI (2002) (%)			

3.8 EXAMES LABORATORIAIS

Exames	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
Data			
Proteínas séricas			
Albumina (g/dL)			
Pré-albumina (mg/dL)			
Glutaciona eritrocitária (g/dL)			
IgA salivar (mg/dL)			
Citocinas			
TNF- α (pg/mL)			
IL- 6(pg/mL)			
IL-10 (pg/mL)			
IFN- γ (pg/mL)			
TGF- β (pg/mL)			
IL- 8 (pg/mL)			

3.9 EXAMES LABORATORIAIS – HEMOGRAMA

Dados	Limites	T0	T1	T2
Data				
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) - WBC / GB	4,5 - 10,5 x $10^3/\text{mm}^3$			
% Linfócitos – LYM	20,5 - 51,1%			
% Monócitos – MON	1,7 - 9,3%			
% Granulócitos – GRA	42,2 - 75,2%			
LYM ($10^3/\text{mm}^3$ ou uL)	1,2 - 3,4 x $10^3/\text{mm}^3$			
MON ($10^3/\text{mm}^3$ ou uL)	0,1 - 0,6 x $10^3/\text{mm}^3$			
GRA ($10^3/\text{mm}^3$ ou uL)	1,4 - 6,5 x $10^3/\text{mm}^3$			
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$) - RBC/GV	4,0 - 6,0 x $10^6/\text{mm}^3$			
Hemoglobina (g/dL) – HGB	11,0 - 18,0 g/dL			
Hematócrito (%) - HCT	35,0 - 60,0 %			
Plaquetas (10^3 / uL)	150 – 450 x $10^3/\text{mm}^3$			
VGM / MCV(fL)	80 - 100 fL			
MCH (pg)	27 - 31 pg			
MCHC (g/dL)	33 -37 g/dL			
Dados Complementares				

VGM ou MCV = volume globular médio; MCH = hemoglobina globular média; MCHC = concentração de Hb globular média.

3.10 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DO SUPLEMENTO

Data	Suplemento ingerido?	Se não, por que?	Observações
D1	() 1ª dose () 2ª dose		
D2	() 1ª dose () 2ª dose		
D3	() 1ª dose () 2ª dose		
D4	() 1ª dose () 2ª dose		
D5	() 1ª dose () 2ª dose		
D6	() 1ª dose () 2ª dose		
D7	() 1ª dose () 2ª dose		
D8	() 1ª dose () 2ª dose		
D9	() 1ª dose () 2ª dose		
D10	() 1ª dose () 2ª dose		
D11	() 1ª dose () 2ª dose		
D12	() 1ª dose () 2ª dose		
D13	() 1ª dose () 2ª dose		
D14	() 1ª dose () 2ª dose		
D15	() 1ª dose () 2ª dose		
D16	() 1ª dose () 2ª dose		
D17	() 1ª dose () 2ª dose		
D18	() 1ª dose () 2ª dose		
D19	() 1ª dose () 2ª dose		
D20	() 1ª dose () 2ª dose		
D21	() 1ª dose () 2ª dose		
D22	() 1ª dose () 2ª dose		
D23	() 1ª dose () 2ª dose		
D24	() 1ª dose () 2ª dose		
D25	() 1ª dose () 2ª dose		
D26	() 1ª dose () 2ª dose		
D27	() 1ª dose () 2ª dose		
D28	() 1ª dose () 2ª dose		
D29	() 1ª dose () 2ª dose		
D30	() 1ª dose () 2ª dose		
D31	() 1ª dose () 2ª dose		
D32	() 1ª dose () 2ª dose		
D33	() 1ª dose () 2ª dose		
D34	() 1ª dose () 2ª dose		

AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DO SUPLEMENTO

Data	Suplemento ingerido?	Se não, por que?	Observações
D35	() 1ª dose () 2ª dose		
D36	() 1ª dose () 2ª dose		
D37	() 1ª dose () 2ª dose		
D38	() 1ª dose () 2ª dose		
D39	() 1ª dose () 2ª dose		
D40	() 1ª dose () 2ª dose		
D41	() 1ª dose () 2ª dose		
D42	() 1ª dose () 2ª dose		
D43	() 1ª dose () 2ª dose		
D44	() 1ª dose () 2ª dose		
D45	() 1ª dose () 2ª dose		
D46	() 1ª dose () 2ª dose		
D47	() 1ª dose () 2ª dose		
D48	() 1ª dose () 2ª dose		
D49	() 1ª dose () 2ª dose		
D50	() 1ª dose () 2ª dose		
D51	() 1ª dose () 2ª dose		
D52	() 1ª dose () 2ª dose		
D53	() 1ª dose () 2ª dose		
D54	() 1ª dose () 2ª dose		
D55	() 1ª dose () 2ª dose		
D56	() 1ª dose () 2ª dose		
D57	() 1ª dose () 2ª dose		
D58	() 1ª dose () 2ª dose		
D59	() 1ª dose () 2ª dose		
D60	() 1ª dose () 2ª dose		
	() 1ª dose () 2ª dose		
	() 1ª dose () 2ª dose		
	() 1ª dose () 2ª dose		
	() 1ª dose () 2ª dose		
	() 1ª dose () 2ª dose		

APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Os pesquisadores responsáveis por este projeto, através deste documento convidam os pacientes portadores de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) ou seus responsáveis a autorizarem a participação voluntária dos pacientes envolvidos no projeto em pauta segundo termos especificados a seguir.

Declaro, por livre e espontânea vontade, que consinto na participação de, _____, com idade de ____ anos e RH de nº _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de nº _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco com o paciente é _____, na pesquisa intitulada **“Suplementação com Proteínas do Soro de Leite Bovino em Pacientes Pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) nos Primeiros 60 dias do Tratamento Quimioterápico”**, projeto de tese de doutorado da aluna Fabiane La Flor Ziegler, promovido pelo Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sob orientação do Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

Espera-se que a suplementação nutricional com proteínas do soro de leite bovino possa minimizar os efeitos secundários decorrentes da quimioterapia, particularmente relacionados à mucosite. É importante salientar que essas proteínas, de origem alimentar, são de elevado valor nutritivo e apresentam efeitos comprovados de ação benéfica na proteção da mucosa e no estímulo do sistema de defesa do organismo animal e humano. O risco que o paciente estará correndo, em decorrência da ingestão dessas proteínas é muito baixo, bem como o seu desconforto, por se tratar de um componente natural do leite especialmente preparado para ingestão via oral e frequentemente consumido pela população pediátrica. Em caso de intolerância ou sintomas de alergia às proteínas do soro de leite a suplementação será imediatamente suspensa.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que meu/minha filho (a) vem recebendo.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional da área de nutrição;
- b) coleta de 15 mL de sangue para a realização de exames nos períodos estipulados (ao diagnóstico, 4^a e 8^a semana) e de 2-4 mL nas demais semanas para realização do hemograma (exame de rotina) ;
- c) coleta de 1,5 mL de saliva (ao diagnóstico, 4^a e 8^a semana);
- d) exames antropométricos (peso, altura, circunferências e pregas cutâneas);
- e) ingestão do suplemento nutricional que for proposto;
- f) orientações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a oferecer ao paciente em questão, o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir as orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia dos responsáveis pela pesquisa, de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida, acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar. É importante ressaltar que os participantes do projeto serão aleatoriamente distribuídos em dois grupos, dos quais um receberá o concentrado de proteínas do soro de leite e o outro grupo (placebo) receberá igual quantidade de um carboidrato (maltodextrina), inócua do ponto de vista fisiológico, servindo apenas como fonte calórica.

A pesquisadora Fabiane La Flor Ziegler será responsável por efetuar as análises bioquímicas e nutricionais constantes do projeto em material biológico coletado pelos encarregados do tratamento dos pacientes. O tratamento médico dos pacientes será de responsabilidade da equipe médica do Centro Infantil Boldrini. A médica Vitória Régia Pereira Pinheiro será a responsável pelo acompanhamento dos pacientes participantes dessa pesquisa.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Fabiane La Flor Ziegler (telefone 19 92879944): _____

Dr^a. Vitória R. P. Pinheiro - Médica (19 37875009): _____

Prof. Dr. Valdemiro Sgarbieri - Orientador (19 37884059): _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

APÊNDICE 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO DO CONTROLE

Os pesquisadores responsáveis pela pesquisa citada abaixo vêm através deste documento convidar crianças e adolescentes ou seus responsáveis a autorizarem a participação voluntária dos mesmos para fazerem parte de um grupo controle saudável que será comparado com os resultados dos pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

- **“Suplementação com Proteínas do Soro de Leite Bovino em Pacientes Pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) nas Fases da Quimioterapia de Indução e Consolidação”** projeto de doutorado da aluna Fabiane La Flor Ziegler, promovido pelo Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sob orientação do Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri.

Declaro, por livre e espontânea vontade, que consinto na participação de, _____, que se encontra sob responsabilidade de _____, com RG de nº _____, residente na _____, cujo grau de parentesco com a criança/adolescente é _____. Declaro ainda que recebi esclarecimentos quanto aos objetivos e procedimentos que serão utilizados durante a coleta, tendo a garantia dos responsáveis pela pesquisa, de receber resposta a qualquer pergunta.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação e que os dados obtidos serão mantidos em sigilo. Para participação será necessário jejum de 4 horas para coleta única de material biológico, tais como:

- a) coleta de 12 mL de sangue para a realização de análises bioquímicas (hemograma, glutatona, albumina, pré-albumina e análises imunológicas);
- b) coleta de 1,0mL de saliva para análise de imunoglobulina A.

A coleta do material biológico será realizada no ambulatório do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), pela enfermeira responsável.

A pesquisa não acarretará constrangimento algum para o participante, apenas o desconforto no momento inicial da coleta de sangue.

Os participantes terão como benefícios à sua saúde a entrega e explicação dos resultados bioquímicos analisados.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____

Fabiane La Flor Ziegler (19) 9287-9944: _____

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri (19) 35214059: _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

APÊNDICE 4: MANUAL DE INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



PESQUISA

“Suplementação com Proteínas do Soro de Leite Bovino em Pacientes Pediátricos com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) nos Primeiros 60 dias do Tratamento Quimioterápico”

MANUAL DE INSTRUÇÕES

Nome do paciente: _____ Idade: _____

Nome do(s) responsável (is): _____

Pesquisadores Responsáveis: Fabiane La Flor Ziegler

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

Colaboradores: Vitória Régia Pereira Pinheiro

Regina Maria H. de Mendonça

Wanélia V. A. Meira

Contatos da pesquisadora responsável: (19) 9287 9944 / 3521 4059
laflor@fea.unicamp.br

INSTRUÇÕES DE USO DO SUPLEMENTO

Estando de acordo com os procedimentos da pesquisa informado no Termo de Consentimento Livre Esclarecido, onde o paciente compromete-se a ingerir o suplemento fornecido pela pesquisadora responsável, segue as orientações de uso do mesmo, bem como orientações do acompanhamento da ingestão alimentar do paciente e do controle da ingestão do suplemento durante o período de suplementação.

Período de ingestão: _____ Data de início de uso: _____ Data do término: _____

Você deverá ingerir DOIS sachês DIARIAMENTE durante 60 dias.

Data: ____ Você esta recebendo ____ SACHÊS referentes ao período de __ semana (s).

Data: ____ Você esta recebendo ____ SACHÊS referentes ao período de __ semana (s).

Data: ____ Você esta recebendo ____ SACHÊS referentes ao período de __ semana (s).

Modo de uso:

1. Abra os sachês a serem usados no DIA, use o picote ou uma tesoura limpa e desinfetada.
2. Adicione TODO o conteúdo de cada sachê em vitamina de leite batido com frutas, sucos de frutas ou outras bebidas ou ainda na forma original de pó misturado a farinhas, cereais matinais, sopas, purês de frutas, mingaus, caldo tipo feijão ou outros tipos de alimentos, sempre respeitando a tolerância do paciente e a temperatura máxima de 50 °C (refeição deve ser ingerida morna), para não provocar a desnaturação (perda) das proteínas.
3. Deve-se misturar BEM o suplemento na preparação que você vai ingerir. NÃO USAR O LIQUIDIFICADOR e sim uma colher.
4. Os sachês devem ficar em lugar fresco e ventilado.
5. Se ainda em uso depois de abertos, os mesmos devem ficar armazenados sob refrigeração (geladeira). Lembrando que é importante ingerir o suplemento, PREFERENCIALMENTE, no horário que foi preparado, NÃO deixando o restante para depois.

Orientação:

1. Marcar ao lado de cada dia (Ex: D1, D10, D60) a respectiva data de ingestão.
2. Marcar com um X após a ingestão de cada dose (sachê) do suplemento para controle.
3. Quando da eventual impossibilidade da ingestão de uma das doses ou de ambas no decorrer do período de suplementação, anotar no(s) dia(s) correspondentes e justificar o motivo.

Quaisquer dúvidas e esclarecimentos acerca dos assuntos relacionados com a pesquisa e a suplementação devem ser realizados juntamente com a pesquisadora responsável.

CONTROLE DIÁRIO DA INGESTÃO DO SUPLEMENTO

Data	Suplemento ingerido?	Se não, por quê?	Observações
D1	() 1ª dose () 2ª dose		
D2	() 1ª dose () 2ª dose		
D3	() 1ª dose () 2ª dose		
D4	() 1ª dose () 2ª dose		
D5	() 1ª dose () 2ª dose		
D6	() 1ª dose () 2ª dose		
D7	() 1ª dose () 2ª dose		
D8	() 1ª dose () 2ª dose		
D9	() 1ª dose () 2ª dose		
D10	() 1ª dose () 2ª dose		
D11	() 1ª dose () 2ª dose		
D12	() 1ª dose () 2ª dose		
D13	() 1ª dose () 2ª dose		
D14	() 1ª dose () 2ª dose		
D15	() 1ª dose () 2ª dose		
D16	() 1ª dose () 2ª dose		
D17	() 1ª dose () 2ª dose		
D18	() 1ª dose () 2ª dose		
D19	() 1ª dose () 2ª dose		
D20	() 1ª dose () 2ª dose		
D21	() 1ª dose () 2ª dose		
D22	() 1ª dose () 2ª dose		
D23	() 1ª dose () 2ª dose		
D24	() 1ª dose () 2ª dose		
D25	() 1ª dose () 2ª dose		
D26	() 1ª dose () 2ª dose		
D27	() 1ª dose () 2ª dose		
D28	() 1ª dose () 2ª dose		

Data	Suplemento ingerido?	Se não, por quê?	Observações
D29	() 1ª dose () 2ª dose		
D30	() 1ª dose () 2ª dose		
D31	() 1ª dose () 2ª dose		
D32	() 1ª dose () 2ª dose		
D33	() 1ª dose () 2ª dose		
D34	() 1ª dose () 2ª dose		
D35	() 1ª dose () 2ª dose		
D36	() 1ª dose () 2ª dose		
D37	() 1ª dose () 2ª dose		
D38	() 1ª dose () 2ª dose		
D39	() 1ª dose () 2ª dose		
D40	() 1ª dose () 2ª dose		
D41	() 1ª dose () 2ª dose		
D42	() 1ª dose () 2ª dose		
D43	() 1ª dose () 2ª dose		
D44	() 1ª dose () 2ª dose		
D45	() 1ª dose () 2ª dose		
D46	() 1ª dose () 2ª dose		
D47	() 1ª dose () 2ª dose		
D48	() 1ª dose () 2ª dose		
D49	() 1ª dose () 2ª dose		
D50	() 1ª dose () 2ª dose		
D51	() 1ª dose () 2ª dose		
D52	() 1ª dose () 2ª dose		
D53	() 1ª dose () 2ª dose		
D54	() 1ª dose () 2ª dose		
D55	() 1ª dose () 2ª dose		
D56	() 1ª dose () 2ª dose		
D57	() 1ª dose () 2ª dose		
D58	() 1ª dose () 2ª dose		
D59	() 1ª dose () 2ª dose		
D60	() 1ª dose () 2ª dose		

APÊNDICE 5: ARTIGO DO ESTUDO PRELIMINAR DO DOUTORADO ENVIADO PARA REVISTA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – SBCTA

Partial chemical and functional characterization of milk whey products obtained by different processes

Fabiane La Flor ZIEGLER, Georgia Alvares CASTRO, Yara Maria Franco MORENO, Vanessa OYA, Maria Marluce dos Santos VILELA, Valdemiro Carlos SGARBIERI

Abstract

Whey protein samples (S-1 to S-5) were tested *in vivo* and *in vitro*, for nutritional properties and selected bioactivities. The *in vivo* studies used weanling male Wistar rats fed modified AIN-93G (12g protein/100g) diets for 21days. The nutritional parameters did not differ among the protein diets. Erythrocyte glutathione was high and superior for S-3, but liver glutathione was the same for all the dietary groups. For S-3, cytokine secretion (IL-10 and TNF- α) by human peripheral blood mononuclear cells (in RPMI-1640 medium) was higher in the absence of antigen than in the presence of BCG antigen. Interleukin-4 secretion was repressed in all treatments. The IC₅₀, the whey protein concentration required to inhibit 50% of the melanoma cell proliferation, was 2.68 mg/mL of culture medium for sample S-3 and 3.66mg/mL for S-2. Based on these results, it was concluded that S-3 (a whey protein concentrate enriched with TGF- β and lactoferrin) produced better nutritional and immunological responses than the other products tested.

Keywords: whey proteins, nutritive value, immune modulation, glutathione, cytokines.

APENDICE 6: RESUMOS ENVIADOS PARA CONGRESSOS

ZIEGLER, Fabiane La Flor; BERNARDI, Daniela; MONTEIRO, Karin; POSSENTI, Ana; CARVALHO, João Ernesto; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE MUCOSITE GASTROINTESTINAL INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUORURACILA EM RATOS WISTAR ADULTOS.** In: IV Congresso Brasileiro de Nutrição e Câncer (CBNC) e II International Conference of Nutritional Oncology (ICNO), 2010, São Paulo.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; BERNARDI, Daniela; MONTEIRO, Karin; POSSENTI, Ana; CARVALHO, João Ernesto; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO (WPC) ENRIQUECIDO COM TGF- β COMO POSSÍVEL PROTETOR DA MUCOSA GASTROINTESTINAL DE RATOS WISTAR TRATADOS COM 5-FLUORURACILA.** In: IV Congresso Brasileiro de Nutrição e Câncer (CBNC) e II International Conference of Nutritional Oncology (ICNO), 2010, São Paulo.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; AFONSO, Wanélia; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **PERFIL NUTRICIONAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) ADMITIDOS NO CENTRO INFANTIL BOLDRINI, CAMPINAS – SP.** In: IV Congresso Brasileiro de Nutrição e Câncer (CBNC) e II International Conference of Nutritional Oncology (ICNO), 2010, São Paulo.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; BERNARDI, Daniela; MONTEIRO, Karin; TINTI, Silene; POSSENTI, Ana; CARVALHO, João Ernesto; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **PROTECTION OF WHEY PROTEIN (WPC) OR CASEIN CONCENTRATES ON GASTROINTESTINAL MUCOSITE IN RAT TREATED WITH 5-FLUORURACIL.** In: International Congress of Nutrition - ICN, 2009, Bangkok.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; BERNARDI, Daniela; MONTEIRO, Karin; TINTI, Silene; POSSENTI, Ana; CARVALHO, João Ernesto; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **DEVELOPING A RAT MODEL FOR GASTROINTESTINAL MUCOSITE INDUCED BY CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS.** In: International Congress of Nutrition - ICN, 2009, Bangkok.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; FRANCHI, G.C; NOWILL, A.E; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **IMPACTO DE UM CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SORO DE LEITE BOVINO (WPC) SOBRE A EVOLUÇÃO DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES (NODSCID) INOCULADOS COM CÉLULAS LEUCÊMICAS HUMANAS.** In: XV Congreso Latinoamericano de Nutrición - SLAN, 2009, Santiago.

ZIEGLER, Fabiane La Flor; MORENO, Y.F.; CASTRO, G.; OYA, V.; VILELA, M.; WU, C.; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. **NUTRITIONAL, PHYSICO-CHEMICAL AND BIOACTIVITY CHARACTERIZATION OF WHEY PROTEIN PRODUCTS.** In: 10th European Nutrition Conference, 2007, Paris.

ANEXO 1: PRINCIPAIS CLASSES DE QUIMIOTERÁPICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. Novas drogas estão sendo permanentemente isoladas e aplicadas experimentalmente em modelos animais antes de serem usadas no homem.

ALQUILANTES

São compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Eles se ligam ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Apesar de efetivos como agentes isolados para inúmeras formas de câncer, eles raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes fase-específicos do ciclo celular. As principais drogas empregadas dessa categoria incluem a mostarda nitrogenada, a mostarda fenil-alanina, a ciclofosfamida, o bussulfam, as nitrosuréias, a cisplatina e o seu análogo carboplatina, e a ifosfamida.

ANTIMETABÓLITOS

Os antimetabólitos afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e função normais da célula. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas (como é a ação dos quimioterápicos 6-mercaptopurina e 6-tioguanina), à produção de ácido timidílico (5-fluoruracil e metotrexato) e a outras etapas da síntese de ácidos nucléicos (citosina-arabinosídeo C). Os antimetabólitos são particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S). A duração da vida das células tumorais suscetíveis determina a média de destruição destas células, as quais são impedidas de entrar em mitose pela ação dos agentes metabólicos que atuam na fase S.

ANTIBIÓTICOS

São um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal

variação, possuem em comum anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a conseqüente produção de radicais livres reativos. Podem apresentar outro grupo funcional que lhes acrescenta novos mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou inibição da função do DNA por intercalação (bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D e adriamicina e seus análogos mitroxantona e epirrubicina). Como todos os quimioterápicos, os antibióticos atuam tanto sobre as células normais como sobre as malignas. Por isso, também apresentam efeitos colaterais indesejáveis.

INIBIDORES MITÓTICOS

Os inibidores mitóticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular. Esta função tem sido útil na "sincronização" das células quando os inibidores mitóticos são combinados com agentes específicos da fase S do ciclo. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia. Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo).

OUTROS AGENTES

Algumas drogas não podem ser agrupadas em uma determinada classe de ação farmacológica. Entre elas, destacam-se a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas; a L-asparaginase, que hidrolisa a L-asparagina e impede a síntese proteica, utilizada no tratamento da leucemia linfocítica aguda. É necessário ressaltar que a quimioterapia antineoplásica requer, por sua complexidade, profissional devidamente capacitado para a sua indicação e aplicação. Ela deve ser empregada e supervisionada por especialista bem treinado nas áreas da oncologia médica e/ou pediátrica e que disponha de condições físicas e materiais adequadas para a sua administração.

Fonte: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101 Acesso em 15 mar 2008.

ANEXO 2: EFEITOS COLATERAIS DAS DROGAS USADAS NO PROTOCOLO NOPHO-AML 93

Citosina-Arabinosídeo Abreviação ARA-C. Quimioterápico classificado como antimetabólico (antagonista da pirimidina). Possíveis efeitos colaterais: 1. Acentuada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (moderado), 3. Mucosite, 4. Disfunção hepática, 5. Disfunção renal, 6. Colestase, 7. Leve Alopecia.

Doxorubicina Quimioterápico classificado como antibiótico antitumoral. Possíveis efeitos colaterais: 1. Acentuada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (moderado) 3. Disfunção hepática, 4. Disfunção cardíaca, 5. Acentuada alopecia.

Etoposídeo Abreviação VP-16. Quimioterápico classificado como inibidor mitótico. Possíveis efeitos colaterais: 1. Moderada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (leve), 3. Leve alopecia, 4. Disfunção hepática, 5. Disfunção renal. Efeitos colaterais raros: neuropatias periféricas, mucosites, febre, sensação de frio, cefaléia e colestase.

Metotrexato Quimioterápico classificado como antimetabólico (antagonista do ácido timidílico). Possíveis efeitos colaterais: 1. Moderada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (leve), 3. Mucosite, 4. Disfunção hepática, 5. Disfunção renal, 6. Disfunção neurológica.

Mitoxantrona Quimioterápico classificado como antibiótico antitumoral. Possíveis efeitos colaterais: 1. Moderada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (leve), 3. Necrose tecidual, 4. Anorexia, 5. Diarreia, 6. Leve alopecia, 7. Disfunção cardíaca, 8. Disfunção hepática, 9. Colestase.

6-Tioguanina Quimioterápico classificado como antimetabólico (antagonista das purinas). Possíveis efeitos colaterais: 1. Moderada citopenia, 2. Náuseas e vômitos (leve), 3. Disfunção hepática, 4. Colestase.

Fonte: CASCIATO DA. **Manual de oncologia clínica.** São Paulo: Tecmedd, p. 1054 - 1055, 2008.

ANEXO 3: ALEATORIZAÇÃO DOS PACIENTES

Foi realizado um processo de aleatorização exaustiva para alocar cada sujeito ao grupo Placebo ou Tratamento (Suplemento protéico), constituída de 5 passos.

- **Passo 1:** Aleatorização nos grupos (Número não aleatório)

Foram realizadas 1.000 aleatorizações de $n = 36$ subdivididos em dois grupos A e B, e foram numeradas de 1 a 1000.

- **Passo 2:** Número Aleatório 1

Após construir 1.000 aleatorizações, foi necessário definir qual aleatorização seria a escolhida para ser alocada aos sujeitos. Os números de 1 a 1.000 foram colocados em ordem aleatória.

- **Passo 3:** Escolha de 5 aleatorizações

Foram escolhidas 5 aleatorizações a partir de um número entre 1 a 1000, Considerando o número X, foram escolhidas as aleatorizações X-2, X -1, X , X +1, X +2.

- **Passo 4:** Número Aleatório 2

Foi sorteado novamente um número entre 1 e 1.000, que correspondeu ao número 913 (número aleatório 2 = 913). Portanto as aleatorizações escolhidas (número aleatório 2) foram as de 911, 912, 913, 914 e 915. Tais aleatorizações correspondem aos números aleatórios 1 presentes na tabela abaixo:

5 aleatorizações sorteadas (n. não aleatório)	N. aleatório 1
520	911
78	912
385	913
219	914
1	915

- **Passo 5:** Número Aleatório 3

Foi alocado as aleatorizações acima, os números de 1 a 5, e foi aleatorizado um número entre 1 e 5, sendo ele o número 4 (número aleatório 3 = 4).

5 aleatorizações sorteadas (n. não aleatório)	N. aleatório 1	Ordem
520	911	1
78	912	2
385	913	3
219	914	4
1	915	5

Portanto a aleatorização escolhida foi a correspondente a ordem 4, número aleatório 1 = 914 , portanto 219ª aleatorização.

ALEATORIZAÇÃO 219	
Ordem de Entrada no estudo	Grupo
1	B
2	B
3	A
4	A
5	B
6	A
7	B
8	B
9	B
10	B
11	A
12	A
13	B
14	A
15	A
16	A
17	A
18	B
19	A
20	B
21	A
22	A
23	A
24	A
25	B
26	B
27	B
28	A
29	B
30	A
31	B
32	B
33	A
34	B
35	A
36	B

ANEXO 4: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO BOLDRINI

14 02 08 09:27

Conselho Nacional De Saúd 61 3315 2414

p.1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PARECER Nº. 31/2008

Registro CONEP: 14097 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0002.0.144.000-07

Processo nº 25000.108553/2007-15

Projeto de Pesquisa: *“Suplemento com proteínas do soro de leite bovino em pacientes pediátricos com leucemia mielóide aguda (LMA) nas fases da quimioterapia de indução e consolidação”.*

Pesquisador Responsável: Dra. Fabiana La Flor Ziegler

CEP de origem: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini/Campinas/SP

Área Temática Especial: Novos Procedimentos/Cooperação Estrangeira

Patrocinador: CNPq/FAPESP

Sumário Geral do Protocolo

Este projeto visa avaliar a eficácia, contra efeitos deletérios da mucosite, de um concentrado protéico de soro de Leite Bovino Desidratado Associado ao Tratamento de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) pediátrica.

O suplemento protéico será administrado durante as fases de quimioterapia de indução e consolidação, por um período de 60 dias.

Na fase de indução o produto será aplicado paralelamente com a quimioterapia, fase em que os indivíduos ficarão internados com acompanhamento clínico nutricional. Com a utilização da quimioterapia e da suplementação espera-se beneficiar os indivíduos submetidos ao tratamento de LMA, particularmente no sentido de amenizar os efeitos secundários associados ao tratamento quimioterápico. Para tal, será realizado um estudo do tipo prospectivo, duplo cego com placebo controlado, onde serão avaliados 36 indivíduos portadores de LMA e virgens de terapia (divididos entre o grupo controle e o grupo suplementado), admitidos no Centro de Investigações Hematológicas Dr. Domingos Boldrini/Campinas/SP.

O aporte do suplemento protéico será de 50% dos valores estabelecidos pelas DRIs (*Dietary Reference Intakes*) e a administração será proporcionada em duas ou três doses diárias.

Comentários/Considerações

Consta descrito que a empresa Hilmar Ingredientes fará a doação do material (concentrado de proteínas de soro de leite bovino) para o Centro de Campinas sem nenhum custo para o Centro Infantil Boldrini.

Consta na Plataforma Lattes os currículos dos pesquisadores envolvidos.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 676/2007, relativo ao projeto em questão, cabem as seguintes considerações:

1. Esclarece que a Dra. Sílvia R. Brandalise é presidente do Centro Infantil Domingos Boldrini e também docente da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Informa que será desconsiderada da função de co-orientadora do estudo.

2. A pesquisadora informa que a Folha de Rosto foi compatibilizada com o restante do projeto, uma vez que no experimento será usado um grupo placebo. Entretanto pede-se que seja apresentada a referida Folha de Rosto devidamente alterada.

Cont. Parecer CONEP Nº31/2008.

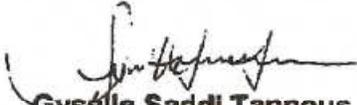
3. Apresenta orçamento detalhado quanto à fonte e destinação dos recursos, prevê o custo total de R\$72.300,00, que serão financiados pela FAPESP R\$27.800,00 e CNPq, R\$44.500,00. Informa que todo o tratamento oncológico dos indivíduos é de responsabilidade exclusiva do Centro Infantil Boldrini.
4. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a frase que sugeria indução ao sujeito em assinar o Termo foi reformulada pela informação de riscos e benefícios. A médica responsável pelo acompanhamento clínico dos sujeitos informa os métodos alternativos para diminuir os efeitos secundários da quimioterapia (mucosite). Foi acrescentada no documento a plena liberdade do sujeito em retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa e esta liberdade será enfatizada durante as entrevistas da pesquisadora com os sujeitos ou responsáveis pelos mesmos. Entretanto pede-se que o Termo seja apresentado em forma de convite à participação do sujeito no estudo.
5. Apresenta documentos da empresa "Hilmar Ingredients", atualizados e devidamente traduzidos.
6. A pesquisadora informa que "todo o tratamento oncológico e clínico dos sujeitos da pesquisa estará a cargo e responsabilidade do pessoal médico do Boldrini. A Dra. Vitória Régia Pereira Pinheiro é colaboradora no projeto e responsável pelo tratamento e acompanhamento dos sujeitos".

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação:

- Que o Comitê de Ética em Pesquisa verifique o atendimento, antes do início do estudo, das solicitações dos itens 2 e 4 deste parecer, com encaminhamento à CONEP das alterações feitas.

Situação: Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 13 de fevereiro de 2008.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO 5: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO ADENDO BOLDRINI



Centro Infantil
Boldrini

Campinas, 07 de junho de 2010.

Ilma. Sra.
Fabiane La Flor Ziegler

Prezada Senhora,

Informamos que seu adendo referente ao projeto intitulado **"SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA) NAS FASES DA QUIMIOTERAPIA DE INDUÇÃO E CONSOLIDAÇÃO"** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 28/05/2010.

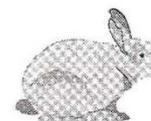
Informamos que a cada 6 meses, deverá ser apresentado um relatório parcial sobre o andamento da pesquisa em questão (formulário: acompanhamento das pesquisas; disponível no site: www.boldrini.org.br ou no L: público/ CEC/ CEP Formulários) ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini).

Solicitamos que, após a conclusão do estudo, o mesmo seja encaminhado à Secretaria do CEP /Boldrini e apresentado aos profissionais do Centro Infantil Boldrini.

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Cordialmente,


Prof. Dr. Sérgio Santos Muhlen
Coordenador do CEP/Boldrini

ANEXO 6: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEEA/Unicamp (Capítulo 3)

CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

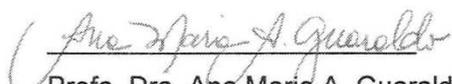
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1577-1, sobre "Modelo de mucosite oral e gastrintestinal induzida por quimioterápicos em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Prof. Dr. Valdomiro C. Sgarbieri / Karin Maia Monteiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 05 de agosto de 2008.

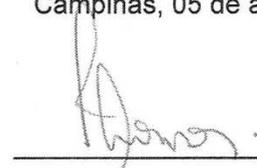
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1577-1, entitled "Chemotherapeutic-induced oral and gastrointestinal mucositis experimental model in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 5, 2008.

Campinas, 05 de agosto de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

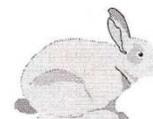


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CPQBA / UNICAMP
Nº 489, 08
Data 06.08.08

CEE/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 7: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEEA/Unicamp (Capítulo 3)

CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

CERTIFICADO

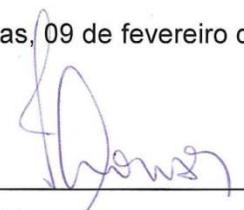
Certificamos que o Protocolo nº **1750-1**, sobre "**Avaliação da eficácia de um concentrado protéico de soro de leite bovino e de uma caseína comercial como possíveis protetores da mucosa gastrintestinal de ratos submetidos a quimioterápicos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri / Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Fabiane La Flor Ziegler**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em **09 de fevereiro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1750-1**, entitled "**Assessment of the efficacy of a bovine whey protein concentrate and a commercial casein as possible protectors of rats gastrointestinal mucosa submitted to chemotherapeutic drugs**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **February 9, 2009**.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009.


 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonço
 Secretária Executiva

CEE/Unicamp
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
 E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 8: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEEA/Unicamp (Capítulo 3)

CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

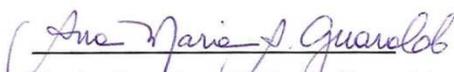
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1922-1**, sobre "**Avaliação do efeito da peletização da proteína do soro de leite e da caseína presentes na formulação da dieta AIN-93G e do estímulo imunológico com hemácias de carneiro sobre os níveis de glutolationa eritocitária e hepática de ratos Wistar**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri / Fabiane La Flor Ziegler**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **07 de agosto de 2009**.

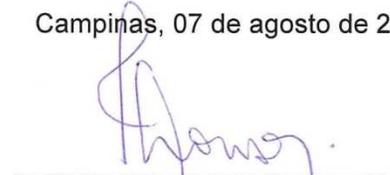
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1922-1**, entitled "**Evaluation of the effect of pelleting of the protein whey and casein in the formulation of the AIN-93G diet and immune stimulation with sheep erythrocytes on the levels of erythrocyte and liver glutathione in Wistar rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 7, 2009**.

Campinas, 07 de agosto de 2009.



 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
 Presidente



 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
 E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 9: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEEA/Unicamp (Capítulo 4)

CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

CERTIFICADO

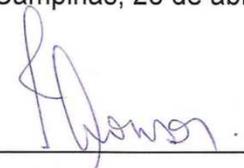
Certificamos que o Protocolo nº 1521-1, sobre "Impacto de um concentrado de proteínas de soro de leite bovino (WPC-TGFbeta) sobre camundongos imunodeficientes (Nod/Scid) inoculados com células leucêmicas humanas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri / Fabiane La Flor Ziegler, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 28 de abril de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1521-1, entitled "Impact of a bovine whey protein concentrated (WPC-TGFbeta) in immunodeficient mice (Nod/Scid) inoculated with human leukemia cells", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 28, 2008.

Campinas, 28 de abril de 2008.


 Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

