



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

SABRINA CARNEIRO MELO BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE A MUCOSITE ORAL, VIA
INIBIÇÃO DE TNF- α , IL-1 β E NOSi, E SOBRE A HIPOSSALIVAÇÃO INDUZIDAS
POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS**

FORTALEZA

2011

SABRINA CARNEIRO MELO BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE A MUCOSITE ORAL, VIA
INIBIÇÃO DE TNF- α , IL-1 β E NOSi, E SOBRE A HIPOSSALIVAÇÃO INDUZIDAS
POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

B212e Barbosa, Sabrina Carneiro Melo.
Efeito protetor da amifostina sobre a mucosite oral, via inibição de TNF- α , IL-1 β e NOSi, e sobre a hipossalivação induzidas por 5-fluorouracil em hamsters/ Sabrina Carneiro Melo Barbosa. – 2011.
102f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Coorientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

1. Estomatite 2. Fluoruracila 3. Amifostina 4. Fator de Necrose Tumoral alfa 5. Interleucina-1beta 6. Óxido Nitrico Sintase I. Título.

CDD:616.31

SABRINA CARNEIRO MELO BARBOSA

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE A MUCOSITE ORAL, VIA
INIBIÇÃO DE TNF- α , IL-1 β E NOSi, E SOBRE A HIPOSSALIVAÇÃO INDUZIDAS
POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Aprovada em 25/04/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes
Hospital A.C. Camargo - Fundação Antônio Prudente

Prof^a. Dr^a. Vilma de Lima
Universidade Federal do Ceará- UFC

A Deus, guia e luz de minha vida, e à Nossa Senhora, fonte de ternura que nos conduz ao
amor de Cristo.

Aos meus amados pais Aldo e Teresinha, espelhos de retidão e bondade, de quem sempre
recebi amor e dedicação incondicionais.

Ao meu querido esposo João Paulo, meu companheiro, com quem compartilho meus sonhos.

Ao meu filho Mateus, que com seu sorriso ilumina cada segundo de minha existência.

Aos meus irmãos Juliana e Aldo Filho, meus melhores amigos e confidentes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela valiosa orientação deste trabalho e pela referência de seriedade e profissionalismo que muito me marcou desde os bancos universitários, a minha gratidão e admiração.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior, exemplo de competência e dedicação, pela participação efetiva neste trabalho.

À Prof^ª. Gerly Anne de Castro Brito, pela fidalguia com que me recebeu para as indispensáveis análises histopatológicas.

À Prof^ª. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pela paciência com que me ensinou o modelo de salivação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo esmero nas aulas e escolha apurada do conteúdo das disciplinas.

À doutora Carolina Addison e aos pós-graduandos Deysi Viviana, Ana Paula e Daniel, pelo companheirismo e pronta disponibilidade no auxílio dos experimentos.

Aos bolsistas de iniciação científica, Caroline Azevedo, Rodrigo Callado e Carlos Rodrigo Nogueira Barbosa, pela amizade e grande interesse científico.

Às técnicas Maria Silvandira França Pinheiro, Maria Socorro França Monte e Tiara Sena Marques, pela colaboração e amizade inestimáveis.

Ao Sr. Haroldo, ao Dr. Armando e ao Sr. Bento pelo compromisso com a pontual entrega de animais bem cuidados.

À secretária Aura Rhanes Yida, pela atenção e gentileza que sempre me dispensou quando a procurei.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Márcia, Carlos, Fernando, Joana, Alana e Ana Paula, pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do departamento.

Ao Comitê de Ética em pesquisa animal da UFC, pelo aprimoramento deste trabalho científico.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E num recolhimento a Deus oferto
O cansado labor e o inquieto sono
Das minhas povoações e dos meus campos
Olavo Bilac

RESUMO

EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE A MUCOSITE ORAL, VIA INIBIÇÃO DE TNF- α , IL-1 β E NOSi, E SOBRE A HIPOSSALIVAÇÃO INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL EM HAMSTERS.

Mucosite oral (MO) é uma complicação comum e limitante da quimioterapia do câncer. Amifostina (AMF) é um agente antioxidante de largo espectro, que vem sendo atualmente estudado na proteção dos efeitos adversos da radioterapia e quimioterapia do câncer. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da AMF sobre a inflamação e a xerostomia observadas na MO experimental, bem como avaliar seu efeito modulador sobre citocinas e óxido nítrico sintase induzida (NOSi). Hamsters *Goldem siriam* receberam injeções i.p. de 60 e 40 mg/kg de 5-FU, nos dias 1 e 2, respectivamente, e, no 4º dia, tiveram suas mucosas jugais submetidas a trauma mecânico (TM) com agulha de ponta romba. Este grupo recebeu ainda solução salina (ss) s.c., durante 10 dias. Um grupo controle recebeu apenas ss i.p. no 1º e 2º dias. Um terceiro grupo, recebeu ss i.p. por 2 dias, tendo sido submetido ao TM, no 4º dia. Adicionalmente, 3 grupos de animais foram tratados com amifostina (12,5, 25 ou 50 mg/kg, diariamente, 30 minutos antes do 5-FU) ao longo dos 10 dias. Os animais foram pesados diariamente. Avaliou-se a taxa de salivação de todos os animais no 4º e 10º dias, sob sedação. No 10º dia, ocorreu o sacrifício para análise macroscópica das mucosas e retirada de amostras para análise histopatológica e imuno-histoquímica, dosagem da atividade demieloperoxidase (MPO) e concentração tecidual de TNF- α e IL-1 β . O tratamento com 5-FU foi capaz de induzir um significativo ($p < 0,05$) aumento de TNF- α ($1471 \pm 452,7$) e de IL-1 β (6870 ± 2417) quando comparado ao grupo tratado apenas com salina (TNF- α : $0,0 \pm 0,0$; IL-1 β : $787,5 \pm 356,1$). O tratamento com AMF (50 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α ($428,6 \pm 246,3$) e de IL-1 β ($395,9 \pm 86,06$), quando comparado ao grupo tratado apenas com 5-FU, atingindo uma inibição de 70,8% e de 100% dos níveis de citocinas, respectivamente. AMF também reduziu significativamente a imunoexpressão de TNF- α , IL-1 β e NOSi. O tratamento com 5-FU induziu um significativo incremento na atividade de MPO ($5,96 \pm 1,81$) quando comparado ao grupo controle ($0,96 \pm 0,47$). O tratamento com AMF atenuou significativamente ($p < 0,05$) a atividade de MPO ($1,79 \pm 0,32$), alcançando uma inibição de 64,2% dos seus níveis de atividade. Na análise das mucosas, as doses de AMF capazes de reduzir a gravidade da MO foram, de 25 e 50 mg/kg/dia, macroscopicamente e de 12,5 e 50 mg/kg/dia, microscopicamente. AMF, em todas as doses utilizadas, reverteu a redução da taxa de salivação induzida pela administração do 5-FU ($6,86 \pm 1,59$; $5,60 \pm 1,72$; $4,50 \pm 1,20$), de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado com 5-FU ($0,50 \pm 0,38$). No entanto, os grupos tratados com AMF não foram capazes de alterar a perda ponderal nem a contagem de leucócitos circulantes. Concluindo, AMF atenua significativamente os eventos inflamatórios e a xerostomia observadas na MO experimental induzida por 5-FU em hamsters. Tal efeito inibitório parece ocorrer via modulação das citocinas TNF- α , IL-1 β e da NOSi.

Palavras-chave: Mucosite oral. 5-Fluorouracil. amifostina. TNF- α . IL-1 β . NOSi.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF THE AMIFOSTINE VIA INHIBITION OF TNF- α , IL-1 β AND INOS ON HYPOSALIVATION ORAL MUCOSITIS AND 5-FLUOROURACIL-INDUCED IN HAMSTERS.

Oral mucositis (OM) is a common complication and limitation of cancer chemotherapy. Amifostine (AMF) is a broad spectrum antioxidant, which is currently being studied in the cytoprotection of the adverse effects of radiotherapy and chemotherapy for cancer. This study evaluated the effect of AMF on inflammation and xerostomia observed in experimental OM as well as evaluate its modulating effect on cytokine and nitric oxide synthase (iNOS). *Golden siriam* hamsters were injected i.p. 60 and 40 mg/ kg of 5-FU on days 1 and 2, respectively, and the fourth day, had their cheek pouches subjected to mechanical trauma (MT) with blunt-tipped needle. This group also received saline solution (ss) s.c. for 10 days. A control group received only i.p. ss the 1st and 2nd days. A third group received i.p. ss for 2 days, and was submitted to the MT, on day 4. Additionally, three groups of animals were treated with Amifostine (12.5, 25 or 50 mg/ kg, daily, 30 minutes before the 5-FU) over 10 days. Animals were weighed daily. We evaluated the rate of salivation in all animals on the 4th and 10th days under sedation. On the 10th day, the sacrifice was to observe the macroscopic mucosa and removal of samples for histopathology and immunohistochemistry, measurement of myeloperoxidase activity (MPO) and TNF- α and IL-1 β tissue concentration. Treatment with 5-FU was able to induce a significant ($p < 0.05$) increase in TNF- α (1471 ± 452.7) and IL-1 β (6870 ± 2417) compared to group treated with saline (TNF- α : 0.0 ± 0.0 ; IL-1 β : 787.5 ± 356.1). Treatment with AMF (50 mg/ kg) significantly reduced ($p < 0.05$) levels of TNF- α (428.6 ± 246.3) and IL-1 β (395.9 ± 86.06) when compared to group treated with 5-FU, reaching an inhibition of 70, 8% and of 100%, respectively. AMF also significantly reduced the immunoreactivity of TNF- α , IL-1 β and iNOS. Treatment with 5-FU induced a significant increase ($p < 0.05$) in MPO activity (5.96 ± 1.81) compared to the control group (0.96 ± 0.47). Treatment with AMF significantly ($p < 0.05$) attenuated MPO (1.79 ± 0.32), reaching an inhibition of 64,2%. On the macroscopic and microscopic analysis, doses of AMF can reduce the severity of OM were 25 and 50 mg/kg/day and 12.5 and 50mg/kg/dia respectively. AMF, at all doses used, reversed the reduction in salivation induced by administration of 5-FU, significantly ($p < 0.05$), without however altering the weight loss and leukocyte count. Finally, AMF significantly attenuates the inflammatory events observed in the OM and xerostomia experimentally induced by 5-FU in hamsters. This inhibitory effect seems to occur via modulation of TNF- α , IL-1 β and iNOS.

Keywords: oral mucositis.5-Fluorouracil.Amifostine.TNF- α . IL-1 β .iNOS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMF	Amifostina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CN	Controle
COX	Ciclo-oxigenase
ESMO	European Society for Medical Oncology
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina-6
MO	Mucosite oral
MPO	Mieloperoxidase
NCI	National Cancer Institute
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
OMAS	Oral mucositis assessment scale
OMS	Organização Mundial de Saúde
QT	Quimioterapia
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Radioterapia
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TLBP	Terapia com laser de baixa potência
TM	Trauma mecânico
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
VAS	Escala visual analógica
5-FU	5- Fluorouracil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estrutura Química do 5-fluorouracil (5-FU) a partir da uracila	15
FIGURA 2. Vias de ativação do 5-fluorouracil (5-FU).....	17
TABELA 1. Risco de mucosite oral (MO) e Diarreia graus 3 e 4 por regime de QT e tipo de tumor.....	18
FIGURA 3. Mucosite oral grau 4 em pacientes, evidenciando intenso processo inflamatório, com ulcerações difusas e a formação de pseudomembranas (A) e (B).....	21
QUADRO 1. Escores associados à mucosite oral.....	22
FIGURA 4. Fases de desenvolvimento da mucosite.....	26
QUADRO 2. Sumário de guidelines de práticas clínicas baseadas em evidências para o cuidado de pacientes com mucosite oral	28
FIGURA 5. Estrutura química da amifostina.....	31
FIGURA 6. (A) Conversão de WR-2721, pró-droga inativa, a um metabólito ativo WR-1065. (B) Oxidação de WR-1065 a WR-33278.....	32
FIGURA 7. Mecanismo de ação da amifostina.....	33
FIGURA 8. Protocolo de mucosite oral experimental.....	43
FIGURA 9. Gradação por escores de 0 a 5 quanto aos aspectos macroscópicos de mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral..	46
FIGURA 10. Cortes histopatológicos de mucosa jugal de hamsters com escore 0 (A), escore 1 (B), escore 2 (C) e escore 3 (D) de mucosite oral.....	48
FIGURA 11. Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais tratados com salina (A), submetidos à mucosite oral experimental (B) e tratados com amifostina nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia (C, D e E respectivamente).....	54
FIGURA 12. Aspecto microscópico (aumento de 40x) de mucosa jugal normal (A), submetida a trauma mecânico (TM) (B), com mucosite oral experimental (C) e com mucosite experimental tratada com AMF 12,5 (D), 25 (E) e 50 mg/kg/dia.....	55
TABELA 2. Amifostina reduz de forma dose-dependente os escores macroscópicos e os microscópicos, em animais submetidos à mucosite oral..	56

FIGURA 13. Amifostina não previne a perda ponderal em animais submetidos à mucosite oral.....	58
FIGURA 14. Amifostina não alterou o número de leucócitos totais em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.....	59
FIGURA 15. Amifostina reduz a atividade de MPO de forma dose-dependente, em animais submetidos à mucosite oral.....	61
FIGURA 16. Amifostina reverteu a redução da produção salivar induzida por 5-FU	62
FIGURA 17. Amifostina reverteu de forma dose-dependente o aumento da dosagem tecidual de TNF-α em hamsters tratados com 5-FU.....	63
FIGURA 18. Amifostina reverteu de forma dose-dependente o aumento da dosagem tecidual de IL-1β em hamsters tratados com 5-FU.....	64
FIGURA 19. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de fator de necrose tumoral (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters..	66
TABELA 3. Escores das análises de imuno-histoquímica para TNF-α.....	67
FIGURA 20. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de Interleucina-1β induzida (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters.	68
TABELA 4. Escores das análises de imuno-histoquímica para IL-1β.....	69
FIGURA 21. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de NO sintase induzida (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters.....	70
TABELA 5. Escores das análises de imuno-histoquímica para NOSi.....	71
FIGURA 22. Modelo hipotético do mecanismo de ação da amifostina na mucosite oral experimental.....	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	5-Fluourouracil.....	15
1.2	Mucosite.....	17
1.3	Mucosite oral.....	18
1.3.1	Mucosite oral- Patogênese.....	23
1.3.2	Mucosite oral- Tratamento e prevenção.....	27
1.4	Xerostomia.....	30
1.5	Amifostina- Um agente citoprotetor.....	30
1.6	Justificativa.....	35
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivos Gerais.....	38
2.2	Objetivos Específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Animais.....	40
3.2	Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	40
3.3	Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados.....	41
3.4	Protocolo Experimental.....	42
3.4.1	Modelo de mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil.....	42
3.4.2	Grupos Experimentais.....	43
3.5	Parâmetros Avaliados.....	44
3.5.1	Análise da variação de massa corpórea.....	44
3.5.2	Avaliação da taxa de salivação não estimulada.....	44
3.5.3	Estudo Hematológico.....	45
3.5.4	Análise macroscópica das mucosas jugais.....	45
3.5.5	Análise histopatológica das mucosas jugais.....	47
3.5.6	Dosagem de mieloperoxidase.....	48
3.5.7	Imuno-histoquímica para TNF- α , IL-1 β e NOSi.....	49
3.5.8	Dosagem tecidual de citocinas TNF- α , IL-1.....	50
3.6	Análise estatística.....	50
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Efeito do tratamento com amifostina sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral.....	53
4.2	Efeito da amifostina sobre os aspectos histológicos observados na mucosite oral.....	53

4.3	Efeito da amifostina sobre a variação de massa corpórea dos animais submetidos à mucosite oral experimental.....	57
4.4	Efeito da amifostina sobre a contagem total de leucócitos sanguíneos dos animais submetidos à mucosite oral experimental..	57
4.5	Efeito da amifostina sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.....	60
4.6	Efeito do tratamento com amifostina sobre a produção salivar não estimulada.....	62
4.7	Efeito da amifostina sobre a dosagem tecidual de TNF-α e IL-1β, nas mucosas jugais de hamsters.....	63
4.8	Efeito da amifostina sobre a imunomarcção para TNF-α, IL-1β e NOSi nas mucosas jugais de hamsters.....	65
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES.....	85
7	REFERÊNCIAS.....	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo inteiro (JEMAL *et al.*, 2011). Segundo dados americanos de 2007, o câncer consistia na segunda causa de mortalidade, representando 23,2% do total de mortes, e perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (JEMAL *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo dados do INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2010) a estimativa de casos novos de câncer em 2010 foram de 489.270, sendo que a população masculina representou 236.240 e a feminina, 253.030; comparando-se aos dados de 2008: 466.730 novos casos, sendo a população masculina representada por 231.860 e a feminina, por 234.870, observando-se, portanto, um incremento na incidência de casos novos.

Ainda considerando dados brasileiros, constatou-se em uma comparação dos 5 tipos mais frequentes de câncer em homens e mulheres, entre os anos de 1998-2002 e 2003-2007, que as taxas de mortalidade do câncer de pulmão e colorretal em mulheres aumentaram de 8,4 para 9,4 e 7,7 para 8,3, respectivamente; e do câncer de próstata e colorretal aumentaram nos homens de 12,1 para 13,3 e 5,7 para 6,2, respectivamente, por 100.000 habitantes (INCA, 2010).

Muitos pacientes quando são diagnosticados com câncer, encontram-se em um estadio avançado, o que torna mais remota a probabilidade de cura. O diagnóstico precoce dessa patologia constitui-se, portanto, na principal abordagem no que concerne ao aumento da sobrevida desses pacientes.

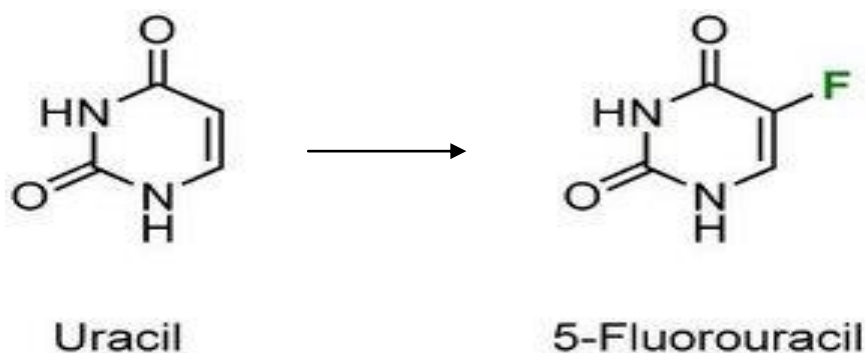
O tratamento do câncer é multimodal podendo incluir quimioterapia e/ou radioterapia e/ou ressecção tumoral, dependendo do tipo e grau de acometimento da neoplasia. O advento de novos agentes antineoplásicos, nas últimas décadas, vem contribuindo para o aumento da sobrevida dos pacientes portadores dessa patologia. Contudo, se a associação desses agentes tem proporcionado um indiscutível incremento nas taxas de resposta e, conseqüentemente, na sobrevida dos pacientes, por outro lado tem contribuído para o surgimento de novos efeitos colaterais, assim como na potencialização daqueles efeitos já esperados. Os efeitos adversos compreendem: neutropenia, mucosite oral e intestinal, náuseas, vômitos, pneumonite intersticial, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, entre outros. Atoxicidade relacionada aos diversos quimioterápicos podem, portanto, afetar desde a qualidade de vida do paciente até o seu prognóstico, visto que, dependendo dessa, pode ocorrer atraso dos ciclos quimioterápicos subsequentes, redução de doses e até interrupção do protocolo utilizado.

1.1 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5-FU) é uma substância análoga da base nitrogenada pirimidina uracila pertencente à classe de quimioterápicos Antimetabólitos, tendo sido o primeiro composto fluoropirimidínico sintetizado em 1957 (CHU,2007). Dr. Charles Heidelberger e seus colaboradores observaram, na década de 50, que o hepatoma de ratos utilizava a uracila radiomarcada mais avidamente que os tecidos normais, e sendo a uracila uma das quatro bases do ácido ribonucléico (RNA), indicava um alvo potencial para quimioterapia antimetabólica, através da síntese de análogos da uracila (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS,1954).

O 5-FU foi sintetizado a partir da troca de um átomo de hidrogênio por um de flúor no carbono da posição 5 do anel de pirimidina da uracila (FIGURA 1) (HEIDELBERGER *et al.*,1957). Sua entrada na célula faz-se através das mesmas vias de difusão e transporte facilitado que as bases de pirimidinas (WOHLHUETER; MCIVOR; PLAGEMANN, 1980). Dentro da célula, o 5-FU é convertido em várias substâncias ativas: monofosfato de deoxiuridina (FdUMP), trifosfato de deoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP) e é catabolizado pela di-hidropirimidina desidrogenase(DPD), expresso em abundância no fígado, no composto inativo di-hidrofluorouracil (DIASIO *et al.*, 1989).

FIGURA 1. Estrutura Química do 5-fluorouracil (5-FU) a partir da uracila



Fonte: man-plan-can.blogspot.com

Existem inúmeras vias disponíveis para a formação do 5'-monofosfato nucleotídeo (F-UMP) nas células animais como mostrado na FIGURA 2. Após reações de fosforilação, o F-UMP pode ser incorporado ao RNA levando à toxicidade, em consequência das alterações de sua função e processamento.

O 5-FU pode ser convertido em desoxirribosídio FUdR pela enzima timidina fosforilase e, posteriormente, em 5-flúor-2'-desoxiuridina-5'-fosfato(FdUMP), que em sua transformação em fluorodesoxiuridina trifosfato(FUTP) gera depleção fisiológica do TTP e, por sua similaridade a esse, incorpora-se ao DNA, desencadeando o processo de excisão-reparo com quebra dos seus filamentos. Como o reparo do DNA exige a presença de TTP, ocorre então morte celular.

Os metabólitos ativos do 5-FU exercem também seu efeito pela inibição da enzima timidilato sintetase (TS), que é responsável pela fonte de timidilato, necessário para replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Esse efeito ocorre através da reação de metilação reduzida do monofosfato de deoxiuridina (dUMP) em monofosfato de deoxitimidina (dTMP) e tendo o folato (5,10-metilenetetrahydrofolato) como doador de metil (SANTI; MCHENRY; SOMMER, 1974). O FdUMP liga-se a timidilato sintase no sítio do nucleotídeo, formando um complexo ternário com o folato; contudo, devido a estabilidade da ligação do flúor-carbono no FdUMP, gera-se uma inibição persistente da enzima, bloqueando a síntese de dTMP (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON,2003), o que acarreta alterações nos níveis dos deoxinucleotídeos, desequilíbrios em mecanismos de retroalimentação, acarretando quebra letal e morte celular.

Na prática oncológica, o 5-FU tem sido largamente utilizado em uma gama de tumores; incluindo o câncer de mama (DRULLINSKY *et al.*,2010; AMADORI *et al.*, 2011), câncer de cabeça e pescoço (LORCH *et al.*,2011), canceres do trato digestivo (TAKASHIMA *et al.*,2009), sendo o de maior impacto o câncer coloretal (IMPACT,1995; MANO *et al.*, 2008). Neste último, em diversos esquemas de associação tem levado a melhora da sobrevida global e sobrevida livre de doença e taxas de resposta de 10-15% quando em monoterapia e de 40% quando associado com irinotecan e oxaliplatina (TOURNIGND *et al.*,2004; FALCONE *et al.*,2007; RAMANATHAN *et al.*, 2008).

A principal restrição para uso desse quimioterápico é a margem de segurança devido aos efeitos colaterais, sendo os principais: a toxicidade gastrointestinal com náuseas, diarreia e mucosite; a toxicidade hematológica com mielossupressão (HIND *et al.*,2008); a toxicidade neurológica e cardíaca (KOSMAS *et al.*,2008). A mucosite associada ao 5-FU pode atingir mais de 40% dos pacientes que utilizam esta droga como parte do protocolo quimioterápico (BARASCH *et al.*, 2003; TROTTI *et al.*, 2003).

FIGURA 2. Vias de ativação do 5-fluorouracil (5-FU).

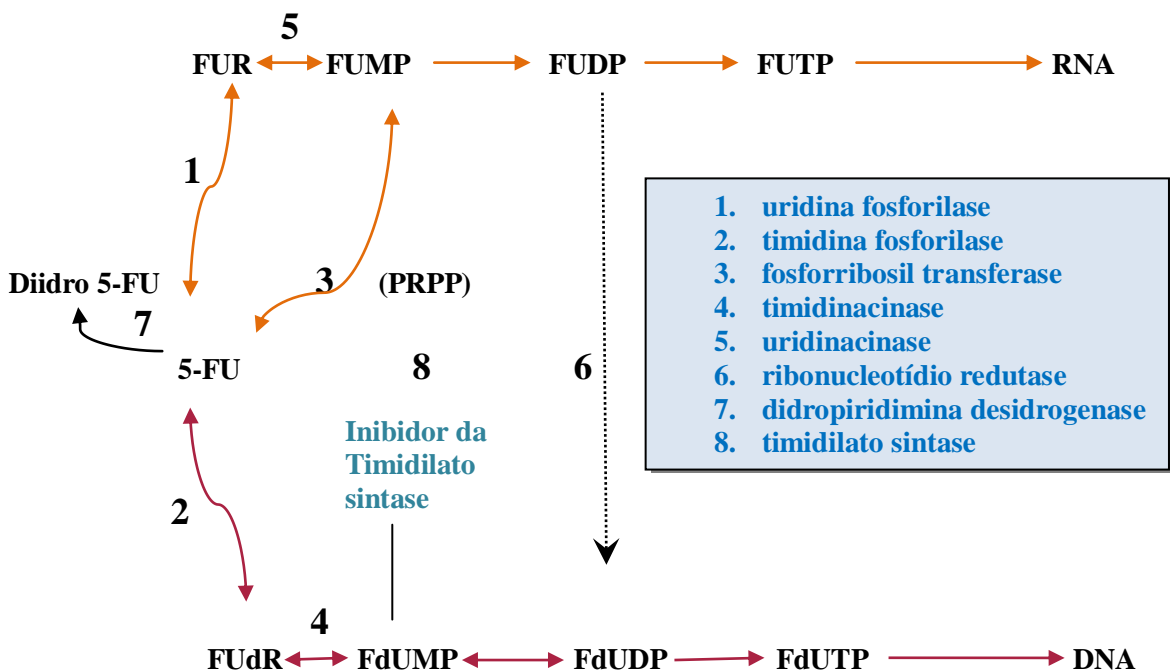


FIGURA 2: Vias de ativação do 5-fluorouracil (5-FU).

FUDP, fluorodesoxiuridina difosfato; FUMP, fluorodesoxiuridina monofosfato; FUTP, fluorodesoxiuridina trifosfato; FUdR, fluorodesoxiuridina; FdUDP, fluorodesoxiuridina difosfato; FdUMP, fluorodesoxiuridina monofosfato; FdUTP, fluorodesoxiuridina trifosfato; PRPP, 5-fosforribosil-1-pirofosfato.

Esquema adaptado de Goodman & Gilman, 2003.

1.2 Mucosite

Mucosite é um termo clínico usado para descrever as alterações da mucosa de todo o trato digestivo provocadas, dentre outras causas, pela radioterapia e/ou quimioterapia do câncer. Esta síndrome, dependendo da gravidade, pode ser caracterizada pelo surgimento de sinais iniciais como eritema, que pode evoluir até ulceração de toda a mucosa, podendo resultar em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (SONIS; FEY, 2002; SONIS *et al.*, 2004; SCULLY; SONIS, 2006).

A incidência e a gravidade da mucosite, assim como sua localização, vão variar em função do tipo de quimioterapia, do esquema empregado e da localização do tumor. De acordo com recente revisão de Keefe *et al.* (2007), evidenciada na **TABELA 1**, observam-se maior incidência de mucosite intestinal em relação à oral nos pacientes em tratamento de câncer de cólon, baixa incidência de mucosite oral e intestinal em pacientes submetidos ao

tratamento de câncer de pulmão, e alta incidência de mucosite oral em relação à intestinal nos regimes para tratamento de câncer de mama e linfoma.

TABELA 1. Risco de mucosite oral (MO) e diarreia graus 3 e 4 por regime de QT e tipo de tumor
95%IC- Intervalo de confiança de 95%

Tipo de câncer	Regime de QT	Número		Risco MO (Graus 3-4)		Risco Diarreia (Graus 3-4)	
		Estudos	Pacientes	%	95% IC	%	95% IC
Linfoma	CHOP-DI-14	4	231	7,8	5,28-11,32	2,36	1,32-4,65
	CHOEP-14	2	346	10,4	7,23-13,44	0,29	0,29-1,01
Mama	AC (semanal)	1	22	13,6	2,27-27,27	2,27	2,27-9,09
	AT	1	36	8,33	1,39-19,44	1,39	1,39-5,56
Pulmão	Gemcitabina+ Paclitaxel	2	109	1,84	1,02-5,33	3,69	2,05-6,97
	Platina+ Paclitaxel+ Outro	7	451	1,47	1,20-3,07	2,80	2,17-4,54
Colorretal	FOLFIRI	2	79	4,43	1,90-9,49	10,13	4,43-16,46
	IROX	3	337	1,48	0,59-2,97	24,33	19,59-29,08

Fonte: Adaptado de Keefe *et al.*, 2007 e Ribeiro *et al.*, 2008.

1.3 Mucosite oral

A mucosite oral (MO) é uma complicação muito frequente da terapia antineoplásica, constituindo-se num efeito colateral limitante de doses terapêuticas e responsável por aumento dos custos hospitalares. Atrasos na quimioterapia podem ser causados pela mucosite, particularmente quando são usados agentes mucotóxicos como: 5-fluorouracil, metotrexate, doxorrubicina, etoposide, melfalam, citarabina e ciclofosfamida (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

A frequência da mucosite oral é variável e influenciada por fatores relacionados aos pacientes, como a idade, o estado nutricional, a condição de pré-tratamento oral, a higiene bucal durante o tratamento, o número de neutrófilos no pré-tratamento (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998) e o sexo do paciente (BARASCH *et al.*, 2003); e ainda por fatores relacionados ao tratamento: diagnóstico, dose, tipo e frequência de administração da droga (SONIS *et al.*, 1997).

Em geral, pacientes jovens parecem apresentar um maior risco para desenvolver mucosite oral, provavelmente por terem uma taxa maior de mitose epitelial ou pela presença de um maior número de receptores de fator de crescimento epidérmico no epitélio. A mucosite oral é a complicação mais frequente e severa do tratamento quimioterápico, em crianças com câncer (KARIS *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento de doenças hematológicas, mais frequentes em crianças, tendem a apresentar uma mielossupressão mais intensa e prolongada, resultando numa mucotoxicidade indireta mais severa. Por outro lado, o declínio fisiológico da função renal associada à idade avançada de pacientes pode resultar em maior risco para desenvolver mucosite (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). Dados sugerem que ser do sexo feminino confere um risco maior de toxicidade para 5-FU e metotrexate (CHANSKY; BENEDETTI; MACDONALD, 2005).

Além dos quimioterápicos, outros fatores relevantes para desenvolver a MO são a doença periodontal crônica, o tabagismo, o abuso de álcool e o estresse psicoemocional (CHIAPPELLI, 2005) e a xerostomia pré-tratamento (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). Fatores genéticos podem desempenhar um papel importante no risco para mucosite. Os determinantes genéticos mais estudados são genes associados ao metabolismo de quimioterapia. Simultaneamente, há ainda novas classes de agentes antineoplásicos, como inibidores de receptores de mamíferos para rapamicina (mTOR), modificadores de receptores e fatores antiangiogênicos que estão sendo introduzidos e com eles vem o risco adicional de MO e novos tipos de lesão da mucosa (SONIS, 2009).

O aumento da morbidade e da mortalidade causadas pela mucosite oral contribui para o aumento dos custos na área da Saúde (RUBENSTEIN *et al.*, 2004). Entre pacientes em tratamento de câncer de pulmão e de cabeça e pescoço há um incremento de \$17000 (USD) por paciente, quando o mesmo apresenta mucosite oral (NONZE *et al.*, 2008). O crescente número de pacientes hospitalizados foi o principal responsável pelos altos custos associados à mucosite, pois resulta em mais exames, procedimentos, visitas clínicas e medicações. Foram relatados resultados similares em pacientes em transplante de medula óssea (TMO) (SONIS *et al.*, 2001).

A apresentação clínica da MO varia em grau de intensidade conforme a presença de descamação, eritema, ulcerações e abscessos. A mucosite oral, em sua forma severa, resulta em um grave desconforto e prejudica a capacidade dos pacientes para mastigar, deglutir e falar, necessitando muitas vezes de analgesia com opioides e nutrição parenteral (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006) (**FIGURA 3**). Associada à QT, que induz à mielossupressão, esses pacientes apresentam maior risco para bacteremia e sepse, visto que as lesões ulcerosas

funcionam como porta de entrada para infecções secundárias, resultando assim em internações mais prolongadas por febre e uso de antibióticos (BERGMANN, 1988; BERGMANN, 1989; LAINE *et al.*, 1992; DONNELLY *et al.*, 1995).

Pacientes podem apresentar mucosite oral em até 100% dos casos quando submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) (RUBENSTEIN *et al.*, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), pacientes que receberam altas doses de radioterapia na região de cabeça e pescoço também apresentam MO em quase 100% dos casos (PETERSON; BENSADOUN; ROILA, 2009).

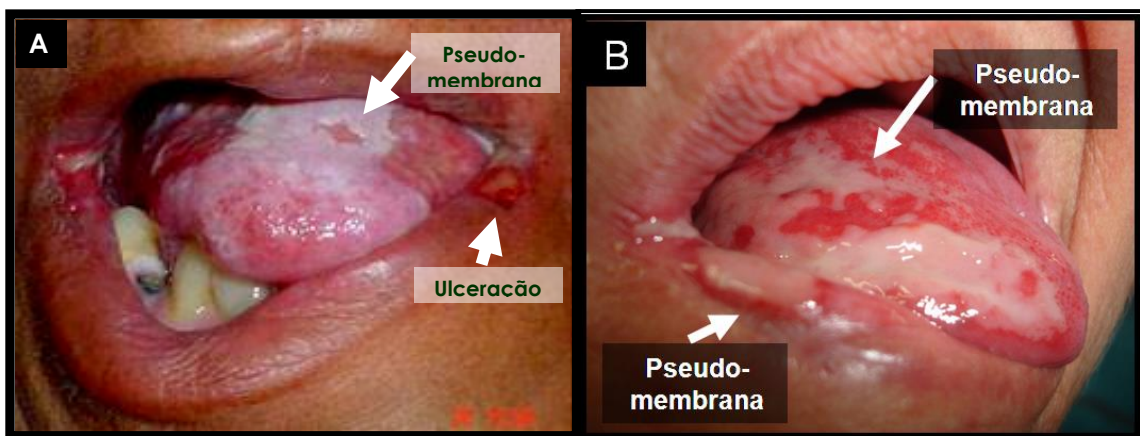
Pacientes em tratamento oncológico podem ser acometidos em cerca de 5 a 15% por mucosite mais grave (graus 3 e 4). Destes, em torno de 35% sofrerão atraso no ciclo subsequente de quimioterapia; em aproximadamente 60% haverá necessidade de redução de doses do esquema terapêutico e cerca de 30% terá de interromper o tratamento. Em protocolos de doses convencionais de QT, 70 % dos pacientes com graus 3 e 4 de MO necessitarão de sondas enterais para manterem uma nutrição adequada, 60% apresentarão febre e 62% terão indicação de hospitalização (SONIS *et al.*, 2004). Há um incremento nos custos de \$2.725 e de \$5.565 por ciclo para os pacientes com MO graus 1e 2 e graus 3 e 4, respectivamente, segundo relato de Elting *et al.* (2003).

Para que ocorra uma intervenção terapêutica adequada nos quadros de mucosite oral é importante que haja uma correta avaliação do grau de comprometimento da mucosa. As escalas de classificação da MO foram propostas a partir da necessidade de se avaliar de forma objetiva, através de pontuações, a gravidade da lesão da mucosa decorrente das diferentes abordagens antineoplásicas; quimioterapia, radioterapia ou ambas. Estas avaliações proporcionariam inclusive a tomada de medidas profiláticas, baseadas no risco de se desenvolver quadros graves de MO, já observados e pontuados anteriormente com determinadas doses e tipos de quimioterápicos, bem como com o uso de radioterapia.

As escalas, idealmente, devem ser compostas por um sistema de pontuação objetivo, validado e reprodutível em todas as situações clínicas, segundo Soniset *al.* (2004). Podemos dividir as escalas de avaliação da MO em três grupos; o primeiro avalia o aspecto clínico da mucosa oral, o grau de dor do paciente, e em alguns casos, a preservação das funções orais; como deglutição e capacidade de falar. Estas escalas foram desenvolvidas a partir da OMS para avaliação dos pacientes que estão recebendo terapia antineoplásica, utilizadas frequentemente por grupos cooperativos de oncologia. O segundo grupo de escalas seriam aquelas desenvolvidas para avaliação pela equipe de enfermagem e utilizadas como ferramentas de pesquisa clínica, caracterizadas pelo uso da combinação de variáveis objetivas,

funcionais e sintomáticas. Já o terceiro grupo consiste de escalas apropriadas para ensaios clínicos, onde se valeriam de escores detalhados e objetivos. As escalas mais importantes para orientar a terapêutica clínica são aquelas baseadas nas desenvolvidas pela OMS, pelo National Cancer Institute (NCI) e pelo Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (SONIS *et al.*, 2004) (QUADRO 1).

FIGURA 3. Mucosite oral grau 4 em pacientes, evidenciando intenso processo inflamatório, com ulcerações difusas e a formação de pseudomembranas (A) e (B)



Fonte: Ribeiro *et al.*, 2008.

QUADRO 1. Escores associados à mucosite oral

Escore para lesão	Mucosite oral	Mucosite oral por radiação	
	OMS	NCI-CTC	RTOG
Grau 0 (nenhum)	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos
Grau 1 (Leve)	Descamação associada ou não com eritema e dor	Eritema da mucosa	Irritação, possível quadro de dor leve que não requer analgesia
Grau 2 (moderado)	Ulcerações com ou sem eritema. Capacidade de ingestão de sólidos	Com manchas, reação pseudomembranosa (manchas de maiores dimensões >1,5 cm, não contíguas)	Mucosite com manchas que podem produzir um exudato inflamatório; dor moderada que requer analgesia
Grau 3 (grave)	Ulcerações com ou sem eritema extenso. Capacidade de ingestão de líquidos somente	Reação pseudomembranosa (manchas contíguas às de maiores dimensões >1,5 cm, não contíguas)	Mucosite confluyente fibrinosa; dor grave que requer narcóticos
Grau 4 (Risco à vida)	Ulceração, alimentação não é possível. Líquidos apenas na forma de suspensão para medicação. NPT requerida	Úlceras ou sangramentos ocasionais, não causados por traumas menores ou abrasões	Úlceras hemorrágicas ou necróticas
Grau 5 (morte)	-	Morte devido à toxicidade	-

Fonte: Graus para mucosite definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) e National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria for Adverse Events v 3.0 (NCI-CTC). NPT: Nutrição parenteral total,

1.3.1 Mucosite Oral - Patogênese

Alguns modelos animais foram propostos no intuito de se investigar melhor os mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite oral.

O primeiro modelo animal para investigar mucosite induzida por quimioterápico foi proposto por Sonis, em 1990. Ele induziu a mucosite oral em hamsters, através da administração de 5-FU e concluiu, em seu trabalho, que as alterações clínicas e histológicas encontradas na mucosa dos animais eram similares às aquelas que ocorrem em seres humanos. Vários estudos foram realizados em seguida, utilizando versões modificadas dele, a fim de investigar os eventos biológicos envolvidos na mucosite oral, desencadeados pela ação de drogas citotóxicas, bem como possíveis armas terapêuticas no combate a esse importante efeito colateral (SONIS *et al.*, 2000; LOURY *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2005; SONIS *et al.*, 1993; KEITH *et al.*, 1994; SONIS *et al.*, 1995; SONIS *et al.*, 1997; CLARKE *et al.*, 1999; SONIS *et al.*, 2004; ALVAREZ *et al.*, 2003; MORVAN *et al.*, 2004; AKSUNGUR *et al.*, 2004; MITSUHASHI *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2002).

Outro modelo em voga para avaliar mucosite é o murino, que vem sendo adotado com o objetivo de avaliar novas estratégias de tratamento contra a citotoxicidade associada a determinadas drogas. Balsari *et al.* (2001) conseguiram eliminar a mucosite oral causada pela apoptose epitelial, devido ao uso de doxorrubicina, através da aplicação tópica de anticorpo antidoxorrubicina, utilizando esse modelo animal.

Estudos vêm investigando largamente a patobiologia (BOWEN *et al.*, 2005; BECK *et al.*, 2004; GIBSON *et al.*, 2003; BOWEN *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2007) e o tratamento (GIBSON; BOWEN; KEEFE, 2005; COOL *et al.*, 2005; GIBSON *et al.*, 2002) da mucosite em ratos. Este é um dos modelos mais utilizados para investigar a mucosite induzida por quimioterapia (HOWARTH *et al.*, 1996; TRAN *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2002) e tem sido demonstrado como um modelo muito próximo do que ocorre em seres humanos. Diversos agentes antineoplásicos citotóxicos vêm sendo investigados nesse modelo animal, como: irinotecano, metotrexate e 5-FU.

Historicamente, a mucosite era vista como um evento único, mediado exclusivamente pelo epitélio, e resultado de efeitos tóxicos inespecíficos nas células epiteliais em divisão, relacionados à quimioterapia, à radioterapia ou a ambas (LOCKART *et al.*, 1981). Acreditava-se que o dano produzido na camada de célula epitelial basal levava à perda da capacidade de renovação do epitélio, resultando em morte celular, atrofia e,consequente,

ulceração. Estudos recentes mostraram que a fisiopatologia da MO não é um processo linear, principalmente quando se leva em consideração o papel da matriz extracelular e de outras células envolvidas nesse processo (SONIS *et al.*, 2004).

A participação de citocinas no desencadeamento da MO foi evidenciada tanto através do aumento de níveis séricos do fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e de interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), em pacientes pós-quimioterapia (HALL *et al.*, 1995), como através do aumento tissular de IL-1 β e de expressão de TNF- α , em modelo animal de mucosite (SONIS *et al.*, 2000). Estudos realizados com agentes capazes de atenuar a expressão de ambas as citocinas demonstraram eficácia na prevenção da mucosite experimental (SONIS *et al.*, 2000) e clínica (EPSTEIN *et al.*, 2001).

Sonis (2004) propôs um modelo para explicar os eventos envolvidos na instalação da mucosite oral, o qual seria composto por cinco fases: iniciação, resposta primária ao dano, amplificação do sinal, ulceração e cicatrização. Esses eventos relacionados ocorreriam de forma rápida e simultânea. A **FIGURA 4** resume os mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da mucosite oral.

A fase de iniciação consiste na geração de espécies reativas de oxigênio (reactiveoxygenspecies- ROS) pelo tecido lesado pela QT ou radioterapia. Estudos que mostram a geração de ROS após exposição a agentes estomatotóxicos (GATE *et al.*, 1999) e atenuação da MO por agentes que bloqueiam os radicais livre de oxigênio (CULY *et al.*, 2001), reforçam o importante papel das ROS nessa fase.

A segunda fase é caracterizada por múltiplos eventos que acontecem simultaneamente. Dano ao DNA e morte de células da camada epitelial diretamente por espécies reativas do oxigênio (ROS) não explicam a extensão da mucosite observada. Fatores de transcrição são gerados, dentre os quais o NFkB, podendo ser um dos reguladores centrais da mucosite por muitas de suas características: é ativado por radioterapia ou quimioterapia, seus inibidores são degradados pelo proteassoma 26S que é detectado em mucosa lesionada, possui a capacidade de regular genes com ampla resposta tecidual, e é ainda, responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzindo lesão tecidual e apoptose. Além disso, o NFkB promove a suprarregulação de genes que causam expressão de moléculas de adesão, ativação de vias da ciclo-oxigenase-2 e, conseqüentemente, angiogênese.

Outros mecanismos ocorrem como a produção de esfingomielinase pelas ROS, além de ativação direta da ceramidasintase pela quimioterapia que, atuando em paralelo ou sequencialmente, induzem apoptose primária (MADDENS *et al.*, 2002).

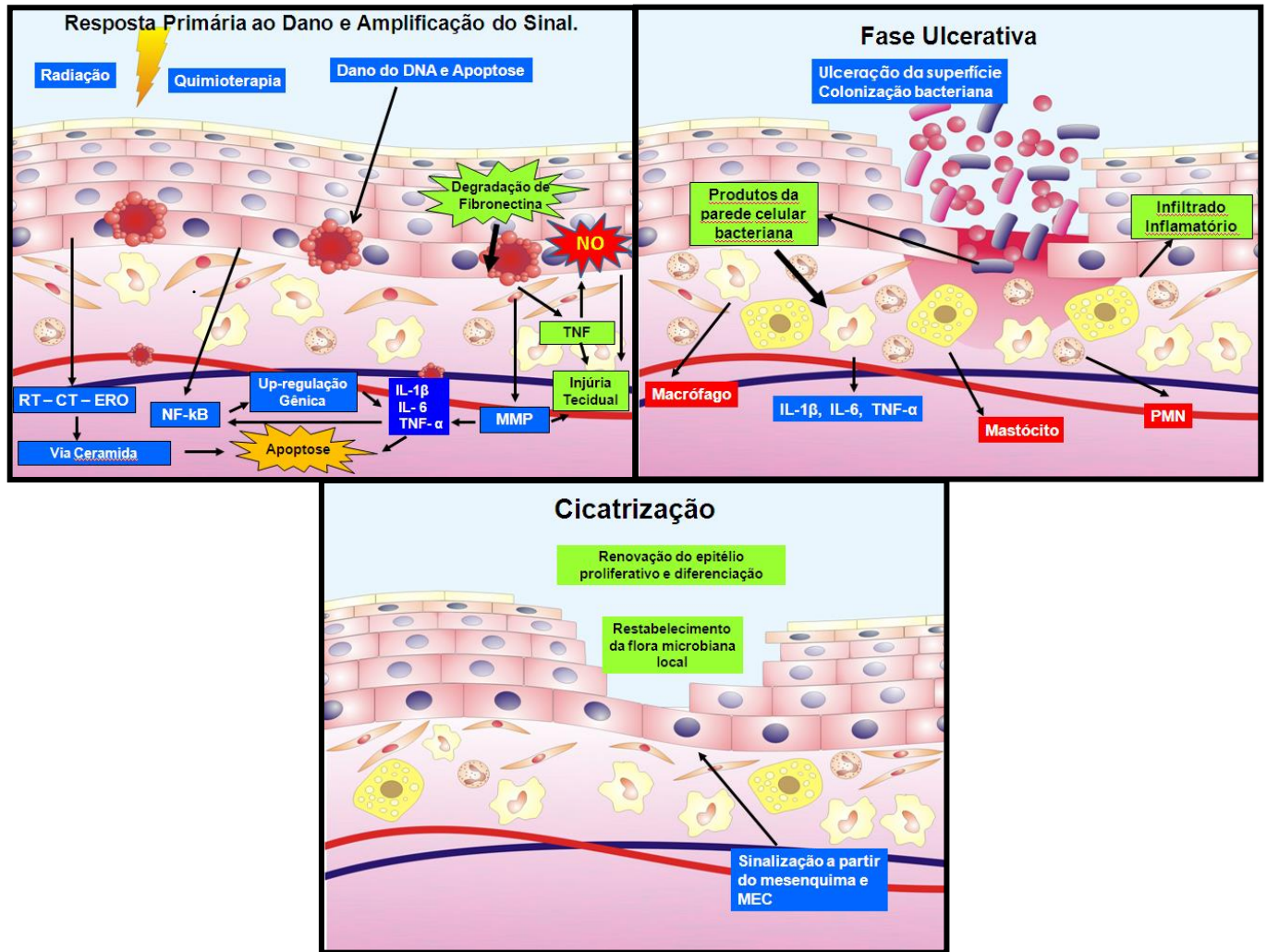
A desestruturação da fibronectina ocorre durante essa fase da mucosite. Os macrófagos ativados induzem à produção de metaloproteinases da matriz e TNF- α que causam mais dano tecidual em todos os níveis de toda região tecidual afetada.

A terceira fase da mucosite trata da amplificação dos sinais já descritos na segunda fase. As citocinas pró-inflamatórias atuam indiretamente ampliando a injúria causada pela quimioterapia ou radioterapia. O TNF- α , como exemplo, é ativado de vias da ceramida, caspase e de fatores de transcrição mediado pelo NF κ B, o que ocasiona maior produção de citocinas, apoptose e lesão tecidual.

A fase de ulceração representa o início dos achados clínicos e histopatológico de dano tecidual com aparecimento de infiltrados de polimorfonucleares e mononucleares e deterioração e quebra da barreira mucosa. A úlcera funciona como um foco de colonização bacteriana, num ambiente rico de micro-organismos levando à infecção secundária. As consequências dessa ulceração são amplificação de citocinas, inflamação e dor; estando o paciente em risco aumentado de bacteremia e sepse.

A última fase da mucosite é a cicatrização da mucosa epitelial. Inicia-se através da sinalização da própria matriz extracelular para proliferação e diferenciação epitelial, além de reestabelecimento da flora microbiana local. Apesar do tecido aparentemente normal, mudanças persistem com angiogênese residual aumentada na mucosa, o que predispõe a novos episódios de mucosite oral em terapias subsequentes.

FIGURA 4. Fases de desenvolvimento da mucosite



A: fase de iniciação, resposta primária ao dano e amplificação do sinal;

B: Fase ulcerativa;

C: fase de cicatrização.

COX-2 – Cicloxigenase 2;

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio;

IL-1β - Interleucina-1β;

IL-6 – Interleucina-6;

PMN – Polimorfonucleares;

MEC – Meio Extracelular;

MMP – Metaloproteinase;

NF-κB – Fator Nuclear kappa B;

NO – Óxido Nítrico;

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral α.

Fonte: adaptado de Keefe *et al.*, 2007 e Ribeiro *et al.*, 2008.

1.3.2 Mucosite Oral - Tratamento e Prevenção

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se buscar terapêuticas eficazes para o combate da mucosite oral. As orientações atualmente preconizadas para a prevenção e o tratamento da mucosite oral são encontradas em consensos publicados baseados nos critérios da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e da European Society for Medical Oncology (ESMO). Esses consensos avaliam os resultados de diversos estudos clínicos e trazem não somente recomendações para uso de novas drogas, como é o caso da palifermina, como também o que não deve ser usado, como é o caso da clorexidine.

As últimas atualizações das diretrizes para o manejo clínico da MO foram as publicadas por Keefe *et al.* (2007) e por Peterson, Bensadoun e Roila (2009), na Sociedade Americana de Câncer e *Annals of Oncology*, respectivamente. Esta última apresenta as recomendações da ESMO. No **QUADRO 2**, resumem-se as orientações baseadas em ambas as publicações, nela podemos observar que as terapêuticas indicadas são: benzidamina, para prevenir mucosite induzida por moderadas doses de radioterapia (RT) de cabeça e pescoço, crioterapia oral em pacientes que receberão 5-FU e/ou edatrexate, ambos em doses-padrão e naqueles que receberão altas doses de melfalam. Além disso, há a orientação de se utilizar palifermina em pacientes que estão recebendo 5-FU e leucovorin e naqueles que serão submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) autólogo e receberão irradiação total do corpo. Para os pacientes que receberão altas doses de quimioterapia e/ou quimioradioterapia prévia ao TCTH é indicado terapia com laser de baixa potência para reduzir a incidência de MO, sendo esta terapia também utilizada no manejo da mucosite causada por altas doses de RT em cabeça e pescoço.

Nos últimos anos foram propostas novas estratégias para a profilaxia e tratamento da mucosite oral, baseadas na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão e cicatrização desse importante efeito colateral da terapia antineoplásica (SONIS *et al.*, 2001; SONIS *et al.*, 1998). No entanto, como podemos observar nos últimos consensos, as terapêuticas utilizadas não abrangem todos os casos de mucosite oral, pois suas indicações são específicas para alguns agentes antineoplásicos e para radioterapia em determinadas doses. A percepção de que grupos de sintomas ocorrem em determinados pacientes, sugerem que a predição de risco genético para a toxicidade, em breve poderá ser uma realidade, levando assim ao desenvolvimento de tratamentos baseados em novos mecanismos (KEEFE *et al.*, 2007).

QUADRO2. Sumário de guidelines de práticas clínicas baseadas em evidências para o cuidado de pacientes com mucosite oral.

MUCOSITE ORAL
CUIDADOS BÁSICOS DE HIGIENE BUCAL E PRÁTICAS CLÍNICAS
<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação, seguimento e cuidados sistemáticos da saúde bucal dos pacientes por equipe multidisciplinar. Orientação de pacientes e responsáveis para uso de protocolos de cuidados orais, a fim de se reduzir a gravidade da mucosite oral induzida por quimioterapia, radioterapia ou ambas. • Uso de escovas dentais com cerdas macias que devem ser trocadas regularmente. • Morfina como analgésico de escolha para tratamento da dor na MO em pacientes submetidos ao TCTH . Uso frequente de escalas validadas como instrumento para avaliação da dor, no seguimento dos pacientes. • Uso de anestésicos tópicos para alívio da dor em curto prazo.
RADIOTERAPIA: PREVENÇÃO
<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento com radiação tridimensional para reduzir as lesões da mucosa. • Benzidamina para prevenção de mucosite induzida por moderadas doses de radioterapia de cabeça e pescoço. • Clorexidine não é recomendado para prevenir MO em pacientes com tumores sólidos de cabeça e pescoço que receberão radioterapia. • Sucralfato e pastilhas antimicrobianas não são recomendadas para prevenção de MO induzida por radioterapia.
RADIOTERAPIA: TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> • Sucralfato também não é recomendado

ADMINISTRAÇÃO DE DOSES-PADRÃO DE QUIMIOTERÁPICOS: PREVENÇÃO

- Trinta minutos de crioterapia oral em pacientes que estão recebendo 5-FU em bolus.
- Vinte a trinta minutos de crioterapia oral para reduzir a MO em pacientes tratados com edatrexate em bolus.
- Aciclovir e seus análogos não devem ser utilizados rotineiramente para prevenir MO.
- Palifermina (fator de crescimento de queratinócito1) pode ser útil na dose de 40µg/kg/dia por 3 dias em pacientes que estão recebendo 5-FU e leucovorin.

ADMINISTRAÇÃO DE DOSES-PADRÃO DE QUIMIOTERÁPICOS: TRATAMENTO

- Clorexidine não é recomendado para reverter a mucosite oral já estabelecida.

QUIMIOTERAPIA EM ALTAS DOSES, COM OU SEM IRRADIAÇÃO TOTAL DO CORPO, ASSOCIADA AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS: PREVENÇÃO

- Palifermina é recomendada na dose de 60µg/kg/dia por 3 dias antes do condicionamento e por 3 dias após o TCTH autólogo em pacientes portadores de malignidades hematológicas que receberam altas dose de QT e irradiação total do corpo.
- Crioterapia é sugerida para prevenção da MO em pacientes recebendo altas doses de melfalam.
- Pentoxifilina não é recomendada para pacientes submetidos a TCTH.
- Enxágue bucal com fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos não é indicado para pacientes que serão submetidos a TCTH.
- Terapia com laser de baixa potência (TLBP) é sugerida para reduzir a incidência de MO e a dor relacionada a ela, em pacientes que recebem altas doses de QT ou quimiorradioterapia prévia ao TCTH. TLBP também é útil no manejo da mucosite causada por altas doses de radioterapia em cabeça e pescoço.

1.4 Xerostomia

A saliva desempenha um papel importante na manutenção da saúde bucal, visto que é responsável pela integridade dos tecidos orais, diluição de detritos alimentares e bactérias e pela limpeza mecânica da cavidade oral. Além disso, previne infecções orais, na medida em que proporciona atividade antimicrobiana (JENSEN *et al.*, 2010).

Quando há hipofunção da glândula salivar, geralmente coexiste uma sensação constante de secura da boca, implicando ainda em sérios riscos de desenvolvimento de infecções orais, desconforto da mucosa bucal e dor, que prejudicam o funcionamento oral, levando a uma piora do estado nutricional.

Durante o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, por exemplo, morbidades relacionadas às glândulas salivares são esperadas durante e após a radioterapia que envolve a exposição dessas glândulas (VISSINK *et al.*, 2003). No entanto, a xerostomia não está associada apenas ao tratamento com radioterapia, mas também à quimioterapia, podendo chegar a 49,9% de prevalência, segundo alguns estudos (WICKHAM *et al.*, 1999; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2007; BLOMGREN *et al.*, 2002). A xerostomia pode ocorrer não somente durante, mas também, após a terapia antineoplásica, apresentando-se algumas vezes como seqüela do tratamento. Alguns pacientes podem ainda apresentar xerostomia de forma temporária e outros podem nem ser afetados.

É possível que o 5-FU possa levar à hipossalivação através da redução da taxa de renovação celular ou ainda, pelos micro-organismos que estariam presente na mucosa comprometida pelos efeitos do quimioterápico, o que levaria á infecção e, conseqüentemente, à hipossalivação.

1.5 Amifostina- Um agente citoprotetor

Espera-se que um agente citoprotetor ideal tenha capacidade de reduzir a toxicidade induzida tanto por radioterapia como por quimioterapia em tecidos normais, sem no entanto interferir negativamente com os efeitos terapêuticos benéficos dessas intervenções, podendo inclusive potenciá-los. Esses fármacos devem ainda ser bem tolerados (KOUKORAKIS *et al.*, 1999).

Atualmente, dispomos de alguns citoprotetores que possuem indicações bem estabelecidas na prática clínica oncológica:

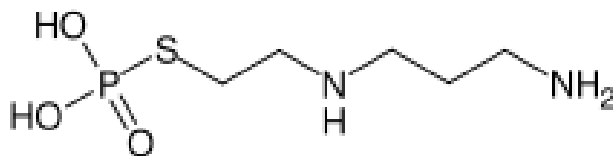
- Mesna é utilizada quando as oxazofosforinas, ciclofosfamida ou ifosfamida fazem parte do tratamento quimioterápico. Seu mecanismo de ação envolve um antagonismo químico com a acroleína, metabólito urotóxico desses fármacos, o que culmina com proteção da mucosa urotelial, prevenindo a cistite hemorrágica (COX, 1979).

- Ácido folínico previne a toxicidade na mucosa do trato gastrointestinal, causada pela administração de metotrexate (FLOMBAUM *et al.*, 1999).

- Fatores de crescimento hematopoiético recombinante humano, como fator estimulador de colônias de macrófago e granulócito (rhGM-CSF), de granulócitos (rhG-CSF) e eritropoietina recombinante humana (rhEPO) são agentes citoprotetores com atividade contra neutropenia e anemia, respectivamente (RUBENSTEIN, 2000; HENKE *et al.*, 1999).

WR-2721 foi desenvolvida pelo Programa de desenvolvimento de drogas antirradiação do exército americano para proteger contra lesões causadas pela radiação ionizante (YUHAS *et al.*, 1969). Atualmente, WR-2721 é conhecida como amifostina (**FIGURA 5**). Este tiol é considerado um agente citoprotetor de amplo espectro, que protege as células contra as lesões causadas por radicais livres de oxigênio e apresenta um importante papel na redução da toxicidade causada por agentes quimioterápicos e pela radioterapia (HENSLEY *et al.*, 1999).

FIGURA 5. Estrutura química da amifostina



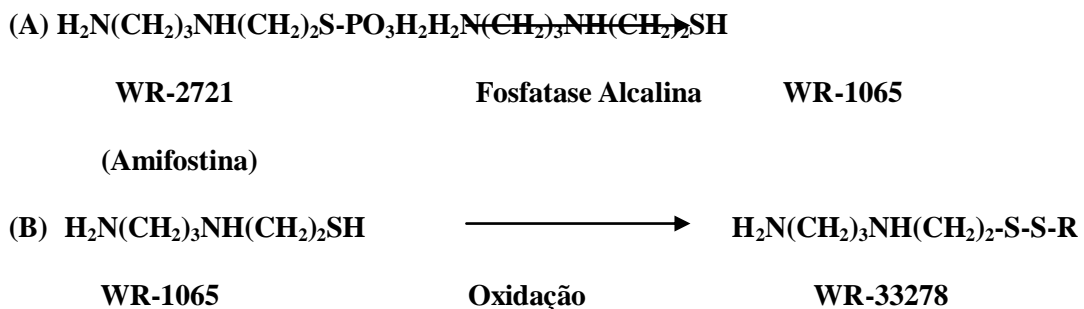
Fonte: Adaptado de www.websters-online-dictionary.org/definitions/Amifostine

Amifostina, ácido 2-[(3-aminopropil)amino]etilfosforotióico, é uma pró-droga que só apresenta seu efeito protetor quando é defosforilada a metabólito ativo, WR-1065, através da fosfatase alcalina (CALABRO- JONES *et al.*, 1985). WR-1065 é ainda metabolizado a uma molécula dissulfeto, que está envolvida em outros mecanismos de citoproteção (**FIGURA 6**).

O grupo tiol é capaz de eliminar radicais livres produzidos pela radiação ionizante ou por fármacos antineoplásicos como as antraciclinas e bleomicinas (KOUKORAKIS, 2002).

A proteção seletiva é resultado do grande acúmulo do metabólito ativo em tecidos normais. Os tecidos tumorais, por serem relativamente hipovasculares, apresentam níveis de hipóxia e baixo pH intersticial, além da expressão reduzida de fosfatase alcalina, o que desfavorece o acúmulo da droga ativa nesses tecidos. Seu mecanismo de ação envolve a eliminação de radicais livres, protegendo dessa forma, as membranas celulares e o DNA de danos causados por esses radicais (YUHAS *et al.*, 1980). Estudos *in vitro* sugerem ainda que a indução de anóxia celular pode ser um mecanismo de radioproteção da amifostina (PURDIE *et al.*, 1983), o que pode, indiretamente, levar à suprarregulação da expressão de várias proteínas envolvidas no reparo de DNA e inibição de apoptose, como Bcl-2 e o fator 1 α indutor de hipóxia (KAJSTURA *et al.*, 1996; SHIMIZU *et al.*, 1996; CARMELIET *et al.*, 1998) (FIGURA7).

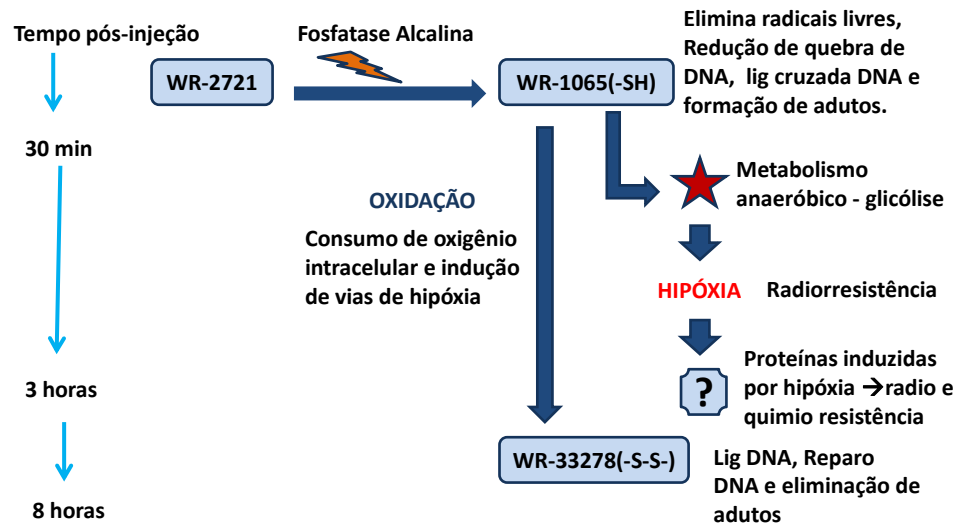
FIGURA 6. (A) Conversão de WR-2721, pró-droga inativa, a um metabólito ativo WR-1065. (B) Oxidação de WR-1065 a WR-33278.



Fonte: Adaptado de Koukorakis,2002.

Imediatamente após a administração de WR-2721 na dose de 150mg/m², a concentração máxima (100-800µmol/l) é alcançada em 1 minuto e a meia-vida é extremamente rápida; 0,88 min (SHAW *et al.*, 1986). Após a administração da amifostina, aproximadamente 2,2% dela e de seus metabólitos são excretados na urina, indicando, portanto, que mais de 90% da droga e de seus metabólitos encontram-se no meio intracelular (SHAW *et al.*, 1988). Estudos farmacocinéticos com animais demonstram uma rápida distribuição da droga nos tecidos, exceto no cérebro, pela incapacidade da droga de atravessar a barreira hematoencefálica (RASAY *et al.*, 1988).

FIGURA 7. Mecanismo de ação da amifostina.



Fonte: Adaptado de Koukourakis, 2002.

A via de administração inicialmente utilizada para amifostina era a intravenosa; no entanto, a via subcutânea tornou-se alvo de grande interesse clínico pela praticidade da administração e por ser essa via mais adequada para certos esquemas terapêuticos que requerem doses diárias desse citoprotetor (KOUKORAKIS *et al.*, 2002).

Amifostina é geralmente bem tolerada, no entanto pode causar eventos adversos transitórios relacionados à dose utilizada: hipotensão, náusea, vômitos, espirros, sonolência, gosto metálico durante a infusão e, ocasionalmente, reações alérgicas como febre, rash e choque anafilático (BLUMBERG *et al.*, 1982). Algumas reações estão mais associadas com a via de administração como é o caso da hipotensão e a infusão endovenosa e febre e reações cutâneas, ambas mais relacionadas à via subcutânea (SASSE; CLARK; SASSE, 2006).

Amifostina foi gradualmente deixando de ser utilizada por conta da severa hipotensão que causava. Ao se observar, contudo, que esse efeito adverso não ocorria quando a droga era administrada por via subcutânea, a amifostina foi resgatada de forma segura como importante citoprotetor. Bardet *et al.* (2011) compararam em um estudo de fase III, o uso da amifostina por via subcutânea e intravenosa em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, em tratamento radioterápico. Os resultados mostraram que amifostina por via intravenosa causava hipotensão em 19% dos pacientes, enquanto que por via subcutânea esse efeito adverso caía para 8%, sendo essa diferença, estatisticamente significativa. Esse estudo

mostrou ainda que, em relação a incidência de xerostomia, em 1 ano, foi maior em pacientes que receberam amifostina por via subcutânea, porém, não houve diferença significativa em ambos os grupos, quando se analisava a xerostomia que ocorria em 2 a 3 anos do tratamento.

Estes resultados vão de encontro às recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica que, em sua atualização de 2008, baseada em três estudos randomizados, orientou amifostina para pacientes em tratamento radioterápico. Já em estudos que avaliam pacientes que recebem uma combinação de QT e RT, dois deles sugerem benefício no uso da amifostina (ANTONADOU *et al.*, 2002; VACHA *et al.*, 2003) e dois, não observaram benefício (BUENTZEL *et al.*, 2006; HADDAD *et al.*, 2009). Postula-se que as explicações para esses dados controversos sejam por pontuação inadequada para avaliação da xerostomia, bem como a falta de grupo placebo, na maioria dos estudos e pelo possível agravamento da xerostomia pelo uso da cisplatina (HEY *et al.*, 2009), que é difícil de combater pelo tratamento com amifostina.

Estudos vem sendo conduzidos no sentido de investigar diferentes usos da amifostina. Seu papel protetor contra leucemogênese e carcinogênese vem sendo demonstrado em diversos estudos experimentais (GRDINA *et al.*, 1985; GRDINA; NAGY; SIGDESTAD, 1988; HILL *et al.*, 1986; BOREK *et al.*, 1983; MILAS *et al.*, 1984; UPTON *et al.*, 1986). Esse citoprotetor está ainda sendo investigado na síndrome mielodisplásica, visto que foi demonstrado que amifostina é capaz de estimular hematopoiese (LIST *et al.*, 1997; LIST *et al.*, 1998; KLIMECKI *et al.*, 1997; BOWEN *et al.*, 1998).

Yuhas *et al.* (1979) demonstraram que amifostina reduz a toxicidade de agentes alquilantes, sem afetar seu efeito antineoplásico. Foi demonstrado adicionalmente por Allalunis-Turner e colaboradores, em 1988, que amifostina reduz a toxicidade pulmonar induzida pela ciclofosfamida. Além disso, mostrou-se um importante papel protetor da amifostina contra a toxicidade da doxorubicina nos miócitos (DORR; LAGEL; MCLEAN, 1996).

Antonadou, Coliarakis e Synodinoume t(2001), em um estudo multicêntrico de pacientes com câncer avançado de pulmão, demonstraram que o pré-tratamento diário com amifostina reduzia a incidência da toxicidade pulmonar aguda e tardia e da esofagite, sem afetar a eficácia do tratamento radioterápico. Vários estudos têm demonstrado ainda que o pré-tratamento com amifostina pode reduzir a incidência e a severidade da toxicidade gastrointestinal que comumente ocorre com o tratamento radioterápico ou quimioradioterápico (KOUKORAKIS *et al.*, 2000; ANTONADOU *et al.*, 2004;

ATHANASSIOU *et al.*, 2004; BEN-JOSEF *et al.*, 2002; KOUKOULIAS *et al.*, 2005, BENSADOUN *et al.*, 2006).

Cosar *et al.* (2011) demonstraram que a lesão renal crônica experimental em ratos, induzida por radioterapia, pode ser reduzida pelo pré-tratamento dos animais com amifostina. Foram utilizados 3 grupos de animais: controle e 2 grupos que receberam radioterapia nos rins direitos, sendo que um dos grupos recebeu amifostina por via i.p. antes da irradiação. No dia do sacrifício, na 24^a semana, foram coletadas amostras de sangue e dos rins. Amifostina reduziu os níveis séricos de malondialdeído (MDA) e do produto da proteína oxidativa avançada (AOPP), quando comparada ao grupo irradiado e aumentou significativamente os níveis séricos da atividade de catalase e glutatona. Nas amostras renais, houve uma significativa redução de MDA e AOPP, além da atividade de glutatona.

Lino (2011) em sua dissertação de mestrado, avaliou o efeito protetor da amifostina na neuropatia sensitiva periférica experimental, induzida por oxaliplatina. Os resultados demonstraram que amifostina promoveu uma importante ação protetora nas alterações sensitivas e teciduais na neuropatia sensitiva periférica, induzida pela oxaliplatina e que tal efeito parece ser devido a uma ação antioxidante, desde que inibiu a expressão da proteína *fos* e da nitrotirosina; e a um efeito antiapoptótico, exercido através da ativação do receptor NMDA. Seguindo a linha de estudo para a prevenção de neuropatia causada por cisplatina e seus compostos relacionados, Albers *et al.* (2011) avaliaram diversas intervenções terapêuticas, dentre elas a amifostina. Os pesquisadores demonstraram resultados favoráveis para a neuroproteção por amifostina, quando eram utilizados testes sensoriais quantitativos.

1.6 Justificativa

Considerando o recente avanço que a terapia antineoplásica tem conferido à sobrevivência dos pacientes oncológicos, tem se evidenciado de forma paralela, um aumento nos eventos adversos relacionados ao tratamento.

A mucosite oral é uma complicação frequente, podendo acometer até 100% dos pacientes, dependendo do esquema quimioterápico utilizado. Além disso, consiste num efeito limitante da terapêutica, visto que pode levar ao atraso nos ciclos, redução de doses dos quimioterápicos, interrupção do esquema de tratamento. A hipossalivação representa outro efeito colateral de alguns quimioterápicos que pode complicar o tratamento por representar um incremento nos riscos de desenvolvimento de infecções orais.

Pesquisadores do Laboratório de Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, vêm realizando estudos com amifostina no intuito de investigar os mecanismos de ação desse citoprotetor. Nesse contexto, Mota em 2004, em seu trabalho de doutorado, estudou o efeito da amifostina na MO experimental induzida por 5-FU em hamsters e demonstrou, preliminarmente, que a droga revertia as lesões causadas pelo quimioterápico de forma significativa. Foi avaliado ainda, neste mesmo trabalho, o efeito citoprotetor na mucosa intestinal de pacientes submetidos à quimioterapia; os resultados sugeriram que amifostina previne a disfunção da barreira intestinal. Batista *et al.*(2006) demonstraram o efeito protetor do tratamento com amifostina na cistite hemorrágica induzida pela injeção sistêmica de ifosfamida, assim como pela injeção intravesical de acroleína, seu metabólito urotóxico indutor dos eventos inflamatórios e da hemorragia. Adicionalmente, Junqueira-Júnior *et al.* (2011), demonstraram que o mecanismo pelo qual amifostina protege da lesão gástrica induzida por etanol em ratos, envolve a restauração de estoques de glutathione.

A proteção da amifostina conforme a experiência do LAFICA em diversos modelos de efeitos colaterais de drogas antineoplásicas, aliada à relevância da mucosite oral como efeito adverso limitante do uso terapêutico dessas drogas, e ainda sem uma terapêutica padrão, estimulou-nos a dar continuidade ao estudo dos mecanismos de ação desse citoprotetor no modelo experimental de mucosite oral.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Demonstrar o efeito protetor da amifostina, via inibição de TNF- α , IL-1 β e NOSi, na mucosite oral e na hipossalivação induzidas por 5-fluorouracil em hamsters.

2.2 Objetivos específicos

- Demonstrar o efeito protetor da amifostina sobre os eventos inflamatórios na mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil em hamsters, através da curva ponderal, da contagem de leucócitos totais, de escores macroscópicos e histopatológicos e da atividade de mieloperoxidase.
- Avaliar o efeito da amifostina sobre as alterações salivares na mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil em hamsters.
- Verificar o efeito modulador da amifostina sobre a produção local de TNF α , IL-1 β , e NOSi, avaliada pela dosagem de citocinas e imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados hamsters *Golden siriam* (*Mesocricetus auratus*) machos, com massa corpórea entre 100 e 150 gramas (g), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram alojados em caixas de plástico, em grupo de 6 animais. Utilizou-se ração padrão purina *CHOW* e jerimum, com livre acesso à água.

A seleção de hamsters para os experimentos foi baseada na facilidade de observação de suas mucosas jugais e por sua habilidade em tolerar doses de quimioterápicos capazes de induzir mucosite oral sem mortalidade significativa (SONIS *et al.*,1990).

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA 01/11)), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, para uso de animais experimentais. Os animais em apreço foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claros-escuros controlados durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais, bem como a dor, o sofrimento e o estresse a que eles foram submetidos.

3.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Balança analítica Ohaus AS2600
- Balança analítica Marte AL200
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- ELISA ELX 800 – Biotex
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergiestation T8.10 – Ika Labortechnik
- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N

- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000 μ l
- Microscópio binocular Nikon Alphaphot2 VS2
- Micrótomo Olympus
- Placa de 96 poços
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)

3.3 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados

- FLUOROURACIL: ampola de 10ml (25mg/ml) (EUROFARMA)
- HIDRATO DE CLORAL (REAGEN)
- HEMATOXILINA (REAGEN)
- EOSINA (MERK)
- FORMALDEIDO (ANALÍTICA)
- TRIBROMO ETANOL
- ÁLCOOL ETÍLICO PA (ANALÍTICA)
- AMIFOSTINA
- Anticorpo primário (goat anti-TNF- α) (SANTA CRUZ-BIOTECH)
- Anticorpo primário (rabbit anti-NOS) (SANTA CRUZ-BIOTECH)
- Anticorpo primário (rabbit anti- IL-1 β) (SANTA CRUZ-BIOTECH)
- DIAMINOBENZIDINA (DAKO)
- Kit Duo Set $\text{\textcircled{R}}$ TNF- α - (R&D SYSTEMS)
- Kit Duo Set $\text{\textcircled{R}}$ IL-1 β - (R&D SYSTEMS)
- Anticorpo secundário (antigoatIgG) (BIOGEN)
- Peroxidase
- Xilol
- Tampão citrato
- PBS
- BSA: albumina bovina; cód. A-7906, Sigma

3.4 Protocolo Experimental

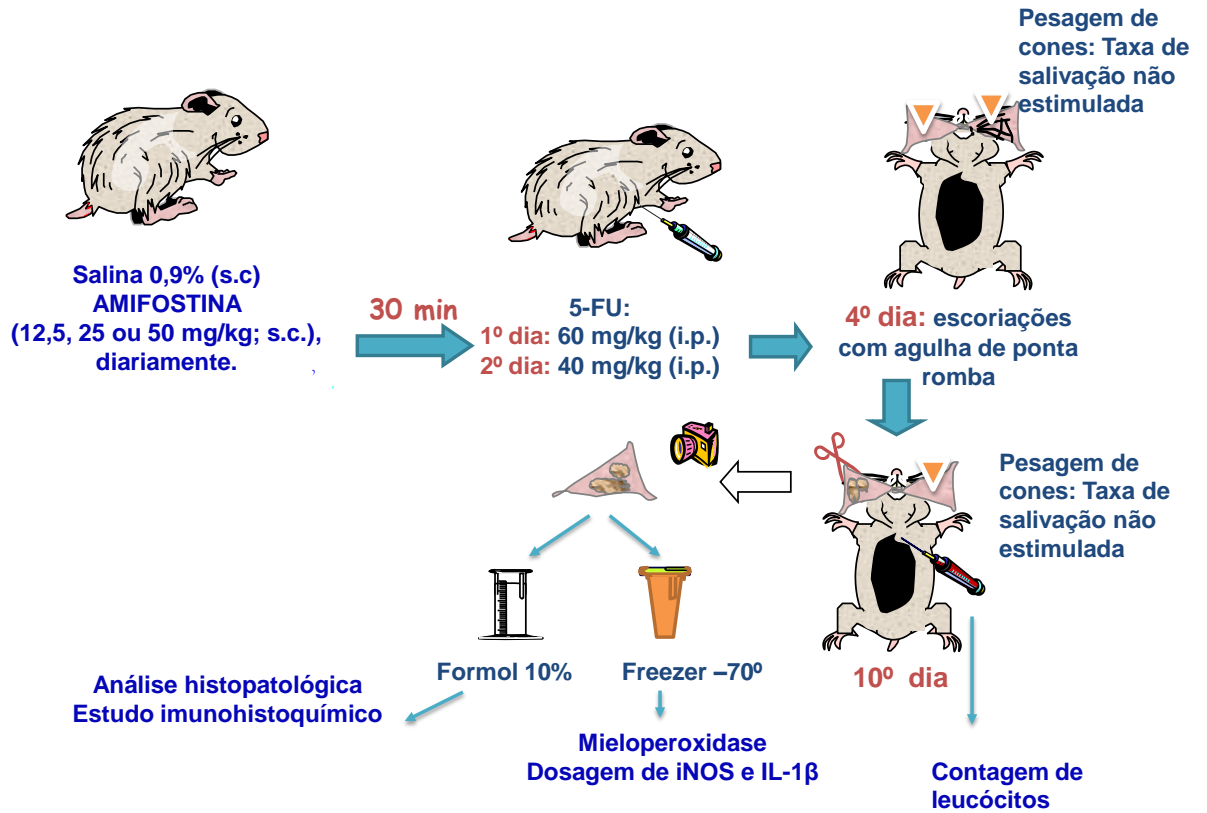
3.4.1 Modelo de mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamsters

Utilizou-se o modelo de mucosite oral experimental, originalmente desenvolvido por Sonis *et al.* (1990) e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina UFC (LEITÃO *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2005). A **FIGURA 8** ilustra, através de esquema, o protocolo experimental.

Os animais receberam 5-FU em doses de 60 e 40 mg/kg nos dias 1 e 2, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.). No quarto dia, foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais, previamente anestesiados com tribromo-etanol na dose de 250 mg/kg, i.p., para reproduzir os sinais clínicos da irritação crônica. O trauma mecânico (TM) foi constituído pela realização de quatro ranhuras distribuídas no sentido radial e duas no sentido periférico; em ambas as faces de uma mesma mucosa, com o auxílio de uma agulha de calibre 22G (BD).

O sacrifício dos animais foi realizado no 10º dia do experimento com Hidrato de Cloral a 10% (300 mg/kg i.p.).

FIGURA 8. Protocolo de mucosite oral experimental.



Fonte: Adaptado de Lima, 2004.

3.4.2 Grupos experimentais

I. Animais (n=6) foram tratados com solução salina a 0,9% (5ml/kg, i.p.), nos dias 1 e 2.

II. Animais (n=6) foram submetidos à indução de mucosite experimental, através de 5-FU nos dias 1 e 2, respectivamente, nas doses 60 e 40 ml/kg, por via intraperitoneal (i.p.), submetidos a trauma mecânico, no quarto dia e tratados com solução salina a 0,9% (5ml/kg, s.c.), diariamente.

III. Animais (n=6) foram submetidos a trauma mecânico, no quarto dia; tendo recebido solução salina a 0,9% (5ml/kg, i.p.) nos dias 1 e 2.

IV, V e VI. Animais (n=6, em cada grupo) foram submetidos à indução de mucosite oral experimental e tratados com amifostina. Os grupos IV, V e VI receberam amifostina nas doses de 12,5, 25 ou 50mg/kg/dia, respectivamente, por viasubcutânea (s.c.), durante os dias de experimento, sendo que, nos dias 1 e 2, a droga era administrada 30 minutos antes da aplicação de 5-FU.

3.5 Parâmetros avaliados

3.5.1 Análise da variação de massa corpórea

Para avaliação ponderal, os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental (10 dias). Os valores encontrados foram expressos em variação percentual de peso em relação ao peso inicial.

3.5.2 Avaliação da taxa de salivação não estimulada

Os animais submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU, assim como o grupo salina e o grupo ranhura, foram anestesiados com tribromo etanol no 4º e 10º dias de experimento, respectivamente, para avaliação da taxa de salivação (LEITÃO *et al.*, 2007). Para tal, a saliva pré-existente nas cavidades bucais foi retirada por bolinhas de algodão, posicionadas no assoalho bucal. Em seguida, cones de papel de filtro para uso em endodontia (TANARI Industrial LTDA, Brasil) foram pesados e posicionados bilateralmente no assoalho bucal para absorção da saliva secretada durante 5 minutos. Após esse período, os cones foram retirados e novamente pesados. A produção salivar durante 5 minutos foi determinada pela diferença entre as duas pesagens.

3.5.3 Estudo Hematológico

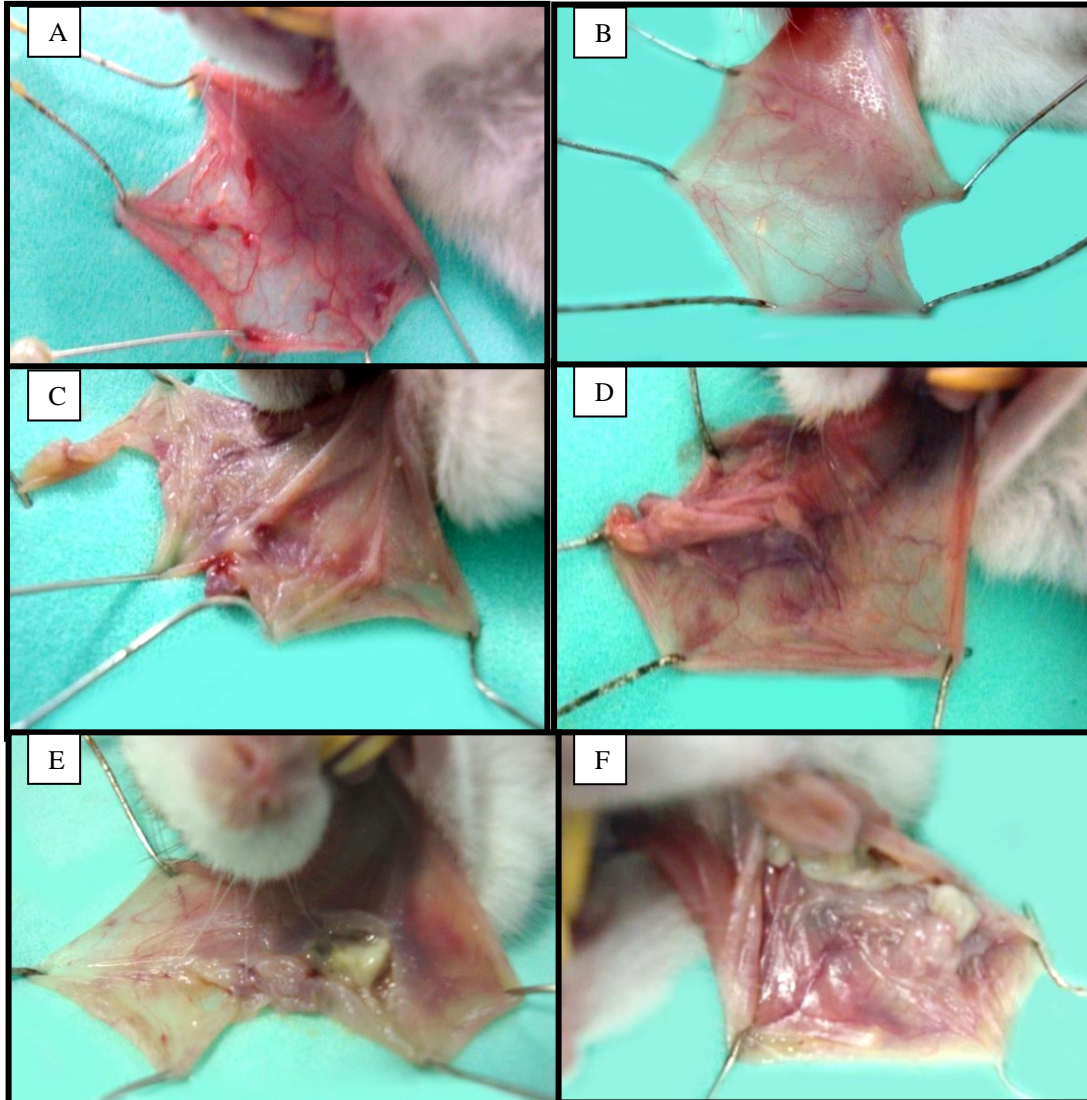
No 10º dia, os animais foram anestesiados com Hidrato de Cloral a 10% (300 mg/kg i.p.). Em seguida, foi retirado sangue através do plexo coroide do olho direito de cada animal. Adicionalmente, 20 µL de sangue foram diluídos em 380 µL de Líquido de Turk, para a realização da contagem total do número de leucócitos. Logo após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A contagem dos leucócitos séricos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer, juntamente com o uso do microscópio óptico (100X; Nikon). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos, contados nos quatro campos da câmara e, posteriormente, multiplicados pelo fator de correção desta. Por fim, os valores foram expressos em nº de células/mm³.

3.5.4 Análise macroscópica das mucosas jugais

Previamente ao sacrifício dos animais, no 10º dia, suas mucosas jugais direitas foram expostas para serem analisadas e fotografadas, antes de serem removidas. Para análise macroscópica foram observados os aspectos inflamatórios como presença, intensidade e extensão de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados a seguir (SONIS *et al.*, 2000) (**FIGURA9**):

- **Escore 0:** mucosa jugal completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação.
- **Escore 1:** presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa.
- **Escore 2:** eritema severo, vasodilatação e erosão superficial.
- **Escore 3:** formação de úlceras em uma ou mais faces, afetando até 25% da área da mucosa jugal. Severo eritema e vasodilatação.
- **Escore 4:** formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área da mucosa jugal.
- **Escore 5:** virtualmente completa ulceração da mucosa jugal. Exposição da mucosa jugal dificultada, sem que haja sangramento.

FIGURA 9. Gradação por escores de 0 a 5 quanto aos aspectos macroscópicos de mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral.



Aspecto das mucosas jugais de hamsters normais,
escore 0 (A);
escore 1 (B);
escore 2 (C);
escore 3 (D);
escore 4(E) e
escore 5(F).

3.5.5 Análise histopatológica das mucosas jugais

O estudo histopatológico das mucosas jugais realizado em cortes seriados de 5 µm de espessura foi observado ao microscópio óptico (40X e 100X). No dia do sacrifício, após a realização das fotos, as mucosas foram removidas e divididas. Uma parte foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24h e, em seguida, conservada em álcool a 70% até o dia de preparação das lâminas. A outra parte da mucosa foi congelada a -70 °C para aferição de mieloperoxidase (MPO) e dosagem de citocinas. Para análise microscópica foram avaliados presença e intensidade do infiltrado inflamatório celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados de 0 a 3 (**FIGURA10**), em nosso laboratório (LIMA *et al.*, 2005), citados a seguir:

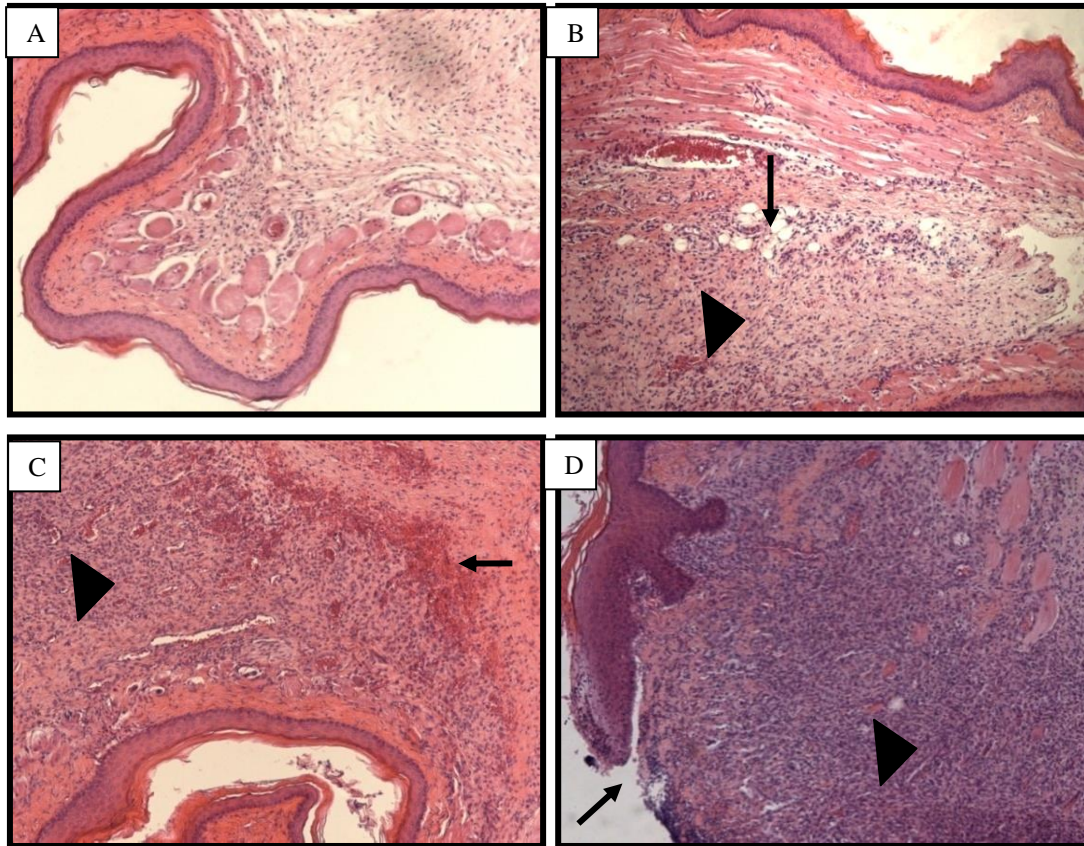
- **Escore 0:** epitélio e conjuntivo sem vasodilatação, infiltrado celular inflamatório ausente ou discreto; ausência de hemorragia, edema, úlceras ou abscessos.

- **Escore 1:** ingurgitamento vascular discreto, áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, às custas de leucócitos monocelulares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras ou de abscessos.

- **Escore 2:** ingurgitamento vascular moderado, degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas de hemorragia, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.

- **Escore 3:** ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada, infiltrado celular acentuado, predominando polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

FIGURA 10. Cortes histopatológicos de mucosa jugal de hamsters com escore 0 (A), escore 1 (B), escore 2 (C) e escore 3 (D) de mucosite oral.



Em B, seta vertical evidenciando edema;

Em C, seta horizontal indicando hemorragia;

Em D, seta inclinada apontando para presença de úlcera.

Em B, C e D, cabeça de seta evidenciando infiltrado celular discreto, moderado e acentuado, respectivamente.

3.5.6 Dosagem de mieloperoxidase

O corte das mucosas jugais, inicialmente congeladas, foi utilizado para aferição da mieloperoxidase (MPO) por método colorimétrico. As amostras (45 a 100 mg) das mucosas jugais dos hamsters foram colocadas em tampão fosfato de potássio com HTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio), em pH 6,0, na proporção de 50mg/ml e homogeneizadas PolitronUltra-Turrax, sob condições adequadas de refrigeração. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 3400 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante, colhido. Este foi transferido para tubos de eppendorfs e novamente centrifugado (10 min) para a melhor remoção de

contaminantes. Após plaqueamento de 7 μ L do sobrenadante, em duplicata, (placas de 96 poços), 200 μ L da solução de leitura (5mg de o-dianisidine; 15 μ L H₂O₂1%, 3mL de NaPO₄ buffer; 27mL de H₂O₂ destilada) foram adicionados aos poços e foi realizada a leitura a 460nm (t₀=0 min e t₁= 1 min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de MPO e os valores obtidos foram expressos em atividade de MPO U/mg tecido.

As medidas de atividade da MPO foram realizadas através de uma versão modificada do método descrito por Bradley, Christensen e Rothstein(1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato para MPO. A unidade de atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 μ mol de H₂O₂ em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como atividade de MPO/mg de tecido.

3.5.7 Imuno-histoquímica para TNF α , IL-1 β e NOSi.

A imuno-histoquímica para TNF α , IL-1 β e NOSi foi realizada usando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). No décimo dia experimental, os animais que receberam solução salina, os que foram submetidos ao TM e os que receberam 5-FU e amifostina na dose de 50mg/kg/dia foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. Ato contínuo, foram desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em lâminas microscópicas de poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados “*overnight*” (4° C) com anticorpo primário anti-TNF α de caprino, anti-IL-1 β e anti-NOSi, ambos de coelho, diluído 1:100 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Em seguida, foram encubados com “biotinylatedgoatanti-habbit”; diluído 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavados, os cortes foram novamente incubados com o complexo conjugado “avidin-biotin-horseradishperoxidase” (Strep ABC complexo pela VectastainR ABC Reagent e solução de peroxidase) por 30 minutos, de acordo com o protocolo da Vectastain. TNF- α , IL-1 β e NOSi foram visualizados com o cromógeno 3,3’diaminobenzidine (DAB). Os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em uma série de concentrações de álcool, clareados com xilol

e, por fim, a lamínula foi colocada. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%, e nenhum desses mostraram imunorreatividade para TNF α , IL-1 β ou NOSi.

3.5.8 Dosagem tecidual de citocinas TNF α e IL-1 β

Amostras de mucosa jugal dos animais que receberam solução salina, os que foram submetidos ao TM e os que receberam 5-FU e amifostina na dose de 50mg/kg/dia foram retiradas no 10° dia para análise de citocinas e estocadas em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção de TNF α e IL-1 foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpos anti-TNF α murino e anti-IL-1 murino (2 μ g/ml, cada). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram, então, lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti- TNF α e anti-IL-1 diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor 0-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado 15 min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 15 a 20min. A reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e a absorbância medida a 490 nm. O resultado foi expresso em pg/ml/mg proteína.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPadPrism®, versão 5.0, empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme os dados apresentassem distribuição normal ou não, respectivamente. Quando identificada diferença significativa entre os grupos, foram utilizados seguidamente o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média \pm

E.P.M (dados paramétricos) ou pela mediana (mínimo -máximo) (dados não paramétricos). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com amifostina sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral

Na avaliação macroscópica das mucosas jugais, realizadas através de escores, detectou-se que a administração do 5-fluorouracil (5-FU) foi capaz de induzir um significativo aumento ($p < 0,05$) no grau atribuído à lesão [5(3-5)] quando comparado ao grupo tratado apenas com salina [0 (0-0)] ou trauma mecânico [1(1-3)]. Em relação aos grupos tratados com amifostina (AMF), verificou-se que as doses 25 e 50 mg/kg conferiram uma proteção estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo que recebeu 5-FU ([2(1-4); 2,5(1-5)]) (**TABELA 4**).

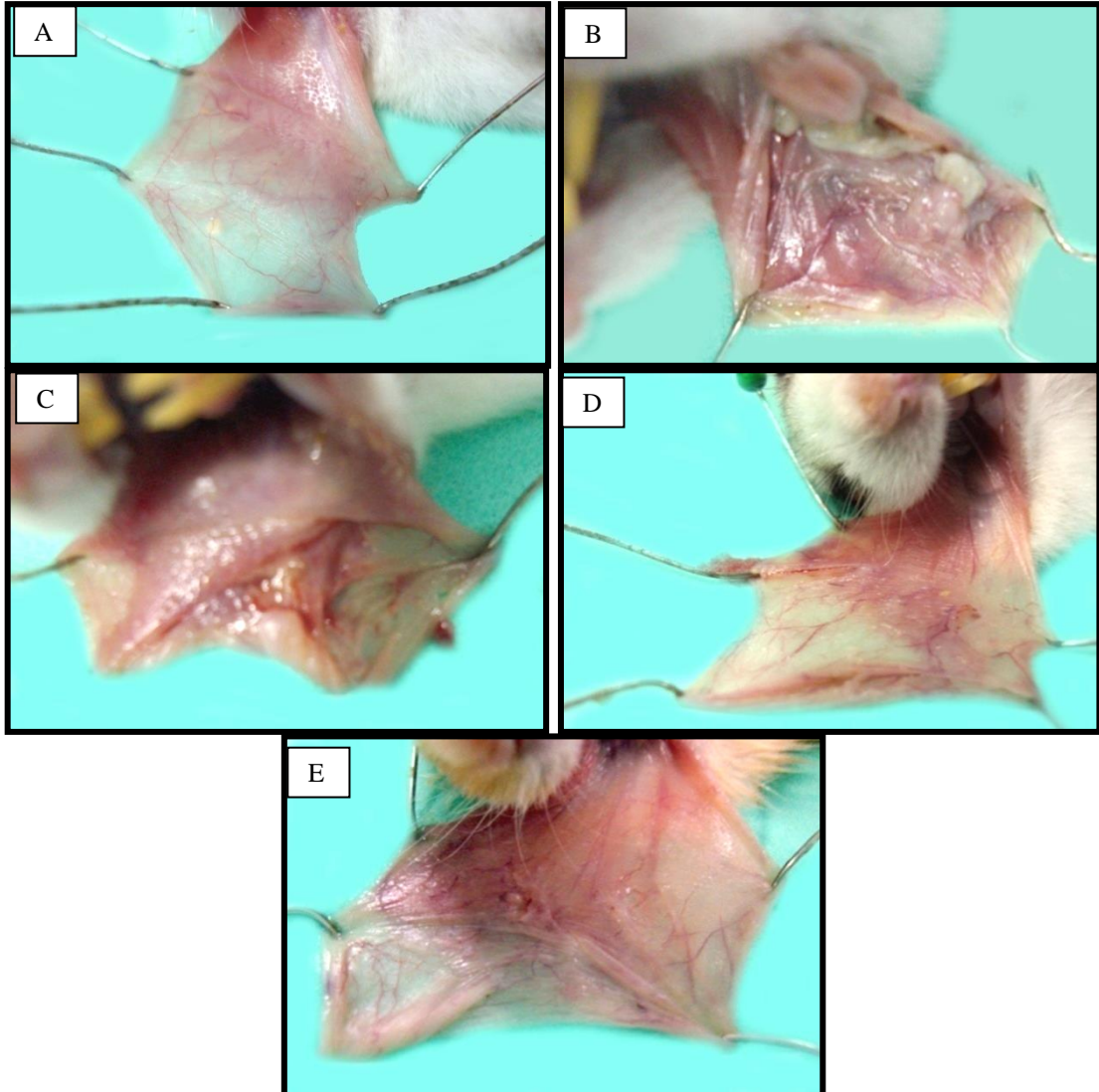
A **FIGURA 11** ilustra o aspecto macroscópico das mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral experimental, obtidas no décimo dia do experimento de animais que receberam salina, 5-FU e amifostina (12,5, 25 e 50 mg/kg/dia).

4.2 Efeito da amifostina sobre os aspectos histológicos observados na mucosite oral

Na avaliação microscópica das mucosas jugais, realizadas através de escores, detectou-se que a administração do 5-FU foi capaz de induzir um significativo aumento ($p < 0,05$) no grau atribuído à lesão [3(2-3)] quando comparado aos grupos salina [0 (0-0)] ou trauma mecânico [2(0-3)]. Em relação aos grupos tratados com AMF, verificou-se que as doses 12,5 e 50 mg/kg conferiram uma proteção estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo que não recebeu 5-FU [2(0-3); 2(0-3)] (**TABELA 2**).

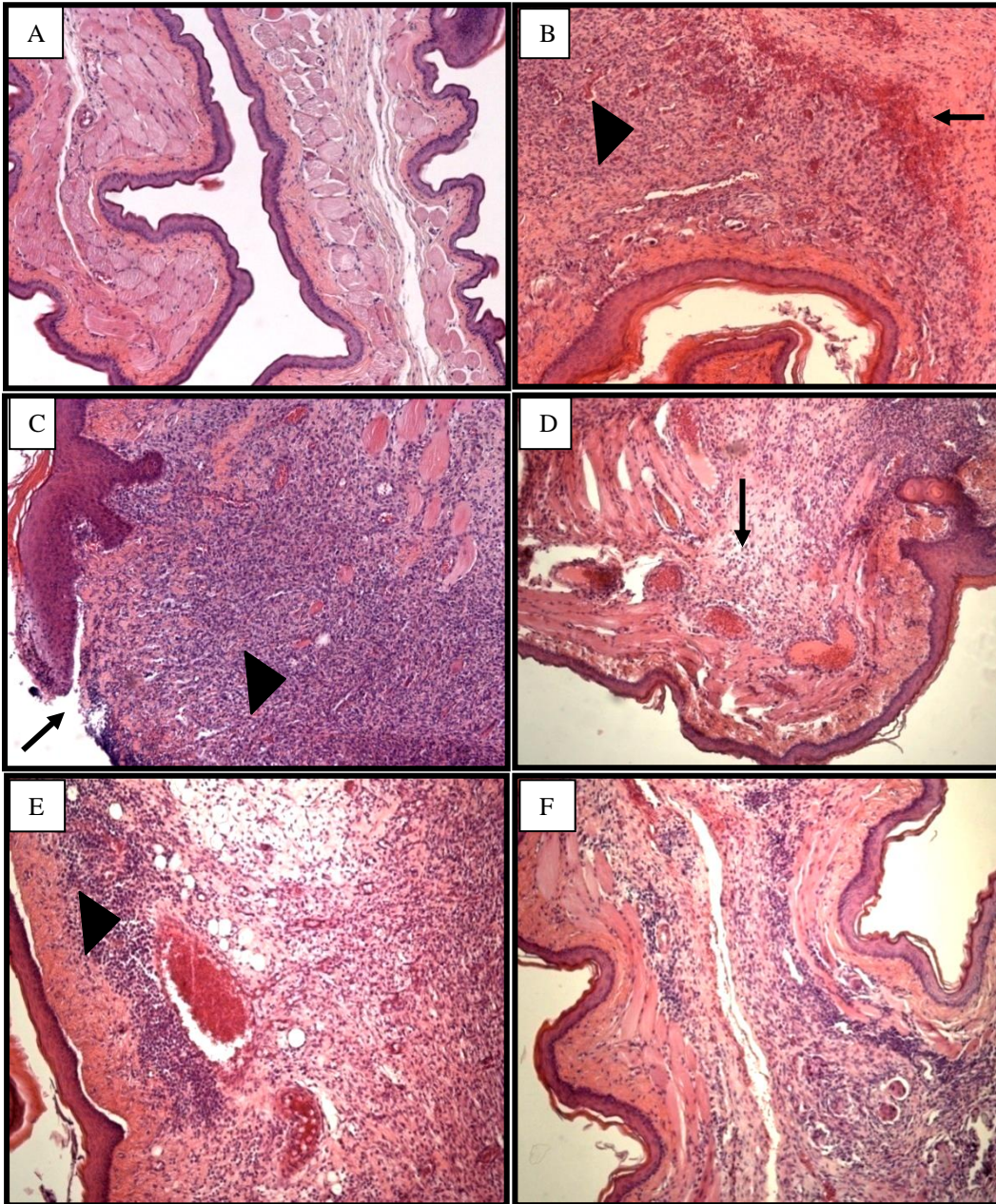
A **FIGURA 12** ilustra de modo representativo o aspecto microscópico das mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral experimental, obtidas no décimo dia do experimento em animais tratados com salina, 5-FU e amifostina (12,5, 25 e 50 mg/kg/dia).

FIGURA 11. Aspecto macroscópico das mucosas jugais de animais tratados com salina (A), submetidos à mucosite oral experimental (B) e tratados com amifostina nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia (C, D e E, respectivamente).



A mucosite oral em hamsters foi realizada através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg diariamente até o 10º dia. Os hamsters foram sacrificados no 10º dia, quando tinham suas mucosas jugais direitas expostas para serem analisadas e fotografadas, antes de serem removidas. Para análise macroscópica foram observados os aspectos inflamatórios como presença, intensidade e extensão de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos.

FIGURA 12. Aspecto microscópico (aumento de 40x) de mucosa jugal normal (A), submetida a trauma mecânico (TM) (B), com mucosite oral experimental (C) e com mucosite experimental tratada com AMF 12,5 (D), 25 (E) e 50 mg/kg/dia (F).



Em B, seta horizontal evidenciando hemorragia e cabeça de seta, infiltrado celular moderado em C, seta inclinada indicando úlcera e cabeça de seta, infiltrado celular acentuado em D, seta vertical evidenciando edema e em E, cabeça de seta indicando infiltrado celular moderado.

A mucosite oral em hamsters foi realizada através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg diariamente até o 10º dia. Os hamsters foram sacrificados no 10º dia, quando tinham suas mucosas jugais removidas. O estudo histopatológico das mucosas jugais foi realizado em cortes seriados de 5µm de espessura, ao microscópio óptico (40X e 100X), no dia do sacrifício, após a realização das fotos. As mucosas foram removidas e divididas, sendo uma parte fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24h e após, conservada em álcool a 70% até o dia de preparação das lâminas. Para análise microscópica foram avaliados presença e intensidade do infiltrado inflamatório celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados de 0 a 3 em nosso laboratório.

TABELA 2. Amifostina reduz de forma dose-dependente os escores macroscópicos e os microscópicos, em animais submetidos à mucosite oral.

Grupos	Escore	
	Macroscópicos	Microscópicos
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
TM	1(1-3)	2 (0-3)
5-FU + Salina	5 (3-5) *	3(2-3) *
AMF 12,5+ 5-FU	3,5 (1-5)	2 (0-3) #
AMF 25+ 5-FU	2 (1-4) #	2,5 (1-3)
AMF 50 + 5-FU	2,5 (1-5) #	2 (0-3) #

A mucosite oral em hamsters foi realizada através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico das mucosas jugais (4º dia). Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50 mg/kg diariamente até o 10º dia. Os hamsters foram sacrificados no 10º dia, quando tinham suas mucosas jugais direitas expostas para serem analisadas e fotografadas, antes de serem removidas. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Teste de Dunn) dos animais com mucosite oral pelo 5-FU em relação àqueles tratados com salina. # $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com amifostina em relação àqueles tratados com 5-FU.

4.3 Efeito da amifostina sobre a variação de massa corpórea dos animais submetidos à mucosite oral experimental

A administração de 5-FU causou significativa redução corpórea (%/dia) dos animais ($p < 0,05$), a partir do 5º dia ($94,15 \pm 1,19$), quando comparado ao grupo salina ($99,73 \pm 0,35$).

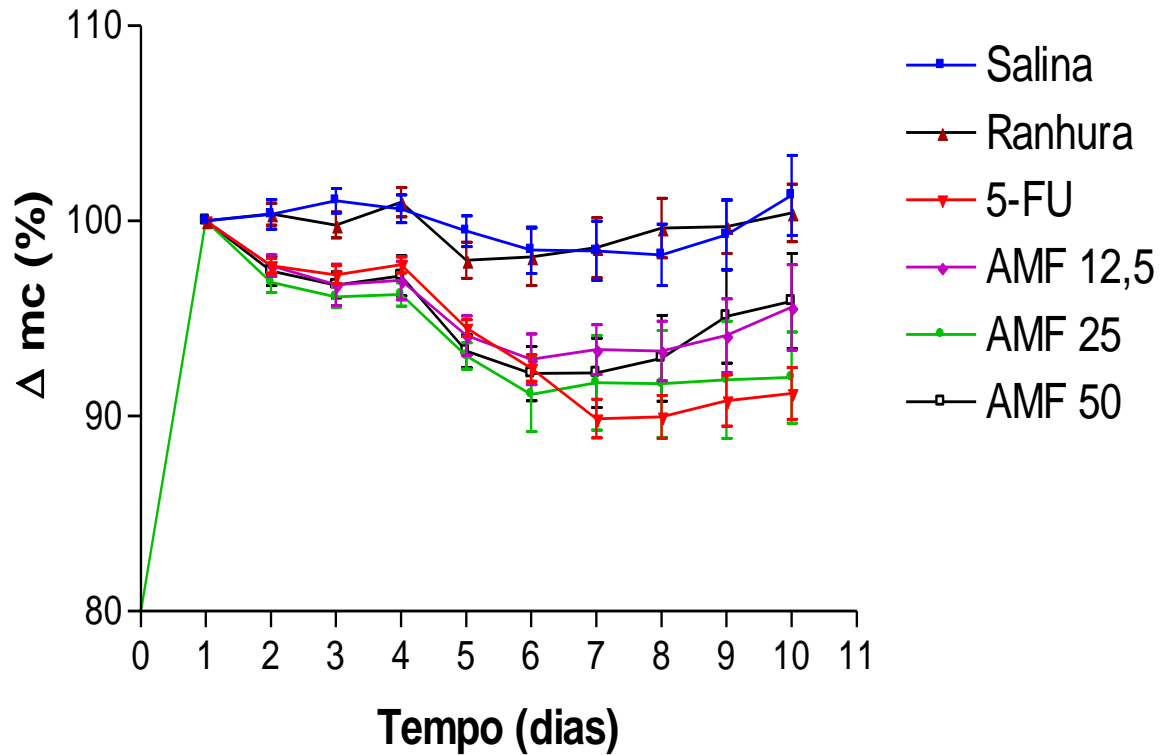
O pré-tratamento dos animais com amifostina nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia não preveniu de forma significativa ($p > 0,05$) a variação de massa corpórea ($95,49 \pm 0,73$; $94,06 \pm 0,95$; $95,31 \pm 0,82$, respectivamente) quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU (**FIGURA 13**).

4.4 Efeito da amifostina sobre a contagem total de leucócitos séricos dos animais submetidos à mucosite oral experimental

A mucosite oral induzida por 5-FU não alterou de forma significativa ($p > 0,05$) o número de leucócitos totais (leucócitos/mm³), no 10º dia (10590 ± 1430), quando comparado ao grupo salina (10750 ± 2821).

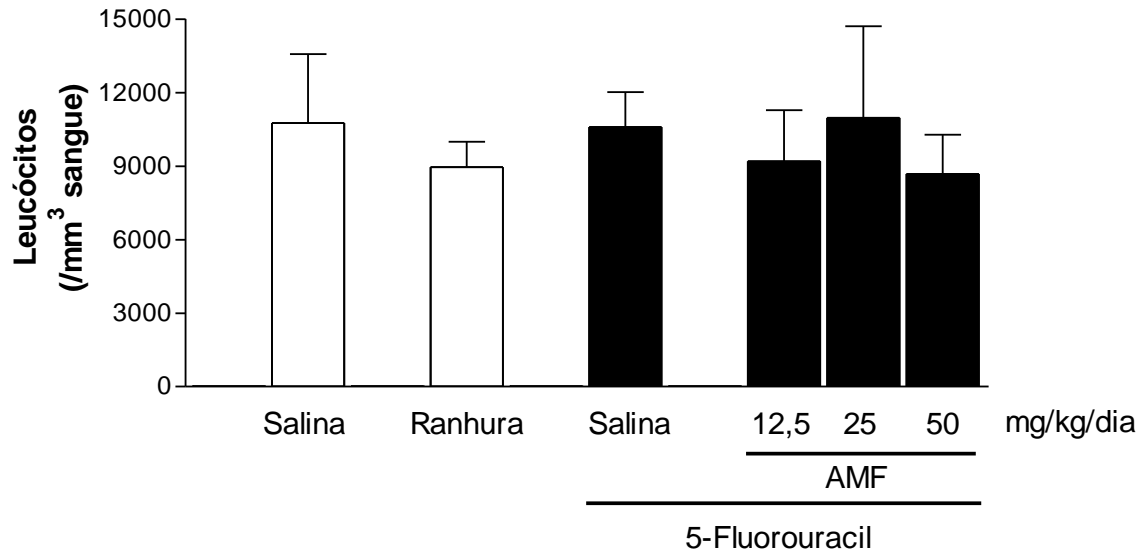
O pré-tratamento dos animais com amifostina nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia não alterou de forma significativa ($p > 0,05$) o número de leucócitos totais, no 10º dia (9193 ± 2091 ; 10960 ± 3740 ; 8675 ± 1603 , respectivamente), a despeito da administração do 5-FU quando comparado ao grupo que recebeu 5-FU (**FIGURA 14**).

FIGURA 13. Amifostina não previne a perda ponderal em animais submetidos à mucosite oral.



A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico das mucosas jugais (4º dia). Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. Os pontos representam a variação de porcentagem das massas dos animais em relação às suas massas originais, durante 10 dias. O gráfico revela que o 5-FU induziu significativa perda de peso quando comparado ao grupo tratado com salina ($p < 0,05$). Adicionalmente, amifostina em nenhuma das doses testadas conferiu proteção aos animais quando comparada ao grupo 5-FU ($p > 0,05$). O trauma mecânico por si não interferiu com a curva ponderal dos animais em comparação ao grupo salina ($p > 0,05$). * $p < 0,05$ representa estatística do grupo de animais submetidos à mucosite oral vs grupo tratado com salina. (Anova; Bonferroni)

FIGURA 14. Amifostina não alterou o número de leucócitos totais em hamsters submetidos à mucosite oral induzida por 5-FU.

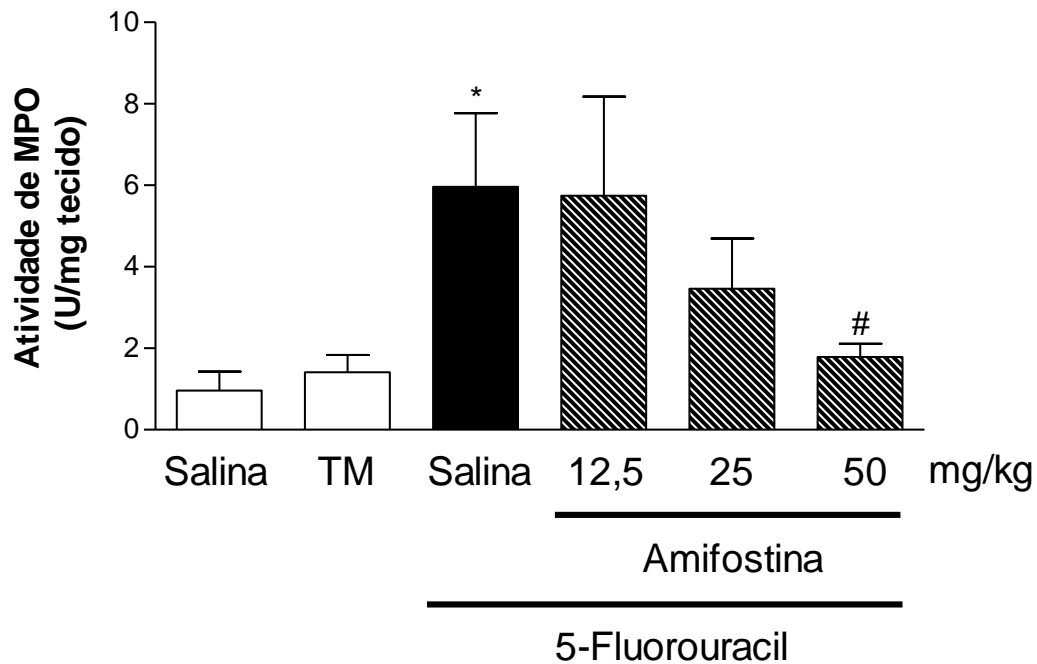


A mucosite oral em hamsters foi realizada através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico das mucosas jugais (4º dia). Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No dia do sacrifício (10º dia), os animais foram anestesiados com Hidrato de Cloral a 10% e submetidos à coleta de sangue através do plexo coroide do olho direito de cada animal. A contagem dos leucócitos séricos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso do microscópio óptico (100X; Nikon). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contado nos 4 campos da câmara de Neubauer e posteriormente multiplicados pelo fator de correção da câmara de Neubauer. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos/mm³. (Anova; Bonferroni).

4.5 Efeito da amifostina sobre a atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters

A administração de 5-FU foi capaz de induzir um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de mieloperoxidase (U/mg tecido) ($5,96 \pm 1,81$) quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina ($0,96 \pm 0,47$). O pré-tratamento dos animais com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia protegeu significativamente ($p < 0,05$) os animais ($1,79 \pm 0,32$), apesar da administração do 5-FU quando comparado ao grupo 5-FU, atingindo uma inibição de 64,2% dos níveis de atividade de MPO. O grupo submetido apenas ao trauma mecânico não apresentou aumento da atividade de mieloperoxidase ($1,41 \pm 0,42$) quando comparado ao grupo injetado com salina ($p > 0,05$). As doses de 12,5 e 25 mg/kg da amifostina não conferiram proteção significativa aos animais ($p > 0,05$) em comparação ao grupo 5-FU (**FIGURA15**).

FIGURA 15. Amifostina reduz a atividade de MPO de forma dose-dependente, em animais submetidos à mucosite oral.



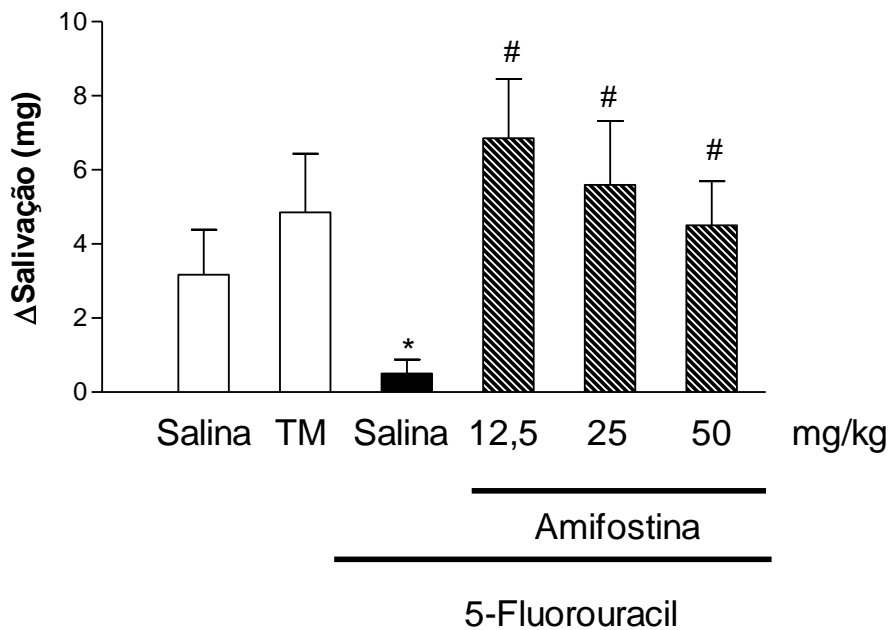
A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1° e 2° dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4° dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg, diariamente até o 10° dia. As mucosas foram retiradas por ocasião do sacrifício realizado no décimo dia e congeladas em freezer a 70 graus Celsius negativos. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas através de uma versão modificada de Bradley, Christensen e Rothstein (1982). As barras representam Média \pm EPM da quantidade de atividade de MPO/ miligrama de mucosa jugal. * $p < 0,05$ representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratado com 5-FU em relação àquele tratado com salina. # $p < 0,05$ representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratado com amifostina em relação àquele tratado com 5-FU (Anova; Bonferroni).

4.6 Efeito da amifostina sobre a hipossalivação induzida por 5-FU

A administração de 5-FU foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) a produção salivar não estimulada (mg/Kg) ($0,50 \pm 0,38$), quando comparada ao grupo tratado apenas com salina ($3,17 \pm 1,22$).

O pré-tratamento dos animais com amifostina nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia reverteu significativamente ($p < 0,05$) a redução da produção salivar ($6,86 \pm 1,59$; $5,60 \pm 1,72$; $4,50 \pm 1,20$), respectivamente, apesar da administração do 5-FU quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com 5-FU (**FIGURA 16**).

FIGURA 16. Amifostina preveniu a hipossalivação induzida por 5-FU.

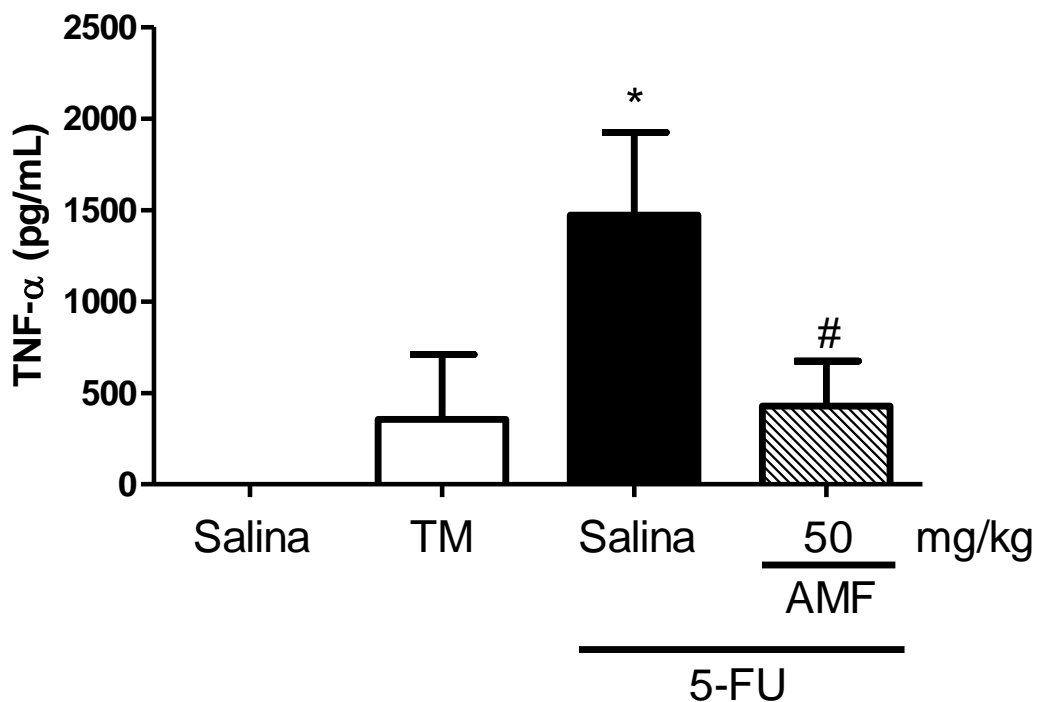


A mucosite oral em hamsters foi realizada através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico das mucosas jugais (4º dia). Os animais foram tratados com amifostina 12,5, 25 e 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. A produção salivar dos animais submetidos à mucosite oral foi avaliada através da pesagem de cones posicionados bilateralmente no assoalho bucal para absorção da saliva secretada durante 5 minutos, no 4º e 10º dias de experimento. As barras representam Média \pm EPM da variação dos pesos dos cones do 10º dia em relação ao 4º, mostrando que o tratamento com amifostina preveniu a redução da produção salivar causada pela mucosite oral induzida pelo 5-FU. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais do grupo salina. # $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais do grupo tratado com 5-FU. (Anova; Bonferroni).

4.7 Efeito da amifostina sobre a dosagem tecidual de fator α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), nas mucosas jugais de hamsters

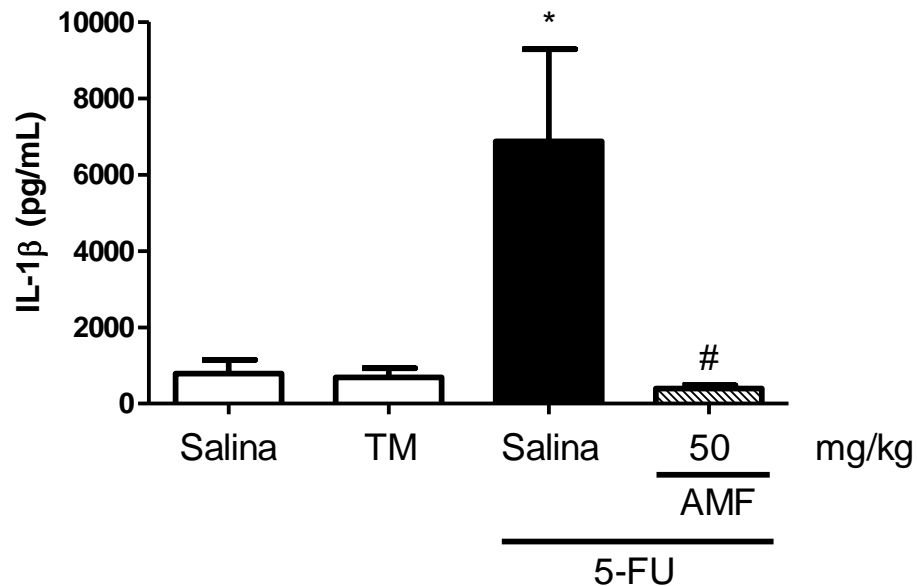
O tratamento dos animais com 5-FU foi capaz de induzir um significativo ($p < 0,05$) aumento da dosagem tecidual de TNF- α e IL-1 β (pg/mL) ($1471 \pm 452,7; 6870 \pm 2417,$) quando comparado ao grupo tratado apenas com salina ($0,0 \pm 0,0; 787,5 \pm 356,1,$). O pré-tratamento dos animais com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia protegeu significativamente ($p < 0,05$) os animais ($428,6 \pm 246,3; 395,9 \pm 86,06$) a despeito da administração do 5-FU quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com 5-FU. O grupo submetido apenas ao trauma mecânico não apresentou aumento da dosagem tecidual de TNF- α , nem de IL-1 β ($354,3 \pm 354,3; 691,3 \pm 239,5$) quando comparado ao grupo tratado somente com salina ($p > 0,05$) (FIGURAS 17 e 18).

FIGURA 17. Amifostina reverteu de forma dose-dependente o aumento da dosagem tecidual de TNF- α em hamsters tratados com 5-FU.



A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. As mucosas foram retiradas por ocasião do sacrifício realizado no décimo dia e congeladas em freezer a 70 graus Celsius negativos. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção de TNF- α foi determinada por ELISA. ^a $p < 0,05$ representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratados com 5-FU em relação àquele tratado com salina. ^b $p < 0,05$ representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratado com amifostina em relação àquele tratado com 5-FU. O número de hamsters utilizado em cada grupo foi no mínimo seis (Anova; Bonferroni).

FIGURA 18. Amifostina reverteu de forma dose-dependente o aumento da dosagem tecidual de IL-1 β em hamsters tratados com 5-FU.



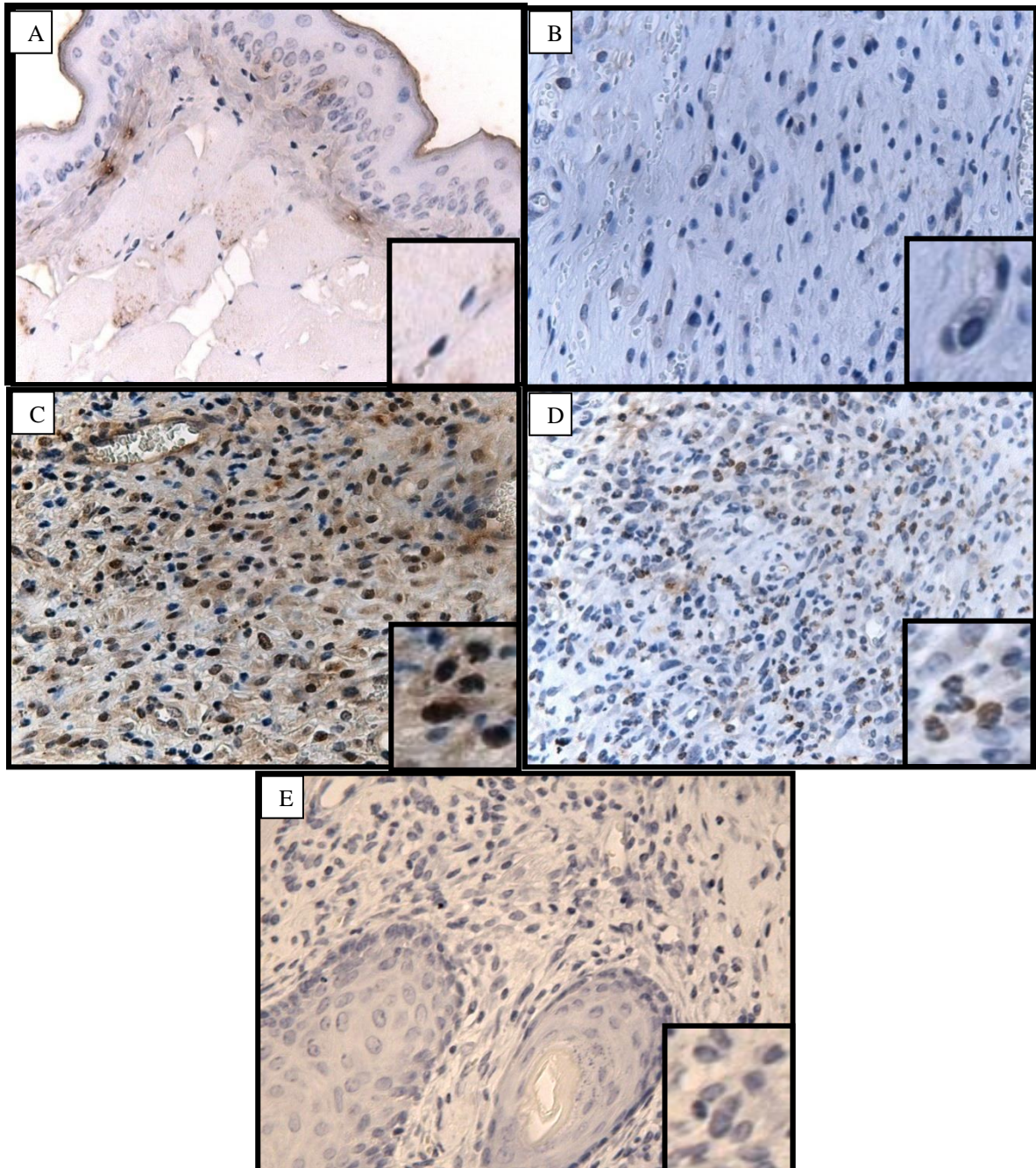
A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1° e 2° dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4° dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10° dia. As mucosas foram retiradas por ocasião do sacrifício realizado no décimo dia e congeladas em freezer a 70 graus Celsius negativos. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção de IL-1 β foi determinada por ELISA. ^ap<0,05 representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratados com 5-FU em relação àquele tratado com salina. ^bp<0,05 representa diferença estatística do grupo de animais com mucosite oral tratado com amifostina em relação àquele tratado com salina. O número de hamsters utilizado em cada grupo foi no mínimo seis (Anova; Bonferroni).

4.8 Efeito da amifostina sobre a imunomarcção para TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico sintase induzida (NOSi) nas mucosas jugais de hamsters

A administração de 5-FU foi capaz de induzir um aumento significativo ($p < 0,05$) da imunomarcção para TNF- α , IL-1 β e NOSi (pg/ml) [2(1-3); 2(1-3); 3(2-3)] quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina [0(0-0); 0(0-1); 0(0-1)], respectivamente. O pré-tratamento dos animais com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia protegeu significativamente ($p < 0,05$) os animais, a despeito da administração do 5-FU (0(0-1); 0(0-2); 1(0-3)) quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU. O grupo submetido apenas ao trauma mecânico não apresentou aumento da imunomarcção para TNF- α , IL-1 β e NOSi [0(0-1); 1(1-2); 2(0-3)] quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com salina ($p > 0,05$) (Tabelas 3, 4 e 5).

As figuras 19, 20 e 21 ilustram a imunomarcção para TNF- α , IL-1 β e NOSi, respectivamente; de uma mucosa jugal normal, submetida apenas ao trauma mecânico, com mucosite oral experimental e com mucosite experimental tratada com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia.

FIGURA 19. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de fator de necrose tumoral (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters.



As figuras mostram no detalhe, à direita (aumento 1000X), um aumento dos tecidos e suas respectivas imunomarcações.

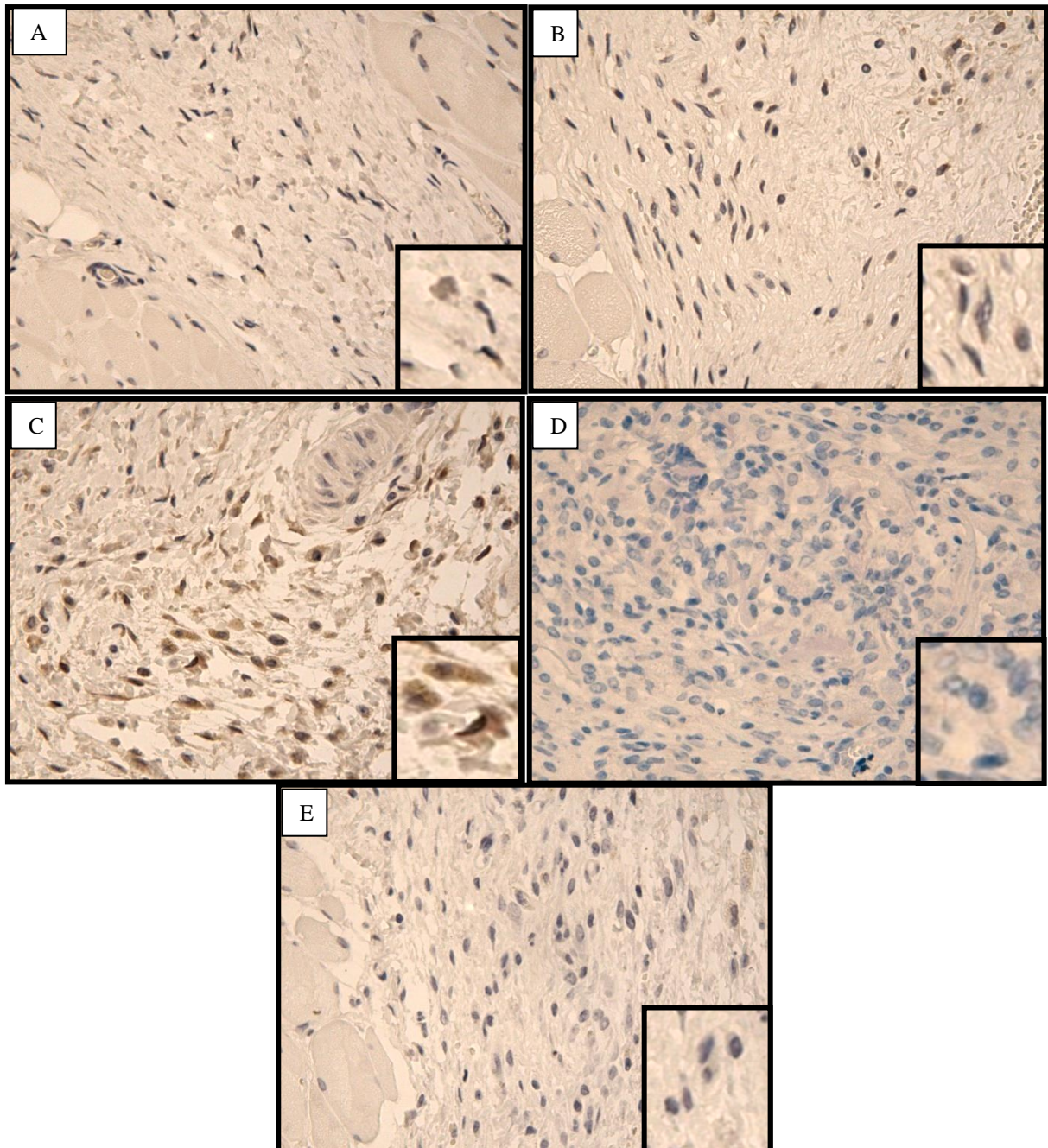
Em **A**, animal normal; em **B**, animal submetido a trauma mecânico; em **C**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e submetido ao TM; em **D**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e tratado com amifostina na dose de 50mg/kg/dia e em **E**, controle negativo não incubado com anticorpo primário. A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de TNF- α em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU foi realizada usando o método de estreptavidinabiotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981).

TABELA3. Escores das análises de imuno-histoquímica para TNF- α

Grupos	Escores imuno-histoquímica
Salina	0 (0-0)
TM	0 (0-1)
5-FU+ Salina	2 (1-3)*
AMF 50 + 5-FU	0 (0-1) #

A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de TNF- α em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU foi realizada usando o método de estreptavidinabiotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). *p<0,05 representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Teste de Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com 5-FU em relação àqueles que receberam salina. #p<0,05 representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com amifostina em relação àqueles tratados com 5-FU. Os dados representam a mediana e a variação de no mínimo seis animais. (Kruskal-Wallis; Teste de Dunn).

FIGURA 20. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de Interleucina-1 β induzida (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters.



As figuras mostram no detalhe, à direita (aumento 1000X), um aumento dos tecidos e suas respectivas imunomarcações.

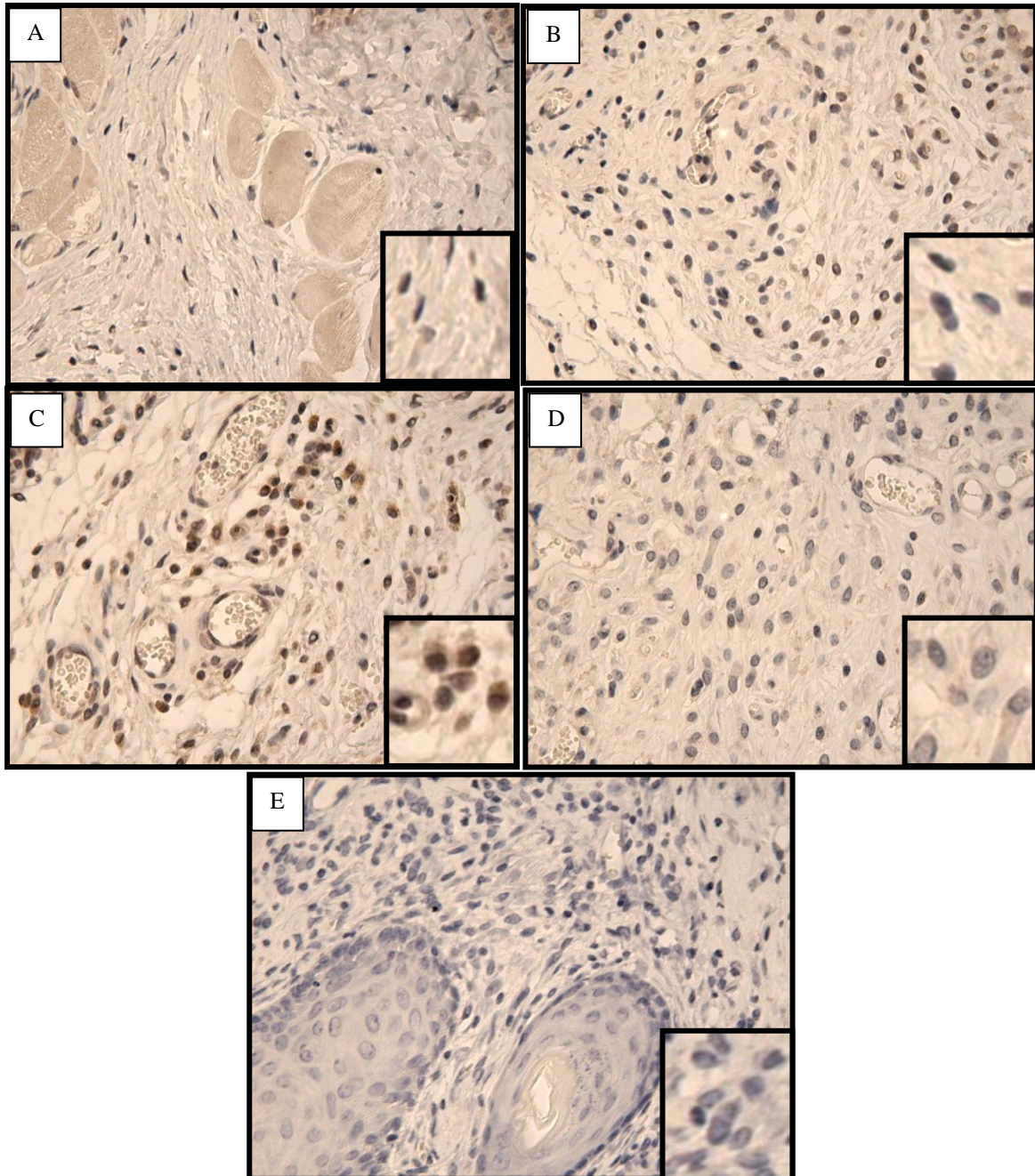
Em **A**, animal normal; em **B**, animal submetido a trauma mecânico; em **C**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e submetido a TM; em **D**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e tratado com amifostina na dose de 50mg/kg/dia e em **E**, controle negativo não incubado com anticorpo primário. A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (40 e 60ml/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de IL-1 β em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU foi realizada usando o método de estreptavidinabiotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981).

TABELA 4. Escores das análises de imuno-histoquímica para IL-1 β

Grupos	Escores imuno-histoquímica
Salina	0 (0-1)
TM	1 (1-2)
5-FU+ Salina	2 (1-3) *
AMF 50 + 5-FU	0 (0-2) #

A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de IL 1 β em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5FU foi realizada usando o método de estreptavidinabiotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). *p<0,05 representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Teste de Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com 5-FU em relação àqueles tratados com salina. #p<0,05 representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com amifostina em relação àqueles tratados com 5-FU. Os dados representam a mediana e a variação de, no mínimo, seis animais. (Kruskal-Wallis; Teste de Dunn).

FIGURA 21. Fotomicrografias da imuno-histoquímica para expressão de NO sintase induzida (aumento 400X), em mucosas jugais de hamsters.



As figuras mostram no detalhe, à direita (aumento 1000X), um aumento dos tecidos e suas respectivas imunomarcações.

Em **A**, animal normal; em **B**, animal submetido a trauma mecânico; em **C**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5-FU e submetido a TM; em **D**, animal submetido à mucosite oral induzida por 5FU e tratado com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia, e em **E**, controle negativo não incubado com anticorpo primário. A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50 mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de NOSi em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-FU foi realizada usando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981).

TABELA 5. Escores das análises de imuno-histoquímica para NOSi

Grupos	Escores imuno-histoquímica
Salina	0 (0-1)
TM	2 (0-3)
5-FU+ Salina	3 (2-3) *
AMF 50 + 5-FU	1 (0-3) #

A mucosite oral em hamsters foi induzida através de injeções de 5-FU (60 e 40mg/kg/dose, no 1º e 2º dias, respectivamente) e de trauma mecânico (4º dia) das mucosas jugais. Os animais foram tratados com amifostina na dose de 50mg/kg, diariamente, até o 10º dia. No décimo dia do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais direitas removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. A expressão por imuno-histoquímica de NOSi em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-FU foi realizada usando o método de estreptavidinabiotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Teste de Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com 5-FU em relação àqueles tratados com salina. # $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis e Dunn) dos animais com mucosite oral tratados com amifostina em relação àqueles tratados com 5-FU. Os dados representam a mediana e a variação de, no mínimo, seis animais. (Kruskal-Wallis; Teste de Dunn).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou o efeito protetor da amifostina sobre a mucosite oral (MO) experimental induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) e trauma mecânico em hamsters. Os resultados mostraram que amifostina atenuou de forma significativa os eventos inflamatórios, além de prevenir completamente a hipossalivação, observados na mucosite oral que se segue à administração de 5-FU.

A dificuldade de prevenção e tratamento da mucosite oral constitui um dos grandes desafios no manejo de pacientes portadores de neoplasias que se submetem à quimioterapia e à radioterapia. Alguns modelos animais foram propostos com o intuito de se investigar melhor os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da mucosite oral. Neste cenário, o modelo considerado um marco histórico na patogênese da mucosite oral foi certamente aquele proposto por Sonis (1990), que utilizava como animal experimental o hamster e como agente antineoplásico indutor, o 5- fluorouracil.

Sonis e colaboradores induziram a mucosite oral em hamsters, através da administração desse quimioterápico nos dias 0, 5 e 10, na dose de 60mg/kg/dia e o trauma mecânico, nos dois primeiros dias (SONIS *et al.*, 1990). Com este modelo foi possível se reproduzir nos animais as alterações clínicas, macrocópicas e microscópicas encontradas em seres humanos. Este modelo passou então a ser reproduzido por diversos outros autores no estudo dos mediadores envolvidos na patogênese da mucosite oral, além de servir como ferramenta de pesquisa na descoberta de possíveis fármacos e/ou agentes biológicos protetores (SONIS *et al.*, 2000; LOURY *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2005; SONIS *et al.*, 1993; KEITH *et al.*, 1994; SONIS *et al.*, 1995; SONIS *et al.*, 1997; CLARKE *et al.*, 1999; SONIS *et al.*, 2004; ALVAREZ *et al.*, 2003; MORVAN *et al.*, 2004; AKSUNGUR *et al.*, 2004; MITSUHASHI *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2002).

Os pesquisadores do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, introduziram adaptações nesse modelo, tanto no que concerne ao esquema de administração do 5-FU, como na extensão dos escores macroscópicos e microscópicos (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007; LEITÃO *et al.*, 2008).

Na presente investigação utilizou-se esse modelo de mucosite oral em virtude desses animais possuírem uma mucosa jugal facilmente manipulável e de melhor

visualização, além do que, os hamsters toleraram doses de 5-FU capazes de induzir a MO, sem apresentar, contudo, mortalidade significativa (SONIS *et al.*, 1990).

Como já havia sido demonstrado por Lima *et al.* (2005), a intensidade do comprometimento das mucosas é máxima no 10º dia do experimento; foi escolhido, portanto, esse dia para o sacrifício dos animais e análise dos parâmetros inflamatórios relacionados ao desenvolvimento da mucosite oral.

Optou-se por estudar a amifostina por ser esta um citoprotetor de amplo espectro, com atividade já comprovada em tecidos normais, com exceção do sistema nervoso central, devido ao baixo acúmulo do metabólito e pela incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (KOUKOURAKIS, 2002). Estudos do nosso laboratório já haviam demonstrado previamente, porém de forma preliminar, através de escores macroscópicos e microscópicos, o efeito protetor da amifostina na mucosite oral induzida por 5-FU (MOTA, 2004). Dado os promissores resultados encontrados, decidiu-se então investigar os mecanismos envolvidos nesse efeito citoprotetor (SONIS *et al.*, 2004).

O presente estudo demonstrou que quando hamsters recebiam 5-FU, nas doses de 60 e 40 mg/kg, nos dias 1 e 2, respectivamente, e eram submetidos a trauma mecânico nas mucosas jugais, no 4º dia, apresentavam mucosite oral significativa. Este resultado vai ao encontro de estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo animal e o mesmo esquema de tratamento com 5-FU (LIMA *et al.*, 2005; MOTA, 2004; SANT´ANA, 2005) e com o trabalho de Sonis *et al.* (1990), que propuseram esse modelo, porém utilizando um esquema diferente, conforme já citado.

Esta pesquisa demonstrou que as mucosas jugais dos animais que receberam 5-FU, na avaliação macroscópica, apresentaram eritema intenso e ulceração em todos os animais, comprovando-se dessa forma que o 5-FU conseguiu induzir mucosite oral em sua apresentação clínica mais severa, representada pela fase ulcerativa. Observou-se ainda, na avaliação histopatológica, ingurgitamento vascular de moderado a acentuado, degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular de moderado a acentuado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas de hemorragia, de edema, e de úlceras pequenas ou extensas, com ou sem abscessos. Estes achados correspondem aos eventos já descritos por Sonis *et al.* (2004), quando os agentes quimioterápicos, por causarem a liberação de espécies reativas de oxigênio, levam a danos celulares e teciduais que irão levar à ativação do NF- κ B que conduziria, por sua vez, à suprarregulação de vários genes, incluindo aqueles responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas citocinas têm sido demonstradas tanto na mucosa como no sangue periférico de

pacientes submetidos a tratamento antineoplásico (HALL *et al.*, 1995; FERRA *et al.*, 1998) e a presença delas levariam à lesão tecidual e à apoptose.

Constatou-se ainda que os animais tratados com amifostina nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia reduziram as lesões causadas pela mucosite oral, ao se proceder a avaliação das mucosas jugais do ponto de vista macroscópico. Observou-se que os animais tratados com o citoprotetor nas doses de 12,5 e 50 mg/kg/dia reduziram as lesões causadas pela mucosite oral, ao serem analisadas as mucosas jugais microscopicamente. Segundo Sonis, em 2004, já na primeira fase de desencadeamento da mucosite oral, encontra-se lesão tecidual. Este fato talvez possa explicar porque a dose de 25 mg/kg/dia da amifostina parece proteger a mucosa, na avaliação macroscópica; não se confirmando, contudo, à microscopia.

Segundo o trabalho de Mota (2004), no entanto, as doses da amifostina que mais se mostraram eficazes na redução das lesões da mucosite oral foram as de 200 e 400 mg/kg/dia, quando a avaliação por escores macroscópicos é realizada. Já segundo a avaliação histopatológica, todas as doses utilizadas em seu estudo; a saber 100, 200 e 400 mg/kg/dia, demonstraram eficácia na redução da severidade da mucosite oral, tanto no protocolo 1, onde a administração do citoprotetor foi durante 2 dias, como no protocolo 2; em que a droga foi aplicada durante 4 dias.

Sabe-se que as vias de administração mais utilizadas para a amifostina são a endovenosa e a subcutânea, e que esta última apresenta um tempo superior de citoproteção contra mucosite induzida por radiação em relação à via endovenosa; sendo mais de 4h para a primeira e mais de 8h para a segunda (KOUKORAKIS, 2002). Levando-se em consideração que a droga protege a mucosa por um período de tempo inferior a 24h, após sua administração, poderia ser feita a suposição de que doses diárias seriam mais eficazes no combate à mucosite oral quando comparadas a 2 ou 4 administrações. Em relação à magnitude da dose, levando-se em consideração que a administração diária de 12,5, 25 e 50 mg/kg corresponderia a doses totais de 125, 250 e 500 mg/dose, respectivamente, não se trataria, portanto, de baixas doses, mas talvez de um esquema citoprotetor mais eficaz quando se leva em consideração a farmacocinética da droga.

Outros estudos realizados no LAFICA evidenciaram o papel citoprotetor da amifostina; um deles foi o realizado por Batista *et al.* (2006), que avaliaram o efeito da amifostina na cistite hemorrágica experimental induzida pela injeção sistêmica de ifosfamida e também pela injeção intravesical de acroleína, metabólito urotóxico da ifosfamida. Observou-se que quando a amifostina, nas doses de 25, 50 e 100mg/kg, foi administrada i.p. em camundongos, 5 minutos antes e 4 e 8h após a administração do quimioterápico, ou

quando o citoprotetor foi injetado diretamente na bexiga junto com acroleína ou 1h antes do metabólito tóxico, ocorria prevenção da cistite hemorrágica de forma significativa e dose-dependente. Este efeito uroprotetor da amifostina foi evidenciado tanto macroscópica, como microscopicamente. Ressalte-se que a amifostina foi o único agente a mostrar um efeito anti-inflamatório protetor na lesão vesical induzida pela injeção direta da acroleína na bexiga, o mesmo não sendo observado com o tratamento com indometacina, pentoxifilina, talidomida e até mesmo com dexametasona.

Mota *et al.* (2007), em pesquisa realizada no LAFICA, demonstraram que a amifostina reverteu completamente a lesão gástrica induzida pela injeção de indometacina, sendo este efeito atribuído a sua ação na migração de neutrófilos. Junqueira-Júnior *et al.* (2010), mais recentemente, investigaram os mecanismos através dos quais a amifostina também protegia da lesão gástrica induzida por etanol. Neste trabalho, demonstrou-se que na mucosa gástrica de ratos tratados com amifostina, nas doses de 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg v.o. ou s.c. administrados 30 min antes do etanol (v.o.), havia restauração dos estoques de glutatona de forma dose-dependente. Mostrou-se ainda que a citoproteção da mucosa gástrica foi revertida com doses neurotóxicas de capsaicina, quando esta era aplicada 8 dias antes do tratamento com amifostina ou da administração de etanol, o que correlaciona o efeito citoprotetor da amifostina com a estimulação dos neurônios aferentes sensoriais.

Trabalhos vêm sendo realizados no sentido de testar outras medidas para se prevenir quadros graves de mucosite oral. Uma linha que vem sendo bastante investigada é a que propõe a utilização de terapia de laser de baixa potência (TLBP), tanto de forma preventiva como terapêutica. Em 2009, França e colaboradores testaram TLBP em animais submetidos à mucosite oral por 5-FU em hamsters, avaliando o grau de MO, utilizando a escala da OMAS (do inglês Oral Mucositis Assessment Scale) modificada para hamsters (WILDER-SMITH *et al.*,2007). Os resultados encontrados foram que os animais que receberam TLBP de forma preventiva (do 1º ao 4º dia) e, principalmente, de modo terapêutico, apresentaram redução da severidade da MO, quando comparados aos que utilizaram crioterapia preventiva, bem como em relação ao grupo controle. Estes achados foram ratificados quando as mucosas jugais foram analisadas microscopicamente, mostrando que a TLBP, como agente preventivo, reduz a gravidade da lesão do epitélio oral e apresenta uma cicatrização mais rápida do mesmo. Já em relação à TLBP terapêutica, a histologia observou diferenças de cicatrização entre feridas irradiadas e não irradiadas, favorecendo os resultados das primeiras.

Ainda nessa linha de estudo, Antunes *et al.* (2007) avaliaram TLBP na prevenção da mucosite oral induzida em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (TMO). Os pacientes recebiam TLBP do D-7 até o dia em que ocorria recuperação neutrofílica. O grupo utilizou três escalas para análise da MO, a saber: a da Organização Mundial de Saúde (OMS), a da Oral Mucositis Assessment Scale (OMAS) e para avaliar a dor dos pacientes causada pela MO, foi utilizada a escala visual analógica (VAS). Os resultados mostraram que segundo a escala da OMS, os pacientes que receberam TLBP apresentaram menor incidência de MO severa e, segundo a escala da OMAS, houve redução da incidência de úlceras neste grupo.

Uma pesquisa que investigou o papel de uma terapia tópica como instrumento no combate à mucosite oral foi a de Watanabe *et al.* (2009). Este estudo utilizou um filme adesivo contendo ginsenoside Rb1, uma substância isolada do ginseng, que foi aplicado na mucosa jugal dos hamsters, do 1º ao 3º dia. Os animais receberam 5-FU, nos dias 0 e 2, na dose de 60mg/kg/dia e foram submetidos a escoriações nas mucosas jugais, com uma pequena escova, nos dias 1 e 2. O tratamento utilizado reduziu a ulceração e a formação de abscessos, quando comparados ao grupo do 5-FU.

No presente trabalho, a repercussão sistêmica da mucosite oral foi avaliada através da percentagem de perda ponderal dos animais. Verificou-se que os animais que receberam 5-FU e submetidos a trauma mecânico apresentaram perda ponderal significativa, a partir do 5º dia. Este dado está em conformidade com dados da literatura, que utilizaram o mesmo modelo animal (LIMA *et al.*, 2005; SANT'ANA, 2006). Ratifica ainda os resultados encontrados em trabalhos que utilizaram esquemas diferentes como o de FRANÇA *et al.* (2009), que administrou 5-FU i.p. nas doses 100 e 65 mg/kg, nos dias 1 e 3, respectivamente, e realizou TM nos dias 4 e 5; e como o de Sonis *et al.* (1990), cujo esquema de tratamento foi anteriormente citado.

Sabe-se que pacientes que desenvolvem mucosite oral podem apresentar desde um leve desconforto até uma odinofagia, só controlada por analgésicos opioides. Quadros álgicos importantes associados à mucosite oral levam à redução da ingestão alimentar, podendo esta restringir-se à nutrição parenteral (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006), o que pode culminar com perda ponderal importante. Neste trabalho, não se observou, contudo, prevenção da perda ponderal dos animais tratados com amifostina em relação aos grupos controles.

Avaliou-se ainda como repercussão sistêmica da mucosite oral a contagem de leucócitos totais no 10º dia do experimento. Observou-se que não houve diferença estatística no número de leucócitos entre os animais dos diferentes grupos. Sabe-se por estudos anteriores (LIMA *et al.*, 2005), que o 5-FU leva à leucopenia nos 4º e 5º dias, provavelmente

devido a mielossupressão causada pelo quimioterápico. Postulou-se que, como não houve diferença entre os animais do grupo salina e os do grupo do 5-FU, possa ter ocorrido recuperação leucocitária. Consequentemente, não seria esperado alteração no número de leucócitos dos animais tratados com amifostina, como de fato não houve. Sonis *et al.*(1990), demonstraram que hamsters submetidos à MO induzida por 5-FU, apresentavam leucopenia no 10º dia de experimento e recuperação da leucometria no 16º dia. No entanto, o esquema de administração do quimioterápico foi distinto; a saber, injeções i.p. nos dias 0, 5 e 10, na dose de 60 mg/kg/dia.

A resposta inflamatória está ligada ao processo de reparo e pode ser desencadeada por vários estímulos, incluindo agentes químicos e físicos, assim como agentes infecciosos. A inflamação aguda ocorre através de três componentes principais: alterações tanto vasculares, como na microcirculação e na emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, da microcirculação para o foco da lesão, a fim de eliminar o agente nocivo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Segundo Sonis *et al.* (2004), a fase ulcerativa da mucosite levaria à predisposição à infecção bacteriana, visto que a ruptura da barreira da mucosa facilitaria a entrada de agentes infecciosos. A mielossupressão causada pelo quimioterápico exacerbaria o risco de morbimortalidade pela infecção, na vigência de mucosite.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que está presente em abundância nos neutrófilos, constituindo-se, portanto, em um marcador indireto da presença dessas células (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). O presente estudo demonstrou aumento da atividade de MPO no grupo 5-FU. Foi evidenciado, ainda, que o grupo tratado com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia apresentou redução significativa da atividade de MPO quando comparado ao grupo que recebeu 5-FU; o mesmo, no entanto, não ocorreu com os grupos tratados com o citoprotetor, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg. O resultado sugere, então, que amifostina na dose de 50 mg/kg seja capaz de reduzir o infiltrado inflamatório neutrofilico na mucosa afetada; reduzindo possivelmente a inflamação *in locu*.

Lima *et al.* (2005) e Leitão *et al.*(2006) investigaram a atividade de MPO na mucosa jugal de hamsters submetidos à MO induzida por 5-FU. O resultado desse trabalho ratificou os achados do presente estudo ao demonstrar aumento significativo da atividade de MPO no grupo 5-FU em relação ao grupo controle (salina) e ao grupo submetido apenas ao trauma mecânico (TM).

Estudos demonstraram que o fluxo salivar estimulado e não estimulado eram significativamente reduzidos e havia aumento da prevalência de xerostomia, durante e após seis meses do uso de esquemas convencionais de doses de quimioterapia (ciclofosfamida,

epirubicina/metotrexate e 5-FU), em pacientes portadores de tumores sólidos (HARRISON *et al.*, 1998; JENSEN *et al.*, 2008). O presente trabalho investigou se a amifostina seria capaz de reverter a redução de salivação causada pelo 5-FU. Constatou-se que os animais tratados com as doses utilizadas, 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia, apresentaram prevenção da redução da taxa de salivação causada pelo quimioterápico, quando avaliou-se a diferença da taxa de salivação do 10º em relação ao 4º dia.

Leitão *et al.* (2006), observaram que o n-(3-(Aminometil) benzil) acetamidina (1400W), um inibidor seletivo da óxido nítrico sintetase induzida (NOS2), foi capaz de prevenir a redução da produção salivar não estimulada, no 4º dia de experimento, quando comparado ao grupo submetido à MO induzida por 5-FU. Foi ainda avaliado nesse estudo, a produção salivar não estimulada no 10º dia do experimento, não sendo encontrado porém, diferença entre os grupos; sugerindo, portanto, que nesse dia a produção salivar já teria sido restabelecida. Como o trabalho de Leitão *et al.* (2007) demonstraram, ainda, a participação do óxido nítrico na patogênese da MO, poderia ser postulado que a redução da sua gravidade, através da inibição desse mediador, levaria, conseqüentemente, a uma produção salivar menos alterada quando comparada ao grupo tratado apenas com 5-FU. Como a amifostina foi capaz de reverter a redução da produção salivar induzida por 5-FU, poder-se-ia postular que este efeito seria via óxido nítrico.

Segundo Sonis *et al.* (2004), a terceira fase da mucosite oral envolveria amplificação de sinal, causando mais ativação do NF- κ B, como consequência de retroalimentação positiva pelas citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, haveria aumento na produção dessas citocinas. Outros mediadores pró-inflamatórios como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) seriam suprarregulados e iniciariam uma cascata inflamatória que levaria à ativação de metaloproteinases, cuja produção causaria lesão tecidual adicional (TADASHI, 2006).

O TNF é predominantemente expresso por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T e possui dois tipos de receptores: TNF-R1, expresso em todos os tipos celulares e o TNF-R2, expresso em células endoteliais ou imunes (MOCELLIN *et al.*, 2005). Quando o TNF interage com TNF-R1 há ativação de diversos eventos celulares como a ativação do NF- κ B e da cascata de caspases, que leva à apoptose (LOGAN *et al.*, 2007). Estudos em animais e em humanos mostraram redução da ocorrência e da gravidade da mucosite oral, após a administração de inibidores de TNF (BIANCO *et al.*, 1991; FERRA *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2004).

A interleucina1 β (IL-1 β) é uma citocina multifuncional que apresenta efeito em uma larga variedade de tipos celulares, bem como interage com outras citocinas (DINARELLO *et al.*, 1996). Assim como o TNF, a IL-1 β está envolvida na ativação do NF- κ B e ambas agem de forma sinérgica, causando, por exemplo, a indução de moléculas de adesão endoteliais que são essenciais para o desencadeamento das fases iniciais da resposta inflamatória (DINARELLO, 2000).

O presente trabalho investigou a participação de TNF- α e IL-1 β no grupo tratado com amifostina na dose de 50 mg/kg, por ter sido esse o grupo responsável pela redução das lesões causadas pela MO e pela redução da atividade de MPO. As dosagens teciduais de TNF- α e IL-1 β foram avaliadas e demonstrou-se que o grupo tratado com amifostina, na dose anteriormente mencionada, reduziu de forma significativa os níveis de ambas as citocinas no tecido da mucosa jugal dos animais submetidos à MO experimental, quando comparados ao grupo tratado com 5-FU. Demonstrou-se, ainda, que houve redução significativa da imunexpressão de TNF- α e IL-1 β , no grupo tratado com o citoprotetor na dose de 50 mg/kg/dia quando comparado ao grupo tratado com 5-FU. Estes resultados sugerem que pelo menos em parte o efeito citoprotetor da amifostina, na MO oral induzida por 5-FU, se deva à inibição da expressão de TNF- α e IL-1 β .

Lima *et al.*(2004), investigaram a participação de TNF- α e COX-2 na MO induzida por 5-FU em hamsters. Os pesquisadores utilizaram celecoxib e indometacina, inibidores seletivos e não seletivos de COX-2 e pentoxifilina e talidomida, inibidores da síntese de citocinas, como ferramentas farmacológicas de estudo. Os resultados demonstraram que pentoxifilina e talidomida apresentaram efeitos protetores significativos na mucosite oral, possivelmente via inibição de TNF- α , citocina que possui sua síntese inibida por ambas as drogas. Além disso, celecoxib apresentou um efeito protetor parcial na MO, visto que as doses menores foram as responsáveis pela reversão dos principais achados inflamatórios da MO. Estes resultados reforçam a participação das prostaglandinas no desencadeamento da MO, tendo um efeito dependente de sua concentração.

Lopes *et al.* (2009) investigaram os mecanismos pelos quais a terapia de laser de baixa potência pode afetar a gravidade da mucosite oral. O grupo induziu MO em hamsters, através da administração i.p. de 5-FU nas doses de 80 e 40 mg/kg/dia, nos dias 0 e 2, respectivamente, seguido de trauma mecânico realizado nos dias 3 e 4. A terapia com laser foi realizada nos animais nos dias 3, 4, 5 e 6; sendo que um grupo recebeu 100 mW e outro, 35 mW. O estudo demonstrou que no grupo que utilizou o laser na dose de 35 mW, houve redução da gravidade da mucosite, associada a uma redução dos níveis de COX-2, avaliado

nas mucosas jugais por imuno-histoquímica. Este resultado corrobora a participação de prostaglandinas na patogênese da mucosite oral. Baseado nesses estudos que demonstraram a participação da COX na patogênese da mucosite oral, poder-se-ia postular que o mecanismo de proteção da amifostina envolveria, provavelmente, a inibição da COX.

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora intracelular e intercelular, envolvida em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos, nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico (AKTAN, 2003). Por um lado, ele age como um mediador biológico e, por outro lado, seus metabólitos o fazem como um agente citotóxico em processos patológicos, principalmente nas desordens inflamatórias (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; BOGDAN, 2001; DAWN; BOLLI, 2002; MONCADA; HIGGS, 1991). Citocinas pró-inflamatórias e patógenos bacterianos podem ativar a óxido nítrico sintase induzida e gerar altas concentrações de óxido nítrico através da ativação de NF- κ B (AKTAN, 2003). A inibição da óxido nítrico sintase induzida pode ser, portanto, benéfica para o tratamento de doenças inflamatórias (AKTAN *et al.*, 2003; BOGDAN, 2001; KROCKE *et al.*, 1998).

O corrente trabalho investigou, portanto, a participação do NO, no grupo tratado com amifostina na dose de 50 mg/kg/dia, pelos resultados encontrados neste grupo, já mencionados. Demonstrou-se que houve redução significativa da imunoexpressão de NOSi no grupo tratado com o citoprotetor, na dose de 50 mg/kg/dia, quando comparado ao grupo tratado com 5-FU. Este resultado sugere que amifostina na dose citada agiria via inibição de NOSi, em seu mecanismo de citoproteção nas mucosas jugais de hamsters submetidos à MO induzida por 5-FU.

Leitão *et al.* (2008) avaliaram dois grupos experimentais, submetidos à MO induzida por 5-FU, tratados diariamente até o 14º dia, com glutamina e alanil-glutamina, respectivamente. Observou-se que ambos os grupos apresentaram redução das alterações inflamatórias, à macroscopia e, ratificando esses resultados, foi observado aumento da reepitelização na avaliação histopatológica da mucosa jugal dos animais em relação ao grupo que recebeu tratamento com 5-FU. Estes pesquisadores investigaram ainda o papel do óxido nítrico (NO) na patogênese da MO, através do tratamento dos animais com N ϕ -Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME), aminoguanidina, ambos inibidores seletivos da óxido nítrico sintase induzida (NOSi), e N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1,400W), inibidor não seletivo da NOS. Os resultados encontrados demonstraram que tanto a aminoguanidina como 1,400W foram capazes de reduzir significativamente as lesões encontradas na MO experimental induzida por 5-FU. Além disso, foi detectado aumento significativo na atividade

da NOS, através da produção de citrulina, nos níveis de nitrito e da NOSi, através da avaliação por imuno-histoquímica. Estes resultados reforçam o papel do NO na patogênese da MO induzida por 5-FU.

Sant'ana (2006) avaliou o uso de gel de extratos de *Aloe barbadensis* (Babosa) e *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-do-Sertão) na mucosite oral experimental. O trabalho demonstrou que *Aloe barbadensis*, em forma de gel, aplicada topicamente duas vezes por dia, nas concentrações de 25, 50 e 100% em mucosas jugais de hamsters submetidos à MO experimental induzida por 5-FU, do quarto ao décimo dia após a administração do quimioterápico, foi capaz de inibir de forma significativa a mucosite em relação aos animais submetidos ao mesmo tratamento contendo apenas gel inerte. Esse efeito foi caracterizado pela inibição da formação de úlceras, hemorragias e abscessos e foi corroborado pelos achados histopatológicos das mucosas jugais avaliadas no estudo; a saber: diminuição do infiltrado celular inflamatório, ausência de áreas de ulceração ou abscessos. O gel de *Aloe vera* na concentração de 100% reduziu ainda a expressão imuno-histoquímica da NOS e de TNF- α . O gel de *M. urundeuva* foi utilizado topicamente, nas concentrações de 5, 10 e 20%, duas vezes por dia, do quarto ao nono dia de experimento. Foi verificada uma inibição significativa dos escores macroscópicos de MO pela droga nas concentrações de 5 e 10%, quando comparados com animais tratados com gel inerte. A avaliação macroscópica revelou mucosas caracterizadas por hiperemia, vasodilatação, sem úlceras extensas ou abscessos. Esses resultados foram confirmados pelas análises histopatológicas das mucosas jugais, que demonstraram ausência de úlceras, abscessos e redução do infiltrado inflamatório. O gel do extrato de *Myracrodruon urundeuva* na concentração de 5% foi capaz, ainda, de reduzir a expressão imuno-histoquímica de TNF- α .

Outros estudos vem sendo conduzidos para investigar o papel da amifostina na mucosite oral. Koukorakis *et al.* (2000) avaliaram a viabilidade, tolerância e eficácia citoprotetora da amifostina administrada por via s.c., em sessenta pacientes portadores de tumores torácicos, quarenta com tumores de cabeça e pescoço e quarenta com tumores pélvicos, em um estudo randomizado de fase 2. A dose utilizada foi de 500 mg, antes de cada sessão de radioterapia. Foi encontrada uma redução significativa da mucosite faríngea, esofágica e retal, no braço que utilizou amifostina. O braço que não utilizou amifostina apresentou atraso significativamente maior na radioterapia, pela presença de mucosite grau 3; comprometendo, portanto, o tratamento desses pacientes.

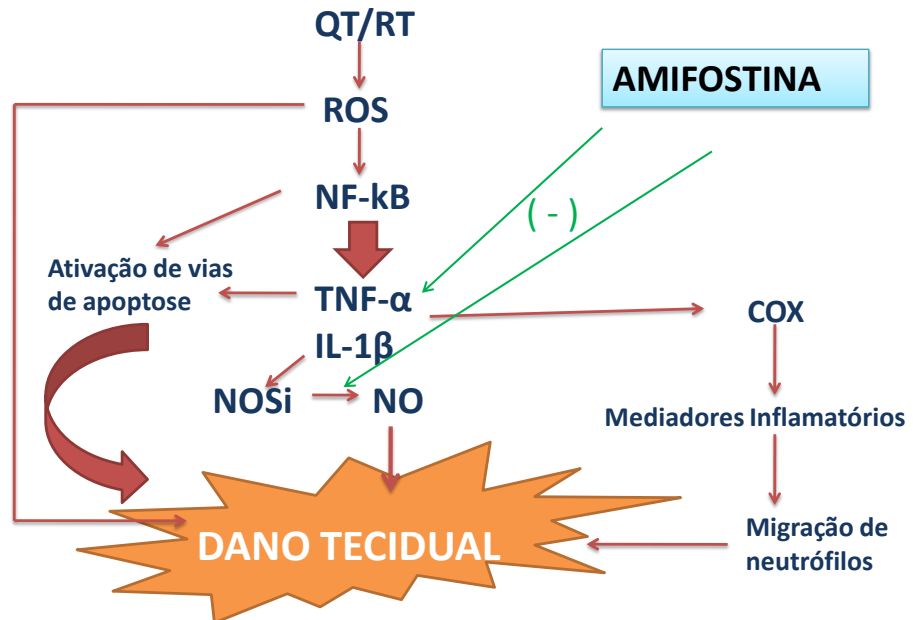
Buentzel *et al.* (2006) avaliaram o efeito da amifostina na mucosite oral e na xerostomia, em pacientes submetidos à quimioradioterapia. Este estudo de fase 3, utilizou

amifostina i.v. na dose de 300 mg/m², 30 minutos ou mais, antes da administração de carboplatina (70mg/m²) e radioterapia nos dias 1 ao 5 e 21 ao 25. O trabalho demonstrou que não houve diferença significativa na incidência de xerostomia grau ≥ 2 , aguda ou crônica, nem na MO grau ≥ 3 , entre os pacientes que receberam amifostina e aqueles que receberam placebo. Nos dias em que a quimioterapia era combinada com a radioterapia, o intervalo de administração da amifostina e a radioterapia excedia 60 minutos; o que poderia ter levado a uma exposição inadequada dos tecidos ao citoprotetor, conforme proposição dos próprios autores do trabalho. Estudos que administraram amifostina 30 minutos antes da radioterapia, mostraram resultados promissores na proteção da xerostomia (ANTONADOU *et al.*, 2002; BRIZEL *et al.*, 2000; VACHA *et al.*, 2003).

Haddad *et al.* (2009) conduziram um estudo randomizado de fase 2, onde a quimioterapia (carboplatina/paclitaxel) semanal era realizada concomitante a radioterapia, em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço localmente avançado. Um braço do estudo recebeu amifostina por via s.c., diariamente e o outro recebeu placebo. Os resultados mostraram que a toxicidade foi similar em ambos os braços: MO grau 3 e xerostomia grau 2. No entanto, o esquema de tratamento desse estudo pode ter aumentado a toxicidade, dado que utilizou a combinação de dois quimioterápicos concomitantemente a radioterapia.

Em suma, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a amifostina atenua de forma significativa os eventos inflamatórios e a xerostomia observados na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. Este agente citoprotetor parece agir via inibição de TNF- α , IL-1 β e NOSi. Estudos clínicos com amifostina devem ser conduzidos no sentido de explorar as potenciais indicações deste citoprotetor, já sugeridas em modelos experimentais.

FIGURA 22. Modelo hipotético do mecanismo de ação da amifostina na mucosite oral experimental.



Fonte: Adaptado de Sant`ana, 2006.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados neste trabalho, foi possível concluir que:

- 1) Amifostina atenua significativamente os eventos inflamatórios e a xerostomia observada na mucosite oral experimental induzida por 5-Fluorouracil em hamsters.
- 2) Tal efeito inibitório parece ocorrer via inibição da produção e/ou expressão de citocinas como o TNF- α e IL-1 β e da enzima óxido nítrico sintase induzida.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

AKSUNGUR P, SUNGUR A, UNAL S, ISKIT AB, SQUIER CA, SENEL S. **Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies.** J Controlled Release 2004;98(2):269-79.

AKTAN, F., HENNESS, S., ROUFOGALIS, B.D., AMMIT, A.J., **Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting Inos enzymatic activity and attenuating NF- κ B-mediated iNOS protein expression.** Nitric Oxide: Biology and Chemistry 2003 8 (4), 235–242.

ALBERS JW, CHAUNDHRY V, CAVALETTI G, DONEHOWER RC. **Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds.** Cochrane Database Syst Rev, 2011 Feb 16;2.

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** Biochemical Journal 2001 357 (Pt. 3), 593–615.

ALLALUNIS-TURNER, SIEMANN DW. **Modification of cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in normal mice.** NCI Monog 1988; 6: 51–3.

ALVAREZ E, FEY EG, VALAX P, YIM Z, PETERSON JD, MESRI M, JEFFERS M, DINDINGER M, TWOMLOW N, GHATPANDE A, LAROCHELLE WJ, SONIS ST, LICHENSTEIN HS. **Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis.** Clin Cancer Res 2003;9(9):3454–61.

AMADORI D, SILVESTRINI R, DE LENA M, BOCCARDO F, ROCCA A, SCARPI E, SCHITTULLI F, BRANDI M, MALTONI R, SERRA P, PONZONE R, BIGLIA N, GIANNI L, TIENGGHI A, VALERIO MR, BONGINELLI P, AMADUCCI L, FAEDI M, BALDINI E, PARADISO A. **Randomized phase III trial of adjuvant epirubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) versus CMF followed by epirubicin in patients with node-negative or 1-3 node-positive rapidly proliferating breast cancer.** Breast Cancer Res Treat. 2011 Feb;125(3):775-84..

ANNÉ PR, MACHTAY M, ROSENTHAL DI, BRIZEL DM, MORRISON WH, IRWIN DH, CHOUGULE PB, ESTOPINAL NC, BERSON A, CURRAN WJ JR. **A phase II Trial and radiation therapy in patients with head-and-neck cancer.** Int J Radial Oncol Biol Phys 2007;67:445-452.

ANTONADOU D, ATHANASSIOU H, SARRIS N ET AL. **Final results of a randomized phase III trial of chemoradiation treatment + amifostine in patients with colorectal cancer: Clinical Radiation Oncology Hellenic Group.** Presented at the 46th Annual Meeting of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2004, Atlanta, GA, October 3–7,.

ANTONADOU D, COLIARAKIS N, SYNODINO M, ATHANASSIOU H, KOUVELI A, VERIGOS C, GEORGAKOPOULOS G, PANOUSSAKI K, KARAGEORGIS P, THROUVALAS N. **Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:915–922.

ANTONADOU D, PEPELASSI M, SYNODINO M, PUGLISI M, THROUVALAS N. **Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck.** *Int J Radial Oncol* 2002;18:3339-3345.

ANTUNES HS, DE AZEVEDO AM, DA SILVA BOUZAS LF, ADÃO CA, PINHEIRO CT, MAYHE R, PINHEIRO LH, AZEVEDO R, D'AIUTO DE MATOS V, RODRIGUES PC, SMALL IA, ZANGARO RA, FERREIRA CG. **Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized Trial** *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):2250-5. Epub 2006 Oct 19.

ATHANASSIOU H, ANTONADOU D, COLIARAKIS N, KOUVELI A, SYNODINO M, PARASKEVAIDIS M, SARRIS G, GEORGAKOPOULOS GR, PANOUSAKI K, KARAGEORGIS P, THROUVALAS N. **Protective effect of amifostine during fractionated radiotherapy in patients with pelvic carcinomas: Results of a randomized trial.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:1154–1160.

BALSARI A, RUMIO C, MORELLI D, SFONDRINI L, NARDINI E, BARAJON I, MÉNARD S. **Topical administration of a doxorubicin-specific monoclonal antibody prevents drug-induced mouth apoptosis in mice.** *Br J Cancer.* 2001 Dec 14;85(12):1964-7.

BARASCH A, PETERSON DE. **Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions.** *Oral Oncol* 2003;39:91-100.

BARDET E, MARTIN L, CALAIS G, ALFONSI M, FEHAM NE, TUCHAIS C, BOISSELIER P, DESSARD-DIANA B, SENG SH, GARAUD P, AUPÉRIN A, BOURHIS J. **Subcutaneous compared with intravenous administration of amifostine in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy: final results of the GORTEC2000-02 phase III randomized trial.** *J Clin Oncol.* 2011 Jan 10;29(2):127-33.

BATISTA CK, MOTA JM, SOUZA ML, LEITÃO BT, SOUZA MH, BRITO GA, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. **Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007 Jan;59(1):71-7.

BECK PL, WONG JF, LI Y, SWAMINATHAN S, XAVIER RJ, DEVANEY KL, PODOLSKY DK. **Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor.** *Gastroenterology* 2004;126(3):796–808.

BEN-JOSEF E, HAN S, TOBI M, SHAW LM, BONNER HS, VARGAS BJ, PROKOP S, STAMOS B, KELLY L, BIGGAR S, KAPLAN I. **A pilot study of topical intrarectal application of amifostine for prevention of late radiation rectal injury.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:1160 –1164.

BENSADOUN RJ, SCHUBERT MM, LALLA RV, KEEFE D. **Amifostine in the management of radiation-induced and chemo-induced mucositis.** *Support Care Cancer* 2006;14:566 –572.

BERGMANN OJ. **Oral infections and septicemia in immunocompromised patients with hematologic malignancies.** *J Clin Microbiol* 1988;26: 2105–2109.

BERGMANN OJ. **Oral infections and fever in immunocompromised patients with haematologic malignancies.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989; 8: 207–213.

BIANCO JA, APPELBAUM FR, NEMUNAITIS J, ALMGREN J, ANDREWS F, KETTNER P, SHIELDS A, SINGER JW. **Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation.** *Blood* 1991;78(5):1205-11.

BLOMGREN J, JANSSON S, RODJER S, BIRKHED D. **Secretion rate from minor salivary glands in patients with malignant haematological diseases receiving chemotherapy—a pilot study.** *Swed Dent J* 2002. 26:75–80

BLUMBERG AL, NELSON DF, GRAMKOWSKI M, GLOVER D, GLICK JH, YUHAS JM, KLIGERMAN MM. **Clinical trials of WR-2721 with radiation therapy.** *Int J Radial Oncol Biol Phys* 1982;8:561-563.

BOGDAN, C. **Nitric oxide and the immune response.** *Nature Immunology* 2001 2 (10), 907–916.

BOREK C, TROLL W. **Modifiers of free radicals inhibit in vitro the oncogenic actions of X-rays, bleomycin and the tumor promotor 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate.** Proc Natl Acad Sci USA 1983;80: 1304–7.

BOWEN JM, GIBSON RJ, CUMMINS AG, TYSKIN A, KEEFE DM. **Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer.** Cancer Chemother Pharmacol 2007;V59(3):337–48.

BOWEN JM, GIBSON RJ, KEEFE DM, CUMMINS AG. **Cytotoxic chemotherapy upregulates pro-apoptotic Bax and Bak in the small intestine of rats and humans.** Pathology 2005;37(1):56–62.

BOWEN DT, DENZLINGER C, BRUGGER W, CULLIGAN D, GELLY K, ADLAKHA S, GROVES M, HEPBURN M, KANZ L. **Poor response rate to a continuous schedule of amifostine therapy for low/intermediate risk myelodysplastic patients.** Br J Haematol 1998;103: 785–7.

BRADLEY PP, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. **Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation.** Blood, 1982 v. 60, p. 618-622.

BÜNTZEL J, GLATZEL M, KUTTNER K, WEINAUG R, FRÖHLICH . **Intensification of radiochemotherapy with Ethiol in head and neck cancer.** Proc Am Soc Clin Oncol 1998;17:403A.

BUENTZEL J, MICKE O, ADAMIETZ IA, MONNIER A, GLATZEL M, DE VRIES A. **Intravenous amifostine during radiochemotherapy for neckhead-and-neck cancer. A randomized placebo-controlled phase III study.** Int J Radial Oncol Biol Phys 2006;52:739-747.

BRIZEL DM, WASSERMAN TH, HENKE M, STRNAD V, RUDAT V, MONNIER A, ESCHWEGE F, ZHANG J, RUSSELL L, OSTER W, SAUER R. **Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer.** J Clin Oncol 2000;18: 3339-3345.

CALABRO-JONES PM, FAHEY RC, SMOLUK GD, WARD JF. **Alkaline phosphatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721.** Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1985;47 :23-27.

CARME LIET P, DOR Y, HERBERT JM, FUKUMURA D, BRUSSELMANS K, DEWERCHIN M, NEEMAN M, BONO F, ABRAMOVITCH R, MAXWELL P, KOCH CJ, RATCLIFFE P, MOONS L, JAIN RK, COLLEN D, KESHERT E. **Role of HIF-1-alpha in**

hypoxia mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-490.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72 (9):3666-70.

CHANSKY K, BENEDETTI J, MACDONALD JS. **Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma.** *Cancer* 2005;103:1165-71.

CHIAPPELLI F. **The molecular immunology of mucositis: implications for evidence based research in alternative and complementary palliative treatments.** *eCAM*, 2005, v. 2, n.4, p. 489-494.

CHO SA, PARK JH, SEOK SH, JUHN JH, KIM SJ, JI HJ, CHOO YS, PARK JH. **Effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) on 5-FU-induced ulcerative mucositis in hamster buccal pouches.** *Exp Toxicol Pathol.* 2006 Mar;57(4):321-8.

CHU E, **Clinical Colorectal Cancer: "Ode to 5-Fluorouracil"**, *Clinical Colorectal Cancer* 2007(Sept)6(9):609.

CLARKE J, BUTLER R, HOWARTH G, READ L, REGESTER G. **Exposure of oral mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy-induced mucositis in the hamster.** *Oral Oncol.* 2002 Jul;38(5):478-85.

CLARKE J, EDWARDS B, SRPEK L, REGESTER G. **Evaluation of bovinelactoferrin as a topical therapy for chemotherapy-induced mucositis in the golden Syrian hamster.** *Oral Oncology* 1999;35(2):197-202.

COOL JC, DYER JL, XIAN CJ, BUTLER RN, GEIER MS, HOWARTH GS. **Pre-treatment with insulinlike growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats.** *Growth Hormone IGF Res* 2005;15(1):72-82.

COSAR R, YURUT-CALOGLU V, ESKIOCAK S, OZEN A, ALTANER S, IBIS K, TURAN N, DENIZLI B, UZAL C, SAYNAK M, PARLAR S, CALOGLU M, UREGEN B, KOCAK Z. **Radiation-induced chronic oxidative renal damage can be reduced by amifostine.** *Med Oncol.* 2011 Feb 24.

COX PJ. **Cyclophosphamide cystitis: identification of acrolein as the causative agent.** *BiochemPharmacol* 1979; 28:2045-9.

CULY C, SPENCER C. **Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome.** *Drugs.*2001; 61:641-684.

CUNHA, F.Q.; BOUKILI, M.A.; MOTTA, J.I.B.; VARGAFTIG, B.B.; FERREIRA, S.H. **Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat.***Eur J Pharmacol*,1993 v. 238, p. 47-52..

CYNTHIA M. FRANÇA A, CRISTIANE M. FRANÇA B, SILVIA C. NÚÑEZ C,D, RENATO A. PRATES C, ELISÂNGELA NOBORIKAWA BMIRIAM R. FARIA B, MARTHA S. RIBEIRO A,C,***Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters,** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 94 2009.25–31.

DAWN, B., BOLLI, R., **Role of nitric oxide in myocardial preconditioning.** *Annals of the New York Academy of Sciences*2002 962, 18–41.

DIASIO, R. B. & HARRIS, B. E. **Clinical pharmacology of 5-fluorouracil.***Clin.Pharmacokinet.*1989.16, 215–237.

DINARELLO C.**Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 1996;87 (6):2095-147.

D HIND, P TAPPENDEN, I TUMUR, S EGGINGTON, P SUTCLIFFE AND A RYAN **The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation** *Health Technol Assess* 2008;12(15):1–182.

DORR RT, LAGEL K, MCLEAN S. **Cardioprotection of rat myocytes with amifostine (Ethyols) and its free thiol, WR-1065, in vitro.** *Eur J Cancer* 1996;32(suppl 4): 21–5.

DRULLINSKY P, SUGARMAN SM, FORNIER MN, D'ANDREA G, GILEWSKI T, LAKE D, TRAINA T, WASSERHEIT-LIEBLICH C, SKLARIN N, ATIEH-GRAHAM D, MILLS N, TROSO-SANDOVAL T, SEIDMAN AD, YUAN J, PATEL H, PATIL S, NORTON L, HUDIS C. **Dose dense cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil is feasible at 14-day intervals: a pilot study of every-14-day dosing as adjuvant therapy for breast cancer.***Clin Breast Cancer.* 2010 Dec 1;10(6):440-4.

DONNELLY JP, DOMPELING EC, MEIS JF, DE PAUW BE **Bacteremia due to oral viridans streptococci in neutropenic patients with cancer: cytostatics are a more important risk factor than antibacterial prophylaxis.** Clin Infect Dis 1995;20:469–470.

EL-HOUSSEINY AA, SALEH SM, EL-MASRY AA, ALLAM AA **Assessment of oral complications in children receiving chemotherapy.**J Clin Pediatr Dent 2007. 31:267–273.

ELTING L, COOKSLEY C, CHAMBERS M, CANTOR S, MANZULLO E, RUBENSTEIN E. **The burdens of cancer therapy.**Cancer , 2003; 98:1531-1539.

EPSTEIN JB, SILVERMAN S JR, PAGGIARINO DA, CROCKETT S, SCHUBERT MM, SENZER NN, LOCKHART PB, GALLAGHER MJ, PETERSON DE, LEVEQUE FG.**BenzydamineHCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.**Cancer. 2001;92: 875-885.

FALCONE A, RICCI S, BRUNETTI I, PFANNER E, ALLEGRINI G, BARBARA C, CRINÒ L, BENEDETTI G, EVANGELISTA W, FANCHINI L, CORTESI E, PICONE V, VITELLO S, CHIARA S, GRANETTO C, PORCILE G, FIORETTO L, ORLANDINI C, ANDREUCCETTI M, MASI G; GRUPPO ONCOLOGICO NORD OVEST.**Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest.** J Clin Oncol 2007; 25:1670–1676.

FERRÀ C, DE SANJOSÉ S, GALLARDO D, BERLANGA JJ, RUEDA F, MARÍN D, DE LA BANDA E, ANCÍN I, PERIS J, GARCÍA J, GRAÑENA A.**IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation.**Haematologica 1998;83(12):1082-7.

FERRÀ C, DE SANJOSÉ S, LASTRA CF, MARTÍ F, MARIÑO EL, SUREDA A, BRUNET S, GALLARDO D, BERLANGA JJ, GARCÍA J, GRAÑENA A.**Pentoxifylline, ciprofloxacin and prednisone failed to prevent transplant-related toxicities in bone marrow transplant recipients and were associated with an increased incidence of infections complications.** Bone marrow Transplant 1997 Dec;20(12):1075-80.

FLOMBAUM CD, MEYERS PA. **High dose leucovorin as sole therapy for methotrexate toxicity.**J ClinOncol 1999;17: 1589-94.

FRANÇA CM, FRANÇA CM, NÚÑEZ SC, PRATES RA, NOBORIKAWA E, FARIA MR, RIBEIRO MS.**Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters.**J Photochem Photobiol B. 2009 Jan 9;94(1):25-31

GATE L PAUL J, BA GN, TEW KD, TAPIERO H. **Oxidative stress induced in pathologies; the role of antioxidants.** *Biomed Pharmacother.* 1999;53:169-180.

GIBSON RJ, BOWEN JM, INGLIS MRB, CUMMINS AG, KEEFE DMK. **Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer.** *JGastroenterol Hepatol* 2003;18(9):1095–100.

GIBSON RJ, BOWEN JM, KEEFE DM. **Palifermin reduces diarrhea and increases survival following irinotecan treatment in tumor-bearing DA rats.** *Int J Cancer* 2005;116(3):464–70.

GIBSON RJ, KEEFE DM, CLARKE JM, REGESTER GO, THOMPSON FM, GOLAND GJ, EDWARDS BG, CUMMINS AG. **The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50(1):53–8.

GIBSON RJ, KEEFE DM, THOMPSON FM, CLARKE JM, GOLAND GJ, CUMMINS AG. **Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats.** *Dig Dis Sci* 2002;47(12):2751–7.

GRDINA DJ, NAGY B, HILL CK, WELLS RL, PERAINO C. **The radioprotector WR-1065 reduces radiation-induced mutations at the hypoxanthine–guanine phosphoribosyl transferase locus in V79 cells.** *Carcinogenesis* 1985; 6: 929–31.

GRDINA DJ, NAGY B, SIGDESTAD CP. **Radioprotectors in treatment therapy to reduce risk of secondary tumor induction.** *Pharmacol Ther* 1988; 37: 21–5.

HADDAD R, SONIS S, POSNER M, WIRTH L, COSTELLO R, BRASCHAYKO P, ALLEN A, MAHADEVAN A, FLYNN J, BURKE E, LI Y, TISHLER RB. **Randomized phase 2 study of concomitant chemotherapy using weekly carboplatin/paclitaxel with or without daily subcutaneous amifostine in patients with locally advanced head and neck cancer.** *Cancer* 2009.115:4514-4523,

HALL PD, BENKO H, HOGAN KR, STUART RK. **The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia.** *Exp Hematol.* 1995; 23: 1256-1260.

HARRISON T, BIGLER L, TUCCI M, PRATT L, MALAMUD F, THIGPEN JT, STRECKFUS C, YOUNGER H. **Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva**

flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist* 1998. 18:109–112

HEIDELBERGER C, CHAUDHUARI NK, DANEBERG P, MOOREH D, GRIESBACH L, DUSCHINSKY K SCHNITZER RJ, PLEVEN E: **Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds.** *Nature* 1957. 179: 663–666.

HEY J, SETZ J, GERLACH R, VORDERMARK D, GERNHARDT CR, KUHN T. **Effect of cisplatin on parotid gland function in concomitant radiochemotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009. 75:1475-1480,

HENKE M. GUTTENBERG R, BARKE A, PAJINK F, POTTER R, FROMMHOLD H. **Erythropoietin for patients undergoing radiotherapy: a pilot study.** *Radiother Oncol* 1999; 50:185-90.

HENSLEY ML, SCHUCHTER LM, LINDLEY C, MEROPOL NJ, COHEN GI, BRODER G, GRADISHAR WJ, GREEN DM, LANGDON RJ JR, MITCHELL RB, NEGRIN R, SZATROWSKI TP, THIGPEN JT, VON HOFF D, WASSERMAN TH, WINER EP, PFISTER DG. **American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants.** *J Clin Oncol* 1999; 17:3333-3355.

HILL CK, NAGY B, PERAINO C, GRDINA DJ. **WR-1065 is antineoplastic and antimutagenic when given during 60Co-gamma ray irradiation.** *Carcinogenesis* 1986; 7: 665–8.

HOWARTH GS, FRANCIS GL, COOL JC, XU X, BYARD RW, READ LC. **Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats.** *J Nutr* 1996; 126(10):2519–30.

IMPACT. **Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer.** *International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT)* investigators. *Lancet* 1995. 345, 939–944

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil: série temporal das taxas de mortalidade, brutas e ajustadas por idade pelas populações mundial e brasileira, para topografias selecionadas, entre 1979 e 2007.** Disponível em <http://www.inca.gov.br/vigilância/mortalidade.html>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil.** 2009. Rio de Janeiro: INCA.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90

JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E. **Cancer statistics, 2010.** *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.

JENSEN SB, MOURIDSEN HT, REIBEL J, BRUNNER N, NAUNTOFTE B **Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induce temporary salivary gland hypofunction.** *Oral Oncol* 2008; 44:162–173

JENSEN SB, PEDERSEN AM, VISSINK A, ANDERSEN E, BROWN CG, DAVIES AN, DUTILH J, FULTON JS, JANKOVIC L, LOPES NN, MELLO AL, MUNIZ LV, MURDOCH-KINCH CA, NAIR RG, NAPEÑAS JJ, NOGUEIRA-RODRIGUES A, SAUNDERS D, STIRLING B, VON BÜLTZINGSLÖWEN I, WEIKEL DS, ELTING LS, SPIJKERVET FK, BRENNAN MT; Salivary Gland Hypofunction/Xerostomia Section, Oral Care Study Group, Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). **A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life.** *Support Care Cancer.* 2010 Aug;18(8):1039-60.

JUNQUEIRA-JÚNIOR J, JUNQUEIRA AF, MEDEIROS JV, BARBOSA SH, NOGUEIRA AC, MOTA JM, SANTANA AP, BRITO GA, RIBEIRO RA, LIMA-JÚNIOR RC, SOUZA MH. **Role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons and non-protein sulphhydryl groups on gastroprotective effect of amifostine against ethanol-induced gastric damage in rats.** *Dig Dis Sci.* 2011 Feb;56(2):314-22

KAJSTURA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNENBLICK EH, KRAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P. **Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats.** *Invest* 1996;74:86-107.

KARIS K.F. CHENG, WILLIAM B. GOGGINS, VINCENT W.S. LEE, DAVID R. THOMPSON. **Risk factors for oral mucositis in children undergoing chemotherapy: A matched case-control study.** *Oral Oncology,* 2008.44, 1019– 1025.

KEEFE DMK, BREALEY J, GOLAND GJ, CUMMINS AG. **Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans.** *Gut* 2000;47 (5):632-7.

KEEFE MD, SCHUBERT MM, ELTING LS, SONIS ST, EPSTEIN JB, RABER-DURLACHER JE, MIGLIORATI CA, MCGUIRE DB, HUTCHINS RD, PETERSON DE.

Updated Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Mucositis. *Cancer*, 2007; v. 109; 5: 821-831.

KEITH JR JC, ALBERT L, SONIS ST, PFEIFFER CJ, SCHAUB RG. **IL-11, a pleiotropic cytokine: exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology.** *Stem Cells* 1994;12(Suppl 1):79–89, Discussion 89–90.

KLIMECKI W, HEATON R, GLINSMANN-GIBSON B, LIST AF. **Amifostine suppresses apoptosis in myelodysplastic CD34⁺ cells and promotes progenitor growth via polyamine-like effects.** *Blood* 1997; 90(suppl 1)abstr 2317

KOSMAS C, KALLISTRATOS MS, KOPTERIDES P, SYRIOS J, SKOPELITIS H, MYLONAKIS N, KARABELIS A, TSAVARIS N. **Cardiotoxicity of fluoropyrimidines in different schedules of administration: a prospective study.** *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Jan;134(1):75-82. Epub 2007 Jul 17.

KOUKOURAKIS MI. **Amifostine: Is there evidence of tumor protection?** *Semin Oncol* 2003; 30 (suppl 18): 18-30

KOUKOURAKIS MI. **Amifostine in clinical oncology: current use and future applications.** *Anticancer Drugs*. 2002 Mar;13(3):181-209. Review.

KOUKOURAKIS MI, FLORDELLIS CS, GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKI S, KAPSORITAKIS A, POTAMIANOS S, RETALIS G, SIVRIDIS E, SALSAA B, HARRIS AL, MARAGOUDAKIS MI. **Oral administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) in the management of radiotherapy induced esophagitis.** *Clin Cancer Res* 1999; 5:3970-6.

KOUKOURAKIS MI, KYRIAS G, KAKOLYRIS S, KOUROUSSIS C, FRANGIADAKI C, GIATROMANOLAKI A, RETALIS G, GEORGOULIAS V. **Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study.** *J Clin Oncol*. 2000 Jun;18(11):2226-33.

KOULOULIAS VE, KOUVARIS JR, PISSAKASGET AL. **Phase II multicenter randomized study of amifostine for prevention of acute radiation rectal toxicity: Topical intrarectal versus subcutaneous application.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:486–493.

KRONCKE, K.D., FEHSEL, K., KOLB-BACHOFEN, V., **Inducible nitric oxide synthase in human diseases.** *Clinical and Experimental Immunology* 1998 113 (2), 147–156.

LAINÉ PO, LINDQVIST JC, PYRHONEN SO, STRAND-PETTINEN IM, TEERENHOVI LM, MEURMAN JH. **Oral infection as a reason for febrile episodes in lymphoma patients receiving cytostatic drugs.** *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B: 103–107.

LEITÃO RF, RIBEIRO RA, BELLAGUARDA EA, MACEDO FD, SILVA LR, ORIÁ RB, VALE ML, CUNHA FQ, BRITO GA. **Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster.** *Cancer Chemother Pharmacol.*,2007, 59(5):p. 603-12.

LEITÃO RF, RIBEIRO RA, LIRA AM, SILVA LR, BELLAGUARDA EA, MACEDO FD, SOUSA RB, BRITO GA. **Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Feb;61(2):215-22.

LI-CQ, WOGAN G.N. **Nitric oxide as a modulator of apoptosis.** *Cancer Left* 2005;226 (1) 1-15.

LIMA V, BRITO GA, CUNHA FQ, REBOUÇAS CG, FALCÃO BA, AUGUSTO RF, SOUZA ML, LEITÃO BT, RIBEIRO RA. **Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifyline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters.** *Eur J Oral Sci.*,2005,113 (3): p.210-217.

LINO JA. **Efeito protetor da amifostina na neuropatia sensitiva periférica experimental induzida por oxaliplatina.** 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011

LIST AF, BRASFIELD F, HEATON R, GLINSMANN-GIBSON B, CROOK L, TAETLE R, CAPIZZI R. **Stimulation of haematopoiesis by amifostine in patients with myelodysplastic syndrome.** *Blood* 1997; 90: 3364–9.

LIST AF. **Haematopoietic stimulation by amifostine and sodium phenylbutyrate: what is the potential in MDS?** *Leuk Res* 1998; 22: S7–11.

LOCKART PB, SONIS ST. **Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histological study.** *J. Dermatol. Surg. Oncol.*;1981. v. 7, p. 1019-1025.

LOGAN RM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DMK. **Nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy.** *Oral Oncol* 2007; 43(4):395–401.

LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, YEOH ANS-J, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DMK. **The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs.** *Cancer Treatment Reviews* 2007 33:448-460.

LONGLEY D.B, HARKIN DP, JOHNSTON PG., **5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.** *Nature Reviews Cancer* 2003 MAY 3, 330-338

LOPES, NNF, PLAPER, H, CHAVANTES, MC, LALLA, RV, YOSHIMURA, E, M, ALVES, M, T. S. A. Y. **Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols.** *Support Care Cancer* (2009) 17: 15409-1415.

LORCH JH, GOLOUBEVA O, HADDAD RI, CULLEN K, SARLIS N, TISHLER R, TAN M, FASCIANO J, SAMMARTINO DE, POSNER MR; for the TAX 324 Study Group. **Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial.** *Lancet Oncol.* 2011 Jan 11.

LOPES NN, PLAPLER H, CHAVANTES MC, LALLA RV, YOSHIMURA EM, ALVES MT. **Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols.** *Support Care Cancer.* 2009 Nov;17(11):1409-15.

LOURY D, EMBREE JR, STEINBERG DA, SONIS ST, FIDDES JC. **Effect of local application of the antimicrobial peptide IB-367 on the incidence and severity of oral mucositis in hamsters.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87(5):544-51.

MADDENS S, CHARRUYER A, PLO I, DUBREUIL P, BERGER S, SALLES B, LAURENT G, JAFFRÉZOU JP. **Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect.** *Blood*; 2002, v. 100, p. 1294-1301.

MANO MS, DUHOUX F. **Colon cancer: update on adjuvant therapy.** *Clin Colorectal Cancer.* 2008 May;7(3):178-83.

MILAS L, HUNTER NR, STEPHENS LC, PETERS LJ. **Inhibition of radiation carcinogenesis in mice by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid.** *Cancer Res* 1984; 44: 5567-9.

MITSUHASHI H, SUEMARU K, LI B, ARAKI H. **Evaluation of topical external medicine for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters.** Eur J Pharmacol 2006;551(1-3):152-5.

MOCELIN S, ROSSI CR, PILATI P, NITTI D. **Tumor necrosis factor cancer and anticancer therapy.** Cytokine Growth Factor Rev 2005;16(1) : 35-53.

MONCADA, S., HIGGS, E.A., **Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance.** European Journal of Clinical Investigation 1991 21 (4), 361-374.

MORVAN FO, BAROUKH B, LEDOUX D, CARUELLE JP, BARRITAU D, GODEAU G, SAFFAR JL. **An engineered biopolymer prevents mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters.** Am J Pathol 2004;164(2):739-46.

MOTA JM, SOARES PM, MENEZES AA, LEMOS HP, CUNHA FQ, BRITO GA, RIBEIRO RA, DE SOUZA MH. **Amifostine (Wr-2721) prevents indomethacin-induced gastric damage in rats: role of non-protein sulfhydryl groups and leukocyte adherence.** Dig Dis Sci. 2007 Jan;52(1):119-25.

MOTAMLS. **Avaliação dos efeitos do agente citoprotetor amifostina na mucosite oral e disfunção da barreira intestinal: modelos experimentais em ratos e em pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia antineoplásica.** 2004. M871a Tese (Doutorado em Farmacologia)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004

NAGY B, DALE PJ, GRDINA DJ. **Protective effects of 2-[(aminopropyl)amino]ethanethiol against bleomycine and nitrogen mustard-induced mutagenicity in V79 cells.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 1986; 12:1475-8.

NAGY B, DALE PJ, GRDINA DJ. **Protection against cis-diaminodichloroplatinum cytotoxicity and mutagenicity in V79 cells by 2-[(aminopropyl)amino] ethanethiol.** Cancer Res 1986; 45: 1132-5.

NONZEE NJ, DANDADE NA, PATEL U, MARKOSSIAN T, AGULNIK M, ARGIRIS A, PATEL JD, KERN RC, MUNSHI HG, CALHOUN EA, BENNETT CL. **Evaluating the supportive costs of severe radiochemotherapy-induced mucositis and pharyngitis: results from a Northwestern University Cost of Cancer Program pilot study with head and neck and nonsmall cell lung cancer patients who received care at a country hospital, a veterans administration hospital, or a comprehensive cancer center.** Cancer 2008;113:1446-52.

ORLICEK SL, BRANUM KC, ENGLISH BK, MCCORDIC R, SHENEP JL, PATRICK CC. **Viridans streptococcal isolates from patients with septic shock induce tumor necrosis factor- α production by murine macrophages.** J Lab Clin Med 1997;130(5):5:515-9

PETERSON D.E, BENSADOUN –JR, ROILA F.: **Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Recommendations.** Annals of Oncology, 2009,20 (4): iv174-iv177.

PICO J-L, AVILA-GARAVITO A, NACCACHE P: **Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting.** The Oncologist, 1998;3: p. 446-451.

PURDIE JW,INHABER ER,SCHENEIDER H, LABELLE JL.**Interaction of cultured mammalian cells with WR-2721 and its thiol.WR-1065;Implications for mechanisms of radioprotection.**Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1983;43:517-527.

WILDER-SMITH P, HAMMER-WILSON MJ, ZHANG J, WANG Q, OSANN K, CHEN Z, WIGDOR H, SCHWARTZ J, EPSTEIN J.**In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography,** Clin. Cancer Res. 13 2007. 2449–2454.

RAMANATHAN RK, BJARNASON GA, BERNARD SA, DESIMONE P, BRAICH T, EVARS JP, HRUSHESKY WJ, JOLIVET J.**A four-arm, randomized, multicenter phase II trial of oxaliplatin combined with varying schedules of 5-fluorouracil as first-line therapy in previously untreated advanced colorectal cancer.**Clin Colorectal Cancer 2008; 7:134–139.

RASAY JS, SPENCE AM, BADGER CC, KROHN KA, VERADM, LIVESEY JC. **Specific protection of different normal tissues.**Pharmacol Ther 1988; 39: 33–43.

RIBEIRO RA,LEITÃO RFC, SANT’ ANA RO,MOURA JFB,LIMA V, MEDEIROS RP,MARQUES NETO RD,LIMA JÚNIOR RCP, VALE ML, SOUZA MHL, BRITO GAC. **Mucosite oral:patogênese e manuseio clínico.** Rev. bras. Oncologia clínica 2008.vol.5.no15 (set/dez) 18-24.

ROBBINS & COTRAN, **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**–2005-7ª Ed.

RUBENSTEIN EB. **Colony stimulating factors in patients with fever and neutropenia.**Int J Antimicrob Ag 2000;16:117-21.

RUBENSTEIN EB, PETERSON DE, SCHUBERT M, KEEFE D, MCGUIRE D, EPSTEIN J, ELTING LS, FOX PC, COOKSLEY C, SONIS ST. **Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Cancer Therapy-Induced Oral and Gastrointestinal Mucositis.** Cancer, 2004, 100(9):p.2026-46.

RUTMAN RJ, CANTAROW A, PASCHKIS KE: **Studies on 2- acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C 14 by pre-neoplastic rat liver.**Cancer Res 1954. 14: 119–126.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.;WOOLF, C.J. **Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia.** Br J Pharmacol, 1995 v. 115, p. 1265-1275.

SANT'ANA RO, **ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTALINDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL: PAPEL DOS EXTRATOS DE *Aloebarbadensis* (BABOSA) E *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO SERTÃO).**2006.Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Faculdade de Medicina,Universidade Federal do Ceará,Fortaleza,2006.

SANTI, D. V., MCHENRY, C. S. & SOMMER, H. **Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate.**Biochemistry 1974.13, 471–481

SASSE AD,CLARK LG,SASSE EC.**Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy.** Results of a metaanalysis.Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;64 :784-791.

SHAW LM, GLOVER D, TURRISI A, BROWN DQ, BONNER HS, NORFLEET AL, WEILER C, GLICK JH, KLIGERMAN MM.**Pharmacokinetics of WR-2721.** Pharmacol Ther 1988; 39:195–201.

SHAW LM, TURRISI AT, GLOVER DJ, BONNER HS, NORFLEET AL, WEILER C, KLIGERMAN MM.**Human pharmacokinetics of WR-2721.** Int J Radiat OncolBiol Phys 1986; 12: 1501–4.

SHIMIZU S, EGUCHI Y, KAMIIKE W, ITOH Y, HASEGAWA J, YAMABE K, OTSUKI Y, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y.**Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apioptosis by BCL-2 AND Bcl-XI.**Cancer Res 1996;56:2161-2166.

SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. **Mucosal diseases series** Oral mucositis. Oral Diseases 2006, 12, 229–241.

SONIS ST, PETERSON RL, EDWARDS LJ, LUCEY CA, WANG L, MASON L, LOGIN G, YMAMKAWA M, MOSES G, BOUCHARD P, HAYES LL, BEDROSIAN C, DORNER AJ. **Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters.** *Oral Oncol* 2000;36(4):373-81.

SONIS ST. **Oral complications.** In: Holland JF, Frei E III, Bast RC Jr., eds. *Cancer Medicine*, 4th Edition. Philadelphia: Lea & Febiger 1997; 3255-3264.

SONIS ST. **Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity.** *Oral Oncol* 1998;34 (1):39-43.

SONIS, ST. **Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities.** *Oral Oncology* 2009, 45, p: 1015–1020.

SONIS J, DOUKAS D, KLINKMAN M, REED B, RUFFIN MT. **Applicability of clinical trial results to primary care.** *JAMA*. 1998; 280:1746.

SONIS ST, ELTING SL, KEEFE D, PETERSON ED, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M, BEKELE BN, DONNELLY JP, RUBENSTEIN EB. **Mucositis: Perspectives on Cancer Therapy- Induced Mucosal Injury.** *Cancer* 2004, 100 (S9), p 1995-2025.

SONIS ST, FEY EG. **Oral complications of cancer therapy.** *Oncology (Williston Park)*. 2002 May;16(5):680-6.

SONIS S, KOPLOWSKY A, MITUS J, ROSENTHAL D, BRAND M. **Relationship of chemotherapy-induced mucositis and myelosuppression in hamsters.** *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B(1):43.

SONIS ST, LINDQUIST L, VAN VUGT A, STEWART AA, STAM K, QU GY, IWATA KK, HALEY JD. **Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3.** *Cancer Res* 1994;54(5):1135–8.

SONIS S, MUSKA A, O'BRIEN J, VAN VUGT A, LANGER-SAFER P, KEITH J. **Alteration in the frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11.** *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B(4):261–6.

SONIS ST, O'DONNELL KE, POPAT R, BRAGDON C, PHELAN S, COCKS D, EPSTEIN JB. **The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis.** *Oral Oncol* 2004;40(2):170–6.

SONIS ST, OSTER G, FUCHS H, BELLM L, BRADFORD WZ, EDELSBERG J, HAYDEN V, EILERS J, EPSTEIN JB, LEVEQUE FG, MILLER C, PETERSON DE, SCHUBERT MM, SPIJKERVET FK, HOROWITZ M **Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation.** *J Clin Oncol* 2001;19:2201-5.

SONIS ST, PETERSON RL, EDWARDS LJ, LUCEY CA, WANG L, MASON L, LOGIN G, YMAMKAWA M, MOSES G, BOUCHARD P, HAYES LL, BEDROSIAN C, DORNER AJ. **Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation induced oral mucositis in hamsters.** *Oral Oncol* 2000;36(4):373–81.

SONIS ST, TRACEY C, SHKLAR G, JENSON J, FLORINE D. **An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1990, 69 (4): p.437-43.

SONIS ST, VAN VUGT AG, MCDONALD J, DOTOLI E, SCHWERTSCHLAG U, SZKLUT P, KEITH J. **Mitigating effects of interleukin 11 on consecutive courses of 5-fluorouracil induced ulcerative mucositis in hamsters.** *Cytokine* 1997;9(8):605–12.

TADASHI Y. **Cartilage destruction by matrix degradation products.** *Modern Reumatol.* 2006;V16(4):197-205.

TAKASHIMA A, YAMADA Y, NAKAJIMA TE, KATO K, HAMAGUCHI T, SHIMADA Y. **Standard First-Line Chemotherapy for Metastatic Gastric Cancer in Japan Has Met the Global Standard: Evidence From Recent Phase III Trials.** *Gastrointest Cancer Res.* 2009 Nov;3(6):239-44.

TOURNIGAND C, ANDRE T, ACHILLE E, LLEDO G, FLESH M, MERY-MIGNARD D, et al. **FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study.** *J Clin Oncol* 2004; 22:229–237.

TRAN CD, HOWARTH GS, COYLE P, PHILCOX JC, ROFE AM, BUTLER RN. **Dietary supplementation with zinc and a growth factor extract derived from bovine cheese whey improves methotrexate-damaged rat intestine.** *Am J Clin Nutr* 2003;77:1296–303.

TROTTI A, BELLM LA, EPSTEIN JB, FRAME D, FUCHS HJ, GWEDE CK, KOMAROFF E, NALYSNYK L, ZILBERBERG MD. **Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review.** *Radiother. Oncol.* 66 2003.253-262.

UPTON A, ed. **Radiation carcinogenesis**. 1996 New York:Elsevier.

VACHA P, FEHLAUER F, MAHLMANN B, MARX M, HINKE A, SOMMER K, RICHTER E, FEYERABEND T. **Randomized phase III trial of post-operative radiochemotherapy ± amifostine in head and neck cancer. Is there evidence for radioprotection ?** *Strahlenther Oncol* 2003;179:385-389.

VISSINK A, JANSMA J, SPIJKERVET FK, BURLAGE FR, COPPES RP. **Oral sequelae of head and neck radiotherapy**. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003 14:199–212

WATANABE S, SUEMARU K, YAMAGUCHI T, HIDAKA N, SAKANAKA M, ARAKI H. **Effect of oral mucosal adhesive films containing ginsenoside Rb1 on 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters**. *Eur J Pharmacol*. 2009 Aug 15;616(1-3):281-6.

WICKHAM RS, REHWALDT M, KEFER C, SHOTT S, ABBAS K, GLYNN-TUCKER E, POTTER C, BLENDOWSKI C **Taste changes experienced by patients receiving chemotherapy**. *Oncol Nurs Forum* 1999. 26:697–706.

WOHLHUETER, R. M., MCIVOR, R. S. & PLAGEMANN, P. G. **Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells**. *J. Cell Physiol*. 1980. 104, 309–319.

YUHAS JM. **Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid**. *Cancer Res* 1980;40;1519-1524.

YUHAS JM, CULO F. **Selective inhibition of nephrotoxicity of cis-platinum without altering its antitumor effectiveness**. *Cancer Treat Rep* 1980; 64:57–64.

YUHAS JM, STORER JB. **Differential chemoprotection of normal and malignant tissues**. *J Natl Cancer Inst* 1969;42:331-335.