



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**LUANA ESCHHOLZ BOMFIN**

**EFEITO DO 5-FLUOROURACIL EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL**

**FORTALEZA**

**2016**

LUANA ESCHHOLZ BOMFIN

EFEITO DO 5-FLUOROURACIL EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina I.

Orientador: Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B683e Bomfin, Luana Eschholz.  
EFEITO DO 5-FLUOROURACIL EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL / Luana Eschholz Bomfin. – 2016.  
117 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

1. mucosite oral. 2. hipofunção salivar. 3. xerostomia. 4. 5-Fluorouracil. I. Título.

CDD 610

---

LUANA ESCHHOLZ BOMFIN

EFEITO DO 5-FLUOROURACIL EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina I.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr.  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr.  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr.  
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Márcia e Asiel, que sempre torceram por  
mim, independente das minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por sempre me presentear através de suas ações divinas, me guiando e iluminando todos os dias nessa jornada.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito**, por ter me recebido na universidade, depositado sua confiança, pela contribuição científica e didática excepcionais.

À Profa. **Dra. Renata Ferreira Leitão**, que contribuiu sabidamente para o desenvolvimento desta tese e artigo científico.

À Profa. **Dra. Gutencilda Colares** pelas sugestões e colaboração na elaboração no estudo.

Às Profas. **Delane Godim** e **Deysi Viviana Tenazoa Wong** pelas críticas valiosas e construtivas na qualificação desta tese.

Às secretarias da pós-graduação em Ciências Médicas, **Ivone** e **Rita**, sempre atenciosas e dispostas a me ajudar em todas as horas.

Às técnicas do laboratório Nempi, **Socorro, Elilce e Flávia** pela disposição, atenção e ensinamentos técnicos essenciais ao meu crescimento profissional.

Aos amigos da UFC, **Ana Angélica, Josy, Cerqueira, Cíntia, Sara, Thais, Antoniella, Zulmira e Naiana** pela amizade, companheirismo e incentivo na realização desta tese.

À minha família cearense **Aline, Denise, Priscila, Rafa, Eduardo, William, Nilton, Beatriz, Magno, Paulinha, Reinaldo e Carla**, pelo apoio, pelas alegrias e tristezas compartilhadas e momentos inesquecíveis durante esses anos.

À **Danielle** e **Victor**, casal que mora no meu coração, pelo carinho, atenção, parceria e amizade, sou eternamente grata.

Aos professores e colegas do **NEMPI, LAFICA de cima** e **LAFICA de baixo**, pela amizade e pela ajuda em diversos momentos.

Aos meus pais, **Asiel** e **Márcia**, amores eternos, pessoas essenciais e indispensáveis na minha vida.

Aos meus avós, **Asiel** e **Lourdes** e **Branca** e **Luis Carlos**, pessoas que tenho enorme admiração e carinho imensurável.

À **FUNCAP** e **CAPES**, pelo financiamento dos meus quatro anos de estudo.

Ciente de que seria impossível lembrar-se de todos que, direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos aqueles que fizeram parte de minha conquista.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.  
(Marthin Luther King)

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo elucidar o efeito do 5-fluorouracil (5-FU) em glândulas salivares maiores, fluxo e composição salivar, utilizando um modelo pré estabelecido de mucosite oral (MO) induzida em hamsters. A MO foi induzida por administrações intraperitoneais de 5-FU, nos 1° e 2° dias do modelo experimental (60mg/kg e 40mg/kg, respectivamente). No 4° dia, os animais foram submetidos ao trauma mecânico em mucosa jugal. Previamente a coleta das glândulas salivares, foi administrado pilocarpina (10mg/kg) para a medida do fluxo salivar e posterior coleta da saliva. As glândulas salivares maiores foram coletadas para análise histopatológica, contagem das células inflamatórias, avaliação do estresse oxidativo (SOD, CAT, nitrito/nitrato, NPSH e MDA), quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e investigação de morte e proliferação celular celular, níveis de CAT, SOD, lisozima e IgA foram avaliados em amostras de saliva. Os resultados mostraram que o 5-FU reduziu significativamente o fluxo salivar estimulado pela pilocarpina no 4° dia do modelo experimental, associado ao aumento dos níveis de SOD na saliva. No 10° dia, foi observada recuperação do fluxo salivar, concomitante a redução dos níveis de lisozima de saliva. Além disso, o 5-FU promoveu vacuolização na glândula parótida e edema periductal na glândula submandibular no 4° dia, associada ao aumento do influxo de células inflamatórias, principalmente no 4° dia na glândula submandibular e nos 4° e 10° dias na glândula parótida. O 5-FU estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) no dia 10° nas glândulas submandibular e sublingual concomitante ao estresse oxidativo. Contudo, apesar do aumento do estresse oxidativo no 10° dia, o 5-FU produziu efeito inibitório das mesmas citocinas pró-inflamatórias na glândula parótida. De acordo com os resultados acima descritos, podemos concluir que o 5-FU induz resposta inflamatória nas glândulas salivares maiores, mais frequentemente observado 10 dias após a primeira administração do 5-FU, o que pode contribuir para a hipofunção das glândulas salivares, levando a alterações no fluxo e composição salivar.

**Palavras-chave:** mucosite oral, hipofunção salivar, xerostomia, 5-Fluorouracil



## ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the effect of 5-Fluorouracil (5-FU) on major salivary glands, salivary flow and saliva composition using an established oral mucositis (OM) model, in hamsters. OM was induced by two intraperitoneal administrations of 5-FU on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> days of the experimental model (60mg/kg and 40mg/kg, respectively), followed by cheek pouch mucosa scratch. Pilocarpine stimulated salivary flow were measured, saliva was collected, salivary glands were harvested for histopathological analysis, measurement of inflammatory cells, evaluation of oxidative stress (SOD, CAT, nitrite, NP-SH and MDA), quantification of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and investigation of cell death and proliferation. CAT and lysozyme activities and IgA and SOD levels were evaluated in saliva samples. This study demonstrated that 5-FU significantly reduced the pilocarpine stimulated salivary flow rate on the 4<sup>th</sup> experimental day, associated with an increase in SOD levels in saliva. Recovery of salivary flow was observed on day 10, when a decrease in the saliva lysozyme levels was detected. In addition, 5-FU promoted vacuolization in parotid gland and periductal edema in submandibular gland, combined with an increase in the inflammatory cells influx, mostly observed on the 4<sup>th</sup> day in submandibular gland and on 4<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days in parotid gland. 5-FU stimulated pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production on 10<sup>th</sup> day in submandibular and sublingual glands associated with oxidative stress. Although the stimulation of oxidative stress on 10<sup>th</sup> day, 5-FU promoted inhibitory effect on both pro-inflammatory cytokines in parotid gland. According to the above mentioned results, 5-FU induced an inflammatory response in major salivary glands, most observed 10 days after its first injection, which may contribute to glands hypofunction, leading to alterations in the salivary flow rate and composition.

**Keywords:** oral mucositis, salivary hypofunction, xerostomia, 5-Fluorouracil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Biopatologia da mucosite oral.....	22
Figura 2	– Estrutura química do 5-FU e do Uracil.....	24
Figura 3	– Mecanismo de ação do 5-FU.....	26
Figura 4	– Distribuição anatômica das glândulas salivares maiores: glândula sublingual, glândula submandibular e glândula parótida.....	28
Figura 5	– Morfologia microscópica das glândulas salivares evidenciando ácinos e ductos.....	29
Figura 6	– Modelo esquemático do processo de formação da saliva.....	31
Figura 7	– Desenho esquemático do protocolo experimental de mucosite oral.....	42
Figura 8	– Distribuição dos grupos estudados no modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU.....	44
Figura 9	– Coleta da saliva estimulada pela pilocarpina.....	46
Figura 10	– Efeito do 5-FU na taxa de salivação estimulada pela pilocarpina nos 4° (a) e 10° dias (b) do modelo experimental.....	60
Figura 11	– Efeito do 5-FU na qualidade da saliva pela análise da atividade da lisozima (unidade de lisozima/ $\mu$ l) (a) e dosagem de IgA (ng/ml) (b) em amostras de saliva estimuladas pela pilocarpina.....	62
Figura 12	– Efeito do 5-FU na atividade de SOD (a) e CAT (b) em amostras de saliva estimulada pela pilocarpina.....	64
Figura 13	– Efeito do 5-FU no peso das glândulas submandibular (SM) e sublingual (SL) (a) e glândula parótida (P) (b).....	66
Figura 14	– Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula sublingual.....	69
Figura 15	– Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula submandibular.....	70
Figura 16	– Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula parótida.....	71
Figura 17	– Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula sublingual.....	74
Figura 18	– Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula submandibular.....	76
Figura 19	– Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula parótida.....	78
Figura 20	– Efeito do 5-FU sobre a vascularização nas glândulas salivares maiores.....	80
Figura 21	– Efeito do 5-FU nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ (a e c) e TNF- $\alpha$ (b e d) nas glândulas salivares maiores.....	82
Figura 22	– Efeito do 5-FU nos parâmetros do estresse oxidativo nas glândulas salivares maiores.....	84
Figura 23	– Efeito do 5-FU na expressão da proteína iNOS nas glândulas sublingual e submandibular do grupo 5-FU-10 dias por western blotting.....	85
Figura 24	– Efeito do 5-FU sobre a morte e proliferação celular da glândula submandibular.....	87
Figura 25	– Efeito do 5-FU sobre a morte e proliferação celular da glândula parótida.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais componentes da saliva.....	32
Tabela 2	– Efeito do 5-FU nos escores de vacuolização e edema periductal nas glândulas salivares maiores.....	68
Tabela 3	– Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula sublingual.....	73
Tabela 4	– Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula submandibular.....	75
Tabela 5	– Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula parótida.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil
<b>8-OHdG</b>	8-hydroxy-2' -deoxyguanosine
<b>Ach</b>	acetilcolina
<b>AMPc</b>	monofosfato de adenosina cíclico
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>BSA</b>	albumina de soro bovino
<b>CAT</b>	catalase
<b>CEPA</b>	comitê de ética em pesquisa em animal
<b>CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub></b>	5, 10-metileno-tetrahidrofolato
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonuclêico
<b>EDTA</b>	ethylenediamine tetraacetic acid
<b>ELISA</b>	enzyme linked immune sorbent assay
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FdUMP</b>	5-fluoro-2-deoxiuridina monofosfato
<b>FdUTP</b>	fluorodeoxiuridina trifosfato
<b>FUTP</b>	fluorouridina trifosfato
<b>GM-CSF</b>	fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos
<b>Gq/11</b>	proteína G heterodimérica
<b>GSH</b>	glutationa
<b>Gy</b>	grays
<b>h</b>	hora
<b>HE</b>	hematoxilina e eosina
<b>IgA</b>	imunoglobulina A
<b>IgG</b>	imunoglobulina G
<b>IgM</b>	imunoglobulina M
<b>IL-1</b>	interleucina-1
<b>IL-6</b>	interleucina-6
<b>ip</b>	intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositoltrifosfato
<b>KGF</b>	keratinocyte growth factor

<b>LAFICA</b>	laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeos
<b>MDA</b>	malonaldeído
<b>min</b>	minuto
<b>MI</b>	mililitro
<b>MO</b>	mucosite oral
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NADPH</b>	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
<b>NAM</b>	N-acetilmurâmico
<b>NAG</b>	N-acetil-D-glucosamina
<b>NBT</b>	tetrazólio nitro azul
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOSi</b>	óxido nítrico sintase induzida
<b>NP-SH</b>	grupos sulfilídricos não proteicos
<b>PBS</b>	tampão salina fosfato
<b>QT</b>	quimioterapia
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SNAP</b>	sistema nervoso autonômico parassimpático
<b>SNAS</b>	sistema nervoso autonômico simpático
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TBA</b>	ácido tiobarbitúrico
<b>TCG</b>	túbulos convolutos granulares
<b>TM</b>	trauma mecânico
<b>TS</b>	timidilato sintase
<b>TUNEL</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>UFC</b>	universidade federal do ceará

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	cálcio
<b>Cl<sup>-</sup></b>	cloro
<b>F<sup>-</sup></b>	flúor
<b>g</b>	gramas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	água oxigenada
<b>HCO<sup>3-</sup></b>	bicarbonato
<b>K<sup>+</sup></b>	potássio
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>kg</b>	kilograma
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato monobásico de fosfato
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligrama
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	magnésio
<b>ml</b>	mililitro
<b>n<sup>o</sup></b>	número
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NF-κB</b>	fator nuclear-κB
<b>ng</b>	nanograma
<b>nm</b>	nanômetros
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitrato
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>p</b>	nível decritivo
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidil-inositol-bifosfato
<b>SCN<sup>-</sup></b>	tiocianeto
<b>TGF-β3</b>	fator de transformação de crescimento beta-3
<b>TNF-α</b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>W</b>	watts
<b>%</b>	porcentagem
<b>°C</b>	grau centigrado

<b>μl</b>	microlitro
<b>μm</b>	micrômetro
<b>μM</b>	micromolar

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Mucosite Oral .....	21
2.2	5-Fluorouracil.....	24
2.3	Glândulas salivares.....	27
2.3.1	<i>Morfologia das glândulas salivares.....</i>	27
2.3.2	<i>Fisiologia das glândulas salivares.....</i>	30
2.3.3	<i>Saliva.....</i>	32
2.3.4	<i>Xerostomia e hipofunção salivar.....</i>	34
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos .....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	Locais de estudo.....	40
4.2	Tipo de estudo.....	40
4.3	Principais fármacos utilizados no estudo.....	40
4.3.1	<i>5-Fluorouracil.....</i>	40
4.3.2	<i>Cloridrato de pilocarpina.....</i>	40
4.3.3	<i>Cloridrato de xilazina.....</i>	40
4.3.4	<i>Cloridrato de cetamina.....</i>	41
4.4	Animais.....	41
4.5	Protocolos experimentais.....	41
4.5.1	<i>Modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU.....</i>	41
4.5.2	<i>Grupos experimentais.....</i>	43
4.5.3	<i>Escores macroscópicos das mucosas jugais.....</i>	44
4.5.4	<i>Taxa de salivação estimulada pela pilocarpina e coleta da saliva.....</i>	45
4.5.5	<i>Coleta das glândulas salivares maiores.....</i>	46
4.6	Parâmetros analisados na saliva.....	47
4.6.1	<i>Dosagem de IgA por ELISA.....</i>	47
4.6.2	<i>Dosagem de Lisozima.....</i>	47
4.6.3	<i>Dosagem de superóxido dismutase (SOD).....</i>	48
4.6.4	<i>Dosagem da catalase (CAT).....</i>	48
4.7	Parâmetros analisados nos tecidos de glândulas salivares maiores.....	49
4.7.1	<i>Análise microscópica das glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	49
4.7.2	<i>Análise histoquímica pela coloração de Azul de toluidina nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	49
4.7.3	<i>Análise histoquímica pela coloração de tricrômico de Mallory nas glândulas parótida, submandibular e sublingual</i>	50
4.7.4	<i>Imunohistoquímica para ki-67 nas glândulas submandibular e parótida.....</i>	51
4.7.5	<i>Método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick end-labeling) nas glândulas submandibular e parótida.....</i>	52
4.7.6	<i>Dosagem de nitrito/nitrato nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	53
4.7.7	<i>Dosagem de grupos sulfídricos não-proteicos (NP-SH) nas</i>	53



	<i>glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	
4.7.8	<i>Dosagem de malonaldeído (MDA) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	54
4.7.9	<i>Dosagem de superóxido dismutase (SOD) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	55
4.7.10	<i>Dosagem da catalase (CAT) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	55
4.7.11	<i>Dosagem das citocinas IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math> por ELISA nas glândulas parótida, submandibular e sublingual.....</i>	55
4.7.12	<i>Determinação da expressão da NOSi por western blotting nas glândulas submandibular e sublingual.....</i>	56
4.7.13	<i>Análise estatística.....</i>	58
5	<b>RESULTADOS.....</b>	59
5.1	<b>Efeito do 5-FU na taxa de salivção estimulada pela pilocarpina.....</b>	59
5.2	<b>Efeito do 5-FU na qualidade da saliva estimulada pela pilocarpina através das dosagens de IgA e lisozima.....</b>	61
5.3	<b>Efeito do 5-FU na qualidade da saliva estimulada pela pilocarpina através dos parâmetros de stress oxidativo: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).....</b>	63
5.4	<b>Efeito do 5-FU na macroscopia e peso das glândulas salivares maiores.....</b>	65
5.5	<b>Efeito do 5-FU na morfologia microscópica das glândulas salivares maiores.....</b>	67
5.6	<b>Efeito do 5-FU nas células inflamatórias das glândulas salivares maiores.....</b>	72
5.7	<b>Efeito do 5-FU no sistema vascular das glândulas salivares maiores.....</b>	79
5.8	<b>Efeito do 5-FU nas citocinas pró-inflamatórias, IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math>, nas glândulas salivares maiores.....</b>	81
5.9	<b>Efeito do 5-FU nos parâmetros de stress oxidativo nas glândulas salivares maiores.....</b>	83
5.10	<b>Efeito do 5-FU na expressão proteica da NOSi nas glândulas sublingual e submandibular.....</b>	85
5.11	<b>Efeito do 5-FU na morte e proliferação celular nas glândulas submandibular e parótida.....</b>	86
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	90
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	99
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	100
	<b>ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAL (CEPA).....</b>	113

## 1 INTRODUÇÃO

A mucosite oral é uma das reações adversas mais comuns decorrentes das terapias antineoplásicas, como a radioterapia em cabeça e pescoço e a quimioterapia, principalmente a que utiliza drogas que afetam a síntese do DNA. Diversos fatores podem contribuir com a severidade desta complicação como as variáveis endógenas do próprio paciente, protocolo de tratamento empregado, quimioterapia concomitante à radioterapia, o que pode levar à instabilidade da saúde bucal e queda da qualidade de vida dos pacientes (VISSINK *et al.* 2010; JENSEN *et al.* 2010; SKEFF *et al.* 2014; VAN DER VELDT *et al.* 2014; AL-ANSARI *et al.* 2015; VILLA, SONIS 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2016).

Além da mucosite oral, outra manifestação comumente observada decorrente destas terapias é a xerostomia (boca seca), que pode agravar o quadro de dor nos pacientes que apresentam a mucosite oral (JENSEN *et al.* 2010, EPSTEIN *et al.* 2002), aumentar significativamente o risco de candidíase orofaríngea (EPSTEIN *et al.* 1993) e problemas dentários (OHRN *et al.* 2001). Está bem estabelecido que a xerostomia é induzida principalmente pelo efeito de radiação localizada sobre as glândulas salivares (submandibular, sublingual e parótida) (OHRN *et al.* 2001; TROTTI *et al.* 2003), mas relatos recentes mostram que a quimioterapia, mesmo quando não está associada com a radioterapia, pode também diminuir o fluxo salivar e alterar a composição da saliva (JENSEN *et al.* 2010; VAN DER VELDT *et al.* 2014; CAMPOS *et al.* 2014).

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma fluoropirimidina comumente utilizado no tratamento de uma variedade de tumores malignos, incluindo mama, trato gastrointestinal e cabeça e pescoço (AL-FAKEEH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; DEL MASTRO *et al.*, 2016). Este quimioterápico atua como inibidor da enzima timidilato-sintase, o que resulta na deficiência de timidina monofosfato, um dos três nucleotídeos que formam timina (LONGLLEY *et al.* 2003). Este processo também implica na geração do estresse oxidativo (OZER *et al.* 2015), culminando à replicação danificada do DNA, danos ao genoma e morte celular (BERGER, BERGER 2006; BARBOUR, BERGER 2008).

A literatura mostra diversas complicações bucais decorrentes do uso do 5-FU, como alteração do pH salivar, dos componentes iônicos, dos níveis de enzimas salivares e redução do fluxo salivar, resultando em xerostomia em humanos (JENSEN *et al.* 2008a; JENSEN *et al.* 2008b; MAZZEO *et al.* 2009).

Também, foi demonstrado que o 5-FU pode induzir ao estresse oxidativo nas glândulas submandibular e sublingual por mecanismos desconhecidos e que foi prevenido pela laserterapia (CAMPOS *et al.* 2014). Contudo, o mecanismo pelo qual o quimioterápico afeta a produção salivar culminando à xerostomia não está totalmente elucidado e conseqüentemente, existe a necessidade de maiores esclarecimentos para que futuramente encontremos formas mais efetivas de tratamento para esta condição e até mesmo, estudar maneiras de preveni-la.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do 5-FU no fluxo e composição salivar, associada a alterações histológicas das glândulas salivares maiores, considerando alguns aspectos como a infiltrado celular imuno-inflamatório, citocinas inflamatórias, morte e proliferação celular e estresse oxidativo em hamsters.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mucosite oral

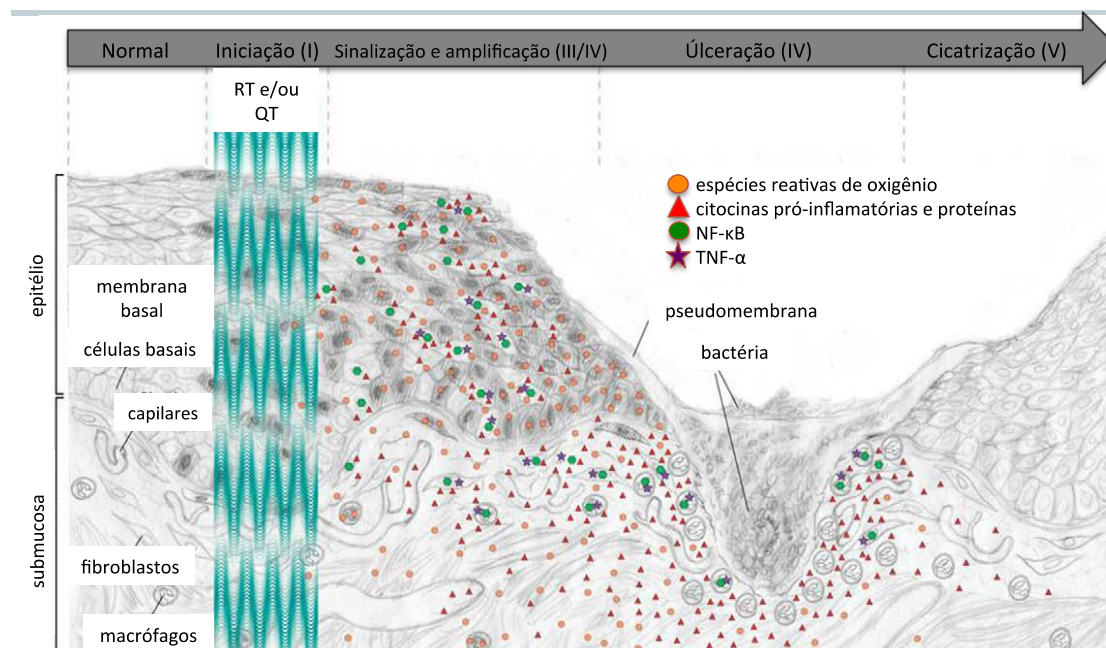
A mucosite oral é uma toxicidade extremamente dolorosa e debilitante, frequentemente observada nos pacientes que fazem uso de terapias antineoplásicas, como a quimioterapia e a radioterapia em cabeça e pescoço. É comum resultar na formação de úlceras, nas quais são susceptíveis de aumento da colonização de microorganismos (VILLA; SONIS, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2016).

A prevalência da mucosite oral varia de acordo com o regime de tratamento empregado: 40% dos pacientes submetidos a quimioterapia, 69,8-76% dos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (ALONSO *et al.*, 2001; JO; KIM, 2014) e 30-100% dos pacientes submetidos a radioterapia em cabeça e pescoço (TROTTI *et al.*, 2003; NAIDU *et al.*, 2004). Cerca de 56% dos pacientes que apresentam a mucosite oral, desenvolvem os graus mais severos (TROTTI *et al.*, 2003).

A patogênese da mucosite engloba uma sequência de eventos biológicos associados à influência do microbioma e ambiente oral. A maioria das vias que levam à mucosite são a mesma em doentes que receberam radioterapia, quimioterapia (como indução), ou radioterapia e quimioterapia concomitantes (SONIS *et al.*, 2009). A progressão da mucosite pode ser resumida em cinco fases: (I) iniciação, (II) sinalização dos sinais, (III) amplificação dos sinais, (IV) ulceração e (V) cicatrização (VILLA; SONIS, 2015). A fase de iniciação é caracterizada pela incidência da radiação e quimioterapia gerando danos ao DNA, geração de espécie reativas de oxigênio (EROs) e e subseqüentemente, morte das células epiteliais da acamada basal. Em seguida, há ativação da resposta imune inata e uma série de eventos biológicos, incluindo ativação de pelo menos, 14 vias canônicas. A via do fator nuclear Kappa-B (NF-κB) foi a mais estudada até o momento (LOGAN *et al.*, 2007). Esta via pode ser ativada diretamente pela quimioterapia e radioterapia, indiretamente pela ligação dos receptores CRAMPs ou por espécies reativas de oxigênio (LOGAN *et al.*, 2008). Esta via vai regular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), COX-2, óxido nítrico sintase induzida (NOSi), superóxido dismutase (SOD) e

moleculas de adesão celular (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008). Ademais, a ativação do NF-κB pode culminar na apoptose das células. O quarto estágio é caracterizado pelo desenvolvimento de úlceras dolorosas que são mais susceptíveis à infecção, podendo haver colonização de bactérias gram-negativas e gram-positivas. O estágio final é caracterizado pela cicatrização espontânea com completa restituição do epitélio (VILLA; SONIS, 2015) (Figura 1).

Figura 1 – Biopatologia da mucosite oral.



Fonte: Adaptado de Sonis (2009).

O primeiro sinal clínico da mucosite oral quimio-induzida surge após 4 à 5 dias, sendo caracterizado por lesões eritematosas atróficas que se distribuem, mais frequentemente, nas mucosas móveis e nas superfícies laterais e ventrais da língua. Nesta fase inicial, os pacientes se queixam de queimação e intolerância aos alimentos apimentados. Após 7 à 10 dias da quimioterapia, pode haver a formação de lesões ulceradas que penetram na submucosa, resultando em desconforto ou, em casos mais graves, dores intensas (ELTING *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 2004). O curso da mucosite oral induzida pela quimioterapia dura, aproximadamente, 1 semana e geralmente, cicatriza espontaneamente em 21 dias após a indução (ELTING *et al.*, 2003; SCULLY *et al.*, 2006; VILLA; SONIS, 2015).

Os pacientes que fazem uso de terapias mieloablativas e que evoluem com perda da integridade da membrana mucosa, apresentam clinicamente, um fator

de risco a bacteremia, fungemia e sepse. Ademais, nestes casos, o uso de opióides e da nutrição enteral/parenteral podem ser necessários, resultando na diminuição da qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento, aumento do custo hospitalar e também redução da tolerância a terapia antineoplásica (ELTING *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 2004).

Novos estudos têm-se concentrado na compreensão das interações entre hospedeiro e a microbiota oral pois as vias atuais têm mostrado que os principais fatores de virulência de microorganismos têm o potencial de contribuir para o desenvolvimento da mucosite oral e pode prolongar a existência de ulcerações já estabelecidas, afetando a cicatrização do tecido (VASCONCELOS *et al.*, 2016).

Apesar de existirem diversos estudos que avaliam possíveis formas de tratamento para esta complicação, poucos mostram resultados realmente eficazes (VASCONCELOS *et al.*, 2016). Atualmente, existem diversos protocolos que visam a prevenção e tratamento da mucosite oral que são utilizados em pacientes submetidos à terapias antineoplásicas. Entre elas podemos citar a crioterapia (ASKARIFAR *et al.*, 2016), antagonistas muscarínicos como a pilocarpina (LALLA *et al.*, 2014), laser de baixa potência (AMADORI *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016) e fator de crescimento de queratinócitos (palifermina) (NGUYEN *et al.*, 2015). Outros estudos em modelos animais também apontam resolutividade da mucosite oral através de doadores de óxido nítrico (SKEFF *et al.*, 2014), outros medicamentos como azilsartan que é um antagonista do receptor de angiotensina II (de ARAÚJO *et al.*, 2015), associação de produtos naturais como a epigenina (PATRICIA *et al.*, 2016) e ziziphus jujube (KOOHI-HOSSEINABADI *et al.*, 2015), entre outros.

Em humanos, existem diversos regimes quimioterápicos que estão comumente associados ao desenvolvimento da mucosite oral. Entre eles podemos citar a associação da doxorubicina e ciclofosfamida, utilizados para o tratamento do câncer de ovário (FLOQUET *et al.*, 2014), 5-Fluorouracil e cisplatina para o tratamento do câncer de laringe (NAKATA *et al.*, 2016), capecitabina e cisplatina para o tratamento de tumores gástricos (YOO *et al.*, 2016), carmustina, etoposide, citarabina e melfalan para o tratamento de linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin (HOHLOCH *et al.*, 2016), entre outras. Em animais, os estudos mais recentes mostram que o modelo de indução da mucosite oral em animais, o 5-fluorouracil é mais utilizado em comparação aos outros quimioterápicos como o metrotexato (PATRICIA *et al.*, 2016; KOOHI-HOSSEINABADI *et al.*, 2015; SKEFF *et al.*, 2014;

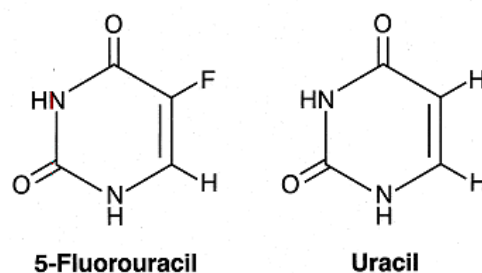
PATEL et al., 2014).

## 2.2 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-FU é uma droga antimetabólita da classe das fluoropirimidinas, comumente utilizada para o tratamento de neoplasias malignas sólidas, principalmente para o câncer de mama (DEL MASTRO et al., 2016), trato gastrointestinal (AL-FAKEEH et al., 2016) e cabeça e pescoço (WANG et al., 2016), podendo ser empregada como terapia adjuvante, neoadjuvante ou de forma paliativa.

Assim como outros antimetabólitos, o 5-FU atua sobre as células que estão na fase S do ciclo celular, o que contribui para reduzir seus efeitos colaterais, uma vez que a população de células que não se encontram nessa fase são poupadas de suas ações (GREM, 2001). Esta droga é análoga a uracila (base nitrogenada do ácido ribonucleico) e possui um átomo de flúor incorporado na posição C-5 do anel aromático. Este sítio de substituição selecionado, inibe a subsequente conversão do nucleotídeo uracila em nucleotídeo timina (Figura 2) (PINEDO; PETERS, 1988). Pode ser administrada por via tópica, endovenosa ou por via oral, sendo que esta última recebe o nome de capecitabina (xeloda).

Figura 2 - Estrutura química do 5-FU e do Uracila.



Fonte: Adaptado de Grem (2001).

Após administração endovenosa, o 5-FU é distribuído através dos líquidos corporais, desaparece da corrente sanguínea em 3 horas e é absorvida,

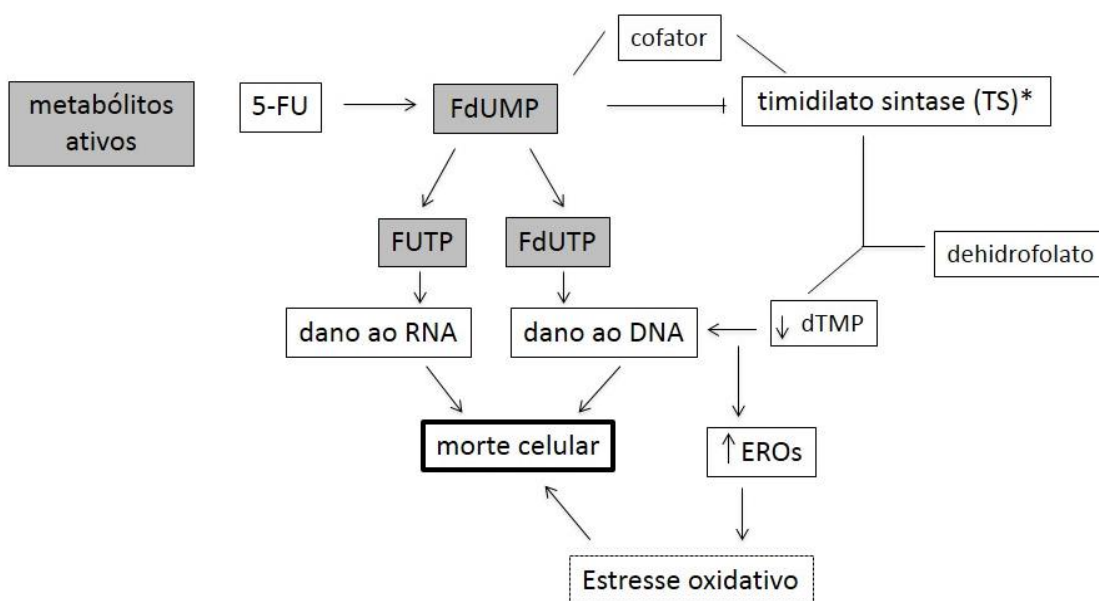
preferencialmente pelos tecidos que possuem alta taxa de divisão celular e pelas células tumorais. Possui tempo de meia vida entre 15 a 20 minutos. Subsequente a uma única dose do 5-FU, aproximadamente 15% é excretado de forma inalterada na urina dentro das 6 primeiras horas. O restante é metabolizado no fígado em metabólitos inativos pelos mecanismos normais do corpo humano para uracila (*BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2015*).

O mecanismo de ação do 5-FU compreende na conversão em três principais metabólitos ativos: 5-fluoro-2-deoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). (*BANDRÉS et al. 2007*). O principal mecanismo de ação é mediado pela inibição da enzima timidilato sintase (TS) que forma um complexo estável entre FdUMP e o cofactor 5, 10-metileno- tetraidrofolato ( $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ). A formação deste complexo, previne a metilação de deoxiuridina-5-monofosfato (dUMP) em deoxitimidina-5-monofosfato (dTMP) catalisada pela TS, impedindo a síntese de DNA. Esse processo pode provocar estresse oxidativo, resultando em desequilíbrio dos nucleotídeos intracelulares, levando ao dano no processo da síntese de DNA, interrupção do ciclo celular e apoptose (Figura 3) (*LONGLEY et al., 2003; BERGER; BERGER, 2006; BANDRÉS et al., 2007; BARBOUR; BERGER, 2008; BÜCHEL et al., 2013, OZER et al., 2015*).

Outro mecanismo tóxico a partir da administração do 5-FU, resulta da incorporação errônea de fluoronucleotídeos, o trifosfato de 5-fluorouridina (FUTP) e trifosfato de fluorouridina (FdUTP) ao DNA e RNA, respectivamente, interferindo na função celular (*LEICHMAN et al., 1997*) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação do 5-FU. O principal mecanismo de ação do 5-FU ocorre pela inibição da enzima TS. Contudo, o 5-FU pode exercer seu efeito citotóxico através da incorporação errônea de FUTP e FdUTP no RNA e DNA, respectivamente. 5-FU: 5-Fluorouracil; dTMP: Deoxitimidina monofosfato; FdUMP: Fluorodeoxiuridina monofosfato; FUTP: Fluorouridina trifosfato; TS: Timidilato sintase (*LEICHMAN et al., 1997; LONGLEY et al., 2003; BERGER; BERGER, 2006; BANDRÉS et al., 2007; BARBOUR, BERGER, 2008; BÜCHEL et al., 2013, OZER et al., 2015*).





Fonte: Elaborado pelo autor.

A resposta ao tratamento é bastante variável entre os pacientes, cerca de 10 a 40% apresentam toxicidade severa ao 5-FU e sua forma ativa oral, sendo parte destas complicações associadas a fatores genéticos (AMSTUTZ *et al.*, 2011).

Os efeitos adversos do 5-FU variam consideravelmente de acordo com o protocolo de tratamento, dose utilizada e via de administração. São mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação (KOENIG; PATEL, 1970; PIRZADA; ALI; DAFER, 2000), podendo resultar em mielossupressão e os primeiros efeitos ocorrem entre 7-10 dias, o nadir de 9-14 dias e a recuperação entre 21-28 dias. Ademais, leucopenia, neutropenia febril, anemia, agranulocitose, trombocitopenia e pancitopenia também são observados quando a droga é administrada (BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2015). No trato gastrointestinal, pode haver manifestação de mucosite oral e intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, estomatite, diarreia, náuseas e vômitos (KOENIG; PATEL, 1970; PIRZADA; ALI; DAFER, 2000). Outros efeitos menos frequentes são alopecia, dermatite, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (PIRZADA; ALI; DAFER, 2000, AMSTUTZ *et al.*, 2011).

Além da mucosite oral, outro efeito colateral bucal importante associado ao uso do 5-FU, é a xerostomia associada ou não à hipofunção salivar (MAZZEO *et al.*, 2013; MAZZEO *et al.*, 2012; MAZZEO *et al.*, 2009), que será descrita adiante.

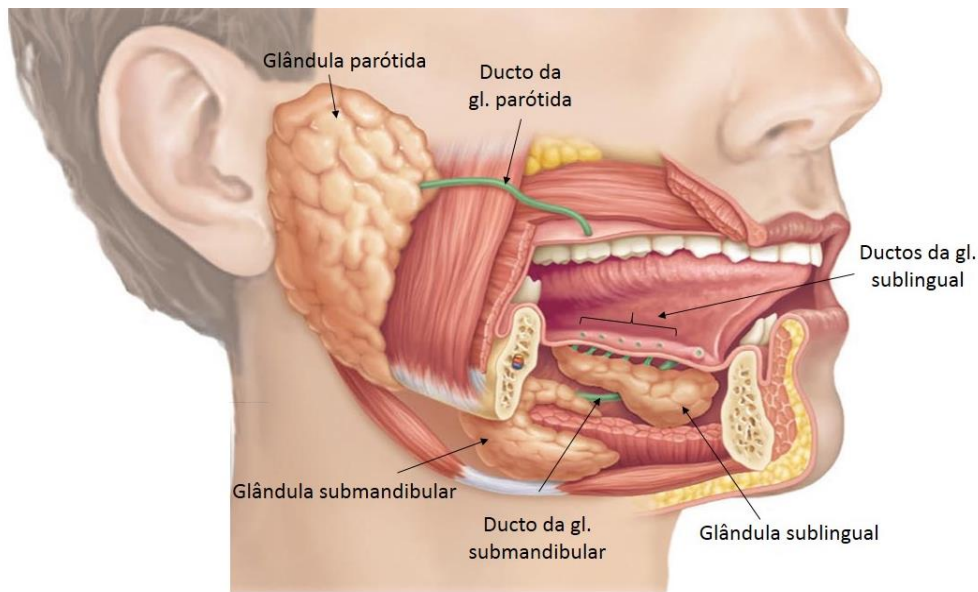
## **2.3 Glândulas salivares**

### **2.3.1 Morfologia das glândulas salivares**

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas fundamentais ao equilíbrio da saúde bucal. São responsáveis principalmente pela produção e excreção de saliva, além do importante papel na lubrificação bucal, digestão de alimentos, imunidade e manutenção da homeostase (HOLSINGER; BUI, 2007). Anatomicamente são constituídas por três pares de glândulas maiores (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas menores distribuídas na mucosa oral (glândulas labiais, glândulas da mucosa jugal, glândulas palatinas, glândulas linguais), orofaringe, laringe, traqueia e nasofaringe (MADEIRA, 2010; NANCI, 2013).

A glândula parótida é a maior em tamanho e se localiza entre o músculo esternocleidomastoídeo e a borda posterior do ramo da mandíbula. Acima se limita com a articulação têmporo mandibular (ATM) e o meato acústico cartilaginoso, e abaixo se estende até o nível do ângulo da mandíbula. O ducto excretor correspondente é o ducto parotídeo, que se origina de diversos ramos e desemboca na cavidade oral, próximo ao dente segundo molar superior, pela papila parotídea. Já, a glândula submandibular apresenta metade do tamanho da parótida, está localizada no triângulo submandibular, sua porção superficial está em contato com a fóvea submandibular e a parte visível com o tendão intermédio do músculo digástrico. Seu ducto excretor, o ducto submandibular, abre-se na carúncula sublingual, ao lado do freio da língua. A menor das três glândulas salivares maiores é a glândula sublingual, situa-se no assoalho da boca, descansa sobre o músculo milo-hioídeo e faz saliência na mucosa (prega sublingual). Apresenta uma dúzia de ductos sublinguais menores que se abrem na prega sublingual. É descrito um ducto maior, o ducto sublingual maior, que se junta ao ducto submandibular ou se abre próximo a este, na carúncula sublingual (MADEIRA, 2010) (Figura 4).

Figura 4 – Distribuição anatômica das glândulas salivares maiores: glândula sublingual, glândula submandibular e glândula parótida.



Fonte: Adaptado de <http://drfarias.com/index.php/garganta/glandulas-salivales>. Acesso em 31 de julho de 2016.

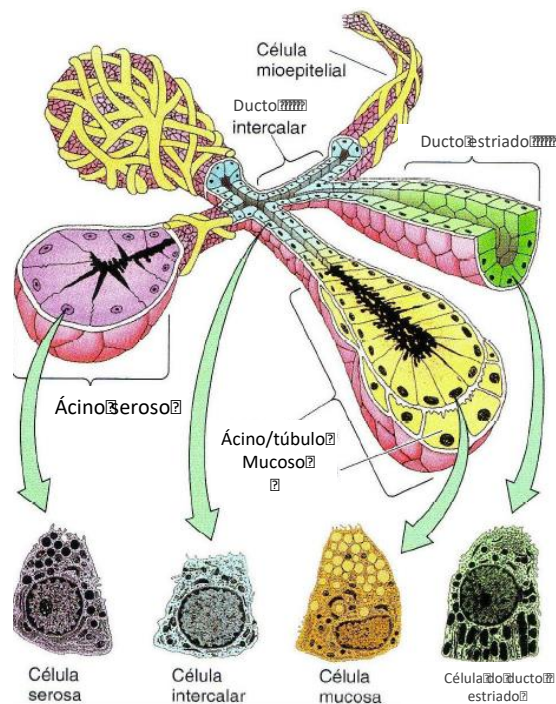
Em animais roedores (ratos e camundongos), as glândulas salivares se localizam na região anterior do pescoço e são rodeadas por tecido adiposo. A glândula parótida se estende posteriormente ao orifício auricular e sua região anterior é limitada pela glândula submandibular. As glândulas sublingual e submandibular, estão dispostas em conjunto e são mantidas envoltas por uma fásia comum, dispostas entre linfonodos submandibulares e a traqueia. O tamanho da glândula sublingual é reduzido, em relação à glândula submandibular e pode ser confundida com linfonodos da região (JONJIC, 2001).

Cada glândula salivar é formada por sistema de ácinos (serosos e/ou mucosos) e ductos, os quais apresentam células específicas e diferenciadas (PEDERSEN *et al.*, 2002). O ácino, porção inicial da glândula, é responsável pela produção da secreção salivar primária que pode conter maior quantidade de enzimas (ácinos serosos) e/ou maior quantidade de mucina (ácinos mucosos), a depender do tipo da glândula (Figura 4). Desta forma, as células acinares determinam o tipo de secreção produzida por cada glândula (NANCI, 2013).

O sistema de ductos das glândulas salivares é semelhante entre humanos e roedores, sendo que os ductos excretores apresentam o mesmo nome. Os ductos são classificados em intercalar, estriado e excretor e atuam regulando a secreção salivar através de reabsorção e eliminação de íons, e transportando a saliva para a cavidade oral (JENSEN *et al.*, 2003) (Figura 5). Segundo Edgar *et al.*

(1992), as células mioepiteliais presentes nos ductos e ácinos são as responsáveis pelo transporte da saliva para a cavidade bucal pois apresentam propriedade contrátil.

Figura 5 - Morfologia microscópica das glândulas salivares evidenciando ácinos e ductos. As glândulas salivares são compostas por ácinos serosos, ácinos/túbulos mucosos e/ou ácinos mistos, que são interligados, nesta ordem pelos ductos estriados, intercalares e excretores, que permite o escoamento da saliva para a cavidade bucal.



Fonte: Adaptado de <http://estudandomed.blogspot.com.br/2011/08/aula-de-histologia-glandulas-salivares.html>. Acesso em 31 de julho de 2016.

A glândula parótida em humanos e em animais roedores (ratos e camundongos) é composta somente por ácinos serosos (AMANO *et al.*, 2012). A única diferença entre as espécies é que, em humanos, esta glândula contém adipócitos intralobulares e nos roedores, não são tão evidentes (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; AMANO *et al.*, 2012). A glândula submandibular em humanos é tubuloacinososa mista, composta por ácinos serosos e mucosos, sendo que os serosos representam cerca de 75% a 80% (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Já, os roedores apresentam somente os ácinos serosos e uma particularidade importante desta espécie é a presença de túbulos convolutos granulares (TCG), situados entre os ductos intercalares e ductos estriados. Os TCG podem ser frequentemente

confundidos com ácinos ou túbulos mucosos. A glândula sublingual é tubuloacinososa mista em ambas as espécies, contendo células acinares serosas e mucosas, sendo estas últimas em maior proporção (AMANO *et al.*, 2012).

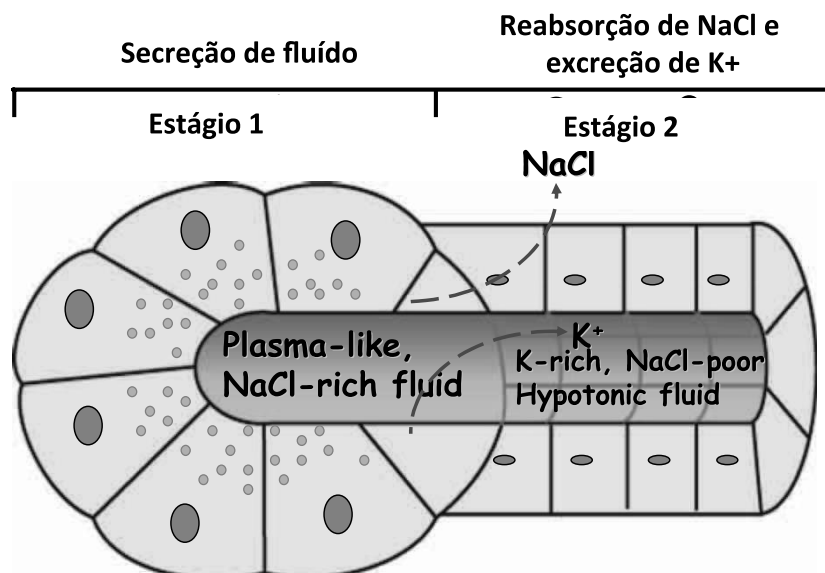
### **2.3.2 Fisiologia das glândulas salivares**

Em geral, cerca de 90% da secreção salivar é proveniente das glândulas salivares maiores, enquanto que o restante corresponde às glândulas salivares menores. Durante o repouso, as glândulas submandibular e sublingual são responsáveis pela produção de 65-75% do volume total de saliva, sendo as parótidas responsáveis por 15-20% e as glândulas salivares menores por 5-8%. Quando estimuladas, ocorre uma alteração na contribuição percentual de cada uma das glândulas, sendo que a parótida pode passar a contribuir com 50% ou mais da salivação (DAWES; ONG, 1973; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; JENSEN *et al.*, 2010a; JENSEN *et al.*, 2010b).

Em roedores, cerca de 90% da saliva total estimulada pela pilocarpina (10mg/kg de peso), é proveniente das três glândulas salivares maiores e a quantidade de saliva excretada pela glândula parótida é duas vezes maior que as glândulas submandibular e sublingual (KONDO *et al.*, 2015).

A formação da saliva envolve duas etapas: (1) as células acinares produzem saliva isotônica plasma-like, rica em NaCl, chamada de saliva primária; (2) a saliva rica em NaCl é modificada durante sua passagem pelos ductos estriados e excretores, onde NaCl é reabsorvido, enquanto que K<sup>+</sup> é secretado. Neste estágio, a saliva excretada para a cavidade oral é hipotônica em relação ao plasma devido à baixa permeabilidade das células ductais (CATALÁN *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6 – Modelo esquemático do processo de formação da saliva.



Fonte: Adaptado de Catalan *et al.* (2009).

Em condições normais, o fluxo salivar é um reflexo controlado e a secreção aumenta em resposta a um estímulo (visão, olfato, paladar, mastigação) (PEDERSEN *et al.*, 2002) e são reguladas tanto pelo sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) quanto pelo parassimpático (SNAP). As fibras simpáticas pós-ganglionares originam-se do gânglio cervical superior e seguem a artéria carótida externa e seus ramos. As fibras parassimpáticas originam-se nos núcleos salivatórios superior e inferior. Do primeiro, elas saem pelo nervo intermédio do facial e alcançam todas as glândulas salivares maiores, menos a parótida. Do núcleo salivatório inferior, elas saem pelo nervo glossofaríngeo e daí vão à parótida (MADEIRA, 2010).

A secreção salivar pode ser desencadeada pela contração das células mioepiteliais através dos receptores muscarínicos (SNAP) e receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (SNAS), na qual gera aumento da pressão nos ductos, impulsionando a saliva. Além deste mecanismo, a secreção salivar pode ser estimulada por uma vasodilatação local, desencadeada pela ligação do neurotransmissor parassimpático (acetilcolina) aos receptores muscarínicos M1 e M3, e do neurotransmissor parassimpático (noradrenalina) aos receptores  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  adrenérgicos. O SNAP das glândulas salivares pode utilizar outros mecanismos de transmissão como peptídeo

intestinal vasoativo (VIP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, substância P, neuroquinina A, neuropéptido Y e óxido nítrico (ON) (EKSTRÖM *et al.* 2012). A estimulação do SNAS contribuí com uma saliva rica em proteínas e pobre em fluídos, e a estimulação do SNAP contribuí igualmente com a secreção de proteínas e fluídos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

### 2.3.3 Saliva

A saliva é uma secreção exócrina, aquosa e transparente que recobre os dentes e a mucosa, mantendo a cavidade oral sempre úmida. É composta de 99% de água e 1% de uma variedade de componentes, principalmente eletrólitos, imunoglobulinas, proteínas, enzimas, entre outros (Tabela 1) (NANCI, 2013).

Tabela 1 - Principais componentes da saliva.

<b>Eletrólitos</b>	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , HCO <sup>3-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , HPO <sup>2-4</sup> , tiocianeto (SCN <sup>-</sup> ) e F <sup>-</sup>
<b>Proteínas e peptídeos secretados</b>	Amilase, proteínas ricas em prolina, mucinas, histatina, cistatina, peroxidase, lisozima, lactoferrina, defensinas, catelicidina-LL37
<b>Imunoglobulinas</b>	IgA de secreção, IgG e IgM
<b>Componentes orgânicos</b>	Moléculas de glucose, aminoácidos, ureia, ácido úrico e lipídeos
<b>Outros componentes</b>	Fator de crescimento epidérmico, insulina, proteínas de ligação ao monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e albumina sérica

Fonte: Adaptado de Nanci (2013).

A glândula parótida contribuí com a produção de uma saliva menos aquosa, rica em enzimas, como amilase, proteínas ricas em prolina e glicoproteínas, devido sua composição exclusiva por ácidos serosos. Já, as glândulas submandibulares e sublinguais, compostas por ácidos mucosos e serosos, produzem uma saliva mais mucosa rica em mucinas (NANCI, 2013).

A saliva contribui enormemente com a manutenção da saúde bucal pois apresenta funções de (1) proteção: limpeza, lubrificação, isolamento térmico/químico, formação da película salivar; (2) tamponamento: manutenção do pH, neutralização de ácidos; (3) integridade dos dentes: maturação e reparo do esmalte; (4) atividade antimicrobiana: barreira física (pelas mucinas), defesa imunológica e não imunológica; (5) reparo tecidual: cicatrização de feridas, regeneração epitelial; (6) digestão: formação do bolo alimentar, digestão de amido e triglicérides e (7) paladar: solubilidade de moléculas e manutenção de corpúsculos gustativos (PENDERSEN *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2010a; NANCI, 2013).

A principal imunoglobulina da saliva, a IgA secretória, possui importante papel na imunidade local, atuando na aglutinação dos microorganismos e neutralizando as toxinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; NANCI, 2013). A IgA secretória está presente nas secreções externas como saliva, lágrima e colostro, revestindo todas as mucosas dos tratos respiratórios, gastroentérico e urinário. Sua molécula é formada por 2 unidades de IgA, idênticas à IgA sérica, interligadas por um peptídeo designado como peça J e outro componente proteico, referido como peça secretora (CALICH; VAZ, 2001).

Nas diferentes espécies animais, a IgA secretória apresenta as mesmas funções de proteção, contudo variações em número de genes, alótipos e formas moleculares têm sido observados. Os seres humanos apresentam duas subclasses de genes, IgA1 e IgA2, enquanto que os roedores apresentam apenas uma variação. A distribuição no soro das diferentes formas moleculares de IgA também varia de espécie para espécie, sendo que, em seres humanos, a IgA sérica é principalmente monomérica, contudo, em outros animais, é principalmente dimérica (WOOF; KEER, 2004).

Outro importante componente orgânico natural presente na saliva é a lisozima, também conhecida como muramidase ou N-acetilmuramida glicanhidrolase, secretada pelos ductos intercalados das glândulas salivares. Esta enzima atua principalmente, na parede celular bacteriana, catalisando a quebra do peptideoglicano da parede celular, atuando na ligação 1,4-beta entre os ácidos N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetil-D-glucosamina (NAG), levando a lise celular (DOUGLAS, 1999; MASSCHALCK; MICHIELS, 2003; XUE, 2004; PARISIEN *et al.*, 2007; RUBIO, 2014). Ademais, a lisozima também apresenta papel da defesa contra vírus (LEE-HUANG *et al.*, 2005), parasitas (LEÓN-SICAIROS *et al.*, 2006) e fungos



(KNORR; SHETTY; KINSELLA, 2004), mesmo na ausência da parede celular típica de peptideoglicano.

#### **2.3.4 Xerostomia e hipofunção salivar**

A xerostomia é um termo utilizado para descrever o que os pacientes referem como “boca seca” e nem sempre está associada a redução do fluxo salivar (hipofunção salivar) ou mudanças na composição da saliva (NAVAZESH; CHRISTENSEN; BRIGHTMAN, 1992; VON BULTZINGSLOWEN *et al.*, 2007; MITTAL *et al.*, 2011; MOHAMMED, 2014; [QUOCK](#), 2016). Em uma pessoa normal, a xerostomia pode ser observada quando a taxa de salivação não estimulada está reduzida em 45-50% (GHEZZI; LANGE; SHIP, 2000; JENSEN *et al.*, 2010b).

A prevalência da xerostomia na população pode variar de 5,5% a 46%. Estudos têm demonstrado grandes diferenças entre os sexos e a xerostomia é mais comumente observada em pacientes com idades mais avançadas. Uma possível explicação decorre do frequente uso crônico de drogas xerogênicas o que pode levar a redução do fluxo salivar não estimulado (THOMSON, 2005; HOPCRAFT; TAN, 2010; VILLA; ABATI, 2011; LIU *et al.*, 2012; VILLA; CONNELL; ABATI, 2014).

Os pacientes que apresentam redução da salivação, além da xerostomia, podem ser observadas queixas como ardor ou dor oral, sensação de perda ou alteração do paladar, dificuldade de fala e baixa tolerância a alimentos secos, picantes e ácidos (VALDEZ *et al.*, 1993; LOESCHE *et al.*, 1995). Clinicamente, a cavidade oral pode apresentar áreas eritematosas, atrofia das papilas filiformes da língua e língua fissurada (GUGGENHEIMER; MOORE, 2003). Outros achados importantes que podem observados são presença de infecções fúngicas, cáries e desconforto ao uso de próteses (SU *et al.*, 2011; BIANCHI *et al.*, 2016; PORTER *et al.*, 2004; ATKINSON; GRISIUS; MASSEY, 2005; JENSEN *et al.*, 2010b; MOHAMMED, 2014).

O diagnóstico da hipofunção salivar e/ou xerostomia depende de uma história clínica detalhada que pode ser realizado através questionários específicos propostos para identificação destas alterações (VALDEZ *et al.*, 1993; FOX *et al.*, 1985; VILLA, 2014). A mensuração da produção salivar por minuto e exames de imagem como sialografias e cintilografias, podem ser realizados como forma de diagnóstico complementares (NAVAZESH; CHRISTENSEN; BRIGHTMAN, 1992;

FOX, 1996).

Diversos fatores podem contribuir ou favorecer o desenvolvimento da disfunção das glândulas salivares e/ou xerostomia como doenças autoimunes (Síndrome de Sjögren) (NGO *et al.*, 2016), idade (RAMSAY *et al.*, 2015), radioterapia em região de cabeça e pescoço (BUGLIONE *et al.*, 2016) e uso de algumas medicações, como antidepressivos (JOHNSSON *et al.*, 2016), diuréticos (PRASANTHI; KANNAN; PATIL, 2014), anti-hipertensivos (GÓMEZ-MORENO *et al.*, 2013), hipoglicemiantes (MOORE *et al.*, 2001) e quimioterápicos (ZECHA *et al.*, 2016; BUGLIONE *et al.*, 2016).

Alguns quimioterápicos apresentam capacidade de causar danos nas glândulas salivares com prevalência de 49,9%, não somente através da indução da hipossalivação mas também pelo efeito inibitório da capacidade protetora que a saliva possui na cavidade bucal. Contudo, o mecanismo de ação pelo qual a droga provoca estas alterações não está elucidado e isto se deve a enorme diversidade de protocolos antitumorais utilizados que dificultam a interpretação dos resultados (JENSEN *et al.*, 2010b).

Os principais quimioterápicos comumente associados as alterações nas glândulas salivares são ciclofosfamida, epirrubicina, metrotexato, 5-FU e taxol, dentre os quais, são empregados para o tratamento de uma variedade de neoplasias malignas que acometem regiões como mama, cabeça e pescoço e medula óssea (HARRISON *et al.*, 1998; JENSEN *et al.*, 2008, JENSEN *et al.*, 2010b).

A hipossalivação e/ou xerostomia quimio-induzida pode se iniciar poucos dias após o início do tratamento, e estudos mostram que a alteração do fluxo salivar pode durar desde 1 semana a anos. Esta variação pode ser justificada devido determinados pacientes apresentarem secreção salivar alterada antes do início da terapia anti-neoplásica (WAHLIN, 1991; BERGMANN, 1991; MANSSON-RAHEMTULLA *et al.*, 1992; WICKHAM *et al.*, 1999; AVSAR *et al.*, 2007; EL-HOUSSEINY *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2008; KAROLEWSKA *et al.*, 2008; MAZZEO *et al.*, 2009; JENSEN *et al.*, 2010a).

Além da alteração no fluxo salivar, estudos mostram que a quimioterapia pode modificar a composição salivar evidenciada pela modificação das quantidades dos componentes presentes na saliva, como moléculas inorgânicas (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) (JENSEN *et al.*, 2008; MAZZEO *et al.*, 2009), proteínas (JANKOVIĆ *et al.*, 1995;

JENSEN *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2014) e enzimas (CAMPOS *et al.*, 2014). Ainda, a saliva pode conter concentrações variadas da droga na sua composição, expondo o microambiente oral à toxicidade (HAYNASHI; WATANABE, 1990; EPSTEIN *et al.*, 2002; MAZZEO *et al.*, 2009)

Na literatura, discute-se a correlação entre altas doses de alguns anti-neoplásicos na saliva com a mucosite oral, onde se questiona o quanto a droga pode estimular ou potencializar a inflamação na mucosa. Quimioterápicos como 5-FU, etoposide, melfalan, carboplatina e taxol podem ser detectados na saliva (SLAVIK; WU; RILEY, 1993; SVOJANOVSKY *et al.*, 1999) devido ao poder de ligação da droga às proteínas, peso molecular e lipofilicidade das drogas (BARRETT, 1987).

Bressolle *et al.* (1992) relataram que as altas doses de doxorrubicina detectadas na saliva coincide com o aparecimento de lesões ulceradas na mucosa, promovendo efeito deletério aos tecidos. Contudo, outros estudos com 5-FU e carboplatina sugerem essa relação, mas não há evidências por não avaliarem o grau de mucosite oral dos pacientes no estudo (MILANO *et al.*, 1989; VAN WARMERDAM *et al.*, 1995).

Ademais, estudos sugerem que a qualidade da saliva pode ter relação com o aparecimento da mucosite oral devido à presença insuficiente de fatores antimicrobianos (lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase e defensinas) decorrente do uso de drogas e redução dos protetores de mucosa na saliva (glicoproteínas, IgA, fator de crescimento epidérmico) (JANKOVIC *et al.*, 1995; EPSTEIN *et al.*, 2002). Outros estudos avaliaram antialojos administrados em associação com etoposide e verificaram redução da incidência da mucosite oral, concluindo que diminuição da saliva resultou em menor incidência da mucosite oral (BROWN *et al.*, 1990; AHMED *et al.*, 1993; OBLON *et al.*, 1997).

A abordagem para o tratamento dos pacientes com hipossalivação e/ou xerostomia é apenas paliativa, apresenta apenas o intuito de buscar alívio dos sintomas e prevenir demais complicações orais (GUGGENHEIMER; MOORE, 2003). Há disponível uma variedade de formulações que podem funcionar como substitutos da saliva, como as salivas artificiais e outros, com objetivo de promover secreção salivar como bochechos, aerossóis, gomas de mascar e dentifrícios (RHODUS *et al.*, 2000). O uso de agentes colinérgicos sistêmicos, também podem ser empregados, contudo podem provocar uma série de efeitos colaterais

desagradáveis que podem limitar a eficácia destes medicamentos (JOHNSON *et al.*, 1993). Atualmente, os medicamentos sistêmicos aprovados pela FDA (*U. S. Food and Drug Administration, 2016*) para o tratamento da “boca seca” são a pilocarpina e cevimeline, e para a eficácia do tratamento, é necessário que haja tecido glandular funcional (VILLA; CONNELL; ABATI, 2014).

Os pacientes que são portadores de neoplasias malignas quase sempre estão sujeitos à manifestações bucais decorrentes direta ou indiretamente das drogas antineoplásicas, que dificultam diversas funções relacionadas à fala, mastigação, percepção gustativa, formação do bolo alimentar e deglutição. Além disso, a quebra da homeostase oral apresenta influência significativa, durante e após o tratamento da doença, afetando a qualidade de vida global dos pacientes. A literatura mostra que a quimioterapia apresenta potencial significativo em causar distúrbios na função glandular, contudo existe uma enorme variação individual, diferentes abordagens terapêuticas e protocolos, além disso grande parte dos estudos apresentam número reduzido de pacientes. Por este motivo, mais estudos são necessários com intuito de elucidar a fisiopatologia dos quimioterápicos nas glândulas salivares o que pode contribuir com um manejo mais apropriado da xerostomia e da mucosite oral.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar as alterações morfofuncionais induzidas pelo 5-Fluorouracil (5-FU) nas glândulas salivares maiores (glândulas parótida, submandibular e sublingual) e composição da saliva no modelo de mucosite oral experimental.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as alterações na taxa de salivação induzida pela pilocarpina no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU;

- Analisar as alterações na composição salivar, induzida pela pilocarpina através das dosagens de IgA e lisozima, além das atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU;

- Verificar as alterações histopatológicas nos tecidos das glândulas salivares maiores, através das colorações em hematoxilina e eosina (HE) e tricômico de Mallory para análise da vascularização no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU;

- Avaliar as potenciais alterações inflamatórias nos tecidos de glândulas salivares através da quantificação de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) pela coloração em HE, quantificação de mastócitos pela coloração em azul de toluidina, quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU;

- Avaliar produção de estresse oxidativo nos tecidos de glândulas salivares maiores através das dosagens de nitrito/nitrato, malonaldeído (MDA), grupos sulfídrícos não proteicos (NPSH), SOD e CAT no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU;

- Determinar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) no tecido das glândulas sublingual e submandibulares;

- Quantificar morte e proliferação celular através dos marcadores TUNEL e ki-67; respectivamente, nos tecidos das glândulas parótida e submandibulares

submetidos ao modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Locais do Estudo**

O estudo foi realizado no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI) e no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **4.2 Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo experimental, com avaliações quantitativa e qualitativa dos dados amostrais.

### **4.3 Principais fármacos utilizados no estudo**

#### ***4.3.1 5-Fluorouracil (5-FU)***

Ampola de 10 mililitros (25 mg/ml), fabricado pela Roche, Rio de Janeiro, Brasil. A manipulação foi feita em capela com exaustor e com a utilização dos equipamentos de proteção individual (óculos, luvas, gorro, máscara, avental).

#### ***4.3.2 Cloridrato de Pilocarpina***

Frasco de 5 gramas, fabricado pela Sigma, Saint Louis, EUA.

#### ***4.3.3 Cloridrato de xilazina***

Frasco de 100 mililitros a 2%, fabricado pela König laboratories S.A, São Paulo, Brasil.

#### **4.3.4 Cloridrato de cetamina**

Frasco de 100 mililitros a 10%, fabricado pela Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.

#### **4.4 Animais**

Os procedimentos aplicados para manejo e cuidado com os animais foram executados de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal* (Washington DC, EUA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, processo nº 43/2012 (Anexo A). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura adequadas e receberam água e comida *ad libitum*, sendo a alimentação à base de sementes e cereais, como aveia, milho, semente de girassol e abóbora.

Para este estudo, foram utilizados hamsters Golden Syrian (*Mesocricetus auratus*) machos, com massa corpórea entre 140 e 160 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, onde foram alojados em caixas de plástico com, no máximo, seis animais em cada uma delas.

Os hamsters foram escolhidos para este protocolo por apresentarem mucosas jugais com grande extensão, de fácil observação e, também, devido a boa tolerância às dosagens de 5-FU, apresentando baixos índices de mortalidade (SONIS *et al.*, 1990).

#### **4.5 Protocolos experimentais**

##### **4.5.1 Modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU**

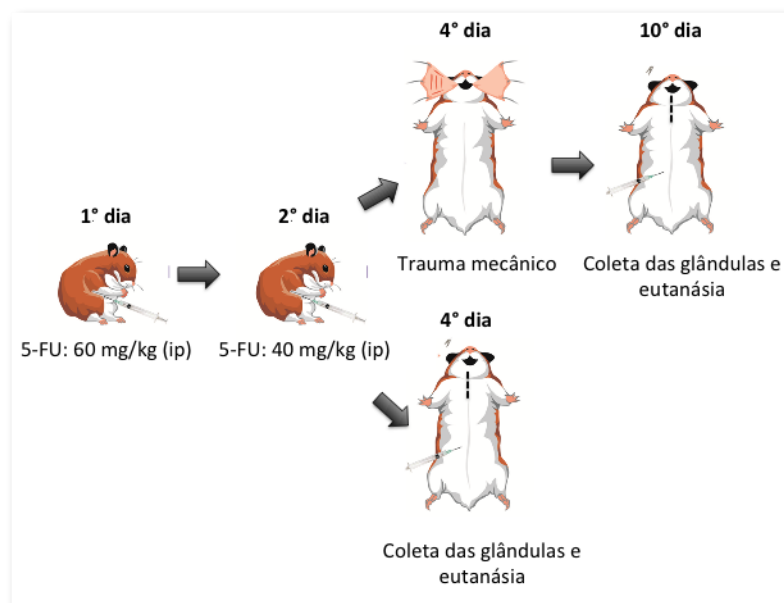
O modelo de mucosite oral experimental utilizado neste estudo foi primeiramente preconizado por Sonis *et al.* (1990) e posteriormente modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC (LIMA *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2007).

Neste estudo, os animais do grupo experimental receberam doses de 5-



FU, administradas por via intraperitoneal (ip), sendo que no 1º dia do experimento, os animais receberam a dose de 60 mg/kg e no 2º dia, 40 mg/kg. Para o grupo controle (Salina), os animais receberam solução salina a 0,9% (1ml/100 gramas de peso corpóreo) via ip nos 1º e 2º dias do experimento. No 4º dia, foram feitas escoriações na mucosa jugal direita dos animais, com auxílio de agulha, conferindo um trauma mecânico (TM). Para a realização do TM, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina a 2% (10mg/kg de peso corpóreo do animal) e cloridrato de cetamina a 10% (200mg/kg de peso corpóreo do animal). Após o efeito anestésico, o tecido da mucosa jugal foi exteriorizado da cavidade oral, sendo disposto e mantido sobre uma superfície plana com auxílio de agulhas. Para a simulação da mucosite oral, foram realizadas 3 ranhuras no sentido horizontal, atingindo toda a área da mucosa e 2 ranhuras no sentido vertical, nas extremidades da mucosa, em ambas as faces da mucosa jugal (Figura 7).

Figura 7 - Desenho esquemático do protocolo experimental de mucosite oral. Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-fluorouracil (ip) no 1º e 2º dias. No 4º dia foram feitas escoriações nas duas faces da mucosa jugal direita, como fator potencializador da mucosite. Parte dos animais foram sacrificados no 4º dia e outra parte no 10º dia.



Fonte: Adaptado de Leitão *et al.* (2007).

De acordo com os estudos previamente realizados no laboratório LAFICA, o 4º dia foi escolhido para a realização do trauma mecânico devido ao

início da leucopenia e perda de peso dos animais nos 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a administração do 5-FU. E o 10<sup>o</sup> dia foi escolhido para o sacrifício dos animais do grupo experimental (5-FU-10 dias) devido a maior intensidade do processo inflamatório na mucosa jugal (LIMA *et al.*, 2005).

#### **4.5.2 Grupos experimentais**

Para este estudo foram realizados um total de 5 experimentos, e em cada experimento, o número de animais utilizados variou de 23 a 30, totalizando 134 animais. Em cada experimento, os animais foram distribuídos entre 4 grupos, sendo que os grupos experimentais correspondem aos grupos 5-FU-4 dias e 5-FU-10 dias e os grupos controle correspondem aos grupos salina e trauma mecânico. Em cada grupo, o número de animais variou entre 5 a 8, aleatoriamente, como mostrado a seguir:

1. Grupo salina: animais que não foram submetidos ao trauma mecânico e nem a administração do 5-FU. Nesse grupo, os animais receberam injeções ip de solução salina no 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias, substituindo a administração do 5-FU, e foram sacrificados no 4<sup>o</sup> dia do modelo experimental (Figura 5);

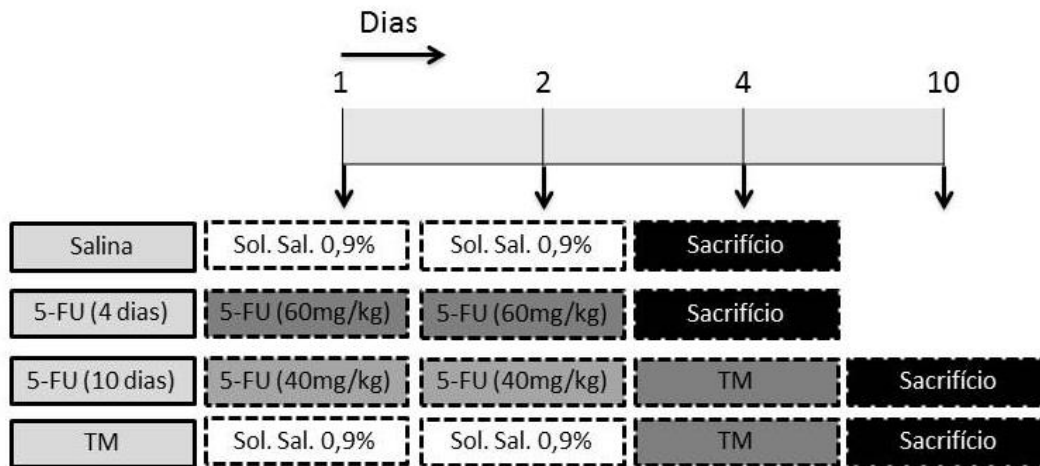
2. Grupo 5-FU-4 dias: animais submetidos apenas à administração do 5-FU, sem a realização das escoriações na mucosa jugal. Nesse grupo os animais receberam administração ip do 5-FU nos 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias, e sacrificados no dia 4<sup>o</sup> dia do modelo experimental (Figura 5);

3. Grupo 5-FU-10 dias: animais submetidos ao trauma mecânico e à administração do 5-FU. Nesse grupo, os animais foram submetidos a administração ip do 5-FU no 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias. No 4<sup>o</sup> dia, receberam escoriações na mucosa jugal e foram sacrificados no dia 10<sup>o</sup> dia do modelo experimental (Figura 5).

4. Grupo trauma mecânico: animais submetidos apenas ao trauma mecânico. Nesse grupo, os animais foram submetidos as escoriações na mucosa jugal no 4<sup>o</sup> dia e injeções ip de solução salina no 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias, substituindo a administração do 5-FU, e foram sacrificados no 10<sup>o</sup> dia do modelo experimental (Figura 8);

Figura 8 - Distribuição dos grupos estudados no modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU. Os grupos Salina e TM receberam solução salina ip nos 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias, e

foram sacrificados nos 4º e 10º dias, respectivamente. Os grupos 5-FU (4 dias) e 5-FU (10 dias), receberam doses ip de 5-FU nos 1º e 2º dias, e foram sacrificados nos 4º e 10º dias, respectivamente. TM = trauma mecânico; Sol. Sal = solução salina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5.3 Escores macroscópicos das mucosas jugais

Com o objetivo de verificar a eficácia da indução do modelo experimental, foi realizada análise macroscópica das mucosas jugais dos animais que foram submetidos ao TM. Os scores foram baseados na escala proposta pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, 1979), padronizada para humanos por Sonis *et al.* (1999) e modificada para utilização em animais de acordo com Medeiros *et al.* (2011). Para a análise macroscópica foram avaliadas presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os seguintes escores:

Grau 0: bolsa completamente saudável.

Grau 1: eritema e vasodilatação discretos à severo, sem evidência de erosão.

Grau 2: eritema e vasodilatação severos com erosão superficial da mucosa.

Grau 3: eritema e vasodilatação severos, úlceras afetando até 25% da área de superfície da mucosa.

Grau 4: eritema e vasodilatação, úlceras afetando 50% da área de superfície da mucosa, com perda da flexibilidade.

Grau 5: completa ulceração da mucosa com perda total da flexibilidade.

#### **4.5.4 Taxa de salivação estimulada e coleta da saliva**

A taxa de salivação foi analisada na saliva estimulada nos dias programados para o sacrifício dos animais (4° e 10° dias), a saliva foi coletada e armazenada para demais análises que serão descritas adiante. Para isto, os animais foram anestesiados por via ip com xilazina a 2% (10mg/kg de peso corpóreo do animal) e cloridrato de cetamina a 10% (200mg/kg de peso corpóreo do animal). Após a anestesia, foi administrada pilocarpina (Sigma, 10 mg/kg de peso corpóreo) em dose única por via ip (KONDO *et al.*, 2015). Os animais foram posicionados paralelamente, a 10 cm de altura da mesa de trabalho, sobre um apoio, e a abertura da cavidade oral foi posicionada sobre um funil de vidro. Desta forma a secreção salivar estimulada foi escoada através da força da gravidade por um período de 15 minutos, diretamente em criotubos previamente pesados (Figura 9). A produção salivar resulta da diferença entre as duas pesagens e o fluxo salivar foi expresso em ml/minuto, considerando a densidade da saliva de 1g/ml. Este procedimento foi baseado e adaptado de Navazesh e Kumar (2008) para mensurar a saliva em animais.

A saliva coletada foi centrifugada em 3000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado, distribuídos em alíquotas de 30 µl e armazenadas em freezer a -80°C.

Figura 9 - Coleta da saliva estimulada pela pilocarpina. Após estímulo da salivação com administração ip de pilocarpina (10mg/kg de massa corpórea), os animais permaneceram por 15 minutos posicionados de forma que a saliva fosse coletada através da força da gravidade. Microtubos previamente pesados, foram utilizados para coleta e armazenamento da saliva, e a taxa de salivação foi expressa por ml/minuto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **4.5.5 Coleta das glândulas salivares maiores**

Após a análise dos escores da mucosa jugal, as glândulas salivares maiores (sublingual, submandibular e parótida) do lado direito (lado em que o TM foi induzido) foram excisadas baseadas na técnica proposta por Jonjic (2001) e as glândulas foram divididas em dois fragmentos iguais. Uma parte do fragmento de cada glândula foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas e transferida ao álcool 70% para realização das técnicas de coloração (Hematoxilina e eosina, Alcian Blue, Tricrômico de Mallory), imunohistoquímica e TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). A outra metade foi devidamente transportada em gelo e armazenada em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior realização de dosagens moleculares. As glândulas sublingual e submandibular foram congeladas no mesmo criotubo pois estas se localizam anatomicamente uma sobre a outra.

#### **4.6 Parâmetros analisados na saliva**

##### **4.6.1 Dosagem de IgA por ELISA**

Para a determinação da IgA, foi utilizado o método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) que consiste na adição de um anticorpo primário, que irá se ligar ao seu antígeno específico na saliva. Em seguida, adiciona-se um anticorpo secundário que contém uma enzima que será responsável por permitir a visualização da reação com a adição de um cromógeno.

As amostras de saliva armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram utilizadas para este

ensaio e a quantificação dos níveis de IgA foi determinada pelo kit de detecção de IgA (Genway, #GWB-1B12B0). Foi realizada curva padrão em 6 poços de 100 µl com concentrações crescentes e 100 µl de amostra foram pipetados para os poços pré designados. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 60 minutos, e depois o conteúdo dos poços foram aspirados. Posteriormente, a placa foi lavada por 3 vezes e em seguida, 100 µL de conjugado de enzima-anticorpo foi pipetado nos poços. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e 100 µl de solução de substrato TMB foi pipetada em cada poço. Em seguida, incubou-se a placa à temperatura ambiente em local escuro durante 10 minutos e 100 µl de solução de parada foi adicionada em cada poço. Em seguida, determinou-se a absorbância em 450 nm. Para este ensaio foram utilizados, no mínimo, 4 animais por grupo e os resultados foram apresentados em ng/ml.

#### **4.6.2 Dosagem de Lisozima**

Amostras de saliva armazenadas a -80°C foram utilizadas e a atividade da lisozima foi determinada pelo kit de detecção de Lisozima (*Sigma-Aldrich*, #LY0100). A atividade da lisozima é obtida através da lise celular do *Micrococcus lysodeikticus* durante a incubação da amostra de lisozima e substrato. A reação é seguida através da monitorização da queda de leitura da absorbância a 450 nm. Para este ensaio, foram utilizados, no mínimo, 4 animais por grupo e os resultados foram apresentados como unidades de lisozima.

#### **4.6.3 Dosagem de superóxido dismutase (SOD)**

As amostras de saliva armazenadas a -80°C foram utilizadas para este ensaio de acordo com Sun *et al.* (1988). A atividade da enzima foi avaliada através da mensuração da sua capacidade de inibir a redução fotoquímica de tetrazólio nitro-azul (NBT). Neste ensaio, a redução fotoquímica de riboflavina gera O<sub>2</sub> que reduz o NBT para produzir o sal de formazano, que absorve a um comprimento de onda de 560 nm. Na presença de SOD, a redução do NBT é inibida pois a enzima converte o peróxido do radical superóxido. Os resultados são expressos como a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%, expresso em unidades de enzima por grama de proteína. Os tubos contendo a

solução resultante foram expostos à lâmpadas fluorescentes (15W) durante 15 minutos e em seguida, lidas utilizando um espectrofotômetro a 560 nm. Para este ensaio, foram utilizados no mínimo 5 animais por grupo e os resultados foram expressos como unidades de SOD/ $\mu$ g de proteína ou  $\mu$ l em tecidos e saliva, respectivamente.

#### **4.6.4 Dosagem da catalase (CAT)**

Amostras de saliva armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram utilizadas para este ensaio. A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  à proporção que a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizado como substrato é hidrolisado, de acordo com Chance e Maehly (1955). A atividade da enzima é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos. Para este ensaio foram utilizados no mínimo, 6 animais por grupo e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína.

### **4.7 Parâmetros analisados nos tecidos de glândulas salivares maiores**

#### **4.7.1 Análise microscópica das glândulas parótida, submandibular e sublingual**

Para avaliação histopatológica, os tecidos fixados foram processados, desidratados em banhos crescentes de álcool (70%, 95% e absoluto) e de xilol e incluídos em parafina. Foram confeccionados cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, em seguida, desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina de Mayer durante 15 a 20 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente e a coloração foi controlada ao microscópio óptico até alcançar a intensidade desejada. Em seguida, os tecidos foram corados com eosina por 2 minutos, lavados em água corrente, desidratados e montados.

Os parâmetros como edema periductal e vacuolização foram graduados de 0 a 2, de modo cego, considerando a intensidade (ausência, moderada ou acentuada) da vacuolização ou do edema de acordo com o número de áreas afetadas em uma mesma lâmina, através do microscópio óptico *Leica DM 2000* com

as lentes objetivas de 200x e 400x de magnitude. As células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos) foram analisadas quantitativamente em 10 campos de magnitude 1000x e em 10 animais por grupo, no mesmo microscópio.

#### ***4.7.2 Análise histoquímica pela coloração de Azul de toluidina nas glândulas parótida, submandibular e sublingual***

A coloração de azul de toluidina evidencia marcação de mastócitos através da cor violeta, enquanto que as demais áreas apresentam coloração azulada. Os tecidos fixados foram processados, desidratados em banhos crescentes de álcool (70%, 95% e absoluto) e de xilol e incluídos em parafina. Cortes com 4 µm de espessura foram desparafinizados e hidratados. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram coradas em azul de toluidina por 5 minutos, lavadas em água destilada e observadas em microscópio óptico até atingir a coloração adequada. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em água corrente, colocadas na estufa a 60°C por 1 hora. Depois, as lâminas foram desidratadas e montadas.

Para análise quantitativa, foram selecionados 10 campos considerados quentes por apresentarem maior quantidade de mastócitos e analisados 5 animais por grupo no microscópio óptico *Leica DM 2000* na objetiva de 1000x.

#### ***4.7.3 Análise histoquímica pela coloração de tricrômico de Mallory nas glândulas parótida, submandibular e sublingual***

A coloração tricrômico de Mallory evidencia marcação de vasos sanguíneos através da cor laranja ou amarela. Os tecidos fixados foram processados, desidratados em banhos crescentes de álcool (70%, 95% e absoluto) e de xilol e incluídos em parafina. Cortes com 4 µm de espessura foram desparafinizados e hidratados. Em seguida, corados com a solução A (0,5 g de fucsina ácida e 100 ml de água destilada) por 2 minutos e solução B (0,5 g de azul de anilina, 2,0 g de orange G e 1,0 g de ácido fosfotúngstico) de 5 a 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso do corante. Os cortes foram passados em álcool 80% por alguns segundos,



desidratados e montados.

Para esta coloração, foram selecionadas, no mínimo, 4 animais de cada grupo. A análise foi realizada de forma quantitativa, onde foi avaliada a área dos vasos e capilares sanguíneos. Para esta análise, foram selecionados 4 lóbulos em cada glândula salivar (parótida, submandibular e sublingual) onde apresentaram maior quantidade de vasos (áreas quentes). Em cada lóbulo analisou-se 4 campos na objetiva de 400x e os resultados foram expressos através da média. A contagem e a delimitação da área foi realizada através do programa *LAS V3.7.0* acoplado ao microscópio óptico *Leica DM 2000*.

#### **4.7.4 Imunohistoquímica para ki-67 nas glândulas submandibular e parótida**

O marcador ki-67 mostra positividade nuclear para as células em proliferação. As reações imunohistoquímicas foram padronizadas para o anticorpo ki-67 com objetivo de estabelecer a diluição e método de recuperação antigênica adequados.

Os tecidos fixados foram processados, em banhos crescentes de álcool (70%, 95% e absoluto) e de xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3 µm de espessura do material incluído em parafina foram deixadas por 24 horas em estufa à 60°C. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em PBS (solução tampão fosfato-salino).

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH; pH=6.1; Dako Denmark A/S*) ou tris/EDTA (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH; pH=9; Dako Denmark A/S*) sob aquecimento em banho maria a 90°C, de 20 a 40 minutos). O pH utilizado para cada anticorpo está descrito na tabela 1. Em seguida, as lâminas foram retiradas do banho-maria, esfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água destilada e PBS.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o peróxido de hidrogênio contendo tampão fosfato (*EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent; Dako Denmark A/S*), diretamente sobre os cortes por 20 minutos e depois foram lavadas em PBS. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em solução tris tamponada (*EnVision™ FLEX antibody diluent; Dako Denmark A/S*) na concentração de 1:200 por 60 minutos. Em seguida, as lâminas

foram lavadas em PBS e incubadas, por 30 minutos, com o polímero (*EnVision™ FLEX/HRP; Dako Denmark A/S*) e em seguida lavados em PBS.

A revelação das lâminas foi realizada com solução 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (*EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen; Dako Denmark A/S*) e monitoradas em microscópio óptico. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer por 8 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Em seguida procedeu-se a imersão das lâminas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas, em seguida, em água corrente e destilada.

Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído pela solução diluente do anticorpo (*EnVision™ FLEX antibody diluent; Dako Denmark A/S*). A montagem das lâminas foi realizada em Entellan new (*Merk KGaA, Alemanha*).

A análise do ki-67 foi realizada de forma quantitativa em 2 animais por grupo e foram selecionados 10 campos em cada grupo experimental.

#### **4.7.5 Método TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick end-labeling*) nas glândulas submandibular e parótida**

O método TUNEL mostra positividade nuclear para as células em morte celular. Foram realizados cortes com 4µm de espessura e montagem em lâminas cobertas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Utilizou-se para a detecção de células TUNEL positivas, como indicativo de morte celular, o kit *ApopTagR S 7100* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 70%). Em seguida, lavados PBS e incubados em temperatura ambiente com proteinase K por 15 minutos, a fim de promover a recuperação antigênica. Depois de lavado com água destilada, o material foi tratado com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em PBS durante 15 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Seguiu-se nova lavagem com PBS e incubação com o tampão de equilíbrio por 10 segundos e, imediatamente depois, com a enzima TDT (*terminal desoxinucleotidil transferase*) associada aos nucleotídeos marcados com digoxigenina (*reaction buffer*), os quais se ligam às

hidroxilas livres do DNA fragmentado das células apoptóticas. O controle negativo não recebeu a enzima. Após incubação em estufa a 37°C por 1 hora, a reação foi bloqueada pela solução *stop* e as lâminas lavadas em PBS. Seguiu-se a adição do conjugado antidigoxigenina e nova incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se a coloração com o cromógeno DAB, seguida por contra coloração com *methyl green*. Por fim, foi feita nova lavagem com água destilada, imersão em N-butanol a 100% e xilol e, em seguida, montagem das lâminas.

A análise do TUNEL foi realizada de forma quantitativa em 4 animais por grupo onde foram selecionados 10 campos em cada grupo experimental.

#### **4.7.6 Dosagem de nitrito/nitrato nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) nas glândulas salivares. Esta dosagem foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (ZI; CHEN; LI, 2000).

As amostras de glândulas salivares armazenadas em *freezer* a -80°C foram homogeneizadas na proporção de 50mg de tecido em 500  $\mu\text{M}$  de solução gelada de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. O nível total de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  foi determinado com  $\text{NO}_3^-$  das amostras (0,04mL) convertido em  $\text{NO}_2^-$  pela incubação em uma solução de 0,04 mL de nitrato redutase, NADPH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água destilada “*overnight*”. Foram utilizadas placas de 96 poços, adicionando 80  $\mu\text{l}$  da amostra experimental em cada poço, em duplicata. Uma série de diluições da curva-padrão de referência de  $\text{NO}_2^-$  (640  $\mu\text{M}$ , 320  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5, 1,25  $\mu\text{M}$  e 0,65  $\mu\text{M}$ ) foi preparada. Em seguida, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de solução Griess composta por 2% de sulfanilamida, ácido fosfórico 5%,  $\alpha$ -haphytil-etileno diamina (*NEED*) e água destilada em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão. Para este ensaio foram utilizados, no mínimo, 4 animais por grupo e os resultados foram expressos em  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{M}$ ).

#### **4.7.7 Dosagem de grupos sulfidrílicos não-proteicos (NP-SH) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

A dosagem dos grupos sulfidrílicos não proteicos foi representado, principalmente pela dosagem de GSH. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito por Sedlak e Lindsay (1968).

As amostras de glândulas salivares armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram trituradas em homogeneizador *Politron Ultra-Turrax* em 1 mL de EDTA 0,02M para cada 100 mg de tecido, sob condições adequadas de refrigeração. Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  do homogenato foram adicionadas a 320  $\mu\text{l}$  de água destilada e 80  $\mu\text{l}$  de ácido tricloracético 50% (TCA) para a precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados (3000rpm/15minutos/4oC) e alíquotas de 400  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foram adicionadas a 800  $\mu\text{l}$  de tampão Tris 0,4 M, pH 8,9 e 20  $\mu\text{l}$  de DTNB (reagente de *Ellman*) e agitados por 3 minutos no agitador de tubos, imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro, com absorvância de 412 nm. Para cada grupo foram utilizados, no mínimo, 5 animais por grupo e a quantidade de grupos sulfidrílicos não proteicos nas glândulas salivares foi descrita como  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido. A leitura das amostras foi realizada através do espectrofotômetro de microplacas *Epoch (Biotek Instruments Incorporation)*.

#### **4.7.8 Dosagem de malonaldeído (MDA) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

MDA é um produto citotóxico decorrente da peroxidação lipídica da camada lipoproteica das células (RAHAL *et al.*, 2014). As amostras de glândulas salivares armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em solução cloreto de potássio (KCl) 1,15% (0,15M) e um homogenato a 10% foi realizado. Em um tubo de ensaio foram acrescentados 250 $\mu\text{l}$  do homogenato, 1,5 mL de ácido fosfórico 1% e 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6%) (TBA). Em seguida, a mistura foi aquecida em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos e depois resfriada em banho de gelo. Foi adicionado 2 ml de n-butanol, agitado por 40 segundos e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. As amostras foram pipetadas em placa de 96 poços para a leitura. Foram realizadas leituras a 520 nm e 535 nm e o resultado do MDA foi

dados pela subtração da primeira leitura pela segunda. Para este ensaio foram utilizados, no mínimo, 5 animais por grupo, a absorbância obtida foi plotada em curva padrão de MDA e os valores expressos como nmol de MDA/grama de tecido. A leitura das amostras foi realizada através do espectrofotômetro de microplacas *Epoch* (Biotek Instruments Incorporation).

#### **4.7.9 Dosagem de superóxido dismutase (SOD) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

Para a determinação da atividade de SOD no tecido das glândulas salivares foi utilizada a mesma técnica realizada na saliva, como foi descrita no item 4.6.3.

#### **4.7.10 Dosagem da catalase (CAT) nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

Para a determinação da atividade de SOD no tecido das glândulas salivares foi utilizada a mesma técnica realizada na saliva, como foi descrita no item 4.6.4.

#### **4.7.11 Dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ por ELISA nas glândulas parótida, submandibular e sublingual**

Para a dosagem das citocinas foi utilizado o método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) que consiste na adição de um anticorpo primário, que irá se ligar ao seu antígeno específico no tecido das glândulas salivares. Em seguida, adiciona-se um anticorpo secundário que contém uma enzima que será responsável por permitir a visualização da reação com a adição de um cromógeno. Para este ensaio foi utilizado os Kits *Duo Set* (R&D Systems).

As amostras de glândulas salivares armazenadas em *freezer* a -80°C foram homogeneizadas na proporção 100 mg de tecido para 600  $\mu$ l de PBS. Placas de 96 poços foram cobertas com 50  $\mu$ l de anticorpo primário diluídos em tampão fosfato (PBS) e incubados por 18 h a 4°C. A placa foi lavada com PBS *tween* 0,05%

por 3 vezes. Em seguida, foram acrescentados 200 µl/poço de PBS/BSA 1% para o bloqueio de sítios inespecíficos, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas. As amostras de glândulas salivares e as citocinas recombinantes em diluição de concentração conhecidas foram plaqueadas em 100 µL/poço, incubadas por 2 h em 37°C. Após a lavagem das placas, 50 µl de anticorpo de detecção biotilado para cada citocina foram acrescentados por 1 h a 37°C. Após a lavagem, as placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina peroxidase diluída em PBS 1:200 (50 µl), por 30 minutos, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com solução de tetrametilbenzidina durante 20 minutos. O bloqueio da reação ocorreu com o acréscimo de 25 ml/poço de ácido sulfúrico.

A densidade óptica das amostras foi determinada através do espectrofotômetro de microplacas Epoch (*Biotek Instruments Incorporation*) com filtro 450 nm. Para este ensaio, foram utilizados no mínimo, 5 animais por grupo e as concentrações das citocinas nas glândulas salivares foram expressas em picogramas por ml (pg/ml).

#### **4.7.12 Determinação da expressão da NOSi por western blotting nas glândulas submandibular e sublingual**

A avaliação da expressão proteica da NOSi nas glândulas salivares foi realizada em duas etapas: extração de proteínas e western blotting.

Para a extração das proteínas, fragmentos de tecido glandular foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto deste processo foi inserido em microtubos contendo 200 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% Triton X-100; 1% deoxicolato de sódio; 01% SDS). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*Pierce™ BCA protein Assay kit, ThermoFisher Scientific, catalog number 23225*). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu<sup>2+</sup>) para a cuprosa (Cu<sup>1+</sup>). Este liga-se a duas moléculas de ácido bicinonínico,

resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente a proteína foi diluída (0,4 µl de proteína: 25 µl de RIPA) e em seguida, foi misturado o reagente A (contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, foi inserido em triplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços, que foi incubada por 30 min a 37°C e a leitura da reação foi realizada pelo leitor de ELISA a 562 nm. Para a curva padrão foram utilizadas concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/ml.

Para a realização do western blotting, 20 µg de proteínas extraída das amostras, foi preparada através da adição do tampão da amostra (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol), vortexadas por 10 segundos, aquecidas em banho maria (95°C, 5 min) e centrifugadas (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, foi realizada eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% ou 8% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS; pH 8,3). Após a corrida, foi realizada a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) a 100 v por 2 horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol; pH 8,3). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, em 5% de BSA diluído em tampão de lavagem (TBST – 20 mM Tris; pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida foi realizada 3 lavagens com TBST por 10 min de cada membrana. Incubou-se *overnight* a 4°C sob agitação constante das membranas com o anticorpo primário diluído em 1% de BSA diluído em TBST. Após esta etapa, foi realizada 3 lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 hora a temperatura ambiente (NOSi, 1:100, *Santa Cruz Biothecnology*). Decorrido deste tempo, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 10 min cada, com TBST. Enfim, foi adicionado o reagente de quimiluminescência, as membranas foram agitadas por 5 min e as imagens capturadas com auxílio do *Chemidoc MP System (Bio-Rad)*. A densidade das bandas foram calculadas por meio do *software ImageJ*.

#### **4.7.13 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  epm). Para comparações entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni para comparar médias. O teste de Kruskal-Wallis e Dunn foram utilizados para comparar medianas. Em determinados casos foi empregado teste *t* de student. Estes testes foram utilizados por meio do software GraphPrism 6 (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*). Foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$  em todas as situações.



## 5 RESULTADOS

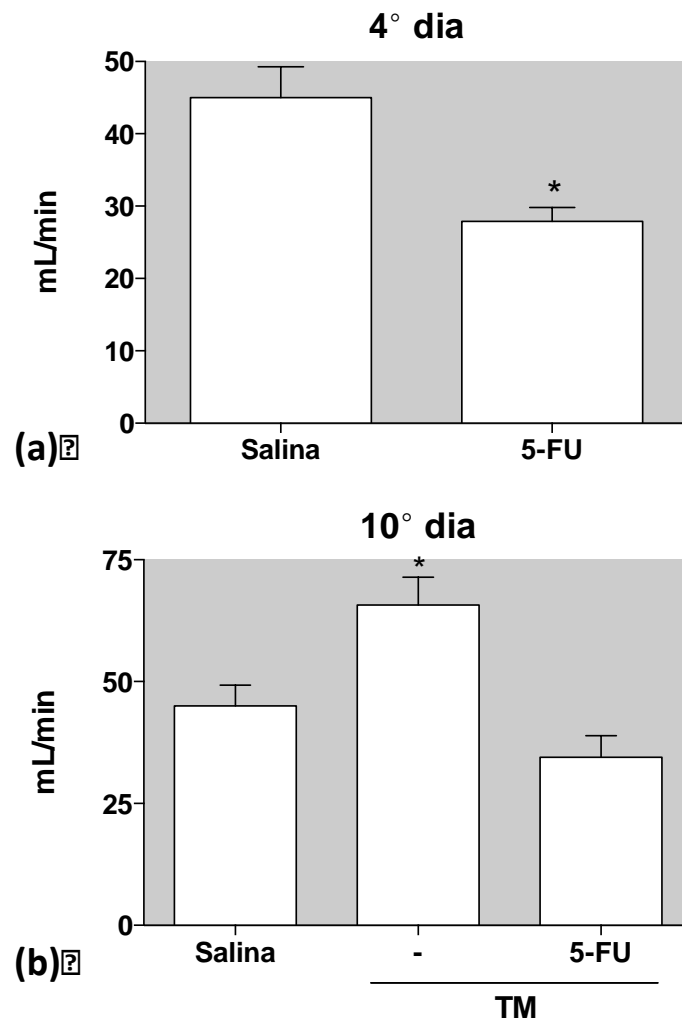
### 5.1 Efeito do 5-FU na taxa de salivação estimulada pela pilocarpina

Com o objetivo de verificar alterações no fluxo salivar provocados pelo 5-FU, optou-se pela estimulação da saliva com a pilocarpina, método consagrado na literatura científica e bastante utilizado em roedores. Sem o estímulo, dificilmente conseguiríamos mensurar a salivação já que o quimioterápico provoca redução da produção salivar.

A salivação dos animais foi, então, estimulada por dose única de cloridrato de pilocarpina (10mg/kg, ip) e a saliva foi coletada durante 15 minutos em todos os grupos do modelo experimental, nos dias previstos para eutanásia dos animais.

A análise da taxa de salivação estimulada pela pilocarpina demonstrou que o 5-FU promoveu redução significativa no 4º dia do modelo experimental ( $p < 0,05$ ) (Figura 10a). Contudo essa alteração foi temporária, conforme demonstrado pela recuperação parcial da taxa de salivação no 10º dia, além disso, o trauma mecânico promoveu aumento da produção salivar (Figura 10b).

Figura 10 – Efeito do 5-FU na taxa de salivação estimulada pela pilocarpina nos 4° (a) e 10° dias (b) do modelo experimental. Após a anestesia dos animais, administrou-se cloridrato de pilocarpina (10mg/kg, ip) para estimulação da saliva. Microtubos foram pesados antes e após a coleta da saliva, durante 15 minutos e a taxa de salivação foi obtida pela diferença das duas pesagens. A taxa de salivação foi expressa em mL/min e os valores foram plotados como média  $\pm$  EPM (n=10). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina (Teste *t* de Student em (a) e ANOVA/Bonferroni em (b)).

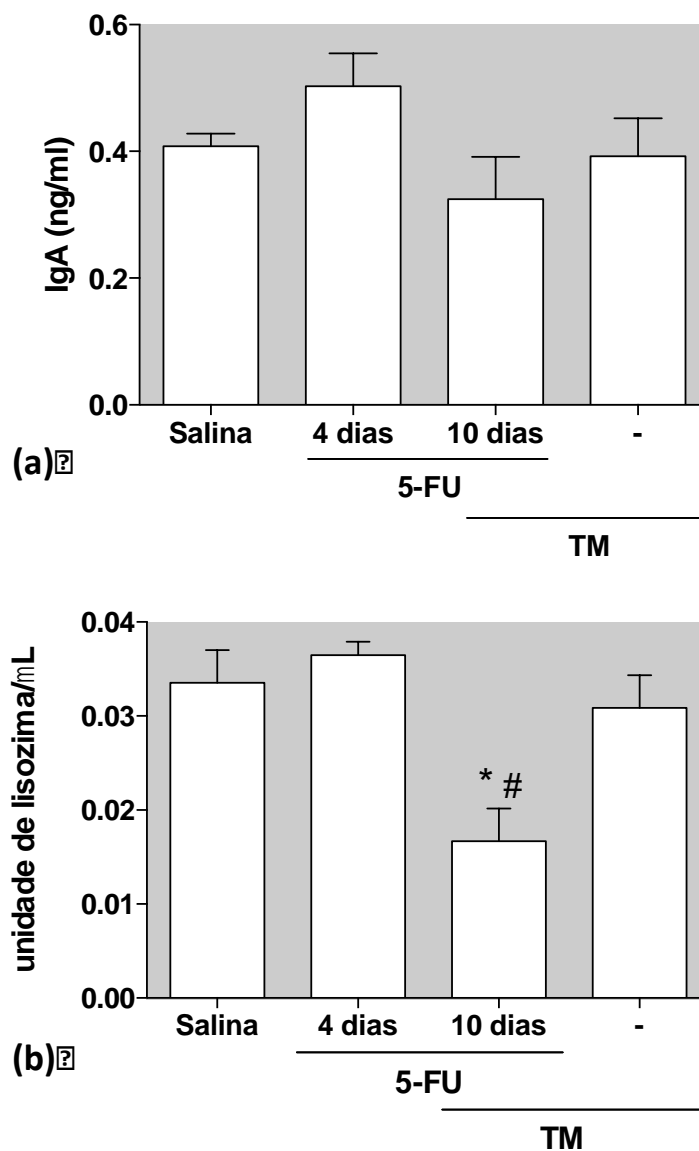


## **5.2 Efeito do 5-FU na composição da saliva estimulada pela pilocarpina através das dosagens de lisozima e imunoglobulina A (IgA)**

Após a mensuração da taxa de salivação, amostras da mesma saliva foram coletadas e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para ensaios posteriores que objetivavam analisar alterações na composição salivar através das dosagens de lisozima e IgA. Ambas as proteínas apresentam importante papel na imunidade local frente aos microorganismos.

A análise da qualidade da saliva demonstrou que o 5-FU promoveu redução estatisticamente significativa na dosagem da lisozima no 10° dia do modelo experimental comparado aos grupos salina e trauma mecânico ( $p < 0,05$ ) (Figura 11a). No entanto, não houve alterações nas dosagens de IgA em nenhum dos grupos analisados (Figura 11b).

Figura 11 – Efeito do 5-FU na qualidade da saliva pela análise da atividade da lisozima (unidade de lisozima/ $\mu$ l) (a) e dosagem de IgA (ng/ml) (b) em amostras de saliva estimuladas pela pilocarpina. Após a anestesia dos animais, administrou-se pilocarpina (10mg/kg, ip) para estimulação da saliva e, em seguida, a saliva foi armazenada em microtubos para ensaios posteriores. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM (n=4). \* $p$ <0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p$ <0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). TM=trauma mecânico.

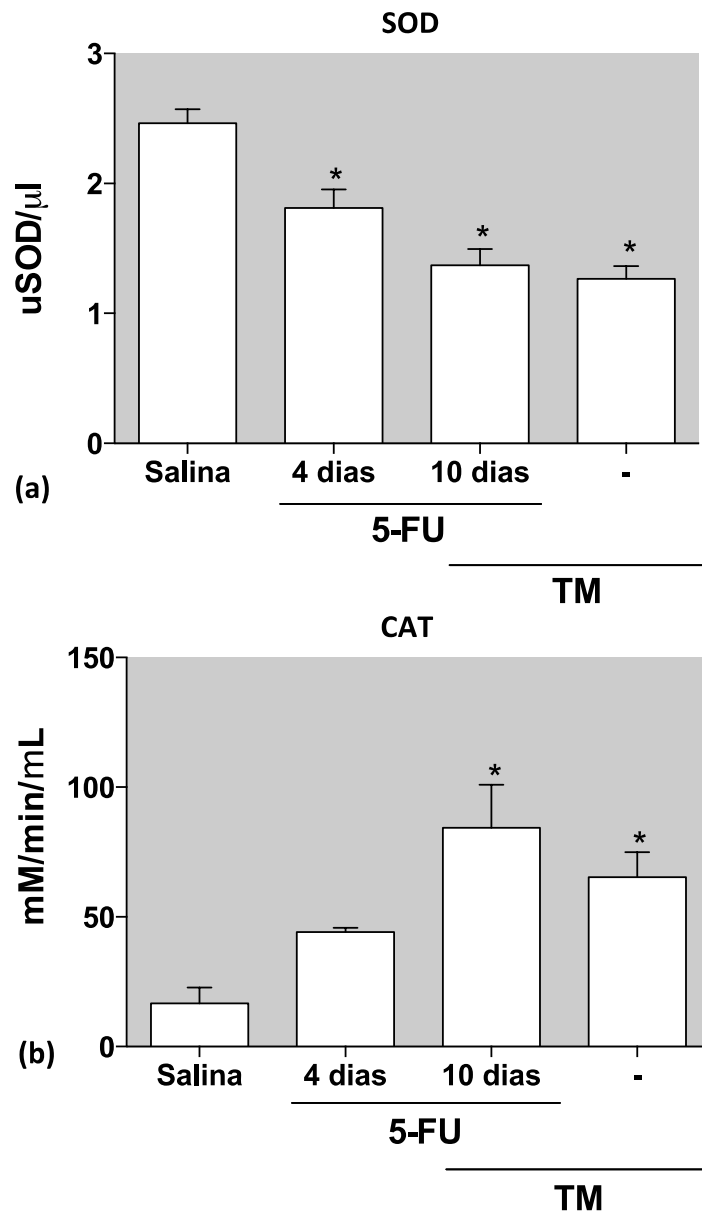


### **5.3 Efeito do 5-FU na qualidade da saliva estimulada pela pilocarpina através dos parâmetros de estresse oxidativo: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)**

Com o objetivo de verificar alterações nos parâmetros de estresse oxidativo nas amostras de saliva, investigou-se a participação das enzimas antioxidantes endógenas, SOD e CAT, que são produzidas com intuito de neutralizam os efeitos dos radicais livres.

A análise do estresse oxidativo em amostras de saliva demonstrou que o 5-FU promoveu alterações significativas principalmente, no 10° dia do modelo experimental, tanto no grupo 5-FU quanto no grupo TM. Verificou-se que o 5-FU e o TM interferiram na homeostase da saliva, evidenciada pela redução da atividade de SOD (figura 12a) ( $p < 0,05$ ). Tanto o 5-FU quanto o TM aumentaram a atividade de CAT observado na figura 12b ( $p < 0,05$ ), no 10° dia.

Figura 12 – Efeito do 5-FU na atividade de SOD (a) e CAT (b) em amostras de saliva estimulada pela pilocarpina. Após a anestesia dos animais, administraram-se pilocarpina (10mg/kg, ip) para estimulação da saliva e depois da mensuração da taxa de salivação, a saliva foi armazenada em microtubos para ensaios posteriores. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM (n=6). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; (ANOVA/Bonferroni). SOD=superóxido dismutase; CAT=catalase; TM=trauma mecânico.

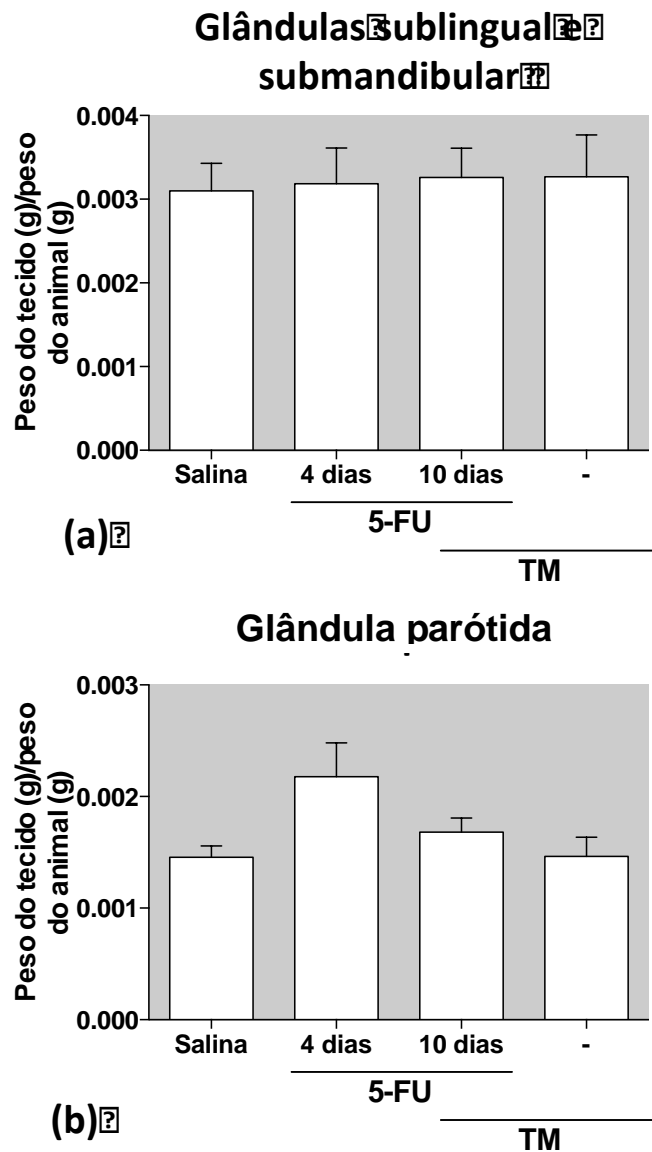


#### **5.4 Efeito do 5-FU na macroscopia e peso das glândulas salivares maiores**

Após a análise do fluxo salivar e coleta da saliva estimulada pela pilocarpina, as glândulas salivares foram removidas cirurgicamente, e pela observação macroscópica, observou-se que o 5-FU não promoveu alterações comparando-se os grupos do modelo experimental.

Com o intuito de verificar possíveis alterações no peso, as glândulas salivares sublinguais e mandibulares foram pesadas em conjunto devido a continuidade anatômica e a glândula parótida foi pesada separadamente. Contudo, assim como a análise macroscópica, o 5-FU não provocou alterações significativas no peso das glândulas salivares maiores (Figura 13a e 13b).

Figura 13 – Efeito do 5-FU no peso das glândulas submandibular (SM) e sublingual (SL) (a) e glândula parótida (P) (b). Após a anestesia dos animais, as glândulas SM e SL foram cirurgicamente removidas e pesadas em conjunto devido à proximidade anatômica e a glândula P foi removida e pesada separadamente. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM do peso das glândulas em mg (n=7) (ANOVA/Bonferroni). SM=submandibular; SL=sublingual; TM=trauma mecânico.





## **5.5 Efeito do 5-FU na morfologia microscópica das glândulas salivares maiores**

Para análise histopatológica, as glândulas salivares maiores dos hamsters foram removidas cirurgicamente após a análise do fluxo e da composição salivar, nos dias previstos para eutanásia dos animais e as glândulas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE). Após observação ao microscópio óptico, verificou-se que as alterações mais evidentes no parênquima foram vacuolização e edema periductal. Para análise quantitativa, scores de 0 a 3 (0=ausência, 1=presença leve, 2=presença moderada e 3=presença acentuada) foram utilizados para graduar a intensidade e número de áreas afetadas por estas alterações.

A glândula sublingual não apresentou alterações significativas na análise histopatológica (Tabela 2, Figura 14a-d). Já nas glândulas submandibular e parótida, o 5-FU induziu alterações, principalmente no 4º dia do modelo experimental, sendo que na submandibular, observou-se aumento significativo do edema periductal ( $p<0,05$ ) (Tabela 2, Figura 15a-d) e na glândula parótida, verificou-se aumento da vacuolização nas células acinares ( $p<0,05$ ) (Tabela 2, Figura 16a-d).

Tabela 2 – Efeito do 5-FU nos escores de vacuolização e edema periductal nas glândulas salivares maiores. Para os escores histopatológicos, considerou-se parâmetros como edema periductal e vacuolização que foram graduados de 0 a 3, de modo cego, considerando a intensidade e número de áreas afetadas (0=ausência, 1=presença leve, 2=presença moderada ou 3=presença acentuada) (n=5). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina (Testes de Kruskal-Wallis's e Dunn's). SM=submandibular; SL=sublingual; P=parótida; TM=trauma mecânico.

parâmetros	glândulas	Grupos			
		salina	5-FU		
			4° dia	10° dia	TM
			média (min-máx.)		
<b>Vacuolização</b>	SL	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
	SM	0 (0-1)	1 (0-3)	1 (0-2)	0,5 (0-3)
	P	0 (0-1)	2 (2-3)*	2 (1-2)	1,5 (0-3)
<b>Edema periductal</b>	SL	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
	SM	0 (0-1)	2 (2-3)*	0 (0-1)	0 (0-2)
	P	2 (2-3)	1,5 (0-3)	1 (0-2)	0 (0-1)

Figura 14 – Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula sublingual. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método em HE do tecido da glândula sublingual nos grupos salina (a), 5-FU – 4 dias (b), 5-FU – 10 dias (c) e TM (d). Na glândula sublingual não foram verificadas alterações histopatológicas significativas. Barra=100  $\mu$ m.

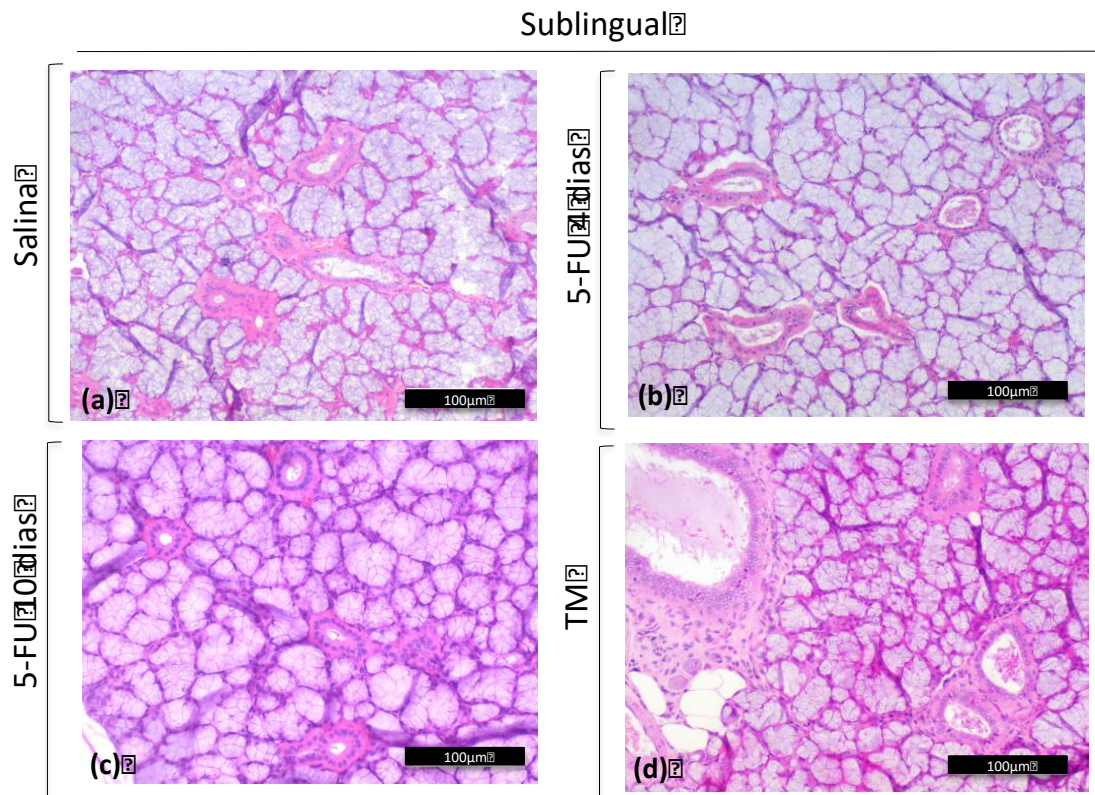


Figura 15 – Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula submandibular. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método em HE do tecido da glândula submandibular nos grupos salina (a), 5-FU – 4 dias (b), 5-FU – 10 dias (c) e TM (d). Verificou-se que na glândula submandibular, o 5-FU provocou aumento do edema periductal no 4º dia do modelo experimental (ponta da seta preta). Barra=100 µm.

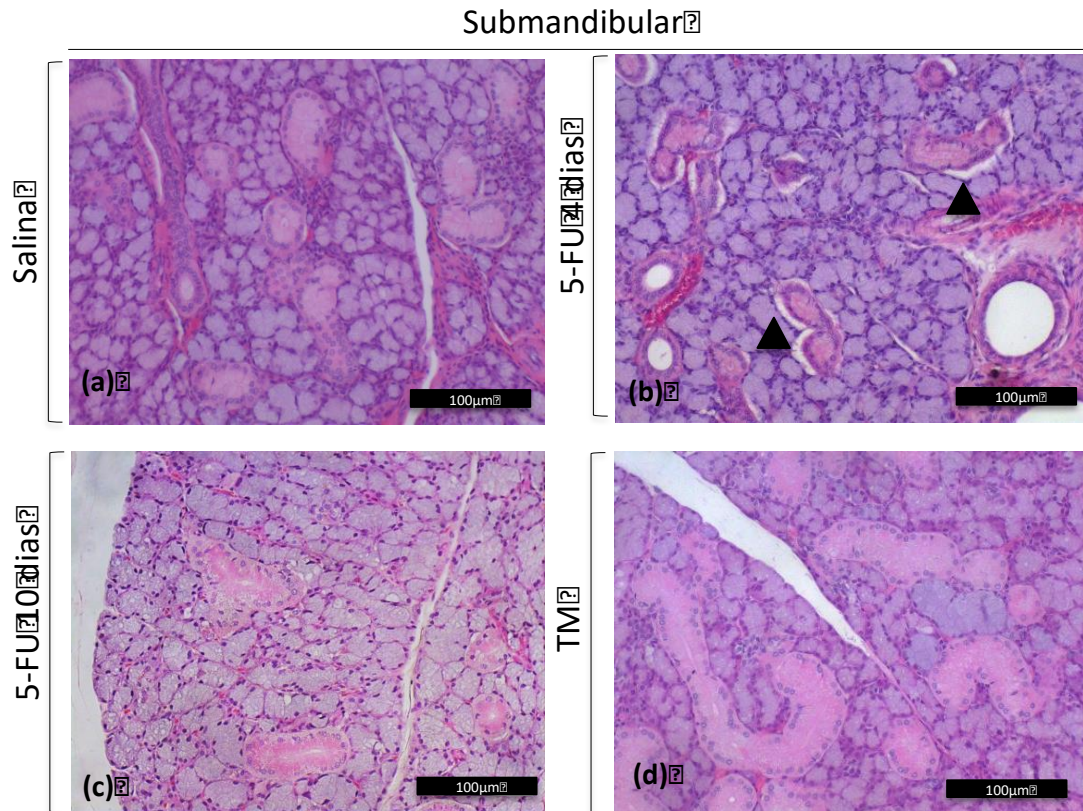
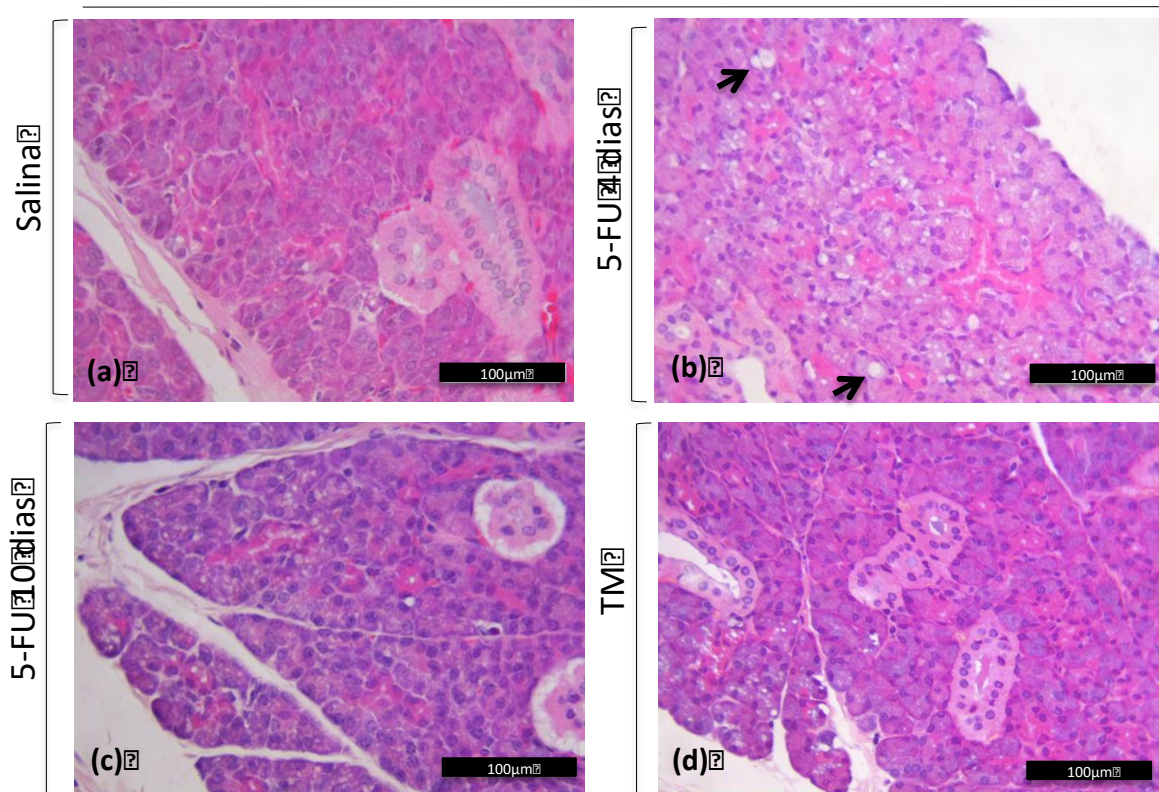


Figura 16 – Efeito do 5-FU sobre as alterações histológicas da glândula parótida. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método em HE do tecido da glândula submandibular nos grupos salina (a), 5-FU – 4 dias (b), 5-FU – 10 dias (c) e TM (d). Verificou-se que na glândula parótida, o 5-FU provocou aumento da vacuolização no 4º dia do modelo experimental (seta preta). Barra=100 µm.

### Parótida



## 5.6 Efeito do 5-FU nas células inflamatórias das glândulas salivares maiores

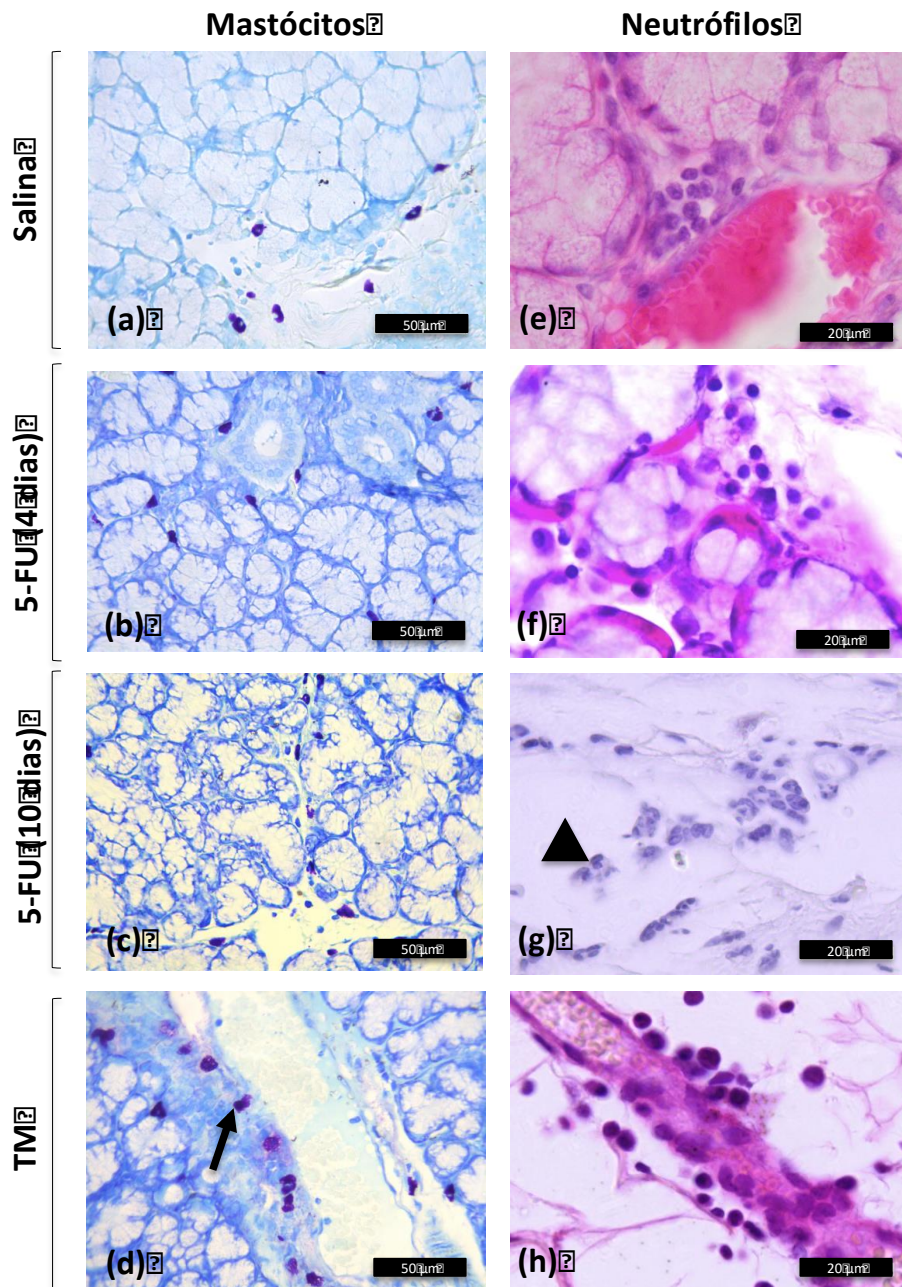
Na análise histopatológica das glândulas salivares coradas em HE, além do edema periductal e vacuolização, foi observado aumento do infiltrado inflamatório, tanto no parênquima quanto no tecido conjuntivo. A análise do infiltrado inflamatório foi realizada de forma quantitativa para os linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, pelo microscópio óptico no aumento de 1000x. A contagem dos mastócitos, foi realizada por meio da coloração azul de toluidina, pela facilidade de evidenciação destas células.

A análise quantitativa das células inflamatórias da glândula sublingual mostrou que o 5-FU induziu à inflamação somente no 10° dia do modelo experimental. Foi observado que o TM provocou aumento significativo de mastócitos ( $p < 0,05$ ) e o 5-FU induziu a redução destas células nos 4° e 10° dias ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3; Figura 17a-d). Ainda, verificou-se que o 5-FU induziu ao aumento de neutrófilos, se comparado aos grupos salina e TM ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3; Figura 17e, g, h).

Tabela 3 – Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula sublingual. As células inflamatórias: neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos foram analisadas quantitativamente em 10 campos de magnitude 1000x nas lâminas coradas em HE (n=4-5). Para a contagem dos mastócitos, utilizou-se método de coloração por azul de toluidina (n=10). Na glândula sublingual, observa-se que o 5-FU induziu ao aumento das células inflamatórias, no 10º dia do modelo experimental. Os valores estão plotados como média ± EPM por campo (n=10). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). SL=sublingual; TM=trauma mecânico

Células	Grupos			
	Salina	5-FU		TM
		4 dias	10 dias	-
Média ± EPM (células/campo 1000x)				
<b>Mastócitos</b>	4,9 ± 0,2	4,4 ± 0,1#	4,1 ± 0,2#	8,1 ± 0,3*
<b>Linfócitos</b>	0,4 ± 0,1	1 ± 0,2	1 ± 0,3	1 ± 0,3
<b>Plasmócitos</b>	1,2 ± 0,2	1 ± 0,4	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,1
<b>Macrófagos</b>	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0	0,1 ± 0,03
<b>Neutrófilos</b>	0,1 ± 0,01	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0*#	0,4 ± 0,2

Figura 17 – Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula sublingual. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método azul de toluidina (a-d) para análise dos mastócitos (campos de magnitude 400x) e em HE (e-h) para análise dos neutrófilos (campos de magnitude 1000x). A seta indica mastócitos e cabeça da seta indica neutrófilos. SL=sublingual; TM=trauma mecânico.



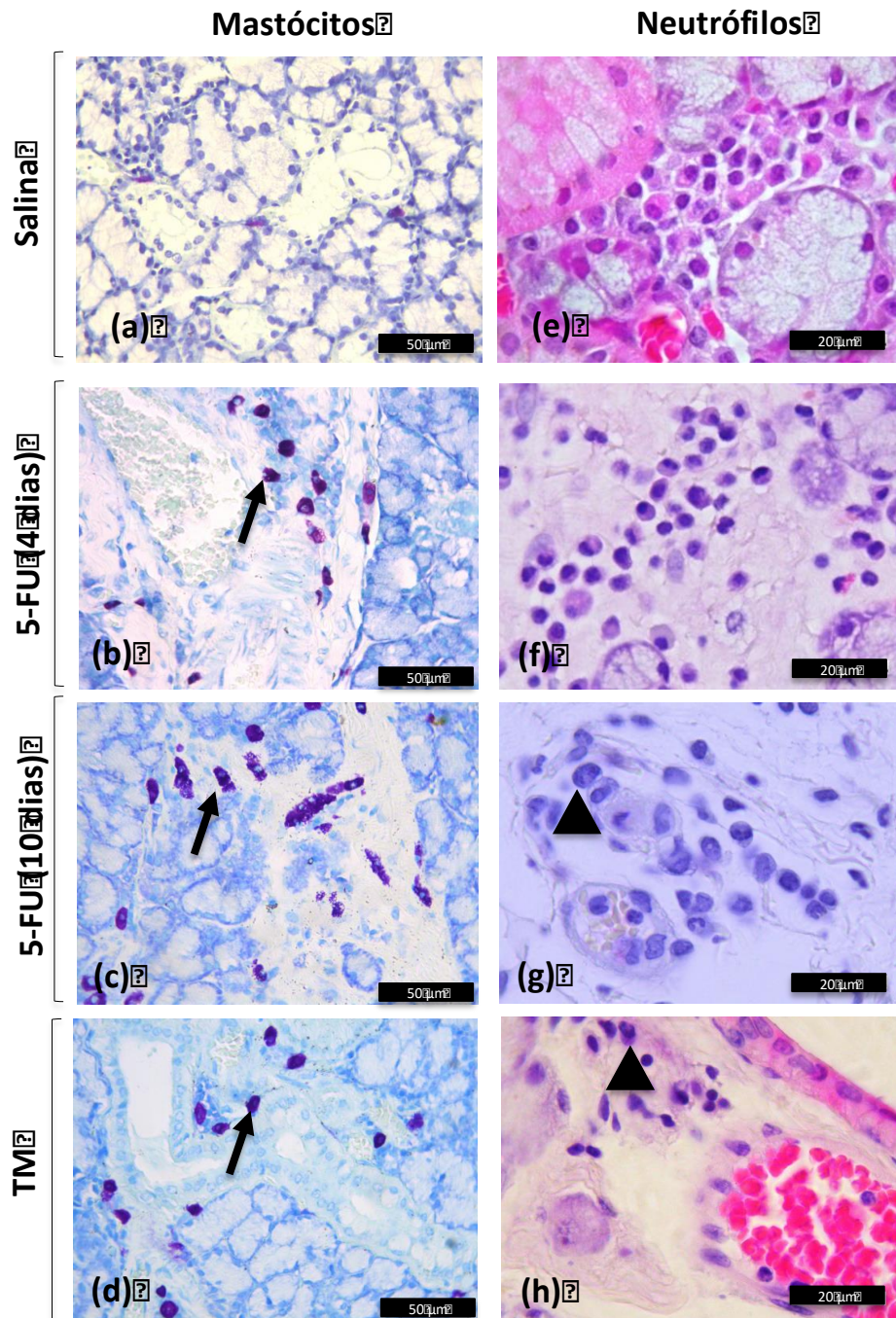


Na glândula submandibular, o 5-FU provocou aumento das células inflamatórias tanto no 4° dia quanto no 10° dia do modelo experimental. No 4° dia, foi observado aumento de mastócitos (Figura 18b), linfócitos e macrófagos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). O 5-FU e o TM induziram ao aumento de mastócitos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4; Figura 18c,d) e de neutrófilos no 10° dia ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4; Figura 18g).

Tabela 4 – Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula submandibular. As células inflamatórias: neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos foram analisadas quantitativamente em 10 campos de magnitude 1000x nas lâminas coradas em HE ( $n=5-7$ ). Para a contagem dos mastócitos utilizou-se método de coloração por azul de toluidina ( $n=10$ ). Na glândula submandibular, observa-se que o 5-FU induziu ao aumento das células inflamatórias, tanto no 4° quanto no 10° dias do modelo experimental. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM por campo. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina (ANOVA/Bonferroni). SM=submandibular; TM=trauma mecânico.

Células	Grupos			
	Salina	5-FU		TM
		4 dias	10 dias	-
		Média $\pm$ EPM (células/campo 1000x)		
<b>Mastócitos</b>	4,3 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3*	8,4 $\pm$ 0,7*	7,6 $\pm$ 0,5*
<b>Linfócitos</b>	1,9 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 2*	0,7 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3
<b>Plasmócitos</b>	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3
<b>Macrófagos</b>	0,04 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,03*	0,05 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,03
<b>Neutrófilos</b>	0,01 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0,3*	0,3 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1*

Figura 18 – Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula submandibular. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método azul de toluidina (a-d) para análise dos mastócitos (campos de magnitude 400x) e em HE (e-h) para análise dos neutrófilos (campos de magnitude 1000x). A seta indica mastócitos e cabeça da seta indica neutrófilos. SL=sublingual; TM=trauma mecânico.

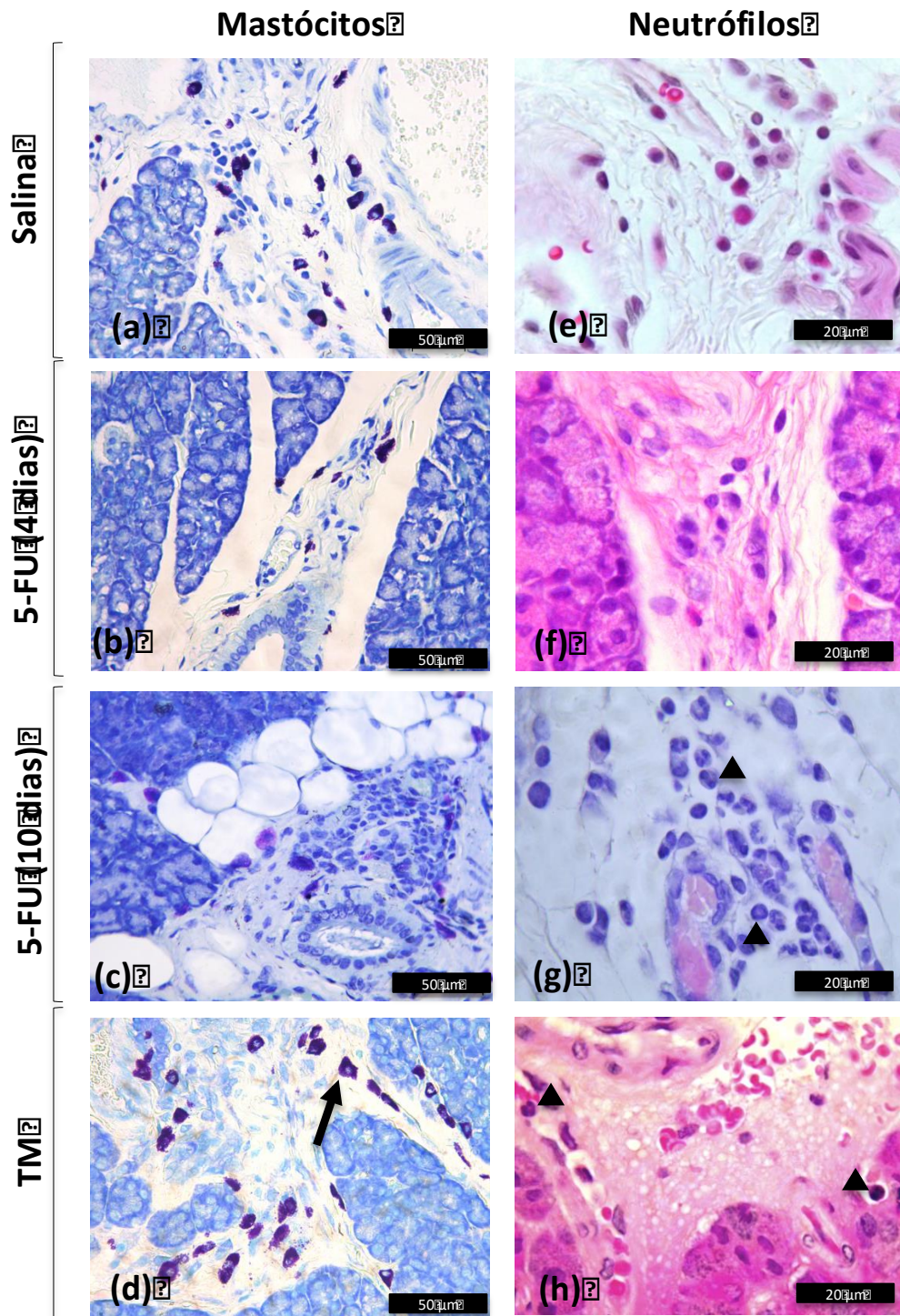


Assim como na glândula submandibular, o 5-FU provocou aumento da inflamação nos 4° e 10° dias na glândula parótida. No 4° dia, o 5-FU induziu ao aumento de linfócitos e plasmócitos ( $p<0,05$ ) (Tabela 5). No 10° dia, o TM induziu ao aumento de mastócitos (Tabela 5; Figura 19d), contudo, foi observado redução destas células quando associado ao 5-FU ( $p<0,05$ ) (Tabela 5, Figura 19b,c). Também, no 10° dia, o 5-FU e o TM induziram ao aumento de neutrófilos (Tabela 5; Figura 19g,h) ( $p<0,05$ ).

Tabela 5 – Efeito do 5-FU nas células inflamatórias da glândula parótida. As células inflamatórias: neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos foram analisadas quantitativamente em 10 campos de magnitude 1000x nas lâminas coradas em HE (n=6-8). Para a contagem dos mastócitos, utilizou-se método de coloração por azul de toluidina (n=10). Na glândula submandibular, observa-se que o 5-FU induziu ao aumento das células inflamatórias, tanto no 4° quanto no 10° dias do modelo experimental. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM por campo (n=10). \* $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). P=parótida; TM=trauma mecânico.

Células	Grupos			
	Salina	5-FU		TM
		4 dias	10 dias	-
Média $\pm$ EPM (células/campo 1000x)				
<b>Mastócitos</b>	7,3 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,4#	8,2 $\pm$ 0,7#	12,2 $\pm$ 1,6*
<b>Linfócitos</b>	2,0 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,5*	1,1 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3
<b>Plasmócitos</b>	0,1 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,5*	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
<b>Macrófagos</b>	0,2 $\pm$ 0,1	0,01 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0
<b>Neutrófilos</b>	0,04 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,6*	0,2 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 0,5*#

Figura 19 – Efeito do 5-FU sobre as células inflamatórias (mastócitos e neutrófilos) na glândula parótida. As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método azul de toluidina (a-d) para análise dos mastócitos (campos de magnitude 400x) e em HE (e-h) para análise dos neutrófilos (campos de magnitude 1000x). A seta indica mastócitos e cabeça da seta indica neutrófilos. SL=sublingual; TM=trauma mecânico.



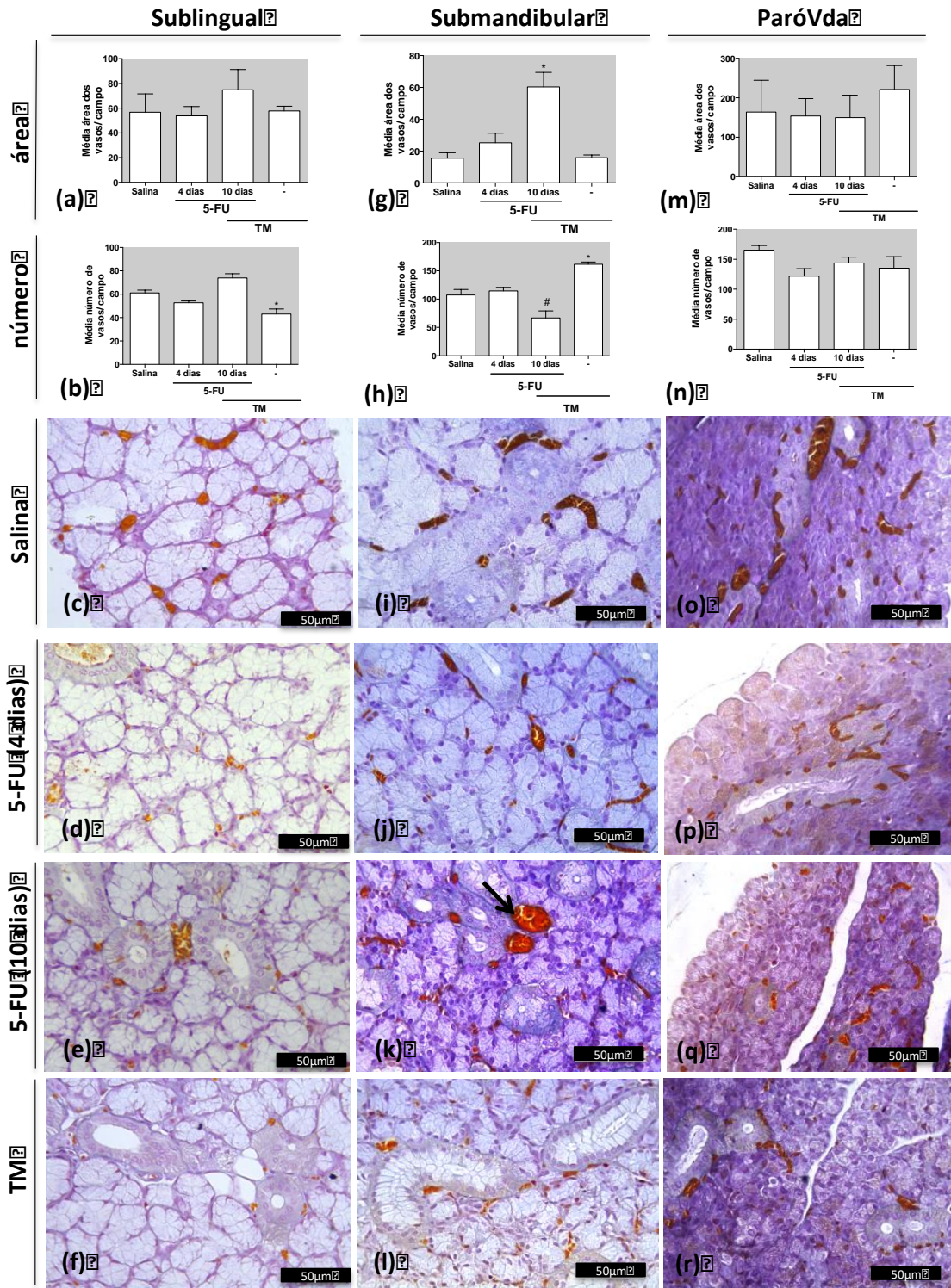
## 5.7 Efeito do 5-FU no sistema vascular das glândulas salivares maiores

Para a análise histopatológica, cortes das glândulas salivares maiores foram corados pela técnica de Mallory, para evidenciação dos capilares e vasos sanguíneos que foram analisados quantitativamente, de acordo com o número e diâmetro dos mesmos.

Na análise vascular da glândula submandibular, verificou-se alteração da vascularização no 10º dia do modelo experimental. Observou-se aumento da área dos vasos no grupo 5-FU do 10º dia indicando vasodilatação, comparando-se os grupos salina e TM (Figura 17 g, k) ( $p < 0,05$ ). Também, no 10º dia, houve aumento do número de vasos no grupo TM (Figura 17 h, l) e diminuição no grupo 5-FU em relação ao grupo TM (Figura 17 h, k) ( $p < 0,05$ ).

Na glândula sublingual, observou-se redução do número de vasos no grupo trauma mecânico em relação ao grupo salina (Figura 17 b, f) ( $p < 0,05$ ). Na glândula parótida, verificou-se que o 5-FU não promoveu alterações estatisticamente significativas (Figura 17 m-r).

Figura 20 – Efeito do 5-FU sobre a vascularização nas glândulas salivares maiores. A análise da vascularização foi realizada de forma quantitativa e foram considerados a área (a, g, m) e o número (b, h, n) dos vasos e capilares sanguíneos. O 5-FU provocou alterações significativas na glândula submandibular no 10º dia do modelo experimental, evidenciada pelo aumento da área e redução do número de vasos (g e h). Para esta análise, foram selecionados 4 lóbulos em cada glândula salivar (parótida, submandibular e sublingual) onde apresentaram maior quantidade de vasos. Em cada lóbulo analisou-se 4 campos na objetiva de 400x. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM por campo ( $n=4$ ). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). As figuras são as fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método tricrômico de Mallory da glândula sublingual (c-f), submandibular (i-l) e parótida (o-r). A seta indica aumento da área do vaso sanguíneo. TM=trauma mecânico.



## **5.8 Efeito do 5-FU nas citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ , das glândulas salivares maiores**

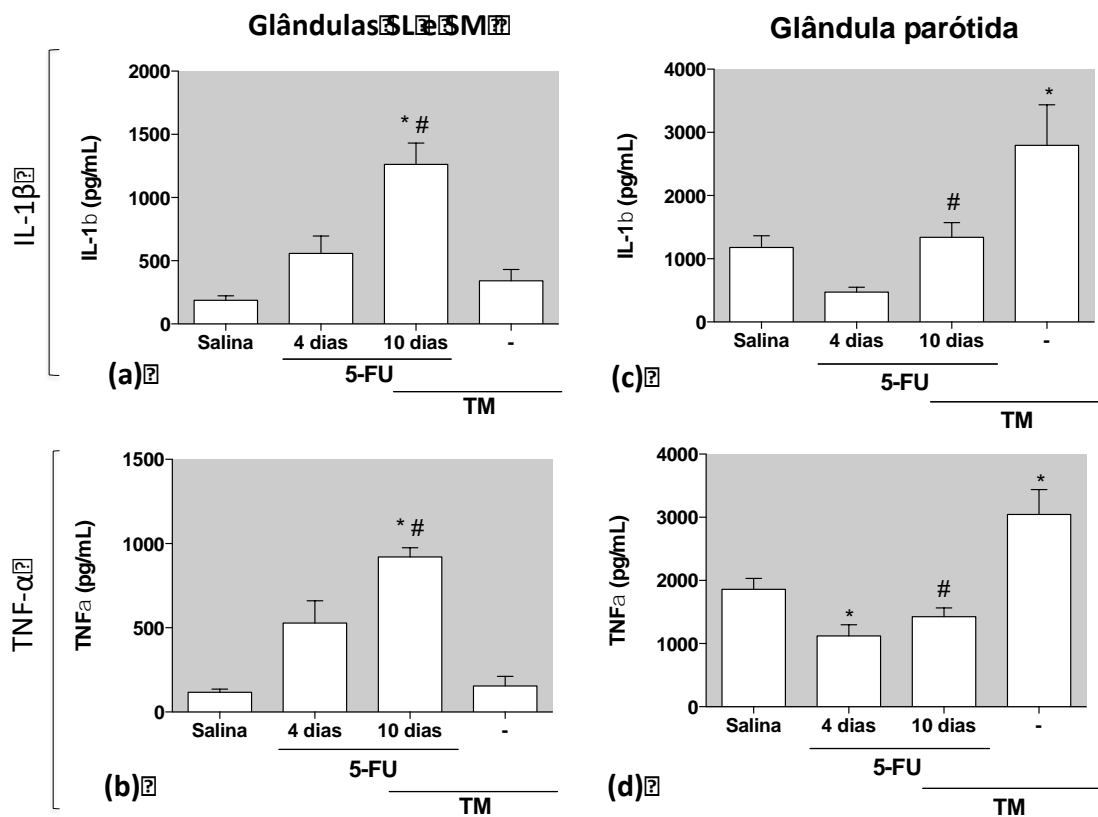
Após coleta cirúrgica das glândulas salivares maiores nos dias programados para eutanásia dos hamsters, parte do tecido foi congelado para realização de determinados ensaios. A análise tecidual das glândulas sublingual e submandibular foi realizada em conjunto devido a continuidade anatômica das mesmas, e a análise da glândula parótida foi realizada separadamente.

Devido ao aumento das células inflamatórias observadas na análise histopatológica, investigamos a possibilidade do 5-FU provocar alterações na produção das citocinas pró-inflamatórias. Citocinas são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (VARELLA; FORTE, 2001).

De acordo com os resultados das dosagens de citocinas neste estudo, pudemos observar que nas glândulas sublingual e submandibular, o 5-FU promoveu aumento significativo de IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  no 10º dia do modelo experimental, em relação aos grupos salina e TM ( $p < 0,05$ ) (Figura 21a,b), concomitante ao aumento do infiltrado inflamatório (mastócitos e neutrófilos, principalmente) observado principalmente no 10º dia, em ambas as glândulas salivares. Além disso, estas alterações coincidem com o aumento do diâmetro dos vasos e capilares sanguíneos, sugerindo vasodilatação, na glândula submandibular.

Na glândula parótida, observou-se que o trauma mecânico promoveu aumento significativo de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no 10º dia do modelo experimental, no grupo TM, em relação ao grupo salina ( $p < 0,05$ ) (figura 21c,d), o que coincide com aumento de mastócitos. Contudo, a associação do TM com 5-FU provocou efeito inibitório destas citocinas, no 10º dia, já que é possível notar, redução das mesmas no grupo 5-FU 4 dias em relação ao grupo salina (Figura 21c,d), o que também coincide com a redução do número de mastócitos nessa glândula.

Figura 21 – Efeito do 5-FU nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (a e c) e TNF- $\alpha$  (b e d) nas glândulas salivares maiores. Após a remoção cirúrgica, as glândulas salivares maiores foram armazenadas em microtubos para posterior realização dos ensaios teciduais. Foi observado que o 5-FU promoveu aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no 10º dia nas glândulas sublingual e submandibular. Contudo, na glândula parótida, o 5-FU provocou inibição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , se comparado ao grupo TM. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM (n=5). \* $p$ <0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p$ <0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). SL=sublingual; SM=submandibular; TM=trauma mecânico.





## 5.9 Efeito do 5-FU nos parâmetros de estresse oxidativo nas glândulas salivares maiores

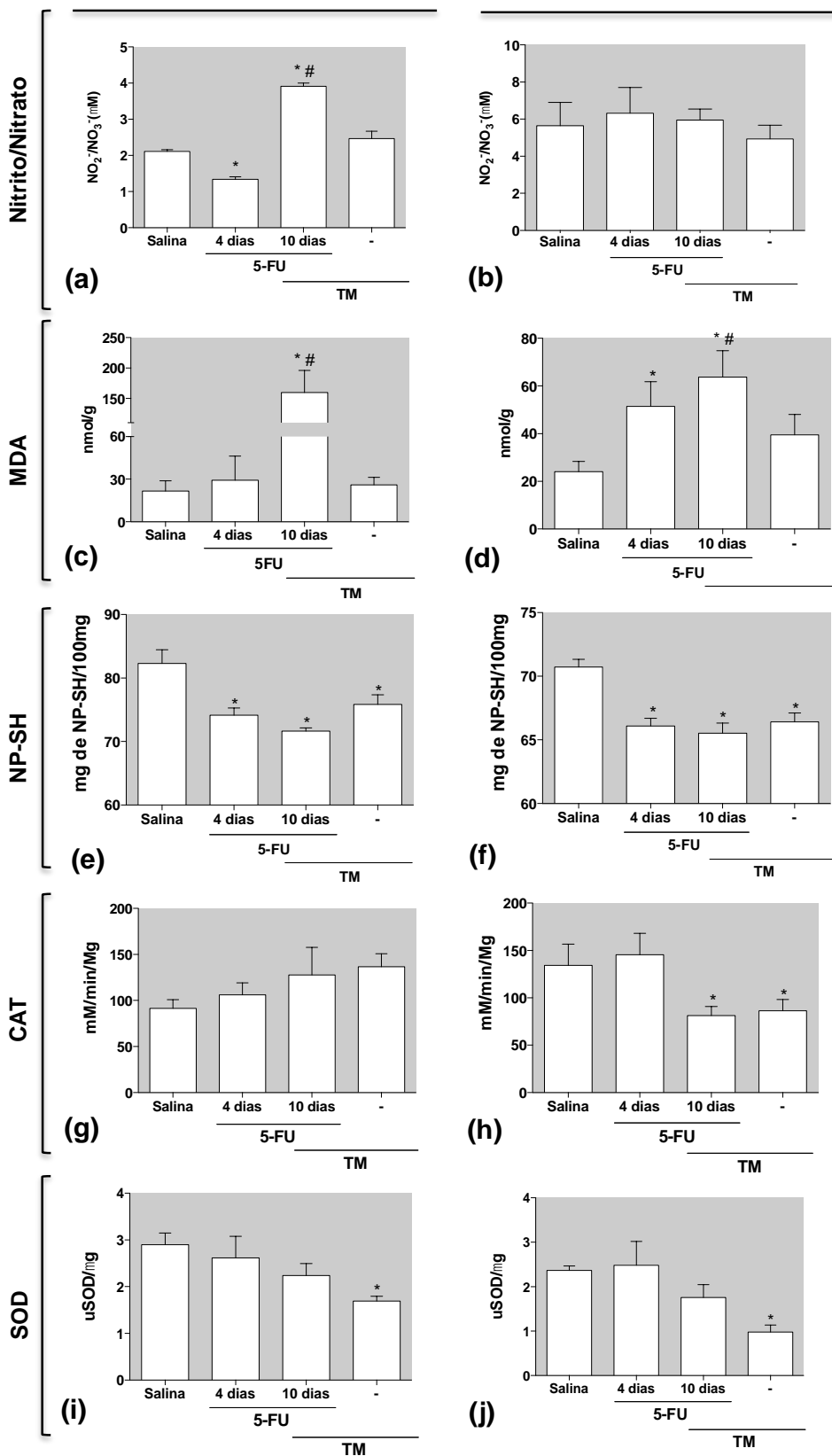
O presente estudo também objetivou investigar o estresse oxidativo nos tecidos das glândulas salivares maiores através dos principais biomarcadores, como nitrito/nitrato, malonaldeído (MDA), grupos sulfilídricos não proteicos (NP-SH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A coleta e preparo do tecido glandular para os ensaios de estresse oxidativo foi realizado da mesma maneira que a dosagem de citocinas pró-inflamatórias.

Os resultados indicam que o 5-FU pode induzir significativamente o estresse oxidativo nos tecidos das glândulas sublingual, submandibular e parótida, observado principalmente no 10º dia após sua primeira administração, detectada pela ativação de diferentes mecanismos de defesa antioxidantes. Observou-se aumento significativo dos níveis de nitrito/nitrato e MDA, associado com redução de NP-SH, um antioxidante não enzimático, observado nos tecidos das glândulas sublingual e submandibular ( $p < 0,05$ ) (Figuras 22a,c,e), enquanto há significativo aumento nos níveis de MDA, relacionado a diminuição dos níveis de NP-SH e atividade de CAT, observados no tecido da glândula parótida ( $p < 0,05$ ) (Figuras 22d,f,h,j).

Figura 22 – Efeito do 5-FU nos parâmetros do estresse oxidativo nas glândulas salivares maiores. Após a remoção cirúrgica, as glândulas salivares maiores foram armazenadas em microtubos para posterior realização dos ensaios teciduais. Os resultados mostram produção do estresse oxidativo nas glândulas salivares maiores, sendo mais evidente glândulas sublingual e submandibular do que na glândula parótida, no 10º dia. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). SL=sublingual; SM=submandibular; TM=trauma mecânico.

**Glândulas SL e SM**

**Glândula Parótida**



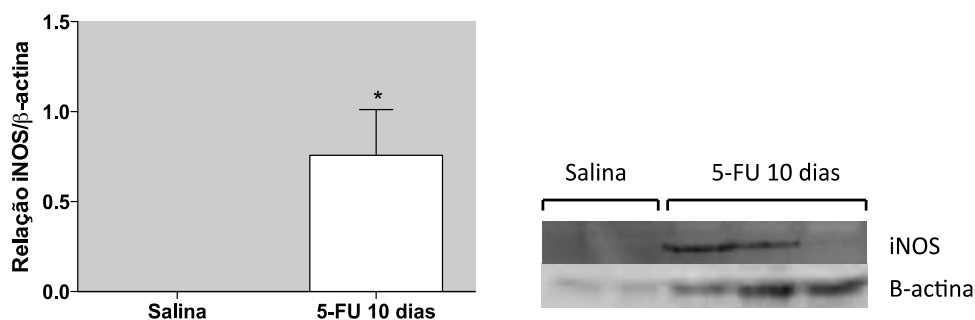
### 5.10 Efeito do 5-FU na expressão proteica da NOSi (óxido nítrico sintase induzida) nas glândulas sublingual e submandibular

Com o objetivo de verificar a produção do óxido nítrico nas glândulas sublingual e submandibular, no 10º dia do modelo experimental, procuramos identificar a expressão proteica de NOSi por meio do western blotting.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que desempenha um papel na resposta defensiva do hospedeiro à infecção em tecidos orais e é sintetizado a partir da conversão da L-arginina à L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (UGAR-CANKAL; OZMERIC, 2006).

Corroborando com a produção do estresse oxidativo principalmente no 10º dia, foi possível notar, nas glândulas sublingual e submandibular, aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), em relação ao grupo salina (Figura 23) ( $p < 0,05$ ).

Figura 23 – Efeito do 5-FU na expressão da proteína iNOS nas glândulas sublingual e submandibular do grupo 5-FU-10 dias por western blotting. Após a anestesia dos animais, as glândulas salivares foram removidas cirurgicamente e armazenadas em microtubos para posterior realização dos ensaios teciduais. Nota-se aumento da expressão da enzima NOSi, no 10º dia do modelo experimental. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM ( $n=3-6$ ). (a)  $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina (Teste  $t$  de student). iNOS=óxido nítrico sintase induzida.



### 5.11 Efeito do 5-FU na morte e proliferação celular das glândulas submandibular e parótida

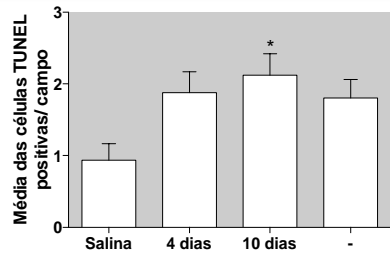
O presente estudo também buscou verificar a possibilidade do 5-FU provocar morte celular através do marcador TUNEL e, posteriormente analisar a recuperação do tecido por meio da proteína Ki-67, que marca células em proliferação, por imunohistoquímica.

Na glândula submandibular, foi possível notar que o 5-FU pode induzir a morte (Figuras 24a-e) e proliferação celular (Figuras 24f-j), observados 10 dias após a primeira administração da droga se comparados aos grupos salina e trauma mecânico ( $p<0,05$ ).

Já, na glândula parótida, foi observado aumento das células em morte celular apenas 4 dias após a primeira administração do 5-FU, em comparação ao grupo salina ( $p<0,05$ ) (Figuras 25a-i). Ademais, verificou-se aumento da proliferação celular no 10º dia, nos grupos TM e 5-FU, em relação ao grupo salina ( $p<0,05$ ) (Figuras 25f-j).

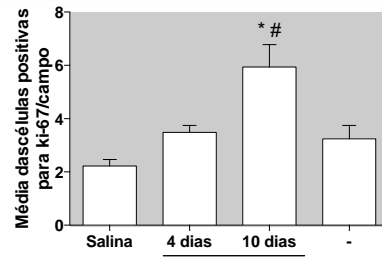
Figura 24 – Efeito do 5-FU sobre a morte e proliferação celular da glândula submandibular. Para a análise da morte celular, foi utilizada o método TUNEL, onde foram considerados 10 campos (400x) ( $n=4$ ). Para análise da proliferação celular foi utilizada a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti-Ki-67, onde foram considerados 10 campos (200x) ( $n=2$ ). Nota-se que na glândula submandibular, há aumento concomitante da morte celular e da proliferação 10 dias após a primeira administração do 5-FU. Os valores estão plotados como média  $\pm$  EPM por campo. \* $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina; # $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo TM (ANOVA/Bonferroni). As figuras são as fotomicrografias representativas dos cortes do tecido glandular corados pelo método TUNEL (b-e) e por imunohistoquímica para o ki-67 (g-j). TM=trauma mecânico.

### TUNEL



(a)

### Ki-67



(f)

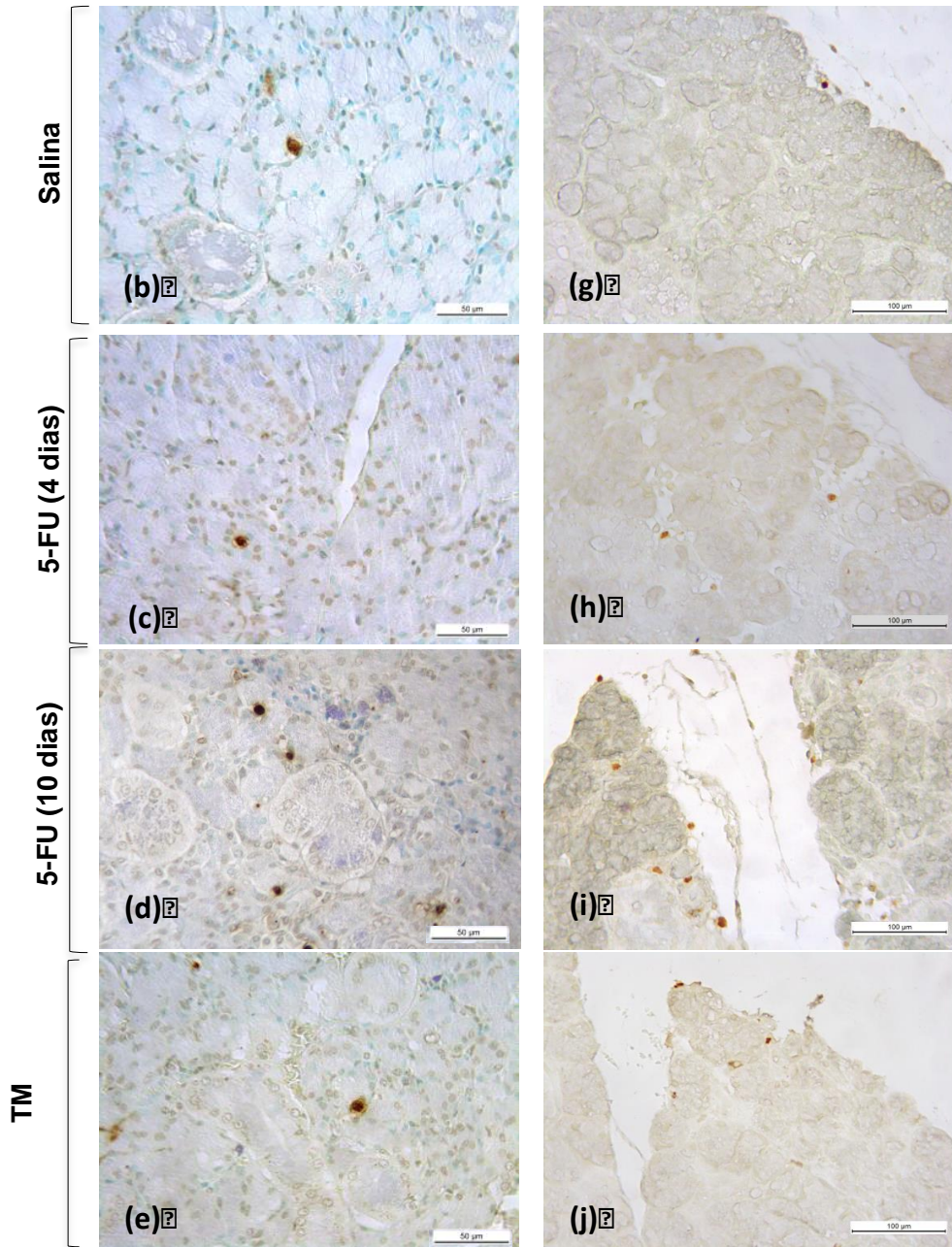
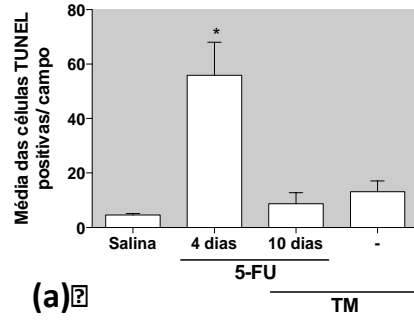


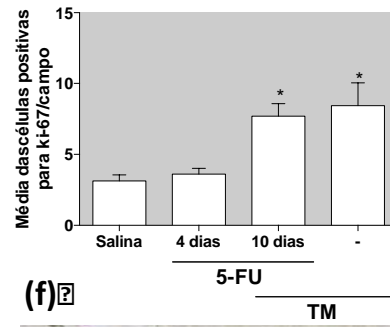
Figura 25 – Efeito do 5-FU sobre a morte e proliferação celular da glândula parótida. Para a análise da morte celular, foi utilizada o método TUNEL, onde foram considerados 10 campos (400x) (n=4). Para análise da proliferação celular foi utilizada a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti-Ki-67, onde foram considerados 10 campos (200x) (n=2). Nota-se que na glândula parótida, há aumento da morte celular 4 dias após a primeira administração do 5-FU e aumento proliferação no 10º dia, nos grupos 5-FU e TM. Os valores estão plotados como média ± EPM por campo. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo salina (ANOVA/Bonferroni). As figuras são as fotomicrografias representativas dos cortes do tecido glandular corados pelo método TUNEL (b-e) e por imunohistoquímica para o ki-67 (g-j). TM=trauma mecânico.

### TUNEL



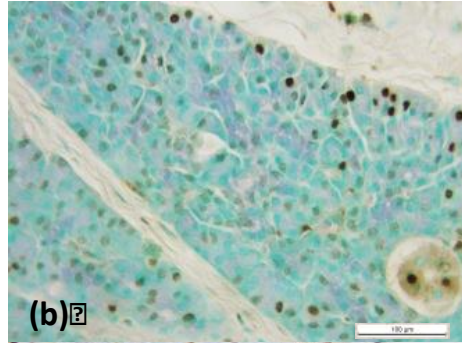
(a)

### Ki-67

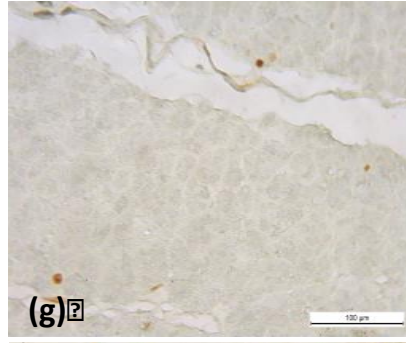


(f)

Salina

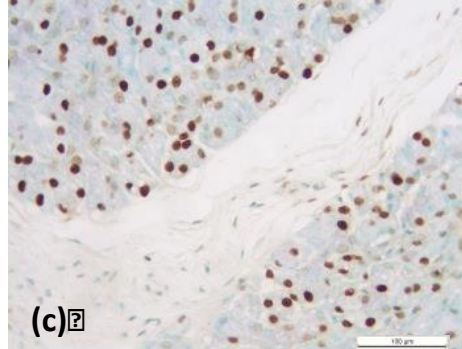


(b)

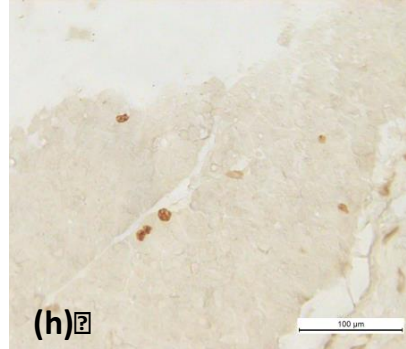


(g)

5-FU (4 dias)

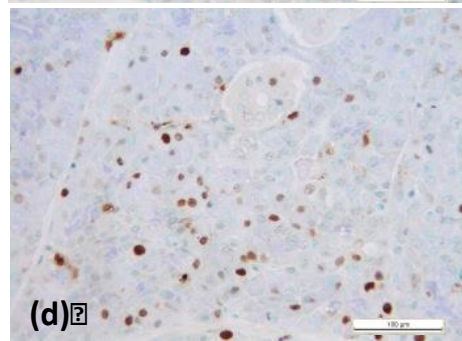


(c)

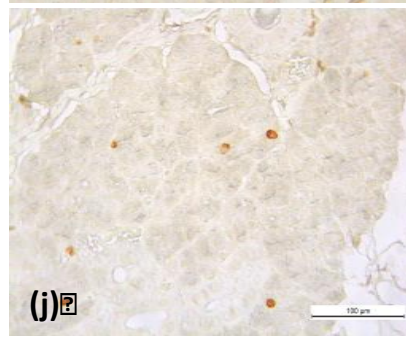


(h)

5-FU (10 dias)

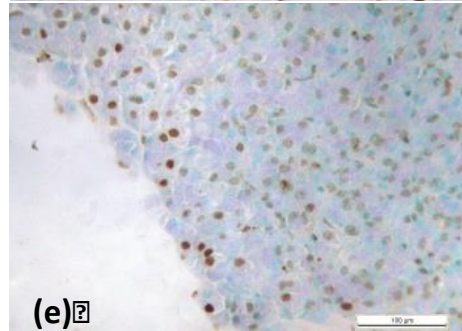


(d)

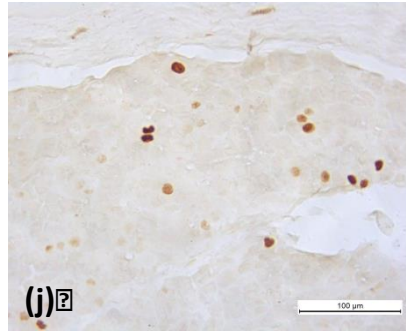


(i)

TM



(e)



(j)

## 6 DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos a partir de nossos experimentos, mostramos que o 5-FU, em modelo de mucosite oral, pode induzir inflamação e aumento da produção de radicais livres em glândulas salivares concomitantemente à alteração no fluxo e composição salivar.

O protocolo de indução da mucosite oral pelo 5-FU utilizado neste estudo foi baseado no modelo proposto inicialmente por Sonis *et al.* (1990) que foi posteriormente modificado em nosso grupo de estudo, de acordo com Lima *et al.* (2005) e Leitão *et al.* (2007). Sonis *et al.* (1990) propuseram o modelo de mucosite oral em hamsters, com doses intraperitoneais de 60 mg/kg do 5-FU nos dias 0, 5 e 10 e induziram ao trauma mecânico na mucosa jugal nos 2 primeiros dias, como fator potencializador do quimioterápico e que possui finalidade de mimetizar o atrito que ocorre durante a mastigação, como causada por restaurações e próteses. Esta espécie se mostrou adequada para o estudo por possuir particularidades anatômicas favoráveis, como mucosa jugal móvel e abundante, capaz de induzir a mucosite oral sem mortalidade significativa.

Com o intuito de exacerbar a estomatotoxicidade, Lima *et al.* (2005) e Leitão *et al.* (2007) propuseram esquemas de doses diferenciadas de 5-FU, de 60 mg/kg e 40 mg/kg, e o trauma mecânico foi realizado no 4º dia devido o início da leucopenia e perda de peso dos animais ocorrer a partir do 4º dia. Ainda, Lima *et al.* (2005) realizaram um estudo piloto em que foi verificada as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais nos dias 0, 4, 5, 10, 12, 14 e 16 após a primeira administração do 5-FU, e como resultado observaram que o pico da inflamação ocorreu no 10º dia, por este motivo, este dia foi escolhido para o sacrifício dos animais do grupo 5-FU 10 dias.

No presente estudo, a análise histopatológica demonstrou que o 5-FU promoveu alterações no tecido glandular quatro dias após a sua primeira administração, evidenciado pelo aumento da vacuolização na glândula parótida e edema periductal na glândula submandibular. As alterações teciduais nas glândulas salivares observadas em nosso trabalho foram previamente descritas em estudos realizados em roedores submetidos à periodontite experimental ou à radioterapia, em região de cabeça e pescoço, observadas principalmente na glândula submandibular (HENRIKSSON *et al.*, 1994; EKUNI *et al.*, 2010; XIANG; XIU-XIU;



FU-YIN, 2013).

Com o objetivo de verificar a associação entre periodontite experimental e disfunção glandular, Ekuni *et al.* (2010) observaram estresse oxidativo e aumento da produção de TNF- $\alpha$  no plasma, associado ao aumento da vacuolização e morte celular na glândula submandibular nos ratos submetidos à periodontite experimental. O estudo concluiu que o desequilíbrio entre o estado oxidante e antioxidante no plasma pode estar associado à vacuolização no tecido, culminando à morte celular.

Xiang, Xiu-xiu e Fu-yin (2013) avaliaram glândulas submandibulares de ratos submetidos à radioterapia onde analisaram o efeito protetor da felinefrina, um agonista seletivo do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. Os autores verificaram que, nos animais submetidos à radioterapia, a glândula submandibular demonstrou atrofia e vacuolização nas células acinares, e quando tratados com felinefrina, as alterações histopatológicas encontradas foram menos evidentes, semelhante ao grupo controle.

O edema periductal observado principalmente na glândula submandibular no presente estudo, foi previamente relatado por Henriksson *et al.* (1994) na glândula parótida de ratos submetidos à radioterapia em cabeça e pescoço. Concomitante ao edema periductal, os autores verificaram uma redução das células acinares, que foi dose-dependente.

Em nosso grupo de pesquisa, estudos prévios demonstraram que, no modelo experimental de mucosite oral induzida pelo 5-FU, o 1400W e a amifostina foram capazes de reverter a redução da salivagem causada pelo 5-FU (LEITÃO *et al.* 2006; BARBOSA, 2011). O 1400W (n-(3-(Aminometil) benzil) acetamidina) é um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzida (NOS2) que foi capaz de prevenir a redução da produção salivar não estimulada, no 4º dia do experimento, quando comparado ao grupo submetido à MO induzida por 5-FU. Foi ainda avaliado neste estudo, a produção salivar não estimulada no 10º dia do experimento, não sendo encontrado porém, diferença entre os grupos; sugerindo, portanto, que neste dia a produção salivar já teria sido restabelecida (LEITÃO *et al.* 2006). A amifostina é um antioxidante de amplo espectro, com efeito protetor frente aos efeitos colaterais provenientes da radioterapia e quimioterapia (BARBOSA, 2011). Neste estudo constatou-se que os animais tratados amifostina, apresentaram prevenção da redução da taxa de salivagem causada pelo quimioterápico, quando avaliou-se a

diferença da taxa de salivação do 10° em relação ao 4° dia.

Nosso trabalho demonstrou que o 5-FU pode induzir à redução do fluxo salivar estimulado pela pilocarpina, observado no 4° dia do modelo experimental, contudo o fluxo salivar foi restabelecido no 10° dia. Conforme este resultado, alguns estudos em humanos e roedores demonstram que o 5-FU, administrado concomitantemente ou não à outras drogas, podem provocar redução temporária do fluxo salivar estimulado (SANBORG; SIEGEL, 1990; JENSEN *et al.*, 2008b; MAZZEO *et al.*, 2009). Ainda, em nosso estudo, a redução do fluxo salivar foi observado concomitantemente ao edema periductal e vacuolização nas células acinares nas glândulas submandibular e parótida, respectivamente, associados ao infiltrado celular mononuclear.

As glândulas salivares apresentam diferenças em relação à contribuição do volume da saliva produzida. As glândulas submandibular e sublingual contribuem em cerca de 65-75% do volume total da saliva produzida quando estão em repouso. Contudo, quando a salivação é estimulada, a glândula parótida pode passar a contribuir em 50% do volume total da produção salivar (DAWES; ONG, 1973; HUMPHREY; WILLIAMSON 2001; JENSEN *et al.*, 2010b).

Jensen *et al.* (2008b) avaliaram pacientes com câncer de mama, durante e após o tratamento com ciclofosfamida, epirrubicina ou metrotexato e 5-FU onde observaram redução do fluxo salivar estimulado e não estimulado durante o tratamento, permanecendo reduzido por 6 meses. Contudo, a taxa de salivação da glândula parótida não foi significativamente afetada, sugerindo que a redução da produção da saliva total estimulada é decorrente diminuição da produção salivar pelas células acinares das glândulas submandibulares.

Em animais, Sandborg e Siegel (1990) avaliaram as alterações provocadas pelo 5-FU exclusivamente na função salivar da glândula parótida, através da técnica do canulamento pelo ducto excretor. O estudo demonstrou redução do fluxo salivar dos animais que receberam exclusivamente administração do 5-FU e dos animais que receberam 5-FU associado ao isoprotenerol, medicamento simpaticomimético que atua ao nível dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Contudo, nos animais que foram submetidos ao 5-FU concomitantemente à pilocarpina (medicamento que possui efeitos semelhantes aos da [acetilcolina](#), ativando o [sistema parassimpático](#) para aumentar a produção de secreções das [glândulas exócrinas](#) no organismo), o fluxo salivar permaneceu inalterado.

De acordo com Mazzeo *et al.* (2009), pacientes diagnosticados com câncer de cólon submetidos ao 5-FU e leucovorina, apresentaram redução da salivação estimulada e não estimulada durante o tratamento quimioterápico. Contudo, a taxa de salivação foi recuperada 21 dias após o término do tratamento. Em conformidade, nosso estudo demonstrou que houve recuperação no 10º dia, sugerindo efeito temporário do 5-FU na taxa de salivação estimulada.

Além disso, nossos resultados demonstram que o 5-FU pode modificar a qualidade da saliva, principalmente pela alteração das atividades enzimáticas e antioxidantes, como redução da lisozima e superóxido dismutase (SOD), e aumento de catalase (CAT). Contudo, a análise da defesa imunológica pela dosagem da IgA na saliva não apresentou alteração. Em concordância com o atual estudo, Mazzeo *et al.* (2009), mostraram que a quantidade de IgA na saliva permaneceu inalterada quando pacientes foram tratados com leucovorina e 5-FU. No entanto, Janković *et al.* (1995) avaliaram pacientes com doenças metastáticas tratados com 5-FU associado a outras drogas e observaram redução da IgA e aumento da IgG.

Em referência a dosagem da lisozima na saliva, estudos em humanos demonstram resultados divergentes. Laine *et al.* (1992) e Meurman *et al.* (1997) avaliaram pacientes com diagnóstico de linfoma que foram tratados com quimioterapias variadas e nenhum dos estudos utilizou-se o 5-FU. Semelhante ao resultado observado em nosso estudo, o primeiro estudo revelou redução da atividade da lisozima, contudo, o segundo estudo revelou aumento da lisozima associada ao aumento de IgA, IgG e IgM. Esta diferença verificada entre os estudos pode estar associada à espécie dos animais e ao uso de diferentes protocolos terapêuticos nos estudos.

Embora não existam estudos que demonstrem o estresse oxidativo induzido por quimioterápicos na saliva, alguns trabalhos demonstram que a doença periodontal pode estimular o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e antioxidantes (CANAKCI *et al.*, 2009; ALMERICHI-SILLA *et al.*, 2015; TRIVEDI *et al.*, 2015). Canakci *et al.* (2009) avaliaram o estresse oxidativo na saliva de pacientes diagnosticados com doença periodontal. Os autores verificaram que elevados níveis de radicais livres como 8-OHdG e malonaldeído (MDA), e redução da atividade antioxidante (SOD e glutatona peroxidase), parecem coincidir com o aumento da inflamação causada pela doença periodontal.

Conforme este estudo, Trivedi *et al.* (2015) também demonstraram

aumento de radicais livres verificado pelo MDA e redução da atividade antioxidante como SOD, CAT e glutathione redutase na saliva, mostrando que o MDA possui correlação direta com a doença periodontal, enquanto que as enzimas antioxidantes demonstraram correlação inversa. Além disso, Almerich-silla *et al.* (2015) demonstraram que altos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (8-OHdG, MDA, glutathione peroxidase e capacidade antioxidante total) na saliva durante a doença periodontal estão correlacionados ao aumento de variados tipos de bactérias. Este resultado favorece a hipótese de que a mudança da microbiota oral observada no modelo de mucosite oral induzida pelo 5-FU pelo aumento da população de bactérias (SKEFF *et al.*, 2014) pode explicar o aumento de CAT na saliva, observada no presente estudo, produzida pelas bactérias.

Os radicais livres, como por exemplo o óxido nítrico, têm sido implicados na patogênese de uma variedade de doenças na região bucal como doença periodontal (UĞAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2010), síndrome de Sjogren (BENCHABANE *et al.*, 2016), disfunção salivar radio-induzida (HANAUE *et al.*, 2007) e desordens associadas à disfunção têmporo-mandibular (GÜVEN *et al.*, 2015). Nossos resultados também apontam que o 5-FU pode induzir ao estresse oxidativo nos tecidos das glândulas salivares, verificado através do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e enzimas antioxidantes, nas quais são produzidas para manter a homeostase. Ademais, o presente estudo sugere a peroxidação lipídica como resultado do estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA, o que conduz a mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana celular, ocasionando danos nas organelas e, por fim, conduzindo à morte celular (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). O estresse oxidativo, sugerido pelo aumento de nitrito e MDA, e diminuição de NP-SH nas glândulas submandibulares, no 10º dia do modelo experimental, é concomitante com aumento da morte celular e incremento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, na glândula parótida, o aumento no MDA e morte celular foram evidenciados antecipadamente, no 4º dia do modelo experimental, coincidindo com a vacuolização e diminuição do fluxo salivar estimulado.

No presente estudo verificou-se também, aumento da expressão enzima NOSi na glândula submandibular, no 10º dia do modelo experimental, simultaneamente a recuperação do fluxo salivar. A NOSi é uma isoenzima responsável pela produção do radical livre NO, a partir do aminoácido L-arginina. É

encontrada em vários tipos celulares como macrófagos e neutrófilos, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios, tais como IL-1, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  e lipopolissacarídeos (LPS), sendo produzido em altas quantidades e por longo período de tempo (KENDAL; MARSHALL; BARTOLD, 2001). O aumento da expressão de NOSi pode provocar efeitos deletérios na função das células e tecidos, principalmente porque o NO reage com superóxidos, produzindo peroxinitrito, um produto que em altas concentrações pode afetar a produção de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (PACHER *et al.*, 2007).

Com o objetivo de avaliar o efeito da expressão da NOSi na secreção salivar frente a um estímulo inflamatório, Correia *et al.* (2010) verificaram a resposta da glândula salivar associada à estimulação colinérgica, em decorrência da administração de lipopolissacarídeos no ducto da glândula submandibular de ratos. Os autores observaram aumento da expressão de NOSi concomitantemente ao aumento da secreção salivar estimulada, o que parece compensar qualquer hipofunção salivar decorrente da inflamação glandular.

Como visto neste trabalho, o 5-FU pode modificar a vascularização nas glândulas salivares. Sob o efeito do 5-FU, as glândulas submandibulares reagem com vasodilatação no 10º dia, o que pode ser decorrente do aumento do estímulo simpático ou parassimpático, ou ainda, pelo aumento de metabólitos vasodilatadores no tecido, como o óxido nítrico (LOOMS *et al.*, 2002) sugerido pelo aumento dos níveis de nitrito e expressão de iNOS observado no presente estudo.

Ainda, neste estudo, foi observada redução de NP-SH, SOD e CAT nos tecidos das três glândulas salivares maiores, revelando que a atividade enzimática antioxidante não foi capaz de controlar o estresse oxidativo. De acordo com este estudo, Campos *et al.* (2014) avaliaram a atividade enzimática nas glândulas sublinguais e submandibulares de hamsters tratados com 5-FU, no entanto, neste modelo experimental o trauma mecânico não foi induzido. Os autores observaram redução das proteínas totais, no 10º dia, o que foi sugerido pelos autores como efeito deletério na função celular devido aos danos provocados nos processos de síntese e liberação de proteínas. Diferente de nosso estudo, em relação às enzimas antioxidantes no tecido glandular, Campos *et al.* (2014) demonstraram que a administração do 5-FU provocou significativo aumento nas atividades de CAT e peroxidase, o que foi justificado pelo efeito do 5-FU em liberar radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio com intuito de danificar o DNA celular.

Em conjunto com o estresse oxidativo, no atual trabalho foi demonstrado que o 5-FU induz ao aumento dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nas glândulas sublinguais e submandibulares no 10 $^{\circ}$  dia, porém, não observado nas glândulas parótidas. O aumento destas citocinas foi concomitante à infiltração de neutrófilos e mastócitos nas glândulas submandibulares. Estes achados sugerem uma associação entre inflamação e estresse oxidativo somente nas glândulas submandibulares, que mostraram maior produção de nitrito, MDA e expressão de NOSi no 10 $^{\circ}$  dia do modelo experimental.

Semelhante ao estudo de Yao *et al.* (2005), onde foram avaliadas as glândulas submandibulares de camundongos submetidos a administração de lipopolissacarídeos, observou-se incremento das citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , demonstrado pelas expressões de mRNAs. A citocina IL-1 $\beta$  foi, também, detectada por imunohistoquímica, nos grânulos secretórios localizados na região apical das células dos túbulos convolutos e pela expressão por mRNAs na saliva. Os autores puderam concluir que as glândulas submandibulares apresentam importante papel no sistema de defesa da cavidade oral, dificultando a entrada de microorganismos.

A interleucina-1 (IL-1) é produzida principalmente por monócitos e macrófagos. Outros tipos celulares podem produzir IL-1, como células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T. Além disso, a citocina IL-1 pode induzir a liberação de histamina a partir de mastócitos no local da inflamação e, em seguida, a histamina pode estimular a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (DINARELLO, 1988). A citocina fator de necrose tumoral (TNF) é sintetizada principalmente por macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e natural killer (NK) e suas ações são semelhantes às da IL-1, como alterações endoteliais, participação na atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos (VILCEK; LEE, 1991; MACKAY *et al.* 1993). Além disso, TNF pode induzir à apoptose e estimular à ação de células polimorfonucleares (PMN) (HULTGREN; KOPF; TARKOWSKI, 1998).

Diferente do resultado observado na dosagem das citocinas pró-inflamatórias na glândula submandibular, a glândula parótida respondeu com aumento das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  decorrente somente do trauma mecânico e ainda, o 5-FU promoveu efeito inibitório das mesmas citocinas nos 4 $^{\circ}$  e 10 $^{\circ}$  dias do modelo experimental. Associado a estes resultados, observamos que o trauma

mecânico induziu ao aumento de mastócitos e o 5-FU promoveu inibição destas células nos 4° e 10° dias e ainda. A queda dos mastócitos observadas na glândula parótida, pode ser decorrente da inibição da mastopoiese pela administração do 5-FU. Ophir *et al.* (1993) verificaram o efeito deste quimioterápico na mastopoiese *in vivo* e *in vitro* através da coleta da medula óssea de ratos. O estudo observou efeito inibitório dose-dependente e irreversível, e que apesar do restabelecimento destas células após 1 ou 2 dias após a administração do 5-FU, as mesmas não apresentavam funcionalidade e encontravam-se em repouso.

Kamachi *et al.* (2002) avaliaram linhagens celulares de glândulas salivares de pacientes com síndrome de Sjogren e demonstraram que as citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  apresentam importante papel na regulação da apoptose nas células acinares e ductais, por meio de mecanismos distintos e sinérgicos, modulando a função glandular. Portanto, esses autores sustentam os achados do atual estudo, demonstrado nas glândulas sublingual e submandibular, pelo aumento da morte celular no 10° dia. Considera-se que, altos níveis de citocinas pode ser considerado como importante biomarcador para investigar as causas da xerostomia, assim como podem ser um potencial alvo terapêutico, principalmente nas glândulas submandibulares, já que nem sempre a hipofunção salivar é acompanhada de alterações celulares e/ou teciduais (AMER *et al.*, 2011).

Neste estudo, foi verificado aumento da positividade para o TUNEL, observado no 4° dia nas glândulas parótidas e, no 10° dia, simultaneamente, com a proliferação celular nas glândulas submandibulares. Na glândula parótida, houve aumento da proliferação celular também no 10° dia, o que também pode contribuir com a recuperação da produção salivar.

De acordo com nossos resultados, Xiang *et al.* (2013) avaliaram o efeito protetor da ativação do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico em glândulas submandibulares de ratos submetidos a radioterapia e, demonstraram que a glândula irradiada apresentou concomitante aumento da apoptose e proliferação celular. Quando os animais foram tratados com felinefrina, houve redução na apoptose e a proliferação foi ainda maior, comparada com as glândulas submandibulares não tratadas. Muhvic-Urek *et al.* (2006) também demonstraram que o processo de morte celular e regeneração tecidual podem ser observados simultaneamente, em glândulas submandibulares de ratos irradiados com 7.5 Gy.

Embora as três glândulas salivares reajam frente ao estímulo do 5-FU, as

glândulas submandibulares e parótidas foram significativamente mais afetadas e, também, respondem de formas diferentes, o que pode ser justificado pelas suas características histopatológicas e localizações distintas. Da mesma maneira, Zalewska *et al.* (2015) avaliaram o estresse oxidativo nas glândulas submandibulares e parótidas em animais diabéticos induzidos por streptozotocina e concluíram que estas glândulas respondem de formas diferentes, sugerindo como justificativa sua estrutura histológica e seu metabolismo desiguais.

Em suma, nossos resultados sugerem que o 5-FU induz ao estresse oxidativo, inflamação, gerando edema periductal, vacuolização, morte celular, resultando na disfunção e qualidade salivar. As glândulas parótidas respondem com menos inflamação, provavelmente pela sua configuração histológica e anatômica. O conhecimento do efeito das drogas antitumorais nas glândulas salivares pode contribuir com o manejo mais apropriado da xerostomia e mucosite oral.



## 7 CONCLUSÕES

O 5-FU, em modelo de mucosite oral, induz à redução da taxa de salivação quatro dias após a primeira administração e ainda, altera a composição salivar pela redução da lisozima e SOD associado ao aumento de CAT, principalmente 10 dias após a primeira administração do 5-FU.

Além disso, o 5-FU provoca alterações teciduais observadas principalmente no 4º dia do modelo experimental evidenciadas pela vacuolização na glândula parótida e edema periductal na glândula submandibular.

O presente estudo também mostrou que o 5-FU induziu o aumento do estresse oxidativo e inflamação, sendo a última mais evidente nas glândulas sublingual e submandibular do que na glândula parótida. Ademais, na glândula submandibular, o 5-FU em modelo de mucosite oral, estimulou de forma concomitante a morte e proliferação celular 10 dias após sua primeira administração, e na glândula parótida, a morte celular foi observada no 4º dia e a proliferação, no 10º dia do modelo experimental.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2015
- AHMED, T.; ENGELKING, T.; SZALYGA, J. Propantheline prevention of mucositis from etoposide. **Bone Marrow Transplant**, v. 2, n. 12, p.131-132, 1993.
- AL-FAKEEH, A. et al. A pilot trial of FLOT neoadjuvant chemotherapy for resectable esophagogastric junction adenocarcinoma. **Med Oncol**, v. 33, n. 7, p.62, 2016.
- ALONSO, P.; BASTÉ, M.A.; CREUS, M. Prevención y tratamiento de la mucositis en el paciente oncohematológico. **Farmacia Hospitalaria**, n. 25, p.139-149, 2001.
- AL-ANSARI, S. et al. Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies. **Curr Oral Health Rep**, v. 2, n. 4, p.202-211, 2015.
- AMADORI, F. et al. Low-level laser therapy for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in childhood: a randomized double-blind controlled study. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 6, p.1231-6, 2016.
- AMANO, O. et al. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop. **Acta Histochem Cytochem**, v. 31, p.241-50, 2012.
- AMER, M. et al. Reduced methacholine-induced submandibular salivary secretion in rats with experimental periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 56, p.421-7, 2011.
- ALMERICH-SILLA, J.M. et al. Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. **Dis Markers** 2015:653537, 2015.
- AMSTUTZ, U.; FROEHLICH, T.K.; LARGIADÈR, C.R. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. **Pharmacogenomics**, v. 12, p.1321-36, 2011.
- DE ARAÚJO, A.A. et al. Azilsartan reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- $\alpha$  in an oral mucositis model. **PLoS One**, v. 10, n. 2, e0116799, 2015.
- ASKARIFAR, M. et al. The Effects of Oral Cryotherapy on Chemotherapy-Induced Oral Mucositis in Patients Undergoing Autologous Transplantation of Blood Stem Cells: A Clinical Trial. **Iran Red Crescent Med J**, v. 18, n. 4, e24775, 2016.
- ATKINSON, J.C.; GRISIUS, M.; MASSEY, W. Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. **Dent Clin N Am**, v. 49, p.309–326, 2005.
- AVSAR, A. et al. Long-term effects of chemotherapy on caries formation, dental development, and salivary factors in childhood cancer survivors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, p.781–789, 2007.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**, 360438, 2014.

BANDRÉS, E. et al. Pharmacogenomics in colorectal cancer: The first step for individualized-therapy. **World J Gastroenterol**, v. 13, 5888-5901, 2007.

BARBOUR, K.W.; BERGER, F.G. Cell death in response to antimetabolites directed at thymidylate synthase. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 61, p.189-201, 2008.

BARRETT, A.P. Clinical characteristics and mechanisms involved in chemotherapy-induced oral ulceration. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 63, p.424-8, 1987.

BC Cancer Agency Cancer Drug Manual. DRUG NAME: Fluorouracil. Disponível em < [http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Fluorouracil\\_monograph\\_1Sep2015.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Fluorouracil_monograph_1Sep2015.pdf)> Acesso em 18 de junho de 2016.

BENCHABANE, S. et al. A case for IL-6, IL-17A, and nitric oxide in the pathophysiology of Sjögren's syndrome. **Int J Immunopathol Pharmacol**, 2016.

BERGER, F.G.; BERGER, S.H. Thymidylate synthase as a chemotherapeutic drug target: where are we after fifty years? **Cancer Biol Ther**, v. 5, p.1238-41, 2006.

BERGMANN, O.J. Humoral immunity of the oral cavity during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**, v. 44, p. 296–301,1990.

BIANCHI, C.M. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 58:e17, 2016.

BÜCHEL, B. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. **Biomed Chromatogr**, v. 27, p.7-16, 2013.

BUGLIONE, M. et al. Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Xerostomia and trismus (Part 2). Literature review and consensus statement. **Crit Rev Oncol Hematol**, S1040-8428(16)30053-1, 2016.

BRESSOLLE, F. et al. Doxorubicin and doxorubicinol plasma concentrations and excretion in parotid saliva. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 30, p.215-8,1992.

BROWN, R.A. et al. High-dose etoposide and cyclophosphamide without bone marrow transplantation for resistant hematology malignancies. **Blood**, v. 76, p.473-9, 1990.

CALICH, V.; VAZ, C. Imunoglobulinas: estrutura e função. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

CAMPOS, L. et al. Comparative study among three different phototherapy protocols to treat chemotherapy-induced oral mucositis in hamsters. **J Biophotonics**, 2016.

CAMPOS, L. et al. Effect of laser phototherapy on enzymatic activity of salivary glands of hamsters treated with 5-Fluorouracil. **Photochem Photobiol**, v. 90, p.667-72, 2014.

CANAKCI, C.F. et al. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. **Eur J Dent**, v. 3, p.100-6, 2009.

CATALÁN, M.A.; NAKAMOTO, T.; MELVIN, J.E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J Med Invest**, 56 Suppl:192-6, 2009.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol**, v. 2, p.764-768,1955.

CORREIA, P.N. et al. Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, p.48-56,2010.

DAWES, C.; ONG, BY. Circadian rhythms in the flow rate and proportional contribution of parotid to whole saliva volume in man. **Arch Oral Biol**, v. 18, p. 1145-53, 1973.

DEL MASTRO et al. 5-Fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide versus epirubicin and paclitaxel in node-positive early breast cancer: a phase-III randomized GONO-MIG5 trial. **Breast Cancer Res Treat**, v. 155, n. 1, p 117-26, 2016.

DINARELLO, C.A. Biology of interleukin 1. **Faseb J**, v. 2, p.108-115,1988.

DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

EDGAR, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br Dent J**, v. 8, p.305-12,1992

EKUNI, D. et al. Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. **Arch Oral Biol**, v. 55, p.170-6, 2010.

EKSTRÖM, J. **Dysphagia**. Medical Radiology. Diagnostic Imaging. Berlin: Springer-Verlag, 2012.

EL-HOUSSEINY, A.A. et al. Assessment of oral complications in children receiving chemotherapy. **J Clin Pediatr Dent**, v. 31, p. 267–273, 2007.

ELTING, L. et al. The burdens of cancer therapy: clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v. 98, p. 1531–1539, 2003.

EPSTEIN, J.B.; FREILICH, M.M.; LE, N.D. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the

head and neck. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 76, n. 2, p.169-74, 1993.

EPSTEIN, J.B. et al. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, p.39-44, 2002.

FLOQUET, A. et al. Pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide in early recurrent ovarian carcinoma: phase I dose-finding study. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, n. 1, p.61-8, 2013.

GUGGENHEIMER, A.; MOORE, P.A. Xerostomia-Etiology, recognition and treatment. **J Am Dent Assoc**, v. 134, p.61-9, 2003.

FOX, P.C. et al. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. **J Am Dent Assoc**, v. 110, p.519-525, 1985.

FOX, P.C. Differentiation of dry mouth etiology. **Adv Dent Res**, v. 10, p.13-6, 1996.

GHEZZI, E.M.; LANGE, L.A.; SHIP, J.A. Determination of variation of stimulated salivary flow rates. **J Dent Res**, v. 79, p.1874-8, 2000.

GÓMEZ-MORENO, G. et al. Effectiveness of malic acid 1% in patients with xerostomia induced by antihypertensive drugs. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 18:e49-55, 2013.

GREM, J.L. 5-fluoropyrimidines. Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. *In*: CHABNER, BA, LONGO, DL. **Cancer Chemotherapy & Biotherapy: principles and practice**. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

GÜVEN, O. et al. Relationship between activity of glutathione peroxidase and nitric oxide in synovial fluid and the progression of temporomandibular joint internal derangement. **J Craniofac Surg**, v. 26, n. 3, e210-3, 2015.

HANAUE, N. et al. Peroxynitrite formation in radiation-induced salivary gland dysfunction in mice. **Biomed Res**, v. 28, p.147-51, 2007.

HARRISON, T. et al. Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. **Spec Care Dentist**, v. 18, p.109-12, 1998.

HAYASHI, Y.; WATANABE, J. Salivary excretion of 5-fluorouracil (5-FU). V. Effect of 5-FU concentration in perfusate on the salivary excretion of 5-FU in perfused rat mandibular gland. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 38, n. 7, p.2008-11, 1990.

HENRIKSSON, R. et al. Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar cells in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. **Br. J. Cancer**, v. 69, p.320-326, 1994.

HOHLOCH, K. et al. Modified BEAM with triple autologous stem cell transplantation

for patients with relapsed aggressive non-Hodgkin lymphoma. **Ann Hematol**, v. 95, n. 7, p.1121-8, 2016.

HOLSINGER, F.C, BUI, D.T. **Anatomy, function, and evaluation of the salivary glands**. In: *Salivary Gland Disorders*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

HOPCRAFT, M.S.; TAN C. Xerostomia: an update for clinicians. **Aust Dent J**, v. 55, n. 3, p.238-44, 2010.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, p.162-9, 2001.

JANKOVIC, L. et al. Salivary immunoglobulins in cancer patients with chemotherapy-related oral mucosa damage. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 31, p.160-5, 1995.

JENSEN, S.B. et al. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 207-25, 2003.

JENSEN, S.B. et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. **Support Care Cancer**, v. 18, n. 8, p.1039-60, 2010a.

JENSEN, S.B. et al. 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**, v. 18, p.1039-60, 2010b.

JENSEN, S.B. et al. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, p.217-26, 2008a.

JENSEN, S.B. et al. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. **Oral Oncol**, v. 44, p.162-73, 2008b.

JO, K.S.; KIM, N.C. Incidence and factors influencing oral mucositis in patients with hematopoietic stem cell transplantation. **J Korean Acad Nurs**, v. 44, p. 542-51, 2014.

JONJIC, S. Surgical Removal of Mouse Salivary Glands. **Current Protocols in Immunology**, 43:III:1.11:1.11.1–1.11.4, 2001.

JOHNSON, J.T. et al. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 329, p.390-5, 1993.

JOHNSSON, M. et al. In vivo studies of effects of antidepressants on parotid salivary secretion in the rat. **Arch Oral Biol**, v. 67, p.54-60, 2016.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

KENDALL, H.K.; MARSHALL, R.I.; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, v. 7, p.2–10, 2001.

KOOHI-HOSSEINABADI, O. et al. Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil: A Golden hamster model. **J Clin Exp Dent**, v. 7, n. 2:e304-9, 2015.

KNORR, D.; SHETTY, K.J.; KINSELLA, J.E. Enzymatic lysis of yeast cell walls. **Biotechnol Bioeng**, v. 21, p.2011-2021, 2004.

KONDO, Y. et al. Functional Differences in the Acinar Cells of the Murine Major Salivary Glands. **Journal of Dental Research**, v. 94, p.715–721, 2015.

KAMACHI, M. et al. Regulation of apoptotic cell death by cytokines in a human salivary gland cell line: distinct and synergistic mechanisms in apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. **J Lab Clin Med**, v. 139, p.13-9, 2002.

KAROLEWSKA, E. et al. Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, p.739–744, 2008.

KOENIG, H.; PATEL A. The acute cerebellar syndrome in 5-fluorouracil chemotherapy: a manifestation of fluoroacetate intoxication. **Neurology**, v. 20, p.416, 1970.

KOOHI-HOSSEINABADI, O. et al. Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil: A golden hamster model. **J Clin Exp Dent**, v. 7, n. 2, p.304-9, 2015.

LAINE, P. et al. Salivary flow and composition in lymphoma patients before, during and after treatment with cytostatic drugs. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 28, n. 2, p.125-8, 1992.

LALLA, R.V. et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of celecoxib for oral mucositis in patients receiving radiation therapy for head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 50, n.11, p.1098-103, 2014.

LEE-HUANG, S. et al. Structural and functional modeling of human lysozyme reveals a unique nonapeptide, HL9, with anti-HIV activity. **Biochemistry**, v. 44, n. 12, p.4648-55, 2005.

LEICHMAN, C.G. et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. **J Clin Oncol**, v. 15, p.3223-9, 1997.

LEITÃO, R.F.C. et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, p.603-612, 2007.

LEÓN-SICAÍROS, N. et al. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, slgA and

lysozyme. **Clin Med Res**, v. 4, p.106-113, 2006.

LIMA, V. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci**; v. 113, p.210-217, 2005.

LIU, B. Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: prevalence and etiology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 1, p.52-60, 2012.

LOESCHE, WJ. et al. Xerostomia, xerogenic medications and food avoidances in selected geriatric groups. **J Am Geriatr Soc**, v. 43, p.401-7, 1995.

LOGAN, R.M. et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncol**, v. 43, p.395-401, 2007.

LOGAN, R.M. et al. Serum levels of NFkappa B and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther**, v. 7, p.1139-1145, 2008.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p.330-8, 2003.

MACKAY, F. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **J Exp Med**, v. 177, n. 5, p.1277-86, 1993.

Madeira, M.C. **Anatomia da face: bases anatomofuncionais para a prática odontológica**. São Paulo: Sarvier; 2010.

MANSSON-RAHEMTULLA, B. Analyses of salivary components in leukemia patients receiving chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, p.35-46, 1992.

MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, v. 29, p.191-214, 2003.

MAZZEO, M.A. et al. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. **Med Oral Pathol Oral Cir Bucal**, 14:E108-E113, 2009.

MAZZEO, M.A. et al. Analysis of saliva samples from oncological patients treated with 5-fluorouracil and leucovorin calcium by scanning electron microscopy with energy dispersive system. **J Oral Pathol Med**, v. 42, n. 10, p. 788-92, 2013.

MEDEIROS, C.A.C.X. et al. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, p.1085-1100, 2011.

MEURMAN, J.H. et al. Five-year follow-up of saliva in patients treated for lymphomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 83, n. 4,



p.447-52, 1997.

MILANO, G. et al. Salivary passage of 5-fluorouracil during continuous infusion. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 24, p.197-9, 1989.

MITTAL, S. et al. The diagnostic role of Saliva -A Review. **J Clin Exp Dent**, 3:e314-20, 2011.

MOHAMMED, A.A. Update knowledge of dry mouth - A guideline for dentists. **Afr Health Sci**, v. 14, p. 736–742, 2014.

MOORE, P.A. et al. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 92, p.281-91, 2001.

MUHVIC-UREK, M. Imbalance between apoptosis and proliferation causes late radiation damage of salivary gland in mouse. **Physiol Res**, v. 55, p.89-95, 2006.

NAIDU, M.U. et al. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis complicating the treatment of cancer. **Neoplasia**, v. 6, p.423-31, 2004.

NAKATA, Y. et al. Treatment results of alternating chemoradiotherapy with early assessment for advanced laryngeal cancer: A multi-institutional phase II study. **Auris Nasus Larynx**, S0385-8146(16)30152-3, 2016.

NANCI, A. **Ten Cate's oral histology: Development, structure and function**. St. Louis: Mosby, c2013.

NAVAZESH, M.; CHRISTENSEN, C.; BRIGHTMAN, V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. **J Dent Res**, v. 71, p.1363-9, 1992.

NAVAZESH, M.; KUMAR, S.K. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. **J Am Dent Assoc**, Suppl:35S-40S, 2008.

NGO, D.Y. et al. The lived experience of Sjögren's Syndrome. **BMC Oral Health**, p. 16:7, 2016.

NGUYEN, D.T. et al. Palifermin for prevention of oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-institution retrospective evaluation. **Support Care Cancer**, v. 23, n. 11, p.3141-7, 2015.

OBLON, D.J. et al. Propantheline protects the oral mucosa after high-dose ifosfamide, carboplatin, etoposide and autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 20, p.961-963, 1997.

OHRN, K.E.; WAHLIN, Y.B.; SJODEN, P.O. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. **Support Care Cancer**, v. 9, n. 4, p.247-57, 2001.

OPHIR, A. et al. 5-fluorouracil and mast cell precursors in mice. **Exp Hematol**, v. 21, n. 12, p.1558-62, 1993.

OZER, U. et al. Oxidative Stress and Response to Thymidylate Synthase-Targeted Antimetabolites. **Mol Pharmacol**, v. 88, p.970-81, 2015.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 87, p.315–424, 2007.

PARISIEN, A. et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides, v. 104, p.1-13, 2007.

PATEL, A. et al. Protective effects of aqueous extract of *Solanum nigrum* Linn. leaves in rat models of oral mucositis. **Scientific World Journal**, 2014:345939, 2014.

PATRICIA, M.P. et al. The therapeutic effects of apigenin and dexamethasone on 5-fluorouracil-induced oral mucositis - a pilot study using a Syrian hamster model. **J Oral Pathol Med**, 2016.

PEDERSEN, A.M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis**, v. 3, p.117–29, 2002.

PINEDO, H.M.; PETERS, G.F.J. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **J Clin Oncol**, v. 6, p.1653-1664, 1988.

PIRZADA, N.A.; ALI, I.I.; DAFER, R.M. Fluorouracil-induced neurotoxicity. **Ann Pharmacother**, v. 3.4, n. 1, p.35-38, 2000.

PORTER, S.R.; SCULLY, C.; HEGARTY, A.M. An update of the etiology and management of xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, p. 28–46, 2004.

PRASANTHI, B.; KANNAN, N.; PATIL, R. Effect of Diuretics on Salivary Flow, Composition and Oral Health Status: A Clinico-biochemical Study. **Ann Med Health Sci Res**, v. 4, n. 4, p.549-53, 2014.

QUOCK, R.L. Xerostomia: current streams of investigation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 122, n. 1, p.53-60, 2016.

VAN WARMERDAM, L.J. et al. Monitoring carboplatin concentrations in saliva: a replacement for plasma ultrafiltrate measurements? **Ther Drug Monit**, v. 17, p.465-70, 1995.

RAMSAY, S.E. et al. Burden of poor oral health in older age: findings from a population-based study of older British men. **BMJ Open**, 5:e009476, 2015.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants and Antioxidants: The Interplay. **Biomed Res Int**, 761264, 2014.

RHODUS, N.L.; BEREUTER, J. Clinical evaluation of a commercially available oral moisturizer in relieving signs and symptoms of xerostomia in postirradiation head and neck cancer patients and patients with Sjögren's syndrome. **J Otolaryngol**, v. 29, p.28-34, 2000.

- RUBIO, C.A. The Natural Antimicrobial Enzyme Lysozyme is Up-Regulated in Gastrointestinal Inflammatory Conditions. **Pathogens**, v. 3, p.73-92, 2014.
- SANDBORG, R.R.; SIEGEL, I.A. Effects of 5-fluorouracil on protein synthesis and secretion of the rat parotid gland. **Arch Oral Biol**, v. 35, p.991-1001, 1990.
- SCULLY, C.; SONIS, S.T.; DIZ, P.D. Oral mucosites. **Oral Dis**, v. 12, p.229-241, 2006.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p.192-205, 1968.
- SKEFF, M.A. et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. **PLoS One**, 9:e113378, 2014.
- SLAVIK, M.; WU, J.; RILEY, C. Salivary excretion of anticancer drugs. **Ann NY Acad Sci**, v. 694, p.319-321, 1993.
- SONIS, S.T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncol**, v. 45, p.1015-20, 2009.
- SONIS, S.T. et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, p.1995–2025, 2004.
- SONIS, S.T. et al. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. **Cancer**, v. 85, p.2103-13, 1999.
- SONIS, S.T. et al. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 69, p.437-43, 1990.
- SU, N. et al. Caries prevention for patients with dry mouth. **J Can Dent Assoc**, v. 77, p.85, 2011.
- SUN, Y.; OBERLEY, L.W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin Chem**, v. 34, n. 3, p.497-500, 1988.
- SVOJANOVSKY, S.R. et al. High sensitivity ELISA determination of taxol in various human biological fluids. **J Pharm Biomed Anal**, v. 20, p.549-55, 1999.
- U.S. Food and Drug administration. Drugs. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/ucm359506.pdf>> Acesso em: 28 abril 2016.
- THOMSON, W.M. Issues in the epidemiological investigation of dry mouth. **Gerodontology**, v. 22, n. 2, p.65-76, 2005.
- TRIVEDI, S. et al. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant

enzymes, and chronic periodontitis. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 35:e14-9, 2015.

TROTTI, A. et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiotherapy and Oncology**, v. 66, p.253–262, 2003.

UGAR-ÇANKAL, D.; OZMERIC, N. Review A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clinica Chimica Acta**, p.90–100, 2006.

VALDEZ, I.H.; FOX, P.C. Diagnosis and management of salivary dysfunction. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, p.271–277, 1993.

VAN DER VELDT, A.A. et al. Effects of chemotherapy on the parotid and submandibular glands in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy. **Strahlenther Onkol**, v. 190, n. 2, p.221-2, 2014.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n.4, p.146-154, 2001.

VASCONCELOS, R.M. et al. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis. **J Dent Res**, v. 95, n. 7, p.725-33, 2016.

VILCEK, J.; LEE, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. **J Biol Chem**, v. 266, n. 12, p.7313-6, 1991.

VILLA, A.; ABATI, S. Risk factors and symptoms associated with xerostomia: a cross-sectional study. **Aust Dent J**, v. 56, n. 3, p.290-5, 2011.

VILLA, A.; CONNELL, C.L.; ABATI, S. Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation. **Ther Clin Risk Manag**, v. 11, p.45-51, 2014.

VILLA, A.; SONIS, S.T. Mucositis: pathobiology and management. **Curr Opin Oncol**, v. 27, n. 3, p.159-64, 2015.

VISSINK, A. et al. Clinical management of salivary gland hypofunction and xerostomia in head-and-neck cancer patients: successes and barriers. **Int J Radiat Oncol Biol Phy**, v. 78, n. 4, p.983-91, 2010.

VON BULTZINGSLOWEN, I. et al. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiology Endod**, 103(S57):e51–15, 2007.

WAHLIN, Y.B. Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 71, p.689–95, 1991.

WANG H.M. et al. Induction chemotherapy with dose-modified docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in Asian patients with borderline resectable or unresectable head and neck cancer. **J Formos Med Assoc**, 0929-6646(16)30015-8, 2016.

WICKHAM, R.S. et al. Taste changes experienced by patients receiving

chemotherapy. **Oncol Nurs Forum**, v. 26, p.697–706, 1999.

WOOF, J.M.; KEER, M.A. IgA function – variations on a theme. **Immunology**, v. 113, p.175–177, 2004.

World Health Organization. Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1979:15-22.

XIANG, B.; LI, X.; ZHANG, F. Underlying protective mechanism of  $\alpha$ 1-adrenoceptor activation against irradiation-induced damage in rat submandibular gland. **Archives of oral biology**, v. 58, p.1238–1245, 2013.

XUE, Q.G. et al. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 139, p.11-25, 2004.

YAO, C. et al. Lipopolysaccharide-induced elevation and secretion of interleukin-1 $\beta$  in the submandibular gland of male mice. **Immunology**, v. 116, p.213-22, 2005.

YOO, C. et al. Vorinostat in combination with capecitabine plus cisplatin as a first-line chemotherapy for patients with metastatic or unresectable gastric cancer: phase II study and biomarker analysis. **Br J Cancer**, v. 114, n. 11, p.1185-90, 2016.

ZALEWSKA, A. et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation markers in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. **Arch Oral Biol**, v. 60, p.1375-86, 2015.

ZECHA, J.A. et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. **Support Care Cancer**, 2016.

ZI, Y.; CHEN, L.; LI, Y. Determination of trace amounts of nitrite and reaction mechanism by triple-wavelength spectrophotometry. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 20, n. 3, p.437-92000.

## ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAL



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1° 27 Rodolfo Manoelino  
Cep: 60490-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8381 Fax: (85) 3366.0333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 43/2012, sobre o projeto intitulado: "**ESTUDO DOS EFEITOS DO 5-FLUOROURACIL E DA PILOCARPINA EM GLÂNDULAS SALIVARES DE HAMSTER.**", de responsabilidade da Profa. Dra. Gery Anne do Castro Brito está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA, em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 29 de novembro de 2012

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

