

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA CONCEIÇÃO DA SILVA

Protocolo clínico de 5-fluorouracil promove toxicidade em diferentes
níveis no fígado, rim e pulmão de ratos *Wistar*

MARIANA CONCEIÇÃO DA SILVA

Protocolo clínico de 5-fluorouracil promove toxicidade em diferentes níveis no fígado, rim e pulmão de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow

Maringá
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586p

Silva, Mariana Conceição da

Protocolo clínico de 5-fluorouracil promove toxicidade em diferentes níveis no fígado, rim e pulmão de ratos Wistar / Mariana Conceição da Silva. -- Maringá, PR, 2021.
50 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

1. Histologia. 2. Preparações farmacêuticas. 3. Quimioterápico. 4. Fluorouracil (5-FU). 5. Estresse Oxidativo. I. Buttow, Nilza Cristina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Morfológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 615.50724

MARIANA CONCEIÇÃO DA SILVA

Protocolo clínico de 5-fluorouracil promove toxicidade em diferentes níveis no fígado, rim e pulmão de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em: 28/07/2021

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow
(presidente)

Profa. Dra. Aline Mara dos Santos
(membro examinador externo - UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal
(membro examinador - UEM)

BIOGRAFIA

Mariana Conceição da Silva (Maringá, 7 de novembro de 1996), possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharel e Licenciatura) pelo Centro Universitário de Maringá (Unicesumar). É especialista em Biotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental (PBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e especialista em Docência no Ensino Superior pela Unicesumar.

Já foi estagiária por 1 ano e 4 meses em um laboratório comercial de análises biotecnológicas, participou como monitora no projeto “espaço segundo cérebro: da produção à popularização do conhecimento do sistema nervoso” no Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI) da UEM e do projeto de ensino de histotécnica no Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) da mesma instituição. Além disso, já teve experiência como professora de ciências pelo Processo Seletivo Simplificado (PSS) do Paraná.

Atualmente estuda como mestranda no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PBC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Possui experiência com o manejo de animais de experimentação, técnicas histológicas e bioquímicas realizadas em laboratório. Apresenta 1 publicação relacionada a área da experimentação animal e o quimioterápico 5-Fluorouracil e publicações de resumos em anais de eventos científicos. Participou de uma série de congressos relacionados à sua área de pesquisa na pós-graduação, tais como: I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia; I Congresso Acadêmico Beneficente de Oncologia e Hematologia (CABOH); Congresso Interligas de Ciência e Saúde (CICS); I Congresso Nacional de Residências em Saúde.

AGRADECIMENTOS

A Deus, base e refugio em cada segundo da minha vida. A minha mãe, Solange, pessoa mais importante da minha vida, minha fonte de motivação, sabedoria e apoio em todos os sentidos. Ao meu pai, Edinaldo por me ajudar a seguir com meu sonho e me dar suporte financeiro e emocional para que eu conseguisse chegar até aqui. Aos meus irmãos, Guilherme, Maria Rita, Manuela e Melissa, meus combustíveis de alegria, amor e carinho. As minhas tias, Alice, Rosangela e Ângela, que acompanharam cada etapa da minha vida contribuindo sempre com orações e apoio emocional. E também ao meu namorado Ivan e amigos, que me motivaram diariamente e me apoiaram em cada decisão.

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra. Nilza Cristina Buttow, que me serve de inspiração por ser uma mulher muito capacitada e eficiente em seu trabalho, me ensinou com excelência em cada etapa da pesquisa e ajudou muito com meu desenvolvimento pessoal. Agradeço também a todos que contribuíram com a construção dos meus conhecimentos e me apoiaram até aqui, Camila, Stephanie, Maria Ângela, Ana Paula, Silvia, Carmen e todos os professores. Ao meu grupo de pesquisa, Lilian, Karile e Pedro, muito obrigada por tudo, com vocês tudo se tornou mais especial, foram essenciais na minha vida e com certeza vou jamais ir esquecer vocês.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e aos integrantes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC), por me proporcionarem todo aprendizado e suporte nesta etapa. Também agradeço aos membros titulares e suplentes dessa banca por aceitarem o convite e contribuírem com o enriquecimento deste estudo.

Finalmente, deixo aqui o meu agradecimento a CAPES, órgão de fomento que viabilizou a execução deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas da revista *Journal of Molecular Biology* (disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-biology/>).

RESUMO GERAL

O câncer é uma das enfermidades que mais mata no mundo. Visando solucionar ou reduzir os impactos dessa doença, diversas formas terapêuticas foram desenvolvidas ao longo dos anos. Entre elas estão as intervenções cirúrgicas, a radioterapia, a imunoterapia e a quimioterapia. Atualmente, a quimioterapia se destaca por sua eficácia no controle da disseminação de vários tipos de tumores e com melhores progressos na qualidade de vida dos pacientes. Logo, em meio aos quimioterápicos, temos como destaque o fármaco 5-fluorouracil (5-FU). Este medicamento tem baixo custo e é muito utilizado para o tratamento de cânceres sólidos. No entanto, apesar do seu custo e benefício, na maioria das vezes, a sua citotoxicidade é relatada como alta. Por este motivo, vários pacientes sofrem por apresentarem efeitos colaterais acentuados fazendo com que o tratamento com o 5-FU, muitas vezes, tenha que ser interrompido. As alterações responsáveis pelas reações adversas com o protocolo clínico do 5-FU são pouco esclarecidas em órgãos importantes e bastante sensíveis a medicamentos como o fígado, rim e pulmão. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamentoclínico do 5-FU sobre o estresse oxidativo, inflamação e morfologia do fígado, rim e pulmão de ratos sem o câncer. Foram utilizados 14 ratos *Wistar* machos divididos em grupo tratado e grupo controle. A administração do 5-FU nos ratos do grupo tratado foi realizada por via intraperitoneal seguindo o protocolo clínico indicado pelo fabricante, ou seja, 15 mg/kg durante 4 dias consecutivos, redução da dose para 6 mg/kg durante 4 dias alternados e no 14º dia 15 mg/kg. No 15º dia, os ratos foram eutanasiados e o fígado, rim e pulmão foram coletados para a realização das análises histológicas e bioquímicas da atividade enzimática da Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione S-transferase, Mieloperoxidase e N-acetil-glicosaminidase, e dos níveis de Glutathione Reduzida, Hidroperóxidos Lipídicos, Óxido Nítrico e interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10). O sangue foi coletado para a quantificação de AST, ALT, ureia, creatinina e ácido úrico. Os resultados demonstraram que o 5-FU promoveu redução na atividade das enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione S-transferase no pulmão e fígado, aumento da Catalase e Superóxido Dismutase no rim e redução do Glutathione Reduzida nos três órgãos avaliados. Os Hidroperóxidos Lipídicos foram elevados apenas no fígado e pulmão, caracterizando uma lesão por Estresse Oxidativo. O 5-FU reduziu a atividade dos marcadores inflamatórios enzimáticos (Mieloperoxidase e N-acetil-glicosaminidase) no rim, mas no fígado e pulmão estes aumentaram, indicando que houve um aumento da resposta inflamatória nestes órgão. As análises histológicas do fígado, rim e pulmão demonstraram alterações morfológicas. As análises dos parâmetros bioquímicos funcionais mostraram aumento nos níveis plasmáticos de ureia, ácido úrico e AST. Assim, o presente estudo revela que o tratamento clínico do 5-FU em ratos promove toxicidade em nível celular e bioquímico de tecidos saudáveis com alterações mais evidentes, como Estresse Oxidativo, aumento da resposta inflamatória e alterações morfológicas, no fígado e pulmão. No rim, este tratamento levou a alterações morfológicas, nos parâmetros funcionais séricos e de Estresse Oxidativo. Ou seja, tais órgão merecem mais atenção no quesito proteção, quando um paciente é tratado com o protocolo clínico do 5-FU. A administração de protetores específicos para estas alterações evitariam vários efeitos indesejáveis e a interrupção do tratamento, além de melhorar a qualidade de vida do paciente.

PALAVRAS-CHAVE: Histologia; Quimioterápico; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Cancer is a disease that kills the most in the world. Aiming to reduce the mortality rate, several therapeutic forms have been developed over the years to try to solve or reduce the impacts of this disease. Among them are surgical interventions, radiotherapy, immunotherapy and chemotherapy. Currently, chemotherapy stand out for its effectiveness in controlling the spread of various types of tumors and better progress in the quality of life of patients. Therefore, among chemotherapeutics, we have the drug 5-fluorouracil (5-FU) as a highlight. This medicine is low cost and is widely used for treating solid cancers. However, despite its cost and benefit, in most cases its cytotoxicity is reported as high. For this reason, many patients suffer from severe side effects, making treatment with 5-FU often must be discontinued. The changes responsible for adverse reactions with the clinical protocol of 5-FU are poorly understood in important organs and are sensitive to drugs such as liver, kidney and lung. Thus, this study evaluated the effects of clinical treatment of 5-FU on oxidative stress, inflammation and liver, kidney and lung morphology in rats without cancer. Fourteen male Wistar rats were divided into treated and control groups. The administration of 5-FU in rats in the treated group was performed intraperitoneally following the clinical protocol indicated by the manufacturer, that is, 15 mg/kg for 4 consecutive days, dose reduction to 6 mg/kg for 4 alternate days and on 14th day 15 mg/kg. On the 15th day, the rats were euthanized and liver, kidney and lung were collected for histological and biochemical analysis of the enzymatic activity of catalase, Superoxide dismutase, glutathione S-transferase, Myeloperoxidase and N-acetyl-glucosaminidase, and the levels of Reduced Glutathione, Lipid Hydroperoxides, Nitric Oxide and interleukins (IL-1 β , IL-6 and IL-10). Blood was collected for the quantification of AST, ALT, urea, creatinine and uric acid. The results showed that 5-FU promoted a reduction in the activity of the enzymes Superoxide Dismutase, catalase and glutathione S-transferase in lung and liver, increased catalase and Superoxide dismutase in the kidney and reduced glutathione in the three organs evaluated. Lipid hydroperoxides were elevated only in the liver and lung, characterizing an oxidative stress lesion. 5-FU reduced the activity of enzymatic inflammatory markers (Myeloperoxidase and N-acetyl-glucosaminidase) in the kidney, but in the liver and lung they increased, indicating that there was an increase in the inflammatory response in these organs. Histological analysis of the liver, kidney and lung showed morphological alterations. Analysis of functional biochemical parameters showed increased plasma levels of urea, uric acid and AST. Thus, this study reveals that the clinical treatment of 5-FU in rats promotes toxicity at the cellular and biochemical level of healthy tissues with more evident alterations, such as oxidative stress, increased inflammatory response and morphological alterations, in the liver and lung. In the kidney, this treatment led to morphological changes and serum functional parameters and in Oxidative Stress. In other words, such organs deserve more attention in terms of protection, when a patient is treated with the 5-FU clinical protocol. The administration of specific protectors for these changes would prevent several undesirable effects and treatment interruption, in addition to improving the patient's quality of life.

KEYWORDS: Histology; Chemotherapy; Oxidative Stress.

**PROTOCOLO CLÍNICO DE 5-FLUOROURACIL
PROMOVE TOXICIDADE EM DIFERENTES NÍVEIS
NO FÍGADO, RIM E PULMÃO DE RATOS *WISTAR***

Mariana Conceição da Silva¹, Karile Cristina da Costa², Lilian Catarim Fabiano², Pedro Luiz Zonta de Freitas², Camila Quaglio Neves¹, Stephanie Carvalho Borges³, Ana Cristina Breithaupt Faloppa⁴, Nilza Cristina Buttow⁵.

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos do tratamento clínico do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) sobre parâmetros histológicos, oxidativos e inflamatórios do fígado, rim e pulmão de ratos sem câncer. Para isso, 14 ratos *Wistar* machos foram separados em grupo Tratado e Controle. O 5-FU foi administrado com 15 mg/kg (4 dias consecutivos), 6 mg/kg (4 dias alternados) e 15 mg/kg no 14º dia. No 15º dia, amostras de sangue, fígado, rim e pulmão foram coletados para avaliações bioquímicas e histológicas. Houve aumento significativo nos marcadores séricos (Aspartato Aminotransferase, ureia, e ácido úrico) no grupo Tratado comparado ao Controle. O 5-FU promoveu alterações em parâmetros para estresse oxidativo nos três órgãos. No fígado e pulmão do grupo Tratado houve aumento dos Hidroperóxidos Lipídicos e redução de antioxidantes endógenos, como Glutathione reduzida e Catalase. Nos rins tratados houve redução dos Hidroperóxidos Lipídicos e Glutathione reduzida, e aumento da Catalase, Superóxido dismutase e Glutathione S-transferase. Os marcadores inflamatórios Mieloperoxidase, N-acetil-glicosaminidase e Óxido nítrico

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

² Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

³ Pós-Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

⁴ Pesquisadora do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

⁵ Orientadora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Endereço para correspondência: Prof^a. Dr^a. Nilza Cristina Buttow. Departamento de Ciências morfológicas / UEM. Av. Colombo 5790, bloco H79 sala 105 A, CEP: 87020-900 - Maringá, PR. Tel: +55-44-3011-4705. e-mail: ncbuttow@uem.br.

aumentaram significativamente no fígado e pulmão dos ratos tratados comparados aos controles. Nos rins tratados houve redução da atividade da Mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase comparados ao controle. As análises histológicas do fígado, rim e pulmão demonstraram alterações. Portanto, o tratamento seguindo o protocolo clínico do 5-FU promove estresse oxidativo e inflamação no fígado e pulmão e alterações histológicas nos três órgãos. Portanto, administrar protetores específicos para estas alterações do fígado, rim e pulmão evitariam vários efeitos indesejáveis, a interrupção do tratamento e melhoraria a qualidade de vida do paciente.

Palavras-chave: Citocinas; Histologia; Neoplasias; Efeitos adversos; Estresse oxidativo.

ABREVIações

5-FU, 5-fluorouracil; CAT, Catalase; SOD, Superóxido Dismutase; GST, Glutathione S-transferase; GSH, Glutathione Reduzida; LOOH, Hidroperóxidos Lipídicos; MPO, Mieloperoxidase; NAG, N-acetilglicosaminidase; ON, Oxido Nítrico; IL-1 β , Interleucina 1 β ; IL-6, Interleucina 6; IL-10, Interleucina 10; EO, Estresse Oxidativo; AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; DVO, Doença Venoso-oclusiva; CCR, Câncer Colorretal; TCP, Túbulos Contorcidos Proximais; TCD, Túbulos Contorcidos Distais; TS, Timidilato Sintase; DPD, Dihidropirimidina Desidrogenase; DHFU, Dihidrofluorouracil; 5-FUH₂, 5-fluoro-5,6-dihidrouracil; FUPA, Fluoro-beta-ureidopropionato; FBAL, Fluoro-beta-alanina; O₂⁻, Radical Superóxido; H₂O₂, Peróxido de Hidrogênio; OH, Radical Hidroxila.

1- INTRODUÇÃO

O câncer encontra-se entre uma das principais causas de óbito na população mundial, conseqüentemente é um grande problema para a saúde pública [1,2]. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de buscar as melhores formas de tratamento ou até mesmo a cura desta doença. Algumas formas tem grande limitação devido ao

alto custo e disponibilidade, já outras ganham destaque por seu baixo custo e eficiência, como por exemplo, o 5-fluorouracil (5-FU) [3,4].

Ao longo dos anos, a Organização Mundial da Saúde [5] vem inserindo o 5-FU na lista dos medicamentos mais importantes e necessários em um sistema básico de saúde. Ele é amplamente utilizado em tratamentos para cânceres sólidos, em especial o câncer colorretal (CCR), que apresenta uma das maiores taxas de incidência e mortalidade entre todos os cânceres [6,7]. A maior parte do 5-FU é catabolizada (degradação) na presença da enzima Dihidropirimidina Desidrogenase (DPD) [7]. No entanto, o mecanismo de ação deste fármaco se destaca pelas reações de anabolismo (síntese) que geram seus metabolitos ativos. As moléculas de 5-FU podem ser convertidas em três metabólitos ativos: Monofosfato de fluoro-desoxiuridina (FdUMP); Fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP); Trifosfato de fluorouridina (FUTP). Estes se ligam aos substratos nucleotídicos das células levando-as a alterações no processamento e funcionamento do material genético (DNA e RNA) e por consequência a morte celular programada (Fig. 1) [6,8–10]. Outra propriedade quimioterápica deste fármaco é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial [11] que amplia os seus efeitos.

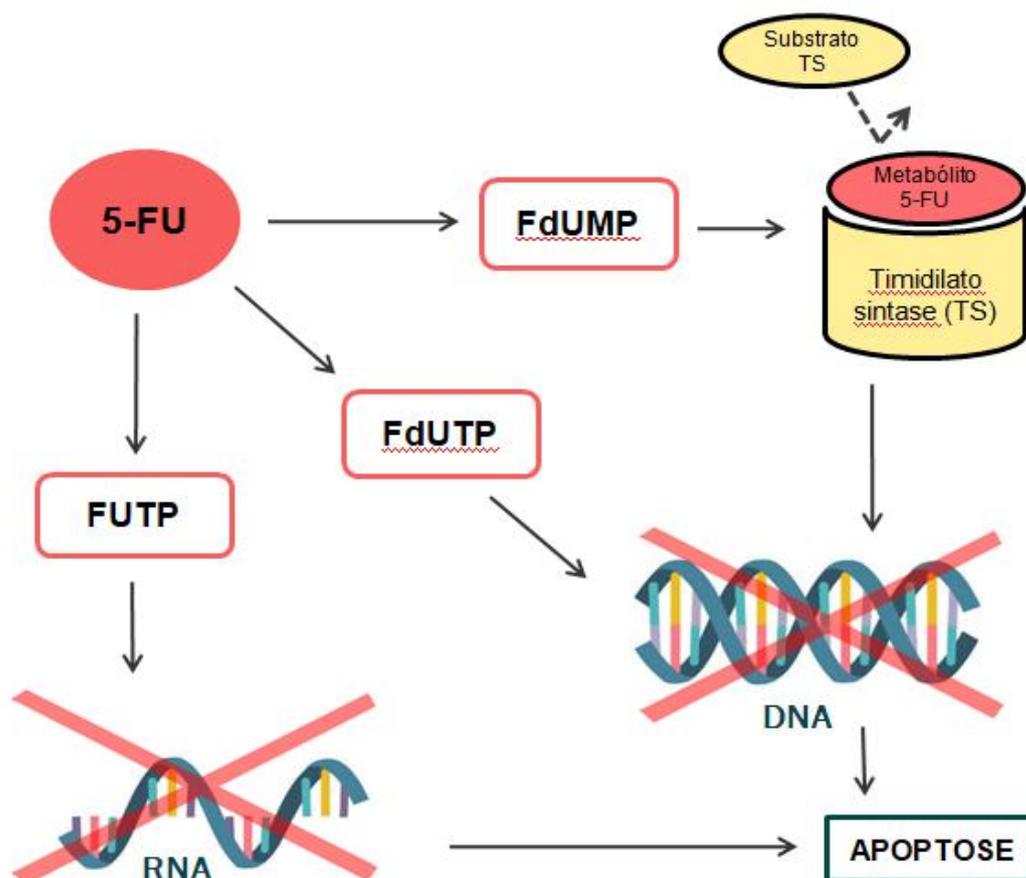


Fig. 1. O FdUMP se liga na enzima Timidilato Sintase (TS) no lugar do seu substrato normal e com isso bloqueia a sua ação de forma irreversível. A TS esta envolvida na produção de componentes básicos das pirimidinas (citosina, timina e uracila) e o seu bloqueio leva a falha na síntese do material genético e, conseqüentemente, a célula morre. Os outros dois metabólitos ativos do 5-FU podem se ligar diretamente ao material genético no lugar de pirimidinas. O FdUTP pode se incorporar diretamente ao DNA e o FUTP pode se incorporar diretamente ao RNA.

Assim como a maioria dos quimioterápicos, a ação do 5-FU não afeta somente as células tumorais [12]. Portanto, tecidos saudáveis também são bastante atingidos pela toxicidade desta droga, ocasionando uma série de efeitos colaterais que podem levar a suspensão do uso comprometendo assim a eficiência do tratamento [13]. A maior parte dos estudos publicados mostram estes efeitos relacionados apenas com sistemas constituídos por células altamente proliferativas, assim como as células neoplásicas [14–16]. No entanto, órgãos vitais constituídos por células com baixa taxa de proliferação como o fígado, rim e pulmão estão constantemente em contato e processando os metabólitos do 5-FU presentes no sangue [17] podendo também ser

afetados. Efeitos colaterais como a doença veno-oclusiva (DVO) [18], hepatite, esteatose, esteatohepatite [19], nefropatia [20] e dor torácica [21], são patologias que acometem os pacientes após o uso do 5-FU. Estes sintomas podem estar relacionados a possíveis alterações bioquímicas no fígado, rim e pulmão, como por exemplo, estresse oxidativo (EO), inflamação [22–25] e alterações morfológicas. O conhecimento do conjunto de alterações nos diferentes órgãos pode auxiliar na busca de drogas que possam amenizar os efeitos colaterais deste fármaco.

Além da dosagem adequada, o tratamento com o 5-FU precisa ser realizado em ciclos periódicos, e os intervalos entre o tratamento permitem a recuperação dos tecidos saudáveis [26]. No caso do 5-FU, um ciclo de quimioterapia equivale a várias dosagens do medicamento aplicadas em dias alternados em aproximadamente duas semanas [15]. Porém, pesquisas realizadas com o 5-FU em modelos animais, na maioria das vezes, utilizam doses únicas e altas, diferente do que acontece no tratamento oncológico em humanos [15]. Por isto, neste estudo, foi administrada a dosagem de 5-FU utilizada na prática clínica, como sugerida pelo fabricante.

Portanto, dado a popularidade clínica do 5-FU e a gama de efeitos adversos relacionados que limitam o seu uso para alguns pacientes, e considerando que estudos sobre os efeitos deste fármaco no fígado, rim e pulmão não são frequentes e são pouco esclarecidos. Este estudo teve como objetivo compreender os efeitos adversos do tratamento clínico padrão com o 5-FU no fígado, rim e pulmão de ratos sem o câncer, a partir de análises sobre os parâmetros oxidativos, inflamatórios, funcionais e histológicos destes órgãos. Tais achados apresentam grande relevância para fornecer subsídios na busca de novos fármacos visando à realização de tratamento adjuvante e com isso a melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

2- RESULTADOS

2.1 Pesos e Análises histológicas dos órgãos

O peso relativo do fígado não apresentou diferença significativa entre os grupos. A área do perfil celular, do núcleo dos hepatócitos e o diâmetro dos

capilares sinusóides aumentaram significativamente no grupo 5-FU quando comparado com o controle (Tabela 1). Na tabela 2 é mostrada a avaliação semiquantitativa da histologia do fígado, onde a esteatose (Fig. 2B) foi classificada na maioria dos animais como grau 3 (71,4%) no grupo dos ratos tratados com o 5-FU, em comparação, todos os animais controles que foram classificados como grau 1. Cerca de 15% dos ratos tratados foram classificados com infiltrado inflamatório portal (Fig. 2C) de grau 3, 70% de grau 2, 14% de grau 1 e nenhum de grau 0, comparados a 0% dos animais controle com grau 3, 28% com grau 2, 43% com grau 1 e 29% com grau 0. Já a inflamação lobular (Fig. 2D) foi classificada predominantemente entre os graus 1 e 2 no grupo tratado, e 85,7% em grau 1 no grupo controle (Tabela 2).

Em relação ao rim, não foi possível observar diferença significativa no peso relativo entre os grupos (Tabela 1). Observou-se o aumento significativo nos parâmetros do corpúsculo renal (área do corpúsculo, área da camada visceral e do espaço de Bowman) nos ratostratados com o 5-FU. A densidade de corpúsculos renais por mm² reduziu significativamente no grupo 5-FU comparado ao controle. O tratamento clínico com o 5-FU não alterou significativamente os parâmetros dos túbulos contorcidos proximais (TCP), mas aumentou a área externa, área interna e espessura dos túbulos contorcidos distais (TCD) nos ratostratados quando comparados aos sem o tratamento (Fig. 3A-B) (Tabela 1).

O peso relativo do pulmão foi significativamente maior no grupo tratado, comparado ao grupo controle. A quantificação dos colágenos de tipo I, III e total (Fig. 4A-B) foram significativamente menores nos ratos tratados com o quimioterápico. Foi observado aumento significativo no número de focos hemorrágicos (Fig. 5B-C) por mm² do tecido pulmonar, além do aumento de infiltrados focais perivasculares (Fig. 5B-D) e infiltrados difusos no parênquima pulmonar (Fig. 5B-E) dos ratos tratados comparados ao sem tratamento (Tabela 1).

Tabela 1: Análises do peso relativo e histologia do fígado, rim e pulmão dos ratos nos grupos estudados.

	Análise	C	5-FU	Valor de p
Fígado	Peso relativo fígado (%)	3,803 ± 0,1355	4,241 ± 0,1904	0,0851
	Diâmetro sinusóides (µm ²)	5,562 ± 0,0734	6,022 ± 0,0975	0,0027*
	Área núcleo (µm ²)	34,74 ± 0,8656	38,21 ± 0,7748	0,0113*
	Área do hepatócito (µm ²)	224,2 ± 4,641	261,4 ± 3,727	<0,0001*
Rim	Peso relativo rim (%)	0,8786 ± 0,0331	0,9214 ± 0,0191	0,2834
	Área do corpúsculo (µm ²)	5674 ± 179,2	6959 ± 232,8	0,0009*
	Área da camada visceral (µm ²)	4302 ± 173,7	5052 ± 179,7	0,0111*
	Espaço de Bowman (µm ²)	1372 ± 54,9	1907 ± 98,12	0,0005*
	Número de corpúsculos (mm ²)	126 ± 1,976	107,7 ± 2,032	<0,0001*
	Área externa TCP (µm ²)	13,15 ± 0,3372	14,3 ± 0,5622	0,1036
	Área interna TCP (µm ²)	3,229 ± 0,121	3,428 ± 0,2261	0,4524
	Espessura TCP (µm ²)	9,92 ± 0,2286	10,88 ± 0,3859	0,0545
	Área externa TCD (µm ²)	9,40 ± 8,405 - 9,524	10,31 ± 9,783 - 10,84	0,0006*
	Área interna TCD (µm ²)	3,102 ± 0,1058	3,456 ± 0,1027	0,0334*
	Espessura TCD (µm ²)	5,862 ± 0,1464	6,857 ± 0,1495	0,0005*
Pulmão	Peso relativo pulmão (%)	0,57 ± 0,0377	0,8043 ± 0,0277	0,0003*
	Colágeno tipo I (%/área)	28616 ± 2325	13718 ± 813,2	<0,0001*
	Colágeno tipo III (%/área)	9677 ± 1115	3872 ± 300,4	0,0003*
	Colágeno total (%/área)	37813 ± 2566	18175 ± 906,1	<0,0001*
	Foco hemorrágico (mm ²)	0 ± 0	39,99 ± 13,55	0,0121*
	Infiltrado focal perivascular (mm ²)	202,1 ± 77,22	1342 ± 383,1	0,0129*
	Infiltrado difuso no parênquima (mm ²)	13,57 ± - 6,18 - 33,33	82,07 ± 26,25 - 137,9	0,0105*

C – grupo controle; 5-FU – grupo tratado; TCP - Túbulos Contorcidos Proximais; TCD - Túbulos Contorcidos Distais. Dados expressos em média ± erro padrão (paramétricos) e mediana ± limite inferior – limite superior (não paramétricos), n=7. * $p < 0,05$.

Tabela 2: Avaliação geral semiquantitativa do tecido hepático dos ratos nos grupos estudados.

	Descrição	Score	Resultados (n=7)	
			C	5-FU
Esteatose	0-33% dos lóbulos	1 (leve)	100%	0%
	34-66% dos lóbulos	2 (moderado)	0%	28,6%
	>66% dos lóbulos	3 (severo)	0%	71,4%
Infiltrado	Ausente	0	28,6%	0%

inflamatório	Foco em 1/3 dos tratos portais	1 (leve)	42,9%	14,2%
portal	Foco em >1/3 e <2/3 dos tratos portais	2 (moderado)	28,5%	71,4%
	Foco em \geq 2/3 dos tratos portais	3 (severo)	0%	14,3%
Infiltrado	Ausente	0	14,3%	0%
inflamatório	<2 focos por campo	1 (leve)	85,7%	57,1%
lobular	2-4 focos por campo	2 (moderado)	0%	42,9%
	> 4 focos por campo	3 (severo)	0%	0%

C – grupo controle; 5-FU – grupo tratado.

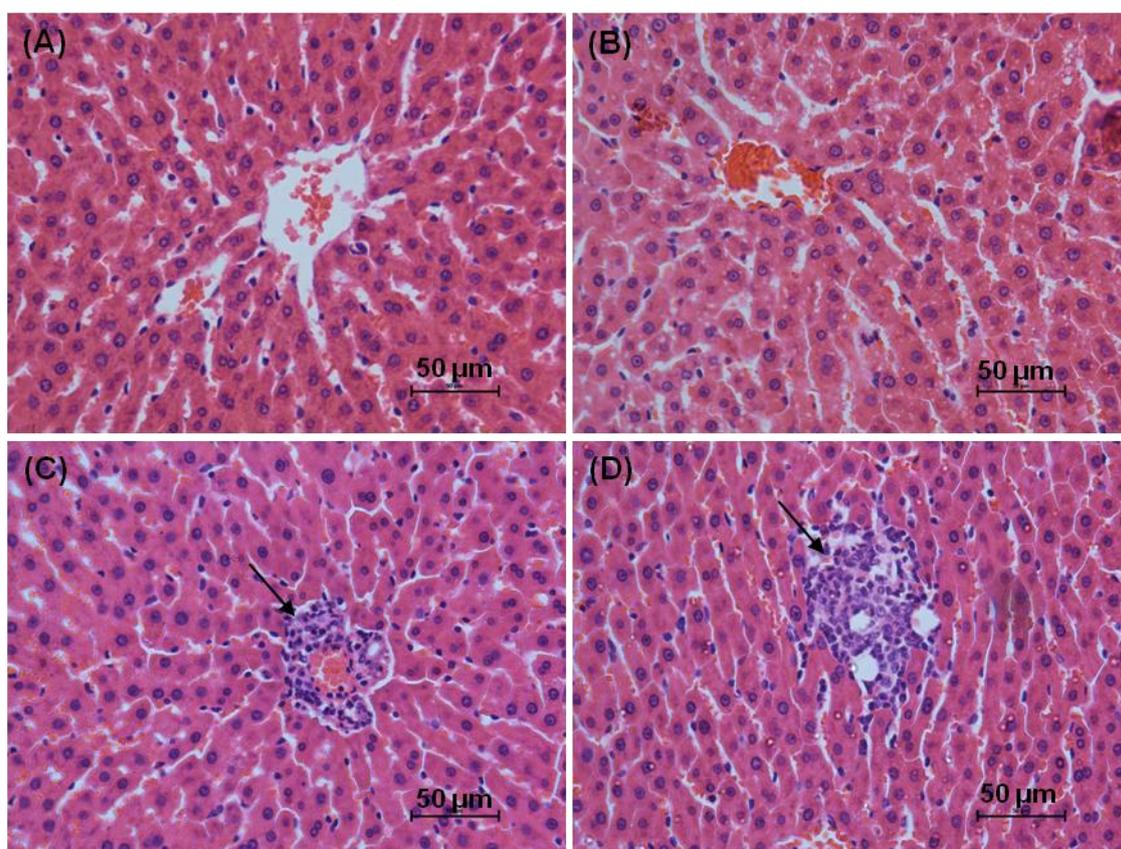


Fig. 2. Fotomicrografias do tecido hepático de ratos nos grupos estudados, obtidas com objetiva de 40X, coradas com HE. (A) região centrolobular sem esteatose, grupo controle. (B) região centrolobular com esteatose, grupo tratado com o protocolo clínico do 5-FU. (C) região portal com infiltrado de células inflamatórias, grupo tratado com o protocolo clínico do 5-FU. (D) região centrolobular com infiltrado de células inflamatórias, grupo tratado com o protocolo clínico do 5-FU. Foco de células inflamatórias (seta).

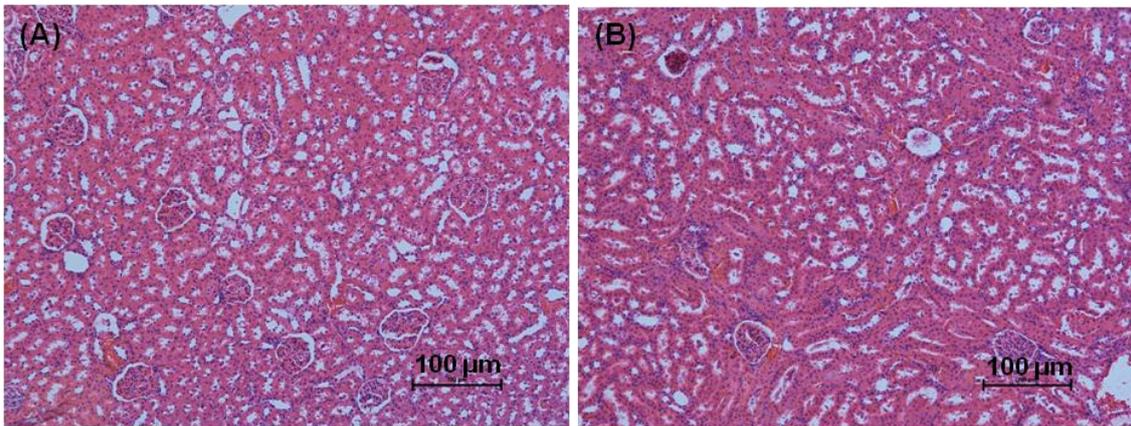


Fig. 3. Fotomicrografias do tecido renal de ratos nos grupos estudados, obtidas com objetiva de 20X, coradas com HE (A e B). (A) grupo controle, (B) grupo tratado com o protocolo clínico do 5-FU.

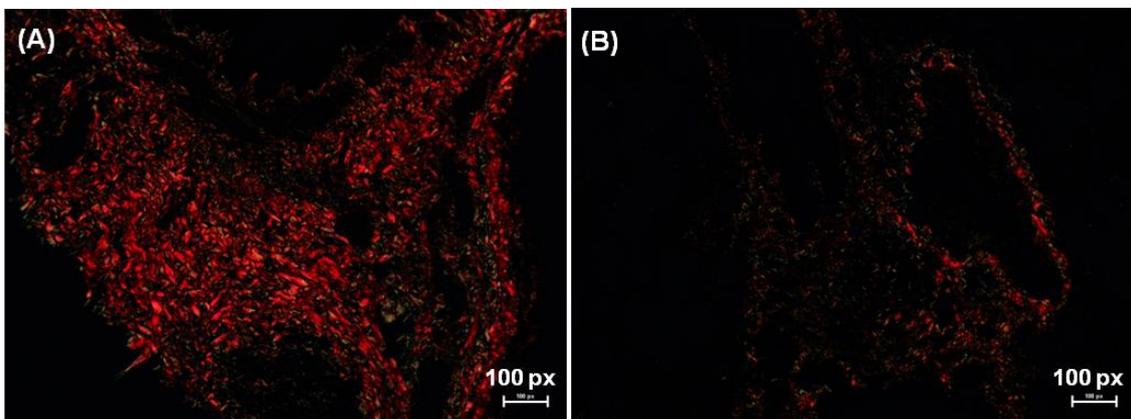


Fig. 4. Fotomicrografias da deposição de fibras de colágeno tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela) do tecido pulmonar de ratos nos grupos estudados, obtidas com objetiva de 20X (com filtro de polarização), coradas com picrosirius-red (A e B). (A) grupo controle, (B) grupo tratado com o protocolo clínico do 5-FU.

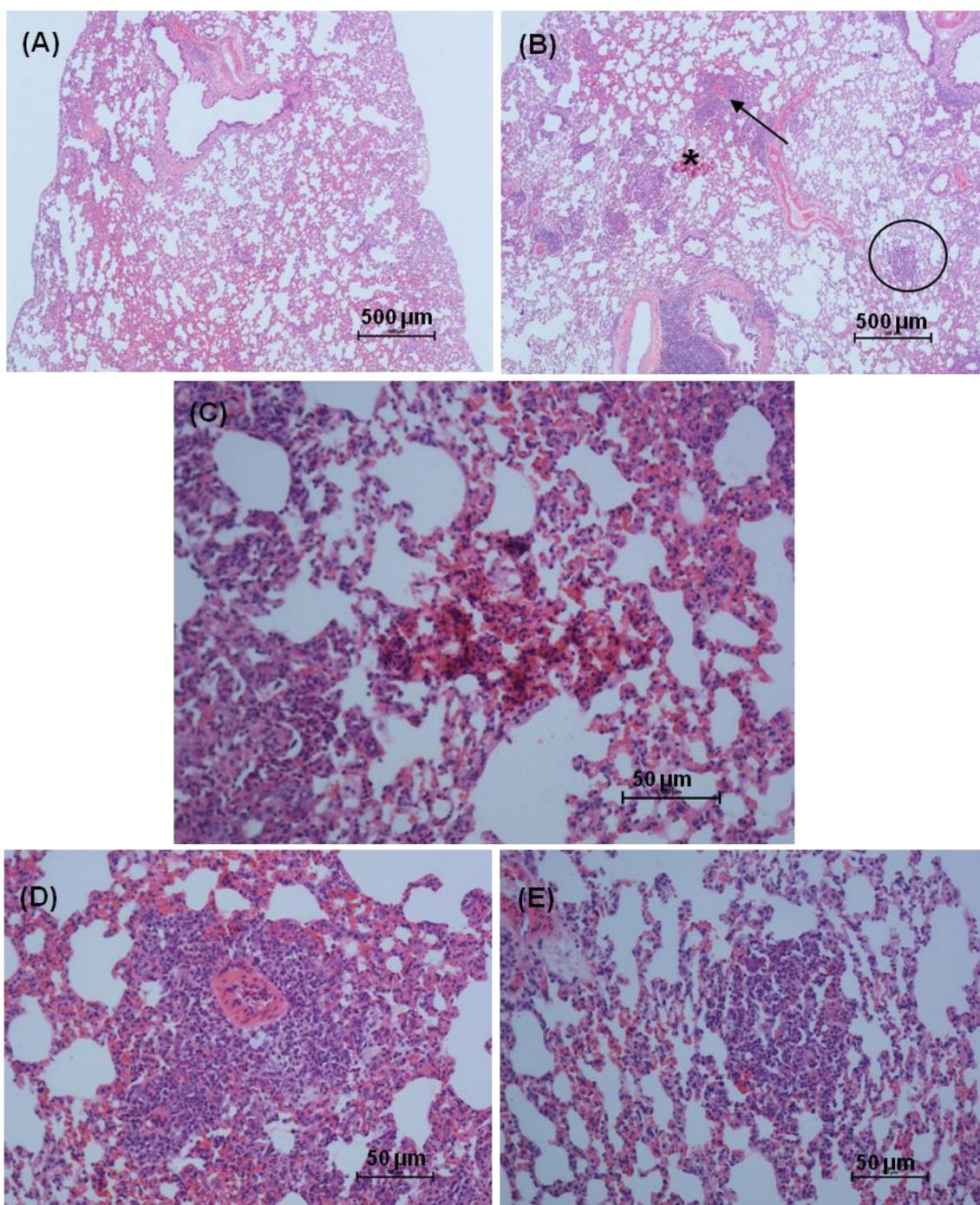


Fig. 5. Fotomicrografias de secções de tecido pulmonar de ratos dos diferentes grupos estudados, obtidas com objetiva de 4X e coradas com HE. (A) grupo controle, mostrando o tecido sem alterações. (B) grupo 5-FU, mostrando infiltrado inflamatório focal perivascular (setas), infiltrado difuso no parênquima pulmonar (círculo) e foco hemorrágico (*). (C) Foco hemorrágico em um aumento de 40X. (D) infiltrado inflamatório focal perivascular em um aumento de 40X. (E) infiltrado difuso no parênquima pulmonar em um aumento de 40X.

2.2 Análises de marcadores para o Estresse Oxidativo

No fígado, houve redução significativa na atividade da Catalase (CAT) e glutaciona S-transferase (GST), e nos níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) do grupo 5-FU. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) aumentaram significativamente no grupo 5-FU. Não houve diferença significativa entre os grupos para Superóxido dismutase (SOD) (Tabela 3).

Os parâmetros oxidativos nos rins demonstraram um aumento significativo na atividade enzimática de CAT e SOD no grupo tratado. Os níveis de GSH e LOOH foram reduzidos significativamente nos ratos tratados, já a atividade da GST não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Tabela 3).

No caso do pulmão, a atividade de SOD, CAT e GST, e os níveis de GSH reduziram significativamente no grupo 5-FU. Os níveis de LOOH aumentaram estatisticamente nos ratos tratados em relação ao grupo controle. Também houve uma redução significativa na quantificação de proteínas totais no grupo tratado (Tabela 3).

Tabela 3: Marcadores de Estresse Oxidativo nos rins, fígado e pulmão dos ratos nos grupos estudados.

	Análise	C	5-FU	Valor de p
Fígado	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,054 \pm 0,0059	0,0301 \pm 0,0022	0,0025*
	SOD (U SOD/mg proteína)	1,032 \pm 0,0724	0,8616 \pm 0,0452	0,0696
	GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,0584 \pm 0,0026	0,0501 \pm 0,002	0,0267*
	GSH (μg GSH/g tecido)	738,8 \pm 646,5 - 956,4	428,3 \pm 291 - 479,6	0,0006*
	LOOH (mmol/mg tecido)	29,77 \pm 27,23 - 31,7	32,98 \pm 29,43 - 42,65	0,0262*
Rim	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,0543 \pm 0,0136	0,1413 \pm 0,0142	0,0008*
	SOD (U SOD/mg proteína)	0,7785 \pm 0,0629	1,138 \pm 0,0468	0,0006*
	GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,0315 \pm 0,0034	0,0406 \pm 0,0027	0,0558
	GSH (μg GSH/g tecido)	550,5 \pm 32,4	388,1 \pm 20,39	0,0011*
	LOOH (mmol/mg tecido)	66,5 \pm 1,646	58,59 \pm 1,779	0,0068*
Pulmão	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,024 \pm 0,0043	0,012 \pm 0,0009	0,0180*
	SOD (U SOD/mg proteína)	1,773 \pm 0,1024	1,388 \pm 0,0781	0,0112*
	GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,0098 \pm 0,0008	0,0066 \pm 0,0004	0,0045*
	GSH (μg GSH/g tecido)	453,6 \pm 413,2 - 555,1	287,9 \pm 246,4 - 405,3	0,0175*
	LOOH (mmol/mg tecido)	11,25 \pm 2,918	26,6 \pm 1,134	0,0004*
	Proteína total ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10,15 \pm 0,3855 (n=6)	8,19 \pm 0,4223 (n=6)	0,0064*

C – grupo controle; 5-FU – grupo tratado. Dados expressos em média \pm erro padrão (paramétricos) e mediana \pm limite inferior – limite superior (não paramétricos), n=7. * $p < 0,05$.

2.3 Análises de marcadores para o processo inflamatório

No tecido hepático, a atividade da Mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), e os níveis de Oxido Nítrico (ON) e Interleucina 1 β (IL-1 β) aumentaram significativamente no grupo tratado. Os níveis da Interleucina 6 (IL-6) foram estatisticamente menores no grupo 5-FU. Não houve diferença significativa, entre os grupos, na quantificação de Interleucina 10 (IL-10) (Tabela 4).

No tecido renal, a atividade enzimática de NAG e MPO diminuíram significativamente no grupo tratado comparado ao grupo controle. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis de ON, IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Tabela 4).

No tecido pulmonar, a atividade enzimática de NAG e MPO, e os níveis de ON aumentaram significativamente no grupo 5-FU, já os níveis de IL-6 reduziram. (Tabela 4).

Tabela 4: Marcadores de inflamação nos rins, fígado e pulmão de ratos tratados com 5-FU.

	Análise	C	5-FU	Valor de p
Fígado	MPO (mD.O./mg proteína)	0,1415 \pm 0,0096	0,1818 \pm 0,0139	0,0347*
	NAG (mD.O./mg proteína)	1,651 \pm 0,1065	2,093 \pm 0,1348	0,0245*
	ON (μ M/ μ L)	95,92 \pm 10,3	199,6 \pm 22,44	0,0012*
	IL-1β (pg/ml)	4686 \pm 585,2	6773 \pm 568,9	0,0252*
	IL-6 (pg/ml)	13126 \pm 1599	7902 \pm 1311	0,0266*
	IL-10 (pg/ml)	118,7 \pm 44,02 - 334,2	174,4 \pm 97,41 - 259,4	0,5350
Rim	MPO (mD.O./mg proteína)	0,1437 \pm 0,0098	0,1143 \pm 0,0054	0,0215*
	NAG (mD.O./mg proteína)	3,53 \pm 0,225	2,847 \pm 0,1235	0,0208*
	ON (μ M/ μ L)	101,2 \pm 29,16 (n=6)	127,4 \pm 42,229 (n=6)	0,6209
	IL-1β (pg/ml)	10217 \pm 863,9	10511 \pm 789,9 (n=6)	0,8088
	IL-6 (pg/ml)	112944 \pm 10176 -	54769 \pm -12492 -	0,5350
		408206	27669	

	IL-10 (pg/ml)	1795 ± 504	3112 ± 949,6	0,2441
Pulmão	MPO (mD.O./mg proteína)	0,2656 ± 0,0401	0,4043 ± 0,0223	0,0105*
	NAG (mD.O./mg proteína)	2,618 ± 0,3137	4,999 ± 0,605	0,0044*
	ON (μM/μL)	17,96 ± 3,816 - 158,1	235,3 ± 209,8 - 297,2	0,0006*
	IL-6 (pg/ml)	1682 ± 380,3	834,9 ± 75,82	0,0495*

C – grupo controle; 5-FU – grupo tratado. Dados expressos em média ± erro padrão (paramétricos) e mediana ± limite inferior – limite superior (não paramétricos), n=7. * $p < 0,05$.

2.4 Análises sanguíneas de marcadores bioquímicos da função hepática e renal

Os valores de Aspartato Aminotransferase (AST) séricos aumentaram significativamente no grupo tratado, no entanto, não houve diferença entre os valores de Alanina Aminotransferase (ALT) (Fig. 6A-B). A administração do 5-FU causou um aumento estatisticamente significativo nos valores séricos de ureia e ácido úrico e redução da creatinina (Fig. 7A - C).

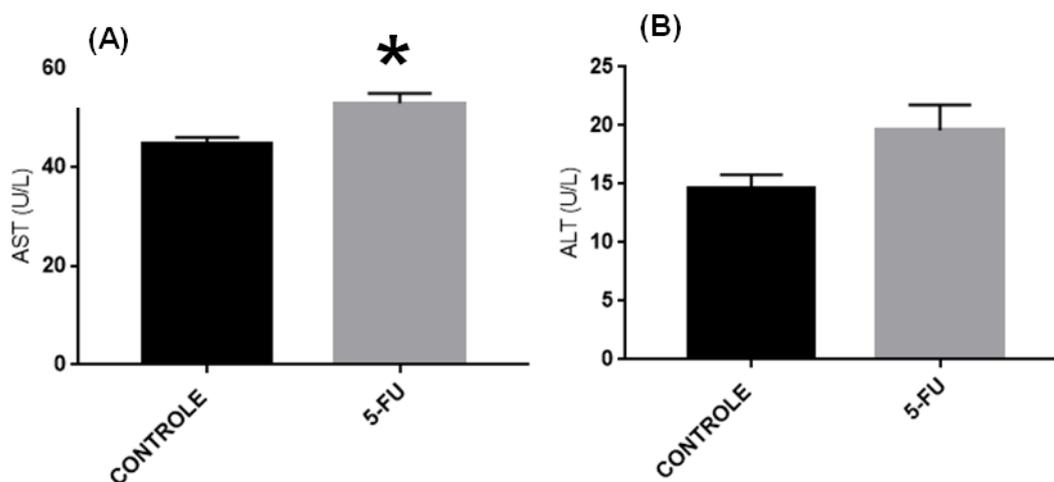


Fig. 6. Marcadores da função hepática de ratos tratados com o protocolo clínico do 5-FU. (A) atividade enzimática de Aspartato Aminotransferase (AST), (B) e Alanina Aminotransferase (ALT) séricos. *, diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Dados expressos em média ± erro padrão (paramétricos), n=7.

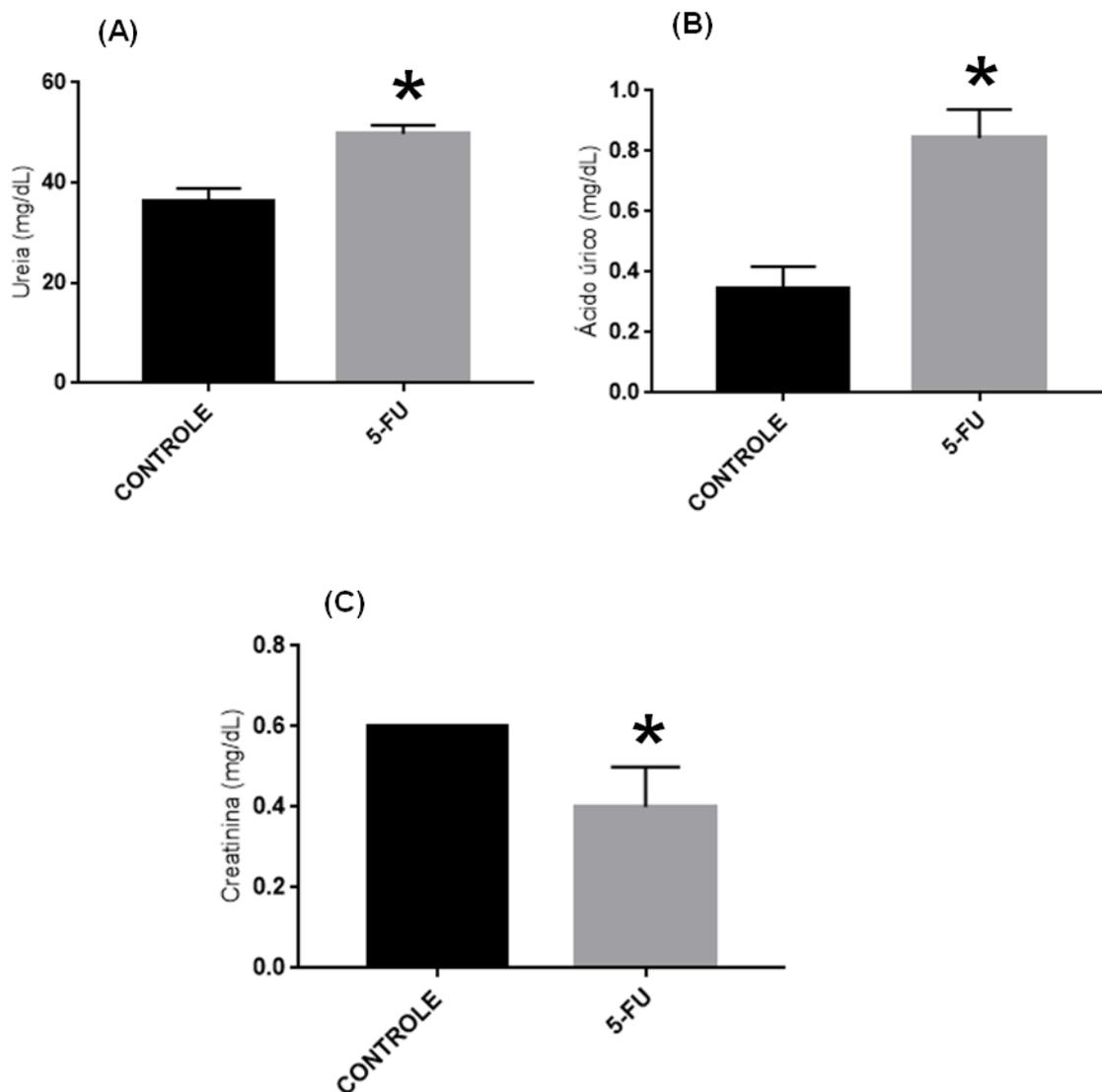


Fig. 7. Marcadores da função renal de ratos tratados com o protocolo clínico do 5-FU. (A) Níveis de ureia, (B) creatinina (C) e ácido úrico séricos. *, diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Dados expressos em média \pm erro padrão (paramétricos) e mediana \pm limite inferior – limite superior (não paramétricos), $n=7$.

3- DISCUSSÃO

O 5-FU é um fármaco bastante utilizado para o tratamento de cânceres sólidos. Contudo, este quimioterápico de ação não direcionada, também é capaz de atuar na divisão de células normais [6,27]. Este fármaco pode desencadear EO, inflamação, alterações morfológicas e metabólicas em vários tipos de tecidos e células saudáveis [28–31] o que leva a uma série de sintomas adversos no organismo das

peessoas em tratamento. Como a maioria dos estudos são realizados com doses maiores do que a dose utilizada na prática clínica, pouco se sabe sobre quais alterações acontecem simultaneamente em órgãos vitais como o fígado, rim e pulmão após o tratamento conforme sugerido pelo fabricante. Neste estudo, avaliamos os efeitos do protocolo clínico do quimioterápico 5-FU sobre o fígado, rim e pulmão de ratos *Wistar* saudáveis. Desta forma, a partir dos resultados deste estudo, foi possível observar que o tratamento seguindo o protocolo clínico utilizado no tratamento oncológico promove alterações histológicas, e em parâmetros bioquímicos, de EO e inflamatórios nos três órgãos avaliados. Estas informações serão úteis para a busca de substâncias adjuvantes que poderão amenizar os efeitos adversos deste quimioterápico.

O 5-FU logo após ser administrado é, em grande parte, catabolizado em outros produtos na presença da enzima DPD [7]. Esta enzima é responsável por catalisar a reação de conversão do 5-FU em dihidrofluorouracil (DHFU) que em seguida é catabolizado em 5-fluoro-5,6-dihidrouracil (5-FUH₂) e depois em fluoro-beta-ureidopropionato (FUPA) [9]. A enzima DPD é expressa em grande quantidade pelo fígado, por isso esse órgão é o principal encarregado pelas reações de degradação do 5-FU. Nos rins o FUPA é transformado em fluoro-beta-alanina (FBAL), e nesta forma, é excretado [9,10]. O FBAL é um metabólito inativo do 5-FU, no entanto, diferente dos outros, este metabólito está frequentemente associado com a disfunção renal [32,33]. Contudo, a forma detalhada de como o FBAL afeta o rim ainda não é bem esclarecida. Os pulmões também são relatados como sendo um local de eliminação do 5-FU [17,34]. Em condições normais, apenas uma pequena porcentagem do 5-FU administrado sofre reações anabólicas que caracterizam o mecanismo de ação deste fármaco, pois são responsáveis por gerar metabólitos ativos (anabólitos de nucleotídeos) com efeitos citotóxicos [35]. Embora o catabolismo seja predominante, o anabolismo do 5-FU ocorre em todos os tecidos, ou seja, sua ação é sistêmica [17].

Nesta pesquisa, observou-se que a passagem do 5-FU pelo fígado levou a danos funcionais observados, primeiramente, pela elevação sérica da enzima AST,

considerado um marcador de lesão hepática, ainda que não tenha apresentado alteração significativa de ALT. Segundo Ozer e colaboradores (2008) [36], nem sempre as alterações de ALT são de utilidade para dados pré-clínicos de lesão no fígado. Este estudo, também demonstrou que este medicamento promoveu EO no tecido hepático. Houve redução da atividade das enzimas CAT e GST, e da molécula antioxidante GSH. O aumento de LOOH caracteriza lipoperoxidação ocasionada por um desequilíbrio redox, podendo levar a lesão celular neste órgão [37,38]. O 5-FU é conhecido por gerar Espécies reativas de oxigênio mitocondrial por meio de uma via de sinalização dependente da p53, onde ocorre a liberação do citocromo C das mitocôndrias [37,39,40]. Este evento faz com que os elétrons sejam desviados do sistema de transporte em direção ao oxigênio, resultando na formação de radicais superóxidos (O_2^-), um tipo de Espécie reativa de oxigênio [41]. O O_2^- é uma espécie reativa de oxigênio altamente deletéria para as células, pois podem ser convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação de Fenton e depois transformados em radical hidroxila (OH) que reage com os lipídeos das células causando lipoperoxidação e conseqüente formação de LOOH [42,43].

Lesões relacionadas às vias de peroxidação lipídica e EO podem ocasionar a esteatose hepática (acúmulo de triglicerídeos no interior dos hepatócitos) [44]. Esta patologia está frequentemente associada à administração do 5-FU [45,46] e não foi diferente em nosso estudo, observamos a elevação do grau de esteatose no fígado dos ratos tratados em comparação aos controles. Estudos mostram que a presença do EO e esteatose torna o fígado mais suscetível a uma reação inflamatória [47,48]. Isso foi comprovado em nossos resultados quando observado que no fígado dos ratos tratados houve um aumento da atividade das enzimas marcadoras do processo inflamatório MPO e NAG, e do ON que é outra substância produzida em excesso durante o processo inflamatório. Observamos também, no fígado, o aumento dos níveis de IL-1 β , entretanto, os níveis IL-6 reduziram. Geralmente, observa-se aumento de IL-6 com o uso do 5-FU, mas também já foi observado a sua redução no plasma de pacientes tratados com este fármaco [49]. Sabe-se que a IL-1 é produzida no início da

inflamação e em seguida estimula a produção de IL-6 [50]. De acordo com Matthews e colaboradores [51], a deficiência de IL-6 pode ser consequência de uma disfunção mitocondrial. O 5-FU está frequentemente associado à redução do potencial de membrana e colapso mitocondrial [52]. Outro fato que indica o processo inflamatório neste caso é o aumento de focos inflamatórios na área portal e lobular do tecido hepático dos ratos tratados. Alguns autores afirmam que em casos de inflamação crônica a presença de infiltrados inflamatórios na área portal do fígado sobrepõe a de infiltrados lobular [44,53] e isso se assemelha aos nossos achados. Estudos de Sommer e colaboradores (2017) [22], com doses elevadas (200 mg/kg) de 5-FU também observaram danos oxidativos e inflamação no fígado de camundongos após 24 horas de tratamento.

O EO e a inflamação podem ser responsáveis pelas alterações histológicas do tecido hepático observadas em nossa pesquisa, assim como já foi mostrado em outros estudos [54–57]. Observamos aumento significativo no diâmetro dos capilares sinusóides e o aumento dos núcleos e perfil celular dos hepatócitos dos ratos tratados com o 5-FU. Além do EO e inflamação, a hipertrofia celular pode ser causa do bloqueio do ciclo celular [58], que é uma consequência da ação do 5-FU [6].

No presente estudo, observamos que a passagem dos metabólitos do 5-FU nos rins não promoveu inflamação ou alterações que caracterizassem EO, no entanto, houve alteração nos parâmetros analisados. Nossos resultados demonstram que nos rins devido ao aumento da atividade da SOD e CAT e o consumo do GSH não houve peroxidação lipídica. Uma das formas de evitar a lipoperoxidação pelo excesso de EROs é o aumento da atividade de antioxidantes endógenos, mantendo um equilíbrio redox [38]. A SOD realiza a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e a CAT converte este composto em H_2O e O_2 , ou ele é eliminado pela glutathione peroxidase usando glutathione reduzida (GSH) via catálise por glutathione transferase (GST) [59].

Na análise de inflamação no rim, observamos que as atividades das enzimas MPO e NAG reduziram significativamente no grupo tratado, já as interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) não apresentaram diferença estatística quando comparadas entre os

grupos, ou seja, não houve inflamação neste órgão. No entanto, Liu e colaboradores (2018) [60] utilizando dose bem mais elevada de 5-FU (200 mg/kg) com um protocolo com administração por 4 dias e eutanásia no 18º dia, observaram aumento de MPO, neutrófilos e macrófagos no rim, além da elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Apesar de não ter ocorrido inflamação e EO a análise da função renal demonstrou que as substâncias plasmáticas, que servem como marcadores funcionais (ureia, ácido úrico, creatinina) dos rins, tiveram alterações. Tais marcadores são constantemente excretados por via renal, logo, nas condições de lesão, é observado o aumento nos níveis séricos dos mesmos [61,62].

Neste estudo, observamos um aumento significativo de ureia e ácido úrico. A creatinina, neste caso, apresentou uma redução significativa nos ratos tratados com o quimioterápico. Alguns pesquisadores explicam que ela é um marcador tardio para a lesão renal [62]. Além disso, em outro estudo, foi demonstrado que a depuração da creatinina é inversamente proporcional ao metabolismo do 5-FU, ou seja, quanto maior sua metabolização menos creatinina estará na circulação sanguínea [63]. De acordo com Matsushita e colaboradores (2020) [64], os rins são órgãos compensatórios e mesmo sendo grande alvo de toxicidade por agentes xenobióticos, conseguem manter certa homeostase. Parte das alterações observadas na função renal podem ser consequência das alterações histopatológicas nos rins.

Quanto às análises histológicas dos parâmetros glomerulares, observamos uma redução significativa na densidade dos corpúsculos glomerulares por campo, aumento da área do corpúsculo, da área da camada visceral e da área do espaço de Bowman do grupo tratado com o 5-FU em comparação ao grupo controle. A hiperfiltração pode resultar em danos renais progressivos que são notados pela redução do número de glomérulos [65]. Segundo Tobar e colaboradores (2013) [66], o aumento do espaço glomerular (espaço de Bowman) está associado à hiperfiltração glomerular o que resulta em um aumento da pressão hidrostática neste espaço e a sua consequente dilatação. O aumento glomerular está associado à hipertrofia dos túbulos [66,67]. Logo, observamos um aumento significativo na área interna, externa e

espessura dos TCD no grupo 5-FU em relação ao controle. A hiperfiltração pode ser resultado do aumento da capacidade de reabsorção tubular [67]. Um dos motivos da hipertrofia dos túbulos é o aumento da atividade da ornitina descarboxilase (ODC), enzima limitante da taxa na biossíntese de poliamina [67]. Segundo Koseki e colaboradores (2016) [68], em um estudo feito com células-tronco cancerosas, o 5-FU provocou a redução dos níveis de poliamina, no entanto, observou-se que em células não cancerosas os níveis de poliamina foram elevados na presença do 5-FU. Isso mostra que como as células do nosso estudo não são cancerosas, o aumento da ODC pode caracterizar a lesão tubuloglomerular.

Em relação ao tecido pulmonar, foi observado EO, inflamação e lesões histopatológicas causadas pelo tratamento clínico com o 5-FU. Naturalmente, o pulmão é o órgão que mais se encontra susceptível ao EO, pois ele está diretamente exposto às mais altas tensões de oxigênio [69]. Portanto, é de se esperar um mecanismo de proteção maior neste tecido [70,71]. Apesar disso, nos pulmões, após o tratamento com o 5-FU, houve redução das defesas antioxidantes endógenas (atividade das enzimas SOD, CAT, GST e níveis de GSH) que pode ter sido fator para o aumento do estresse oxidativo caracterizado pela elevação dos níveis de LOOH.

O tecido pulmonar também apresentou inflamação, pois a atividade das enzimas MPO e NAG, e os níveis de ON se elevaram apesar da redução da citocina pró-inflamatória IL-6, assim como foi observado no fígado. Tivemos limitação para a análise da citocina IL-1 β e IL-10 no pulmão por falta de material. Contudo, as análises dos outros parâmetros nos fornecem subsídios para sugerir que houve inflamação neste órgão. Além disso, as análises histológicas do pulmão dos ratos tratados mostraram a presença de focos hemorrágicos e infiltrados inflamatórios (perivascular e no parênquima). De acordo com a literatura, produtos do EO costumam ativar o processo inflamatório das vias aéreas superiores por meio da liberação de mediadores inflamatórios e citocinas [71,72]. Fernandez et. al. (2018) [73], assim como em nosso estudo, mostrou que o uso do 5-FU em um paciente com câncer colorretal, levou a hemorragia alveolar.

Os pesos dos órgãos em análises de toxicidade costumam ser um parâmetro grande importância [74,75]. Neste estudo, o peso relativo do pulmão aumentou significativamente após o uso do 5-FU, quando comparados aos animais sem o tratamento e isso pode ser efeito da infiltração de células inflamatórias [76]. Em situações de lesão pulmonar, é comum a observação da fibrose (cicatrização após lesão), indicada pelo acúmulo anormal de colágeno na matriz extracelular do tecido [77]. No entanto, neste estudo, a quantidade de colágeno tipo I, III e total foram reduzidas nos ratos tratados. Sabemos que os metabólitos do 5-FU são responsáveis por afetar a síntese de proteínas a medida que se incorporam aos ácidos nucleicos [8,78]. O colágeno é uma proteína sintetizada por fibroblastos e alguns estudos já mostraram a atuação do 5-FU como um agente antiproliferativo de fibroblastos [79], redutor da síntese de fibronectina, colágeno tipo I e III [78,80], semelhante aos nossos achados.

Desta forma, apesar dos efeitos antitumorais do 5-FU, o presente estudo revela que o uso clínico deste quimioterápico está correlacionado a toxicidade tanto em nível celular quanto bioquímico nos três órgãos estudados. O rim foi o órgão menos lesionado, quando comparado com o fígado e pulmão, mas ainda assim apresentou danos representativos. No corpo humano, os órgãos e tecidos funcionam em conjunto e são altamente conectados por meio de interações complexas [81]. Neste estudo, o fígado e pulmão foram similarmente prejudicados. De acordo com Kuan et al. (1998) [17], quando o 5-FU entra na veia hepática, o fígado e o pulmão passam a atuar em conjunto devido as suas relações anatômicas. Estes autores explicam que o pulmão processa todo o débito cardíaco (suprimento sanguíneo) que provem da veia hepática [17]. Por outro lado, é importante ressaltar que o 5-FU apresenta diferentes mecanismos de ação, portanto células de origem diferente podem apresentar ou não respostas diferentes a este fármaco [82].

Nossos resultados demonstraram que o 5-FU produz alterações histológicas nos três órgãos estudados, provoca alterações fisiológicas no fígado e rim e promove EO e inflamação no fígado e pulmão. De forma geral, os resultados descritos neste

estudo destacam a capacidade do 5-FU em exercer a sua ação em sistemas integrados do nosso corpo. Portanto, descobrir os potenciais efeitos negativos deste medicamento é tão importante quanto os efeitos no local alvo. Quando os efeitos colaterais não são adequadamente elucidados, medidas para evitar esses efeitos deixam de ser aplicadas, comprometendo a qualidade de vida do paciente.

Ademais, o conhecimento das alterações encontradas neste estudo é de fundamental importância na busca de um tratamento adjuvante que possa reduzir principalmente o EO e o processo inflamatório, promovidos pelo tratamento com o protocolo clínico de 5-FU. Estudos futuros precisam ser realizados com a adição de compostos ativos protetores direcionados ao fígado, rim e pulmão para ajudar a solucionar as lacunas encontradas nesta pesquisa.

4- MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo animal neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (CEUA, nº 4422140918). Para tanto, foram utilizados 14 ratos *Wistar* machos (peso $270,6 \pm 8,2$ g), adquiridos por meio do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os ratos foram ambientados às condições laboratoriais padrão com um ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 22 ± 1 °C.

O experimento foi delineado em dois grupos (n=7), sendo um controle e outro tratado. Os ratos do grupo tratado receberam 5-FU (Fluoruracila 50 mg/ml - Neugrast®) por via intraperitoneal durante 4 dias consecutivos com a dose equivalente à de humanos (15 mg/kg), depois a redução da dose para 6 mg/kg por 4 dias alternados. A última dose foi de 15 mg/kg e foi administrada no 14^o dia e a eutanásia ocorreu no 15^o dia. Os ratos controles foram tratados com o mesmo volume de veículo (solução salina 0,9%).

A eutanásia aconteceu 24 horas após a última dose e foi realizada com dose letal (120 mg/kg) de Tiopental Sódico® (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) por via intraperitoneal. O fígado, rim e o pulmão foram coletados,

pesados e divididos para as técnicas histológicas, de EO e inflamação. Para as técnicas histológicas foram separados o lobo quadrado do fígado, o rim direito e o pulmão esquerdo. Os segmentos foram imediatamente fixados em Paraformaldeído 4% (pH 7,4) durante 24 horas e cortados em segmentos menores para a realização dos posteriores procedimentos.

Para os testes de função hepática (AST e ALT) e renal (Ureia, Creatinina e Ácido Úrico), foi feita a punção cardíaca e centrifugação do sangue para a obtenção do plasma que foi congelado à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia das análises.

Para as análises de EO e inflamação foram separados o lobo maior do fígado, o rim esquerdo e o pulmão direito. Após lavagem em PBS, estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à temperatura $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises. No dia da realização das mesmas, os segmentos já descongelados foram pesados, triturados e homogeneizados em Tampão Fosfato de Potássio (200 mM) pH 6,5 com volume de 10x o peso da amostra para Rim e fígado e 7x para pulmão. Parte deste homogenato foi separada para a avaliação de GSH. O restante foi centrifugado a 9.000 rpm durante 20 minutos, resultando em sobrenadante que foi aliquoteado separadamente entre as técnicas de mensuração da atividade da CAT, SOD, GST, e dos níveis de LOOH. O pellet resultante foi utilizado para as análises de atividade das enzimas MPO e NAG.

4.1 Pesos e Análises histológicas dos órgãos

O peso dos órgãos obtidos no dia da coleta foi normalizado de acordo com a porcentagem do peso corporal dos ratos ($\text{peso relativo do órgão} = \text{peso do órgão} / \text{peso corporal do animal} \times 100$). As análises histológicas foram realizadas após a fixação dos segmentos do fígado, rim e pulmão, e seguinte desidratação em séries crescentes de etanol. Depois estes segmentos, foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina. O material foi cortado em micrótomo de forma semisseriada com espessura de $5\text{ }\mu\text{m}$ e mantido em lâminas para a realização do processo de coloração. O fígado e rim foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e ácido periódico de

Schiff (PAS). O pulmão foi corado com HE e picrosirus-red (PICRO). As imagens foram capturadas através de microscópio óptico com auxílio de sistema de captura com uma câmera de alta resolução. As medidas morfométricas foram obtidas com o auxílio do software de análises de imagem Image-Pro Plus – Media Cybernetics.

4.1.1. Análises da histologia do fígado

Para a avaliação histológica do fígado foram utilizadas as lâminas coradas com HE e PAS. Os cortes histológicos corados com HE e capturados em um aumento de 40x foram utilizados para a avaliação das alterações semiquantitativas na morfologia do fígado e seguidos os seguintes critérios: A) grau de esteatose; B) infiltrado portal; C) infiltrado lobular. Para essas análises foram utilizados escores conforme a Tabela 2. Os critérios A e C foram analisados em 40 campos por animal, já o critério B foi realizado em 20 campos por animal. As avaliações morfométricas foram determinadas pela área citoplasmática e nuclear de 200 hepatócitos aleatórios nas lâminas coradas com PAS em um aumento de 40X. Os resultados foram expressos em μm^2 . Foi mensurado também o diâmetro de 100 sinusóides hepáticos por animal, em um aumento de 40X nas lâminas coradas em PAS. Os resultados foram expressos em μm^2 .

4.1.2. Análises da histologia do rim

A análise histológica do rim foi realizada nas lâminas coradas com HE no aumento de 20X. Foram realizadas medidas no córtex renal, baseadas nos métodos de Marcelino et al. (2020) [83]. Foi medida a área do corpúsculo e camada visceral, em 30 glomérulos por animal expressos em μm^2 . Após estas medidas foi calculada a área do espaço de Bowman que foi resultante das medidas da área do corpúsculo subtraída da área da camada visceral (corpúsculo - camada visceral = espaço de Bowman). Estes resultados foram expressos em μm^2 . Também foi mensurada a área interna e externa de ambos os túbulos proximais e distais, e calculados a espessura de cada túbulo pela subtração da área externa pela interna (área externa - área interna

= espessura). As medidas foram feitas em 80 túbulos distais e proximais por animal. Os resultados foram expressos em μm^2 .

Foi quantificado o número de corpúsculos renais no córtex, em 50 imagens por animal. Os resultados foram expressos como número de corpúsculos por mm^2 .

4.1.3. Análises da histologia do pulmão

Os cortes histológicos corados com HE e *picrosirus-red* foram utilizados para avaliar alterações na morfologia do pulmão. Nas lâminas coradas com HE em aumento de 20X, foram realizadas as medidas da área e espessura de 300 alvéolos por animal. As medidas da espessura foi obtida pela média de 5 medidas na parede ao redor dos alvéolos. Os resultados foram expressos em μm^2 .

Nas laminas coradas com HE e aumento de 4X, foi realizada a quantificação de focos hemorrágicos, infiltrado focal perivascular e infiltrado difuso no parênquima do pulmão. Tais análises foram expressas em mm^2 do tecido pulmonar.

As lâminas coradas com *picrosirus-red* foram utilizadas para quantificar as fibras colágenas do tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha), do tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela) e total (tipo I + tipo III = colágeno total) em 30 imagens por animal, capturadas no aumento de 20X em um microscópio de luz trinocular (NIKON® Eclipse 80i) com um filtro de polarização, acoplado a uma câmera de vídeo digital de alta definição. As imagens foram analisadas com a ajuda do software de análises de imagem (Image-Pro Plus – Media Cybernetics). Os resultados foram expressos pelo percentual da área contendo colágeno em relação à área total de medição.

4.2 Análises de marcadores para o Estresse Oxidativo (EO)

4.2.1 Níveis de Glutathione Reduzida (GSH)

O GSH foi determinado segundo o método de Sedlak e Lindsay [84]. Foi acrescentado 48 μL de TCA (ácido tricloroacético) ao homogenato das amostras para a precipitação de proteínas e então centrifugado. O sobrenadante foi colocado em

placas e adicionado solução de Tris-HCL (0,4 M) pH 8,9 e DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzólico, 10 mM). A leitura foi realizada em até 5 minutos com espectrofotômetro em 415 nm. Os valores foram inseridos em uma curva padrão de GSH e expressos em μg GSH/g de tecido.

4.2.2. *Atividade enzimática da Glutathione-S-transferase (GST)*

Esta metodologia foi realizada de acordo com o método descrita por Warholm e colaboradores [85]. Foi utilizado o sobrenadante diluído em tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH: 6,5) e reação com solução de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e GSH. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm e coeficiente de extinção de 9,6 mmolar 1/cm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.2.3. *Atividade enzimática da Catalase (CAT)*

Para esta análise o método foi baseado em Aebi [86]. Foi utilizado o sobrenadante diluído em tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 6,5). A reação se deu pela adição de tampão Tris-HCL+EDTA 0,1 M (pH 8,5) e H_2O_2 . A leitura cinética foi realizada a 240 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.2.4. *Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada pelo método de Marklund e Marklund [87] que utiliza a capacidade desta enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol. A reação foi feita com o sobrenadante e adição de Tampão Tris-HCL EDTA (pH=7,5) e pirogalol. A solução foi encubada em temperatura ambiente por 20 minutos e em seguida adicionado HCL 1 M para parar a reação. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

4.2.5. *Níveis de hidroperóxidos lipídicos*

Foi medido o total de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) pelo método de Jiang e colaboradores [88]. O sobrenadante foi diluído em metanol 30% e outra solução contendo metanol 90% xilenol laranja, ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 25 mM), hidroxitolueno butilado (BHT, 4 mM) e $FeSO_4NH_4$ (250 Mm) foi adicionada a reação. Esta foi incubada por 30 minutos no escuro e após este período foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. As concentrações de LOOH foram determinadas usando um coeficiente de extinção molar 4,3 mmolar 1/cm, e os resultados foram expressos como mmol/mg de tecido.

4.2.6 Concentração total de proteínas

O cálculo da proteína total foi realizado com o kit comercial Pierce TM BCA Protein Assay, seguindo as recomendações do fabricante. As análises foram lidas em espectrofotômetro a 562 nm e os resultados expressos em $\mu g/ml$.

4.3 Análises de marcadores do processo inflamatório

4.3.1. Atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO)

O pellet foi ressuspensionado em solução de tampão fosfato de potássio (0,08 M) com hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (pH 5,4). Esta solução foi agitada e centrifugada e ao sobrenadante foi adicionado solução contendo H_2O_2 e tetrametilbenzidina (TMB) para iniciar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm, com resultados expressos em unidade de densidade óptica mD.O/mg de proteína.

4.3.2. Atividade da enzima N-acetil-glicosaminidase (NAG)

O pellet foi ressuspensionado em solução de tampão fosfato de potássio (0,08 M) com HTAB (0,5%) (pH 5,4) e novamente centrifugado. Foi então adicionado a amostra tampão citrato (50 mM, pH 4,5) e solução de NAG (2,24 mM). A solução foi incubada por 60 minutos a 37 °C e depois a reação foi parada com a adição de tampão glicina (200 mM, pH 10,4). A leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro e os resultados foram expressos em mDO/mg de proteína.

4.3.3. *Quantificação de Óxido Nítrico (ON)*

Nesta metodologia foi utilizada a reação de Griess para avaliar indiretamente o ON a partir da quantificação do seu subproduto, nitrito, foi adaptada do método de Tiwari e colaboradores [89]. Em segmento específico as amostras de tecido foram trituradas em PBS 0,1 M; pH 7,4 e então centrifugadas. Para esta análise foram utilizados ácido fosfórico, sulfanilamida, água destilada e N-1-naphitiletilenodiamida (NED) que foram pipetados em amostras do sobrenadante para competirem com o nitrito presente. A leitura desta reação foi feita usando um espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas usando uma curva padrão que estava localizada na faixa de 100 a 1,56 μM de nitrito de sódio (NaNO_2). Os níveis de nitrito foram expressos como μM .

4.3.4. *Dosagens dos níveis de Interleucinas*

Foram quantificadas as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. As análises de interleucinas foram realizadas utilizando kits de ensaio enzimaticamente imunoabsorventes (ELISA) (R & D Systems) de acordo com o protocolo do fabricante. As análises foram lidas em espectrofotômetro a 450 nm. Os níveis das interleucinas foram expressos como pg/ml.

4.4 Análises sanguíneas de marcadores bioquímicos da função hepática e renal

O sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma sanguíneo obtido foi usado para avaliação das enzimas AST e ALT, e de Ureia, Creatinina e ácido úrico. As análises foram realizadas com o kit comercial Analisa® e cada leitura seguiu as recomendações do fabricante.

4.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 7. Foi realizada a análise da normalidade dos resultados pelo teste de Shapiro-Wilk. Para

os dados paramétricos a comparação entre os grupos foi realizada com o Test *t* de *Student*. Para os dados não paramétricos a comparação entre os grupos foi realizada com o teste de Mann Whitney. Para tais análises o valor de *p* menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (paramétricos) ou mediana ± limite inferior – limite superior (não paramétricos).

5- AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

6- REFERÊNCIAS

- [1] L.P. Untura, L.F. de Rezende, Cognitive function in patients undergoing chemotherapy: a systematic review, *Rev. Bras. Cancerol.* 58 (2012) 257–265. http://www1.inca.gov.br/rbc/n_58/v02/pdf/16_revisao_funcao_cognitiva_pacientes_submetidos_quimioterapia_revisao_integrativa.pdf.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2020, *CA. Cancer J. Clin.* 70 (2020) 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- [3] MINISTÉRIO DA SAÚDE, *Abc Do Câncer, ABC Do Câncer Abordagens Básicas Para o Control. Do Câncer.* 81 (2011) 128.
- [4] J.A.L. de Miranda, J.E.F. Barreto, D.S. Martins, P.V. de S. Pimentel, D.V. Da Silva Costa, R.R. E Silva, L.K.M. de Souza, C.N. de C. Lima, J.A. Rocha, A.P.F. de Freitas, D.A. Da Silva, A.G. Scafuri, R.F. de C. Leitão, G.A. de C. Brito, J.V.R. Medeiros, G.S. Cerqueira, Protective effect of cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-fluorouracil-induced intestinal Mucositis, *Pharmaceuticals.* 12 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.3390/ph12020051>.
- [5] World Health Organization (WHO), *Model List of Essential Medicines*, WHO

- Electron. Essent. Med. List (Beta Version 1.0). (2020) 129.
http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_en.pdf
(accessed June 19, 2020).
- [6] T.J. Wigle, E. V. Tsvetkova, S.A. Welch, R.B. Kim, DPYD and fluorouracil-based chemotherapy: Mini review and case report, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 1–17.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050199>.
- [7] P. Xie, J.L. Mo, J.H. Liu, X. Li, L.M. Tan, W. Zhang, H.H. Zhou, Z.Q. Liu, Pharmacogenomics of 5-fluorouracil in colorectal cancer: review and update, *Cell. Oncol.* 43 (2020) 989–1001. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00529-1>.
- [8] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 330–338.
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- [9] V. Sharma, S.K. Gupta, M. Verma, Dihydropyrimidine dehydrogenase in the metabolism of the anticancer drugs, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 84 (2019) 1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03936-w>.
- [10] M.W. Saif, A. Choma, S.J. Salamone, E. Chu, Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: A rational approach to improving therapeutic outcomes, *J. Natl. Cancer Inst.* 101 (2009) 1543–1552.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djp328>.
- [11] Y. Liu, Q. Li, L. Zhou, N. Xie, E.C. Nice, H. Zhang, C. Huang, Y. Lei, Cancer drug resistance: Redox resetting renders a way, *Oncotarget*. 7 (2016) 42740–42761. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8600>.
- [12] J.L. Arias, Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems, *Molecules*. 13 (2008) 2340–2369.
<https://doi.org/10.3390/molecules13102340>.
- [13] Y. Kodama, S. Fumoto, J. Nishi, M. Nakashima, H. Sasaki, J. Nakamura, K. Nishida, Absorption and distribution characteristics of 5-fluorouracil (5-FU) after an application to the liver surface in rats in order to reduce systemic side effects, *Biol. Pharm. Bull.* 31 (2008) 1049–1052. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1049>.

- [14] J.L. Grem, 5-Fluorouracil: Forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development, *Invest. New Drugs*. 18 (2000) 299–313. <https://doi.org/10.1023/A:1006416410198>.
- [15] EUROFARMA, Flusan (fluorouracila) - bula para o profissional da saúde, (2015) 1–14. http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23438952016&pIdAnexo=3925101.
- [16] Q. Boucherville, Fluorouracil injection USP, (2012).
- [17] H.Y. Kuan, D.E. Smith, W.D. Ensminger, J.A. Knol, S.J. DeRemer, Z. Yang, P.L. Stetson, Regional pharmacokinetics of 5-fluorouracil in dogs: Role of the liver, Gastrointestinal tract, and lungs, *Cancer Res*. 58 (1998) 1688–1694.
- [18] S. Corbacioglu, E.J. Jabbour, M. Mohty, Risk Factors for Development of and Progression of Hepatic Veno-Occlusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome, *Biol. Blood Marrow Transplant*. 25 (2019) 1271–1280. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.02.018>.
- [19] F. Alessandrino, L. Qin, G. Cruz, S. Sahu, M.H. Rosenthal, J.A. Meyerhardt, A.B. Shinagare, 5-Fluorouracil induced liver toxicity in patients with colorectal cancer: role of computed tomography texture analysis as a potential biomarker, *Abdom. Radiol*. 44 (2019) 3099–3106. <https://doi.org/10.1007/s00261-019-02110-3>.
- [20] H.H. Arab, S.A. Salama, I.A. Maghrabi, Camel Milk Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Renal Injury in Rats: Targeting MAPKs, NF- κ B and PI3K/Akt/eNOS Pathways, *Cell. Physiol. Biochem*. 46 (2018) 1628–1642. <https://doi.org/10.1159/000489210>.
- [21] T. Südhoff, M.D. Enderle, M. Pahlke, C. Petz, C. Teschendorf, U. Graeven, W. Schmiegel, 5-Fluorouracil induces arterial vasocontractions, *Ann. Oncol*. 15 (2004) 661–664. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh150>.
- [22] J. Sommer, A. Mahli, K. Freese, T.S. Schiergens, F.S. Kuecuekoktay, A. Teufel, W.E. Thasler, M. Müller, A.K. Bosserhoff, C. Hellerbrand, Analysis of molecular

- mechanisms of 5-fluorouracil-induced steatosis and inflammation in vitro and in mice, *Oncotarget*. 8 (2017) 13059–13072. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14371>.
- [23] J. Alexandre, C. Nicco, C. Chéreau, A. Laurent, B. Weill, F. Goldwasser, F. Batteux, Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 236–244. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj049>.
- [24] A.J. Akindede, G.O. Oludadebo, K.I. Amagon, D. Singh, D.D. Osiagwu, Protective effect of carvedilol alone and coadministered with diltiazem and prednisolone on doxorubicin and 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats, *Pharmacol. Res. Perspect.* 6 (2018). <https://doi.org/10.1002/prp2.381>.
- [25] S. Riul, O.M. Aguillar, Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura, *Rev. Min. Enferm.* 3 (1999) 60–67.
- [26] V. da R. Maia, Protocolos de Enfermagem: administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas, 1º, 2010. http://www.hemorio.rj.gov.br/Html/pdf/Protocolo_ulcera.pdf.
- [27] O. Capitain, M. Boisdron-Celle, A.L. Poirier, S. Abadie-Lacourtoisie, A. Morel, E. Gamelin, The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer, *Pharmacogenomics J.* 8 (2008) 256–267. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500476>.
- [28] R. Tamaki, A. Kanai-Mori, Y. Morishige, A. Koike, K. Yanagihara, F. Amano, Effects of 5-fluorouracil, adriamycin and irinotecan on HSC-39, a human scirrhous gastric cancer cell line, *Oncol. Rep.* 37 (2017) 2366–2374. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5470>.
- [29] X. xia Yan, H. long Li, Y. ting Zhang, S. yan Wu, H. lei Lu, X. lu Yu, F. guo Meng, J. hua Sun, L. kun Gong, A new recombinant MS-superoxide dismutase alleviates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice, *Acta Pharmacol. Sin.* (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0295-8>.

- [30] K.A. Amin, B.M. Mohamed, M.A.M. El-Wakil, S.O. Ibrahem, Impact of breast cancer and combination chemotherapy on oxidative stress, hepatic and cardiac markers, *J. Breast Cancer.* 15 (2012) 306–312. <https://doi.org/10.4048/jbc.2012.15.3.306>.
- [31] W.Y. Li, X.L. Ye, X.S. Jia, L.L. Jia, Expression and Role of Oct3/4 in Injury- Repair Process of Rat Alveolar Epithelium after 5-Fu Treatment, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/3856839>.
- [32] Y. Nishikawa, T. Funakoshi, T. Horimatsu, S. Miyamoto, T. Matsubara, M. Yanagita, S. Nakagawa, A. Yonezawa, K. Matsubara, M. Muto, Accumulation of alpha-fluoro-beta-alanine and fluoro mono acetate in a patient with 5-fluorouracil-associated hyperammonemia, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79 (2017) 629–633. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3249-1>.
- [33] C. Poole, J. Gardiner, C. Twelves, P. Johnston, P. Harper, J. Cassidy, J. Monkhouse, L. Banken, E. Weidekamm, B. Reigner, Effect of renal impairment on the pharmacokinetics and tolerability of capecitabine (Xeloda) in cancer patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 (2002) 225–234. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0408-0>.
- [34] H.M. Pinedo, G.F. Peters, Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology, *Am. Soc. Clin. Oncol.* 6 (1988) 1653–1664.
- [35] R. Soong, R.B. Diasio, Advances and challenges in fluoropyrimidine pharmacogenomics and pharmacogenetics, *Pharmacogenomics.* 6 (2005) 835–847. <https://doi.org/10.2217/14622416.6.8.835>.
- [36] J. Ozer, M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey, S. Schomaker, The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity, *Toxicology.* 245 (2008) 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>.
- [37] K.A. Conklin, Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness, *Integr. Cancer Ther.* 3 (2004) 294–300. <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>.
- [38] E. Dounousi, E. Papavasiliou, A. Makedou, K. Ioannou, K.P. Katopodis, A.

- Tselepis, K.C. Siamopoulos, D. Tsakiris, Oxidative Stress Is Progressively Enhanced With Advancing Stages of CKD, *Am. J. Kidney Dis.* 48 (2006) 752–760. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.08.015>.
- [39] A. Parrish, C. Freel, S. Kornbluth, Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5 (2013). <https://doi.org/10.1017/S0140525X00005070>.
- [40] B. Akpınar, E. V. Bracht, D. Reijnders, B. Safarikova, I. Jelinkova, A. Grandien, A. Hyrslova Vaculova, B. Zhivotovsky, M. Olsson, 5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53, *Oncotarget.* 6 (2015) 43679–43697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6030>.
- [41] M.D. Jacobson, Reactive oxygen species and programmed cell death, Elsevier Sci. Ltd. (1996). <https://doi.org/10.1201/9781439854082>.
- [42] C.E. Thomas, L.A. Morehouse, S.D. Aust, Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3275–3280. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83617-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83617-7).
- [43] S. Nigam, T. Schewe, Phospholipase A2s and lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1488 (2000) 167–181. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00119-0).
- [44] E.M. Brunt, Nonalcoholic steatohepatitis, *Liver Dis.* 24 (2004) 20. <https://doi.org/10.15406/acp.2017.02.00022>.
- [45] R. Jiménez, E. Hijona, J. Emparanza, J.M. Alústiza, L. Hijona, M.T. Macarulla, M.P. Portillo, M. Herreros-Villanueva, A. Beguiristain, J. Arenas, L. Bujanda, Effect of neoadjuvant chemotherapy in hepatic steatosis, *Chemotherapy.* 58 (2012) 89–94. <https://doi.org/10.1159/000336133>.
- [46] T.M. Pawlik, K. Olino, A.L. Gleisner, M. Torbenson, R. Schulick, M.A. Choti, Preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases: Impact on hepatic histology and postoperative outcome, *J. Gastrointest. Surg.* 11 (2007) 860–868. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0149-4>.
- [47] P. Dietrich, C. Hellerbrand, Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the

- metabolic syndrome, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28 (2014) 637–653. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.07.008>.
- [48] T. Hardy, F. Oakley, Q.M. Anstee, C.P. Day, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 11 (2016) 451–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>.
- [49] M. Zhang, Y. Fan, X. Che, K. Hou, C. Zhang, C. Li, T. Wen, S. Wang, Y. Cheng, Y. Liu, X. Qu, 5-FU-Induced Upregulation of Exosomal PD-L1 Causes Immunosuppression in Advanced Gastric Cancer Patients, *Front. Oncol.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00492>.
- [50] B.E. Barton, The biological effects of interleukin 6, *Med. Res. Rev.* 16 (1996) 87–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199601\)16:1<87::AID-MED3>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<87::AID-MED3>3.0.CO;2-Q).
- [51] V.B. Matthews, T.L. Allen, S. Risis, M.H.S. Chan, D.C. Henstridge, N. Watson, L.A. Zaffino, J.R. Babb, J. Boon, P.J. Meikle, J.B. Jowett, M.J. Watt, J.O. Jansson, C.R. Bruce, M.A. Febbraio, Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance, *Diabetologia.* 53 (2010) 2431–2441. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1865-y>.
- [52] Y.S. Chun, A. Laurent, D. Maru, J.N. Vauthey, Management of chemotherapy-associated hepatotoxicity in colorectal liver metastases, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 278–286. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70064-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70064-6).
- [53] E.M. Brunt, Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: The Knodell histology activity index and beyond, *Hepatology.* 31 (2000) 241–246. <https://doi.org/10.1002/hep.510310136>.
- [54] P. Nagy, T. Teramoto, V.M. Factor, A. Sanchez, J. Schnur, S. Paku, S.S. Thorgeirsson, Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat, *Hepatology.* 33 (2001) 339–345. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.21326>.
- [55] L.D. Deleve, X. Wang, J.F. Kuhlenkamp, N. Kaplowitz, Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: The role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease, *Hepatology.*

- 23 (1996) 589–599. <https://doi.org/10.1002/hep.510230326>.
- [56] L. Rubbia-Brandt, V. Audard, P. Sartoretti, A.D. Roth, C. Brezault, M. Le Charpentier, B. Dousset, P. Morel, O. Soubrane, S. Chaussade, G. Mentha, B. Terris, Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 460–466. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh095>.
- [57] G. Brancatelli, A. Furlan, A. Calandra, M. Dioguardi Burgio, Hepatic sinusoidal dilatation, *Abdom. Radiol.* 43 (2018) 2011–2022. <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1465-8>.
- [58] T.P. Neufeld, B.A. Edgar, Connections between growth and the cell cycle, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 784–790. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80122-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80122-1).
- [59] M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz, N. Kaplowitz, J.C. Fernández-Checa, MITOCHONDRIAL GLUTATHIONE: FEATURES, REGULATION AND ROLE IN DISEASE, *Biochim Biophys Acta.* (2014) 3317–3328. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.018.MITOCHONDRIAL>.
- [60] X.Y. Liu, F.R. Zhang, J.Y. Shang, Y.Y. Liu, X.F. Lv, J.N. Yuan, T.T. Zhang, K. Li, X.C. Lin, X. Liu, Q. Lei, X.D. Fu, J.G. Zhou, S.J. Liang, Renal inhibition of miR-181a ameliorates 5-fluorouracil-induced mesangial cell apoptosis and nephrotoxicity, *Cell Death Dis.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0677-8>.
- [61] C. Giordano, O. Karasik, K. King-Morris, A. Asmar, Uric Acid as a Marker of Kidney Disease: Review of the Current Literature, *Dis. Markers.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/382918>.
- [62] V. Gounden, B. Harshil, J. Ishwarlal, Renal Function Tests, *StatPearls Publ. LLC.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa088>.
- [63] T. Inaishi, K.I. Fujita, N. Matsumoto, T. Shimokata, O. Maeda, T. Kikumori, N. Hattori, G. Nakayama, Y. Ando, Correlation between the Metabolic Conversion of a Capecitabine Metabolite, 5'-Deoxy-5-fluorocytidine, and Creatinine

- Clearance, *In Vivo* (Brooklyn). 34 (2020) 3539–3544.
<https://doi.org/10.21873/invivo.12196>.
- [64] K. Matsushita, T. Toyoda, T. Yamada, T. Morikawa, K. Ogawa, Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for the investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy, *J. Appl. Toxicol.* 40 (2020) 1373–1383. <https://doi.org/10.1002/jat.3990>.
- [65] E.J. Baldelomar, J.R. Charlton, S.C. Beeman, B. Hann, M. Zhang, Phenotyping by magnetic resonance imaging nondestructively measures glomerular number and volume distribution in mice with and without nephron reduction, *Kidney Int.* 89 (2016) 498–505. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.316.Phenotyping>.
- [66] A. Tobar, Y. Ori, S. Benchetrit, G. Milo, M. Herman-Edelstein, B. Zingerman, N. Lev, U. Gafter, A. Chagnac, Proximal Tubular Hypertrophy and Enlarged Glomerular and Proximal Tubular Urinary Space in Obese Subjects with Proteinuria, *PLoS One.* 8 (2013) 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075547>.
- [67] S.C. Thomson, A. Deng, D. Bao, J. Satriano, R.C. Blantz, V. Vallon, Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 217–224.
<https://doi.org/10.1172/JCI10963>.
- [68] J. Koseki, H. Matsui, M. Konno, N. Nishida, K. Kawamoto, Y. Kano, M. Mori, Y. Doki, H. Ishii, A Trans-omics Mathematical Analysis Reveals Novel Functions of the Ornithine Metabolic Pathway in Cancer Stem Cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–8.
<https://doi.org/10.1038/srep20726>.
- [69] A.J. Lopes, A.J. Noronha, T.T. Mafort, Mecanismos de Defesa do Sistema Respiratório, *Rev. Hosp. Univ. PedRo ERnesto, UeRJ.* 9 (2010) 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.coastaleng.2005.09.003>.
- [70] P. Dammeyer, E.S.J. Arnér, Human Protein Atlas of redox systems - What can be learnt?, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810 (2011) 111–138.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.07.004>.

- [71] I. Rahman, S.K. Biswas, A. Kode, Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases, *Eur. J. Pharmacol.* 533 (2006) 222–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.087>.
- [72] I. Rahman, W. MacNee, Oxidative Stress and regulation of GSH in lung inflammation, *Eur. Respir. J.* 16 (2000) 534–554.
- [73] L. Fernandez, A. Dominguez, W. Martinez, F. Sanabria, Pulmonary toxicity due to 5-fluorouracil (5-FU) manifested as diffuse alveolar hemorrhage: Case report, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197 (2018) 2–4. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30130.91847>.
- [74] E. Wahlström, A. Ollerstam, L. Sundius, H. Zhang, Use of Lung Weight as Biomarker for Assessment of Lung Toxicity in Rat Inhalation Studies, *Toxicol. Pathol.* 41 (2013) 902–912. <https://doi.org/10.1177/0192623312470763>.
- [75] S.A. Bailey, R.H. Zidell, R.W. Perry, Relationships Between Organ Weight and Body/Brain Weight in the Rat: What Is the Best Analytical Endpoint?, *Toxicol. Pathol.* 32 (2004) 448–466. <https://doi.org/10.1080/01926230490465874>.
- [76] S.W. Chang, N. Ohara, Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: Role of thromboxane A₂, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 264 (1993) 245–252. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1993.264.3.l245>.
- [77] Z. Xu, Z. Li, Z. Liao, S. Gao, L. Hua, X. Ye, Y. Wang, S. Jiang, N. Wang, D. Zhou, X. Deng, PM 2.5 induced pulmonary fibrosis in vivo and in vitro, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171 (2019) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.061>.
- [78] N.W. Bulstrode, V. Mudera, D.A. McGrouther, A.O. Grobbelaar, A.D. Cambrey, 5-Fluorouracil selectively inhibits collagen synthesis, *Plast. Reconstr. Surg.* 116 (2005) 209–221. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000169701.16509.D6>.
- [79] P.T. Khaw, M.B. Sherwood, S.L.D. MacKay, M.J. Rossi, G. Schultz, Five-Minute Treatments with Fluorouracil, Floxuridine, and Mitomycin Have Long-term Effects on Human Tenon's Capsule Fibroblasts, *Arch. Ophthalmol.* 110 (1992) 1150–1154. <https://doi.org/10.1001/archopht.1992.01080200130040>.

- [80] N.L. Occleston, J.T. Daniels, R.W. Tarnuzzer, K.K. Sethi, R.A. Alexander, S.S. Bhattacharya, G.S. Schultz, P.T. Khaw, Single exposures to antiproliferatives: Long-term effects on ocular fibroblast wound-healing behavior, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 1998–2007.
- [81] A. Skardal, S. V. Murphy, M. Devarasetty, I. Mead, H.W. Kang, Y.J. Seol, Y.S. Zhang, S.R. Shin, L. Zhao, J. Aleman, A.R. Hall, T.D. Shupe, A. Kleensang, M.R. Dokmeci, S. Jin Lee, J.D. Jackson, J.J. Yoo, T. Hartung, A. Khademhosseini, S. Soker, C.E. Bishop, A. Atala, Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08879-x>.
- [82] I. Petak, D.M. Tillman, J.A. Houghton, p53 Dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 4432–4441.
- [83] M.C. da S. Marcelino, W.V. Magalhães, F.L.A. Fonseca, R.A.B. Nucci, L.B.M. Maifrino, Effects of resistance training on kidney morphology of aged ovariectomized rats, *Acta Histochem.* 122 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151613>.
- [84] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).
- [85] M. Warholm, C. Guthenberg, C. Von Bahr, B. Mannervik, Glutathione Transferases from Human Liver, 113 (1985) 499–504.
- [86] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [87] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.
- [88] Z.Y. Jiang, A.C.S. Woollard, S.P. Wolff, Lipid hydroperoxide measurement by

- oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method, *Lipids*. 26 (1991) 853–856. <https://doi.org/10.1007/BF02536169>.
- [89] V. Tiwari, A. Kuhad, K. Chopra, *Emblica officinalis* corrects functional, biochemical and molecular deficits in experimental diabetic neuropathy by targeting the oxido-nitrosative stress mediated inflammatory cascade, *Phyther. Res.* 25 (2011) 1527–1536. <https://doi.org/10.1002/ptr.3440>.

ANEXOS

NORMAS DO PERIÓDICO

- O Journal of Molecular Biology publicará Artigos completos, Comunicações, Revisões, Perspectivas, Brevia, Notas de Métodos, Bancos de Dados, Servidores Web e Fast Track.
- Os artigos não são limitados em comprimento, mas os editores recomendam que, na maioria dos casos, eles **não devam ter mais de 15 páginas impressas** (sem contar as páginas de referências) com **não mais de 10 figuras e 4 tabelas**. Observe que 1 página impressa é aproximadamente equivalente a 2,5 páginas em um documento do Word usando espaçamento duplo e fonte Arial 11.
- **Folha de rosto:** Deve incluir o **título, nomes e afiliações dos autores, informações do autor correspondente e o endereço atual / permanente dos pesquisadores**.
- **Título:** Deve transmitir o conceito e a importância do artigo para leitores não especialistas. Os títulos **não podem ocupar mais do que três linhas. Cada linha deve conter no máximo 50 caracteres, incluindo espaços**. Os títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- Todas as páginas devem ser numeradas.
- **Resumo:** Deve ser conciso (**limite de 250 palavras**) e factual. Deve transmitir o conceito e a importância do artigo para leitores não especialistas. O resumo deve apresentar resumidamente os antecedentes da questão, os principais resultados e concluir com uma descrição clara do avanço conceitual e da importância do trabalho. Descrições detalhadas do estudo ou dos resultados não devem ser incluídas no resumo. Um resumo geralmente é apresentado separadamente do artigo, portanto, deve ser capaz de ser independente. Além disso, abreviações não padronizadas ou incomuns devem ser evitadas, mas, se essenciais, devem ser definidas na primeira menção no próprio resumo.
- **Palavras-chave:** Os autores devem fornecer **cinco palavras-chave** após o Resumo. Palavras-chave não devem ser palavras do título.
- **Abreviações:** Define abreviações não padronizadas em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. As abreviaturas inevitáveis no resumo devem ser definidas na primeira menção ali, bem como no rodapé. Garanta a consistência das abreviaturas em todo o artigo.

- **Introdução:** Indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando um levantamento detalhado da literatura ou um resumo dos resultados.
- **Resultados:** Os resultados devem ser claros e concisos.
- **Discussão:** Deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repetilos. Uma seção combinada de Resultados e Discussão costuma ser apropriada. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.
- **Materiais e métodos:** Fornecem detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido. Os métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas as modificações relevantes devem ser descritas.
- **Agradecimentos:** Reúna os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como nota de rodapé do título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda com o idioma, assistência na redação ou revisão do artigo, etc.).
- **Referências:** Devem ser listadas no final do manuscrito. Devem ser listados na ordem em que aparecem no texto, tabelas e legendas das figuras e numerados sequencialmente. Quando citados no texto, os números de referência devem ser colocados entre colchetes. Apenas artigos que foram publicados ou aceitos devem ser citados na lista de referências (ver sugestão de preprints). Devem ser citados todos os sobrenomes e iniciais dos autores, ano do artigo (entre parênteses), título do artigo, título do periódico (abreviado e itálico), número do volume e primeira e última páginas.
- **Citação no texto:** Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências forem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão do periódico e devem incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como "no prelo" implica que o item foi aceito para publicação e uma cópia da página de título do artigo em questão deve ser enviada.
- **Tabelas:** Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em página (s) separada (s) no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja cauteloso no uso de tabelas e assegure-se de que os dados nelas

apresentados não duplicem os resultados descritos em outra parte do artigo. Evite usar réguas verticais e sombreamento nas células da tabela.

- **Figuras e obras de arte:** Certifique-se de incluir figuras de baixa resolução em seu arquivo do Manuscrito Word e coloque uma legenda abaixo de cada figura. A legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados. Isso foi criado para ajudar os revisores a avaliar seu trabalho com mais eficiência.

COMPROVANTE CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES DOSES DO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL SOBRE A MUCOSITE, PLEXO MIOENTÉRICO, FIGADO E PULMÃO DE RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 4422140918 (ID 001962), sob a responsabilidade de **Nilza Cristina Buttow e equipe; Lilian Catarim Fabiano; Pedro Luiz Zonta de Freitas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 06/11/2018.

We certify that the proposal "COMPARATIVE STUDY BETWEEN DIFFERENT DOSES OF THE 5-FLUOROURACIL CHEMOTHERAPY ON MUCOSITIS, MYENTERIC PLEXUS, LIVER AND LUNG OF WISTAR RATS", utilizing 36 Heterogenics rats (36 males), protocol number CEUA 4422140918 (ID 001962), under the responsibility of **Nilza Cristina Buttow and team; Lilian Catarim Fabiano; Pedro Luiz Zonta de Freitas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 11/06/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2018](#) a [09/2021](#) Área: [Dcm-Ciências Morfológicas](#)

Origem: [Biotério Central da UEM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [55 a 60 dias](#)

N: [36](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [230 a 250 g](#)

Local do experimento: Será realizado no laboratório de histotécnica animal 1 do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM

Maringá, 06 de novembro de 2018



Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá



Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá