

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR  
RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM – PAPEL PROTETOR DA  
PENTOXIFILINA**

**FORTALEZA  
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR  
RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM – PAPEL PROTETOR DA  
PENTOXIFILINA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

**Orientador:** Prof. Dr. Ronaldo de A. Ribeiro  
**Co-Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Vilma de Lima

**FORTALEZA – CE**  
**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M929m Moura , José Fernando Bastos de

Modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem - papel protetor da pentoxifilina / José Fernando Bastos de Moura - Fortaleza, 2006.

103 f.: Il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de A. Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Cirurgia.

1. Radioterapia. 2 . Mucosite oral . 3 . Pentoxifilina. I. Título.

CDD 616.994

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR  
RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM – PAPEL PROTETOR DA  
PENTOXIFILINA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

**BANCA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

---

**Prof. Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**

---

**Prof. Doutor Lúcio Flávio Gonzaga Silva**

---

**Prof. Doutor Paulo Eduardo Ribeiro dos Santos Novaes**

## A DEUS

“Grandes foram as lutas, maiores serão as vitórias. Sempre estiveste comigo. Muitas vezes, pensei que este momento nunca chegaria, queria recuar ou parar, no entanto, Tu sempre estavas presente, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força. Com a Tua ajuda venci. A emoção é forte. Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada. Por isso, digo a Ti muito obrigado”

Aos meus pais, irmãos e irmãs, que estiveram sempre ao meu lado, participando de forma ativa em todas as etapas desta caminhada acadêmica e tiveram a sabedoria, compreensão e paciência de me apoiar em todas as horas de minha ausência, angústia e desânimo.

À minha esposa Raquel e as minhas filhas Izabelzinha e Alice, que souberam exercitar a virtude da paciência suportando tantas ausências, em função deste estudo, pelo estímulo constante e apoio nos momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, que muito me estimulou a enveredar na área da pesquisa, sendo ele, na verdade, uma referência de dedicação à assistência, ao ensino e à pesquisa clínica.

À minha co-orientadora, professora Dra. VILMA DE LIMA, por sua inquestionável dedicação à conclusão deste trabalho e sua dedicação incondicional à pesquisa.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em cirurgia professor. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS pelo incentivo constante para conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA, por todo o seu empenho na concretização desta dissertação.

À professora Dra. GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, pela dedicação expressa, em tudo que faz, e que serve de incentivo à pesquisa.

Ao Hospital do Câncer - Instituto do Câncer do Ceará e, em especial, ao Departamento de Radioterapia e todos os colegas de trabalho, por terem gerado a expectativa deste estudo, abrindo oportunidades para que ele fosse realizado.

À Dra. LÚCIA ALCÂNTARA, pelo apoio indispensável durante toda a fase de execução deste projeto.

Aos físicos do Departamento de Radioterapia do Hospital do Câncer do Ceará pelo apoio e cuidado na montagem do modelo experimental.

A todos os colegas do laboratório LAFICA, especialmente ANTONIELLA SOUSA GOMES, ROSEMAYRE SOUSA FREIRE, RENATA LEITÃO E MARIANA L. VALE, pela excelente colaboração.

Aos estudantes da Iniciação Científica, ADRIANO A.T.V.A. ALEXANDRE, NILFACIO P. BEZERRA E RAPHAEL AUGUSTO C. CAPAZ, pela contribuição emprestada.

Aos técnicos: MARIA SILVANDIRA PINHEIRO E IVAN RODRIGUES DE SOUSA, pela dedicação e carinho manifestados em tudo que fazem e pelo apoio incondicional que permitiu que este trabalho fosse realizado.

Às minhas amigas, funcionárias do HC-ICC, LUCIANA SILVA DA COSTA, MARIA WALLITA L. PEREIRA E JUCILEIDE RODRIGUES DE ANDRADE pela ajuda valiosa nos muitos momentos em que precisei dos seus préstimos, para levar adiante este projeto, de grande importância para o meu crescimento pessoal e profissional.



Ao meu colega e amigo Dr. CARLOS HELI BEZERRA LEITE por todo o apoio para concretização deste trabalho.

À senhora ELSIE STURDART GURGEL DE OLIVEIRA pelo apoio incondicional na revisão e correção deste trabalho.

À nossa bibliotecária SALEMMA SUGETTE pela revisão das referências bibliográficas.

Às secretárias do programa de Pós-graduação em Cirurgia, MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA E MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, que foram sempre solícitas, atenciosas e acima de tudo amigas e cooperativas durante o período deste trabalho.

## RESUMO

**Modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem – Papel protetor da pentoxifilina. JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA.** Pós-graduação “*Stricto Sensu*”, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Dezembro, 2006. Orientador: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

A mucosite ou estomatite oral (MO), que consiste na resposta inflamatória da mucosa oral à ação de drogas ou radioterapia, constitui-se num efeito colateral debilitante, sendo uma complicação potencialmente séria, dose-limitante que tem impacto tanto no controle local quanto na sobrevida e qualidade de vida de pacientes oncológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de MO induzida por radioterapia (RXT) em aparelho de megavoltagem - cobalto-60 (MV - Co<sup>60</sup>) e avaliar o papel protetor do agente inibidor de citocinas, pentoxifilina (PTX). Foram utilizados 156 hamsters Golden Siriam machos com massa corpórea média de 139 gramas. Os animais foram submetidos à RXT da mucosa jugal, utilizando aparelho de MV - Co<sup>60</sup>. A irradiação foi realizada no dia um com campo direto e colocação de bolus sobre a mucosa e dose única de 35 Gy. No quarto dia foram feitas irritações mecânicas (IM) na mucosa jugal irradiada, como fator potencializador da MO. Os animais foram observados por um período de 16 dias, ao longo do qual a mucosa foi avaliada macroscopicamente considerando os aspectos de hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras e abscessos. Em dias pré-determinados (7, 10, 13 e 16 dias), os animais foram sacrificados e as mucosas removidas e processadas para análise histopatológica (infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vascular, hemorragia, edema, úlceras e abscessos), dosagem da mieloperoxidase e detecção de TNF- $\alpha$  por imunohistoquímica. Antes do sacrifício, foi colhido sangue para contagem total e diferencial de leucócitos. Os animais foram pesados diariamente e avaliados quanto as suas respectivas variações da massa corpórea e realizado também estudo da curva de sobrevida. No 13º dia, observou-se o pico de intensidade dos achados inflamatórios. A PTX foi utilizada nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup>sc, 1 h antes da radioterapia e, diariamente, por 13 dias. Observou-se que a indução da MO causou lesões significantes a partir do 7º dia, atingindo pico entre os dias 13 e 16, com aumento significativo de marcação de TNF- $\alpha$ , sem alteração do hemograma dos animais. Contudo, a indução da MO causou perda significativa de peso a partir do 5º dia, mantendo-se estável até o 13º dia, quando, então se observou queda acentuada e significativa da sobrevida dos animais até o 16º dia. A PTX (15 mg kg<sup>-1</sup>) foi capaz de reduzir hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos (0; 0-2), quando comparada a animais com MO não tratados (salina) com PTX (3; 2-3) (p<0,05). Estes dados foram confirmados pela análise histopatológica das mucosas, onde PTX 15 mg kg<sup>-1</sup> (1; 1-3) reduziu o infiltrado inflamatório, dilatação e ingurgitamento vasculares, edema, úlceras e abscessos, quando comparada aos animais que receberam apenas Salina (3; 1-3) (p<0,05). Ainda, PTX 15 mg kg<sup>-1</sup> reduziu, a marcação do TNF- $\alpha$  nas mucosas com MO, quando comparada aos animais não tratados. A PTX não alterou o hemograma, nem a variação de massa corpórea observada na MO. Em resumo, o modelo de MO induzido por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica em hamster foi desenvolvido e em concordância ao modelo descrito na literatura por ortovoltagem, mostra características que em muito se assemelham à mucosite oral humana, em termos de achados macroscópicos, histopatológicos e bioquímicos, portanto, se prestando para o estudo de novas drogas capazes de combatê-la. Quanto à ação da PTX, foi observado um efeito protetor deste agente na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup>, confirmado pela avaliação do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  e também um possível efeito de radiosensibilização na dose de 45 mg kg<sup>-1</sup>.  
Unitermos: Mucosite oral experimental, Radioterapia, Pentoxifilina, Inflamação.

## ABSTRACT

**Experimental model of oral mucositis radio-induced by megavoltage – the protective role of the pentoxifylline.** JOSÉ FERNANDO BASTOS MOURA. Post-graduation “stricto sensus”, Surgery Department of the Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará. (Master grade in Surgery). December, 2006. Oriented by Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

The oral mucositis (OM) consists of an inflammatory response of the oral mucosa to the drugs or radiation therapy and is a deleterious side effect and a potential serious complication, limiting-dose and impacting the local control, overall survival and quality of life in oncology patients. The objective of this study was to develop a OM model radio-induced (RXT) by a megavoltage machine – cobalt unit (MV -  $^{60}\text{Co}$ ) and evaluate the protector role of the cytokines inhibitor agent, pentoxifylline (PTX). For this purpose, 146 male Golden Siriam Hamsters with medium body mass of 139 grams were used. On the first day, the animals were exposed to megavoltage irradiation in a cobalt unit, with a single fraction of 35 Gy. A irradiation field was opened to the oral mucosa and it was used a bolus on it. After the 4<sup>th</sup> day of irradiation, a mechanical scratching (MS) was done over the irradiated oral mucosa for enhancing the OM. The animals were observed for 16 days period in which the oral mucosa was evaluated macroscopically considering the clinical aspects of hyperemia, bleeding areas, ulcers and infections. In pre-determined days (days 7, 10, 13 and 16), the animals were sacrificed and the oral mucosa removed to be analyzed under the histopathological aspects (cellular effusion, vascular dilatation, bleeding, edema, ulcers and infection), mieloperoxidase dosage and TNF- $\alpha$  detection by imunohistochemical stain. Before the animals were sacrificed, a blood sample was drawn to count the white cells. The animals were daily weighed and evaluated about their body mass variations and a survival curve was taken. On the 13<sup>th</sup> day, it was observed the highest inflammatory finding. The PTX was used in the following doses: 5, 15 and 45 mg kg<sup>-1</sup> sc, one hour before the irradiation and daily, for 13 days. It was observed that the induced OM was greatly significant after the 7<sup>th</sup> day, with the higher findings of TNF- $\alpha$  without blood counting changes between 13 to 16 days. The weight loss was detected after the 5<sup>th</sup> day and remained stable till 13<sup>th</sup> day when it was noticed a highly significant weight loss and survival till the 16<sup>th</sup> day. The PTX (15 mg kg<sup>-1</sup>) was able to reduce the hyperemia, bleeding, ulcers and infection (0; 0-2) when compared to the animals that received only saline solution (3; 1-3) ( $p < 0,05$ ). The PTX 15 mg kg<sup>-1</sup> reduced the TNF- $\alpha$  stain in the oral mucosa with OM when compared to the animals that were not treated. The PTX altered neither the blood counting nor the body mass in the OM group. In summary, the OM model induced by megavoltage irradiation and mechanical scratching in hamsters was developed accordingly to the model designed to ortovoltage studies in the literature, shows close relationship to the human oral mucosa changes, macroscopically, histopathologically and biochemically, and it can be used in the study of new drugs to prevent mucositis. About the PTX action, it was observed the protector effect of this agent in the 15 mg kg<sup>-1</sup> dosage, confirmed by the evaluation of the TNF- $\alpha$  and its possible radiation sensitivity effect in the 45 mg kg<sup>-1</sup> dosage.

Key words: Experimental oral mucositis, radiotherapy, pentoxifylline and inflammation.

## LISTA DE FIGURA

<b>FIGURA 1</b> - Escala de tempo dos eventos envolvidos na inativação das células pela radiação e efeitos da radioterapia.....	23
<b>FIGURA 2</b> - Ciclo Celular: Estágios do ciclo mitótico.....	24
<b>FIGURA 3</b> - Diagrama simplificado do mecanismo de ação da radioterapia sobre o DNA das células.....	25
<b>FIGURA 4</b> - Mecanismo de lesão celular por radiação ionizante.....	26
<b>FIGURA 5</b> - Representações esquemáticas das fases e dos principais mecanismos e mediadores envolvidos nos danos à mucosa oral (MO), induzidos pela radioterapia (RXT) e/ou quimioterapia (QT).....	31
<b>FIGURA 6</b> - Representação esquemática da evolução da mucosite oral.....	32
<b>FIGURA 7</b> - Estrutura química da pentoxifilina.....	38
<b>FIGURA 8</b> - Aparelhos de megavoltagem A. Acelerador linear. B. Cobalto-60.....	43
<b>FIGURA 9</b> - Animal anestesiado e preparado para ser submetido à radioterapia, em aparelho de megavoltagem cobalto-60 com o uso de bolus (A e B).....	45
<b>FIGURA 10</b> - Radioterapia da mucosa jugal do hamster em aparelho de megavoltagem cobalto-60.....	46
<b>FIGURA 11</b> - Gráfico do percentual de dose na profundidade para energias de cobalto-60 e 250 KV de ortovoltagem.....	47
<b>FIGURA 12</b> - A. Mucosite oral experimental induzida por quimioterapia. B. Aparelho de ortovoltagem.....	53
<b>FIGURA 13</b> - Roteiro da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica.....	54
<b>FIGURA 14</b> - Representação esquemática da escolha da dose e aparelho de radioterapia para o desenvolvimento do modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica.....	60
<b>FIGURA 15</b> - Aspectos macroscópicos das mucosas jugais de hamster normal (A) ou submetidos à radioterapia e irritação mecânica nos dias 7 (B), 10 (C), 13 (D) e 16 (E).....	62

<b>FIGURA 16</b> - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C) e animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 7º dia experimental (D, E, F) .....	64
<b>FIGURA 17</b> - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 10º (G, H, I) e no 13º dias experimentais (J, L, M).....	65
<b>FIGURA 18</b> - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 16º dia experimental.....	66
<b>FIGURA 19</b> - Dosagem de enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica.....	67
<b>FIGURA 20</b> - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica – marcação deTNF- $\alpha$ .....	69
<b>FIGURA 21</b> - Fotomicrografias de controles negativos. G, H, I representam mucosas jugais de hamsters normais na presença de anticorpo anti-TNF $\alpha$ . J, L, M são de animais com mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica, na ausência de anticorpo anti-TNF $\alpha$ .....	70
<b>FIGURA 22</b> - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem isolada (N, O, P) e irritação mecânica isolada (Q, R, S) por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ .....	71
<b>FIGURA 23</b> - Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre o leucograma dos hamsters.....	72
<b>FIGURA 24</b> - Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a variação de massa corpórea dos hamsters .....	73
<b>FIGURA 25</b> - Curva de sobrevivência dos hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica da mucosa jugal.....	74
<b>FIGURA 26</b> - Aspectos macroscópicos das mucosas jugais com 13 dias de mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	76
<b>FIGURA 27</b> - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C), animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina(D, E, F) e animais tratados com pentoxifilina 15 mg kg <sup>-1</sup> (G, H, I).....	78

<b>FIGURA 28</b> - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem + irritação mecânica, tratados com salina (A e B), e com pentoxifilina 15 mg kg <sup>-1</sup> por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ (C e D).....	79
<b>FIGURA 29</b> - Fotomicrografias das mucosas de animais normais (A), submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina (B) ou pentoxifilina (C) .....	80
<b>FIGURA 30</b> - Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea de hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	82
<b>FIGURA 31</b> - Papel modulador da pentoxifilina na mucosite induzida por radioterapia .....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Dose secundária decorrente da irradiação da mucosa jugal do hamster .....	46
<b>TABELA 2</b> – Percentual de dose na profundidade para o cobalto 60 e aparelho de ortovoltagem.....	47
<b>TABELA 3</b> – Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters.....	61
<b>TABELA 4</b> – Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters .....	63
<b>TABELA 5</b> – Imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ em hamsters normais, submetidos à radioterapia (RXT) ou irritação mecânica isoladas (IM), e radioterapia + irritação mecânica (RXT+IM).....	68
<b>TABELA 6</b> – Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM).....	75
<b>TABELA 7</b> – Efeito da pentoxifilina sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).....	77
<b>TABELA 8</b> – Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma de hamsters com mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	81

## LISTA DE FIGURA

<b>FIGURA 1</b>	Escala de tempo dos eventos envolvidos na inativação das células pela radiação e efeitos da radioterapia	23
<b>FIGURA 2</b>	Ciclo Celular: Estágios do ciclo mitótico	24
<b>FIGURA 3</b>	Diagrama simplificado do mecanismo de ação da radioterapia sobre o DNA das células	25
<b>FIGURA 4</b>	Mecanismo de lesão celular por radiação ionizante	26
<b>FIGURA 5</b>	Representações esquemáticas das fases e dos principais mecanismos e mediadores envolvidos nos danos à mucosa oral (MO), induzidos pela radioterapia (RXT) e/ou quimioterapia (QT)	31
<b>FIGURA 6</b>	Representação esquemática da evolução da mucosite oral	32
<b>FIGURA 7</b>	Estrutura química da pentoxifilina	38
<b>FIGURA 8</b>	Aparelhos de megavoltagem A. Acelerador linear. B. Cobalto-60	43
<b>FIGURA 9</b>	Animal anestesiado e preparado para ser submetido à radioterapia, em aparelho de megavoltagem cobalto-60 com o uso de bolus (A e B)	45
<b>FIGURA 10</b>	Radioterapia da mucosa jugal do hamster em aparelho de megavoltagem cobalto-60	46
<b>FIGURA 11</b>	Gráfico do percentual de dose na profundidade para energias de cobalto-60 e 250- KV de ortovoltagem	47
<b>FIGURA 12</b>	A. Mucosite oral experimental induzida por quimioterapia. B. Aparelho de ortovoltagem	53
<b>FIGURA 13</b>	Roteiro da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica	54
<b>FIGURA 14</b>	Representação esquemática da escolha da dose e aparelho de radioterapia para o desenvolvimento do modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica	60
<b>FIGURA 15</b>	Aspectos macroscópicos das mucosas jugais de hamster normal (A) ou submetidos à radioterapia e irritação mecânica nos dias 7 (B), 10 (C), 13 (D) e 16 (E)	62
<b>FIGURA 16</b>	Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C) e animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 7º dia experimental (D, E, F)	64
<b>FIGURA 17</b>	Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 10º (G, H, I) e no 13º dias experimentais (J, L, M)	65
<b>FIGURA 18</b>	Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 16º dia experimental	66
<b>FIGURA 19</b>	Dosagem de enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica	67
<b>FIGURA 20</b>	Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica – marcação de TNF- $\alpha$	69
<b>FIGURA 21</b>	Fotomicrografias de controles negativos. G, H, I representam mucosas jugais de hamsters normais na presença de anticorpo anti-TNF $\alpha$ . J, L, M são de animais com mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica, na ausência de anticorpo anti-TNF $\alpha$	70
<b>FIGURA 22</b>	Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem isolada (N, O, P) e irritação mecânica isolada (Q, R, S) por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$	71



<b>FIGURA 23</b>	Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre o leucograma dos hamsters	72
<b>FIGURA 24</b>	Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a variação de massa corpórea dos hamsters	73
<b>FIGURA 25</b>	Curva de sobrevivência dos hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica da mucosa jugal	74
<b>FIGURA 26</b>	Aspectos macroscópicos das mucosas jugais com 13 dias de mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica	76
<b>FIGURA 27</b>	Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C), animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina(D, E, F) e animais tratados com pentoxifilina 15 mg kg <sup>-1</sup> (G, H, I)	78
<b>FIGURA 28</b>	Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem + irritação mecânica, tratados com salina (A e B), e com pentoxifilina 15 mg kg <sup>-1</sup> por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ (C e D)	79
<b>FIGURA 29</b>	Fotomicrografias das mucosas de animais normais (A), submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina (B) ou pentoxifilina (C)	80
<b>FIGURA 30</b>	Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea de hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica	82
<b>FIGURA 31</b>	Papel modulador da pentoxifilina na mucosite induzida por radioterapia	92

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Dose secundária decorrente da irradiação da mucosa jugal do hamster .....	46
<b>TABELA 2</b> – Percentual de dose na profundidade para o cobalto 60 e aparelho de ortovoltagem.....	47
<b>TABELA 3</b> – Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters.....	61
<b>TABELA 4</b> – Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters .....	63
<b>TABELA 5</b> – Imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ em hamsters normais, submetidos à radioterapia (RXT) ou irritação mecânica isoladas (IM), e radioterapia + irritação mecânica (RXT+IM).....	68
<b>TABELA 6</b> – Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM) .....	75
<b>TABELA 7</b> – Efeito da pentoxifilina sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).....	77
<b>TABELA 8</b> – Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma de hamsters com mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	81

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	<b>Alfa</b>
$\beta$	<b>Beta</b>
$\gamma$	Gama
$\mu\text{mol}$	Micromolar
$\mu\text{l}$	microlitro
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>Anova</b>	Análise de variância
<b>cGy</b>	Centi-Gray
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucléico</b>
<b>epm</b>	Erro padrão da média
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>Gy</b>	Gray
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>IM</b>	Irritação mecânica
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IFN-</b>	Interferon
<b>ip</b>	Via intra-peritoneal
<b>kV</b>	Kilovoltagem
<b>kVp</b>	Kilovoltagem de pico
<b>LAFICA</b>	Laboratório de Inflamação e do Câncer
<b>TLE</b>	Transferência Linear de Energia
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>MCP</b>	Mercaptopurinas
<b>mmHg</b>	Milímetros de Mercúrio
<b>mmAl</b>	Milímetros de Alumínio
<b>mmCu</b>	Milímetros de Cobre
<b>MPO</b>	<b>Mieloperoxidase</b>
<b>MV</b>	<b>Mega-Volts</b>
<b>MeV</b>	<b>Mega-Eletrons-Volts</b>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>Fator de transcrição nuclear kappa B</b>
<b>OMS</b>	<b>Organização Mundial de Saúde</b>
<b>PDE</b>	<b>Fosfodiesterase</b>
<b>PTX</b>	<b>Pentoxifilina</b>
<b>PMN</b>	<b>Polimorfonucleares</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotações por minuto</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucléico</b>
<b>RXT</b>	Radioterapia
<b>sc</b>	Via subcutânea
<b>TMO</b>	<b>Transplante de Medula Óssea</b>
<b>TNF</b>	<b>Fator de necrose tumoral</b>
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

### **LISTA DE FIGURAS**

### **LISTA DE TABELAS**

### **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. Mediadores inflamatórios na mucosite oral.....	35
1.2. Citocinas como mediadores da resposta inflamatória .....	36
1.3. Pentoxifilina .....	38
1.4. Justificativas .....	42
2. Objetivos .....	44
<b>3. MÉTODO</b> .....	44
3.1. Animais.....	44
3.2. Radioterapia.....	44
3.3. Drogas, anticorpos, soluções, líquidos e corantes utilizados.....	48
3.4. Protocolo experimental.....	50
3.4.1. Modelo de mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica em hamsters .....	50
3.4.2. Parâmetros avaliados .....	55
3.4.2.1. Análise da estrutura das mucosas jugais.....	55
A. Análise macroscópica das mucosas jugais .....	55
B. Análise microscópica das mucosas jugais .....	55
C. Dosagem da mieloperoxidase .....	56
D. Estudo imunohistoquímico para detecção de TNF- $\alpha$ .....	57
3.4.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais .....	57
A. Estudo hematológico (análise de leucograma) .....	57
B. Análise da variação da massa corpórea .....	58
3.5. Grupos de animais tratados .....	58
3.6. Análise estatística .....	58
<b>4. RESULTADOS</b> .....	59
4.1. Escolha do tipo de radiação para indução de mucosite oral experimental em hamsters.....	59
4.2. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos	

macroscópicos das mucosas dos hamsters .....	61
4.3. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos	
histológicos das mucosas jugais dos hamsters .....	63
4.4. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a atividade da	
mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters .....	67
4.5. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a detecção de TNF- $\alpha$	
por método de imunohistoquímica .....	68
4.6. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre o leucograma dos	
hamsters .....	72
4.7. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a variação de massa	
corpórea dos hamsters .....	73
4.8. Efeito da radioterapia sobre a curva de sobrevida dos hamsters .....	74
4.9. Efeito do tratamento farmacológico no grupo experimental .....	75
4.10. Tratamento com pentoxifilina.....	75
4.10.1. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das	
mucosas jugais dos hamsters com mucosite oral induzida por	
radioterapia e irritação mecânica .....	75
4.10.2. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações histológicas das mucosas	
jugais dos hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação	
mecânica .....	77
4.10.3. Imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ em hamsters com	
mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação	
mecânica e tratados com pentoxifilina na dose 15 mg kg <sup>-1</sup> .....	79
4.10.4. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos hamsters com	
mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	81
4.10.5. Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea dos	
hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica .....	82
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é definido como uma doença genética e surge a partir de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, que sofrem transformações, até que se tornem malignas. Na verdade, as neoplasias malignas ocorrem quando mutações alteram o controle do crescimento celular, ou indiretamente, impedem os mecanismos normais que restringem a divisão celular (ROCHA et al., 2006). Todos os processos desde a iniciação tumoral, transformação, invasão até metástases ocorrem em múltiplas etapas e podem envolver dezenas, até mesmo centenas, de genes, por meio de mutações intragênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade dos genes e mecanismos epigenéticos. Nos tecidos normais, as taxas de crescimento e de morte celular estão em equilíbrio. No câncer, esse equilíbrio é rompido por perda no controle do crescimento celular e/ou dos mecanismos de apoptose (ROCHA et al., 2006).

Hoje, o câncer é considerado a terceira causa de óbito na população brasileira e configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (ROCHA et al., 2006). No Brasil, esperam-se para o ano de 2006 cerca de 472050 novos casos de câncer, dos quais 13.470 serão na cavidade oral, sendo 10.060 no sexo masculino e 3.410 no feminino (INCA-MS, 2006). As neoplasias malignas da cavidade oral estão entre os seis tipos mais comuns de câncer que acometem o homem e entre os oito tipos mais comuns no sexo feminino. Segundo estimativas do INCA para o ano de 2006, são esperados no Ceará cerca de 15.780 novos casos de câncer em todo o estado. Deste total, temos uma estimativa de 400 casos para a cavidade oral, com previsão de 220 casos para homens e 180 para mulheres (INCA-MS, 2006). Na região Nordeste as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, e nas demais regiões, seguem-se às doenças cardiovasculares. Nos Estados Unidos da América para o ano de 2005 ocorreram aproximadamente 39.250 casos novos dos tumores de cavidade oral, faringe e laringe, com uma estimativa de óbitos de 11.090 pacientes (JEMAL et al., 2005).

A Oncologia é uma das áreas da medicina de maior evolução nas últimas décadas, constituindo-se a cura do câncer um dos mais significativos desafios para a comunidade científica. O tratamento do câncer consiste em três modalidades principais: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O emprego da cirurgia e radioterapia tem como objetivo, o controle local da doença, ou seja, são formas de tratamentos para a doença

localizada ou regionalizada, ao contrário da quimioterapia, cuja ação é sistêmica (LOPES et al., 2005; PEREZ et al., 1997). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de dois terços dos pacientes com câncer utilizam radioterapia em alguma fase do tratamento da doença, com finalidade curativa ou paliativa, de forma isolada ou associada a outras modalidades de terapia oncológica (NOVAES, 1998).

Desde a descoberta dos raios X por Wilhem Conrad Röntgen em 1895 e da radioatividade natural por Henri Becquerel em 1896, a radiação ionizante passou a ser amplamente utilizada na indústria e na medicina, com finalidade de pesquisa, diagnóstico e tratamento das doenças. Neste contexto a radioterapia tem tido avanços extraordinários. A radioterapia, isolada ou combinada a outras modalidades terapêuticas, como a quimioterapia ou cirurgia oncológica, caracteriza-se por ser curativa, efetiva para muitas neoplasias malignas, apresentando altas taxas de controle e sobrevida, principalmente para os tumores com estadiamento inicial (estádios I e II) (PINTO et al., 1999). A utilização de radiações ionizantes para o tratamento de doenças iniciou-se logo após a descoberta dos raios X, sendo o primeiro relato de tratamento em 1896, em uma paciente com câncer de mama (PEREZ et al., 1997; SALVAJOLI et al., 2003).

Muitos efeitos colaterais ocorreram em virtude do seu uso empírico, até que em 1934 surgiram as bases para a radioterapia fracionada e protraída, com Regaud e Coutard. O empirismo inicial deu lugar ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais precisas de administração da dose, através de equipamentos emissores de radiação de maior energia como os cobaltos e aceleradores lineares. A partir de então ocorreram notáveis avanços no conhecimento radiobiológico com o intuito de compreender melhor o papel da radiação ionizante no tratamento dos tumores (PINTO et al., 1999).

A radioterapia pode ser aplicada em diferentes formas: externa ou teleterapia, e interna ou braquiterapia. A radioterapia externa utiliza equipamentos que são classificados de acordo com a energia que produzem. A radioterapia convencional ou quilovoltagem compõe-se de aparelhos que produzem raios X de contato, superficiais e de ortovoltagem. A terapia de contato opera com potenciais de 30 a 50 kVp, normalmente com 2 mA de corrente, distância foco-superfície de 2cm ou menores e filtração entre 0,5 a 1 mmAl. A terapia superficial usa potenciais de 50 a 150 kVp, corrente no tubo entre 10 a 20 mA, distância foco-superfície entre 20 a 40cm e filtração entre 1 e 6 mmAl. A terapia de ortovoltagem trabalha com potenciais de 150 a 300 kVp, corrente no tubo entre 10 a 20mA, distância foco-superfície entre 30 a 50cm e filtração entre 1 e 4mmCu. Estas modalidades de radioterapia são empregadas quase que exclusivamente para os tumores

superficiais, como os da pele. A dose é calculada normalmente na pele, portanto para uma profundidade zero (SCARFF, 1997). Em virtude do desenvolvimento dos aparelhos nas décadas de 1960 e 1970, foi possível aplicar doses de radiação maiores em profundidade, surgindo a radioterapia de megavoltagem, produzida por equipamentos que emitem raios X e gama de super e megavoltagem (600 kV a 50 MeV) gerados pelas unidades de cobalto 60 e aceleradores lineares de partículas (SALVAJOLI et al., 2003).

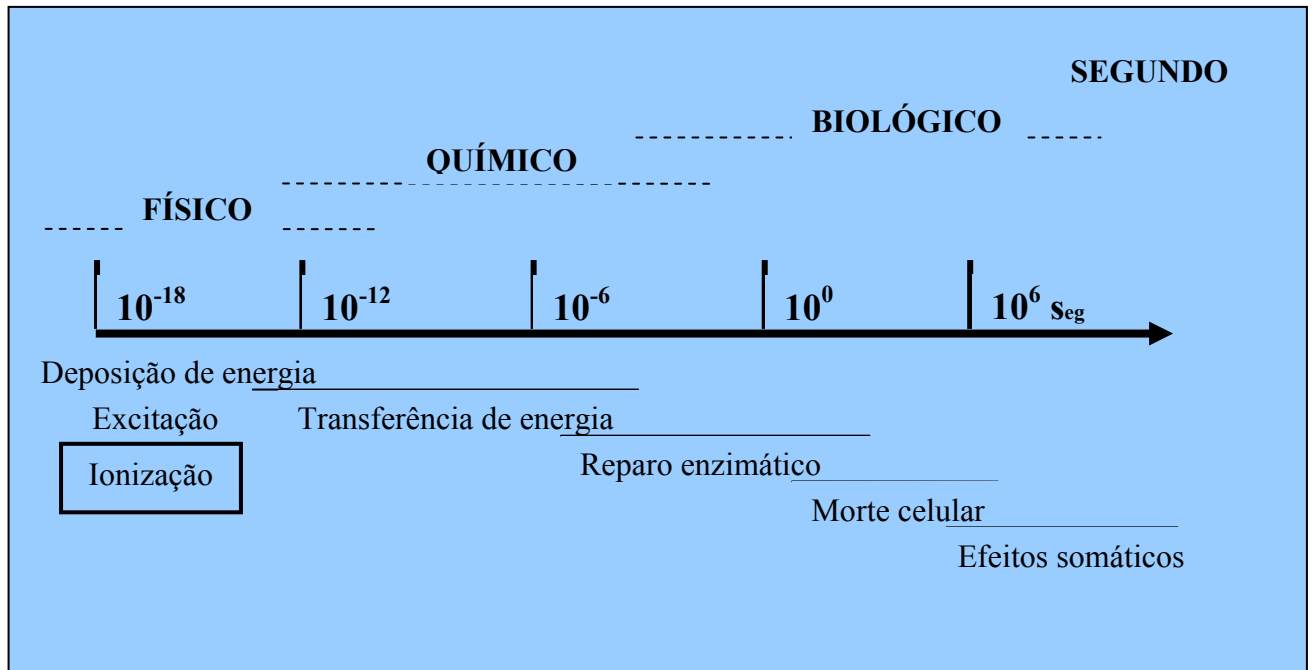
A radioterapia, concebida como uma modalidade de tratamento tem, como agente terapêutico, a radiação ionizante, ou seja, aquela que, em razão de suas características físicas, promove ionização no meio onde incide, retirando elétrons da estrutura da matéria. Quando a ionização acontece no interior da estrutura celular, ocorrem alterações de macromoléculas indispensáveis às funções vitais, levando a célula à morte ou à inviabilidade biológica. A radiação ionizante são divididas em eletromagnéticas e corpusculares. As primeiras são representadas pelos raios X e raios gamas (fótons) apresentando baixa densidade de ionização, percorrendo maior trajeto e são consideradas ter baixa transferência linear de energia (TLE), enquanto as segundas se caracterizam por apresentar massa, sendo representadas por elétrons, prótons, nêutrons, e apresentam alta densidade de ionização em pequeno trajeto e ter alto TLE. A transferência linear de energia é a taxa de energia liberada pela radiação por unidade de caminho percorrido. Do ponto de vista clínico, a maior parte dos tratamentos em radioterapia se faz através do uso de fótons e elétrons (NOVAES, 1998; MARTELLA et al., 2006).

A interação da radiação ionizante com o meio biológico inicia-se como um processo físico e passa aos estágios físico-químicos e biológicos (Figura 1) nas manifestações de seus efeitos, como a morte celular, perda da função do órgão, mutagênese e carcinogênese (LEHNERT, 1999).

As radiações ionizantes agem sobre o DNA nuclear, levando a célula à morte ou à perda da sua capacidade reprodutiva. Como o conteúdo do DNA duplica durante a mitose, células com alto grau de atividade mitótica são mais radiosensíveis do que aquelas com baixa taxa de mitose. Através de estudos em radiobiologia, ficou estabelecido que no ciclo celular, as células são mais radiosensíveis nas fases G<sub>2</sub> e M (LEHNERT, 1999; NOVAES, 1998). A fase de mitose é extremamente sensível à radiação, pois existe grande possibilidade de fixação da lesão radioinduzida. Acredita-se que este fato ocorra devido à grande compactação do DNA. Isso aumenta a probabilidade de interação, provocando aberrações cromossômicas e morte celular, o que corresponde ao aumento da



radiossensibilidade. A grande compactação da cromatina torna as lesões inacessíveis às enzimas reparadoras (SEGRETO et al., 2000).



**FIGURA 1 - Escala de tempo em segundos dos eventos envolvidos na inativação das células pela radiação e efeitos da radioterapia.** Figura modificada de LEHNERT, 1999.

O conceito de ciclo celular é fundamental para o entendimento de radiobiologia. Para células em proliferação, o ciclo celular é frequentemente representado como um círculo subdividido em quatro fases: M (mitose),  $G_1$ , S (síntese de DNA) e  $G_2$  (Figura 2). Um período  $G_0$  pode ser incluído para descrever o estado quiescente da célula. Vários experimentos, usando populações sincronizadas de células em cultura de tecidos, mostram que a sensibilidade à radiação depende do ponto, no ciclo mitótico, em que a célula é irradiada. Em geral, as células são mais sensíveis durante ou próximo à mitose. O período  $G_2$  também é sensível e, em alguns casos, pode ser tão sensível quanto à mitose (LEHNERT, 1999; HALL, 2000).

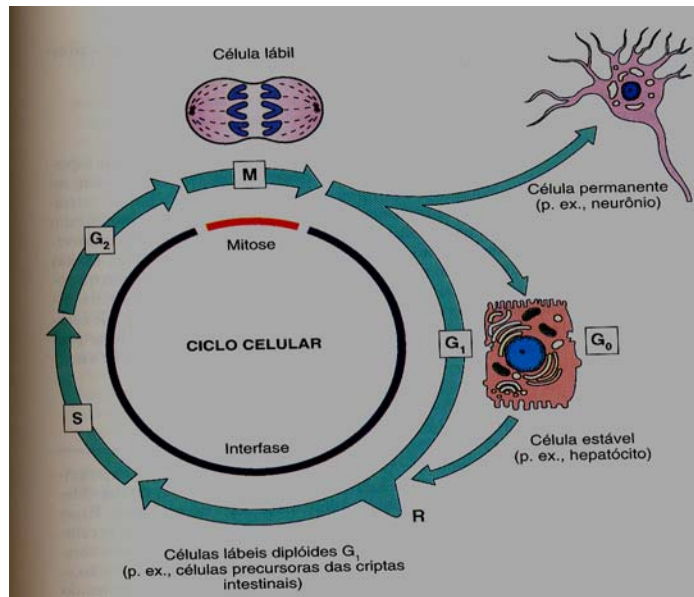
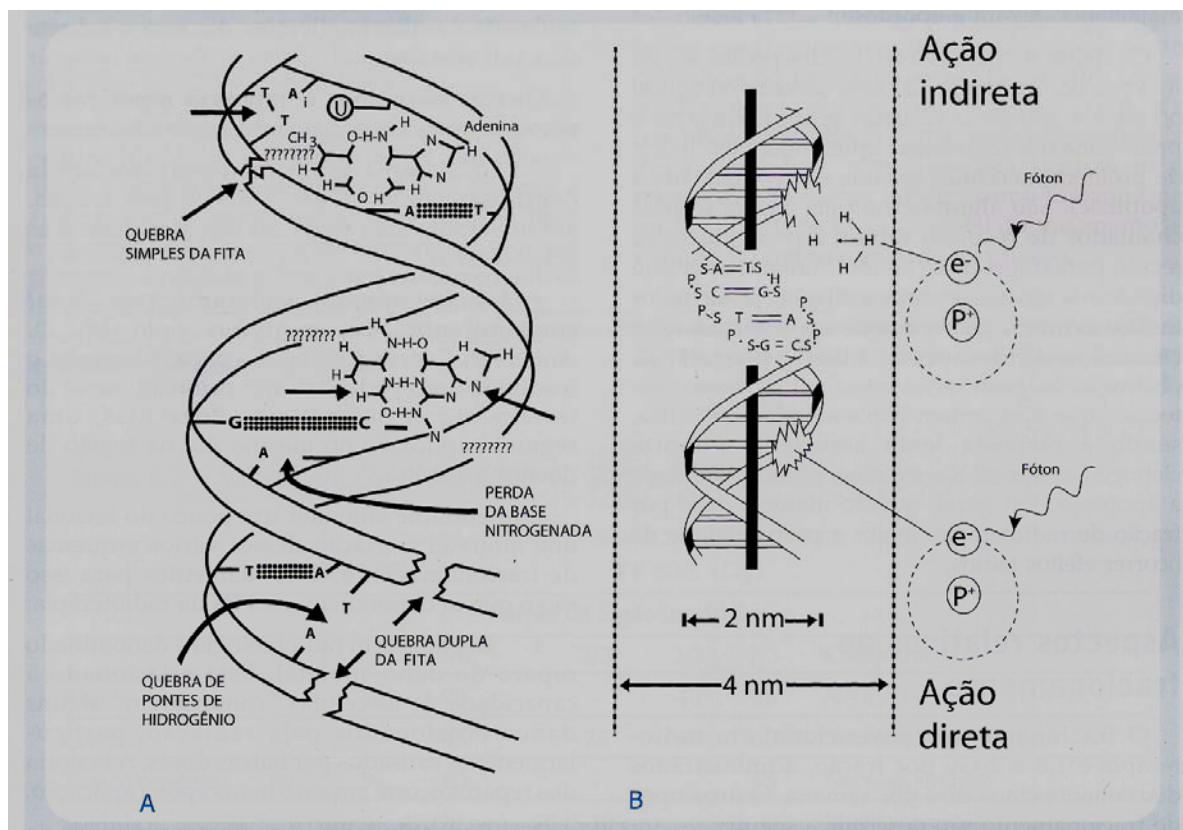


FIGURA 2 - Ciclo celular: Estágios do ciclo mitótico. FANTONE et al., 2002.

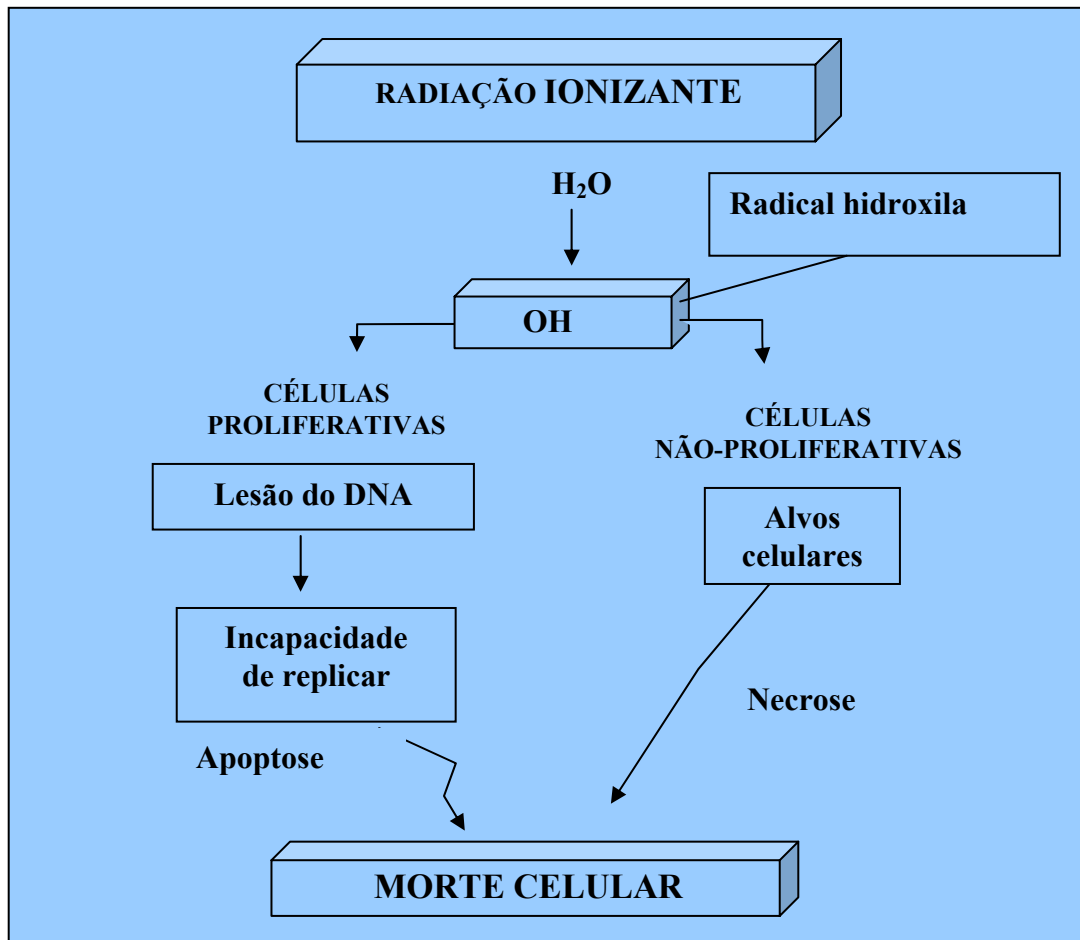
O efeito biológico da radiação nos tecidos orgânicos pode se processar de forma direta ou indireta (Figura 3). No efeito direto, a molécula de DNA é quebrada pela radiação com interferência no processo de duplicação, provocando alterações estruturais, constituindo cerca de 30% do efeito biológico. No efeito indireto, a lesão do DNA acontece pela ação dos radicais livres, produzidos a partir da ionização da água citoplasmática, respondendo por 70% dos danos, em virtude de a água ocupar parcela substancial da composição celular (LEHNERT, 1999). No entanto, a predominância de um efeito sobre o outro depende da TLE. Logo, a ação direta é o modo predominante de interação para radiação de alta TLE (LEHNERT, 1999; HALL, 2000).

No efeito indireto (Figura 4), ocorre à produção do radical livre oxidante hidroxila resultante da radiólise da água. A recombinação dos radicais livres leva à formação de outros componentes como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Quando os radicais hidroxilas reagem com moléculas orgânicas, formam-se radicais livres orgânicos. A presença de oxigênio induz a formação de radicais livres peroxidantes, os quais não permitem a recombinação para a molécula original, levando ao aumento de radicais livres no meio e maior potencial lesivo. A presença e a ausência de oxigênio molecular influenciam a resposta biológica aos raios X. Para produzir efeito, o oxigênio deve estar presente no momento da irradiação. O mecanismo de ação é por promover fixação da lesão induzida pelos radicais livres. Na ausência do oxigênio, a lesão produzida pelo

mecanismo indireto pode ser reparada. Dessa forma, o efeito indireto é modificado e o direto não. Esse efeito é detectado em situação de hipóxia considerável, em que os níveis de oxigênio são menor que 30mmHg. Neste caso, pequena quantidade de oxigênio é necessária para a radiosensibilização (SEGRETO et al., 2000).



**FIGURA 3 - Diagrama simplificado do mecanismo de ação da radioterapia sobre o DNA das células. A:** Quebra simples e dupla da fita do DNA, pela radiação. **B:** Ação química de radicais livres produzidos pelo mecanismo indireto da radiação sobre o DNA e a quebra direta das hélices do DNA pela radiação, caracterizando o efeito biológico direto (MARTELLA et al., 2006).



**FIGURA 4 - Mecanismo de lesão celular por radiação ionizante.** FANTONE et al., 2002.

Existem ainda diferenças na resposta radiobiológica entre o tecido normal e o tumoral, bem como entre os diferentes tecidos normais. Os de resposta rápida são aqueles que apresentam as manifestações clínicas de lesão em curto período de tempo depois da irradiação, como a pele, mucosa e tecido hematopoético. Associa-se à resposta rápida desses tecidos a alta atividade mitótica e a grande suscetibilidade à apoptose. Os de resposta lenta, ou tardia, são aqueles que apresentam alterações no tempo mais prolongadas e possuem baixa capacidade proliferativa, como o tecido ósseo, conjuntivo, muscular e nervoso. A resposta lenta associa-se à morte de clones celulares e a menor suscetibilidade à apoptose (PEREZ et al., 1997; WITHERS et al., 1997). Os tecidos de resposta rápida, nos quais as células morrem rapidamente após irradiação, praticamente não reparam as lesões radioinduzidas. Porém, devido à sua alta capacidade mitótica, as células precursoras que escaparam da morte possuem grande chance de se dividir e

repopular, mantendo assim a homeostase do tecido, dependendo da dose de radiação. Os tecidos de resposta lenta também apresentam capacidade de reparar as lesões radioinduzidas. Porém, esta capacidade é limitada e quando ultrapassada, a lesão estará estabelecida. As células lesadas e não reparadas morrem e não são substituídas uma vez que tais tecidos têm pequena atividade mitótica. A resposta está relacionada com a capacidade de a célula reparar ou não as lesões radioinduzidas.

A radioterapia é hoje, um recurso terapêutico bem definido para o tratamento de tumores iniciais ou avançados, quer em sua finalidade exclusiva, paliativa ou de forma adjuvante (LEE et al., 2004; BRIZEL, 2004). A utilização de modalidades combinadas, como a associada à quimioterapia além de perseguir melhores resultados do tratamento, tem o intuito de conseguir um controle local mais efetivo da doença, além de assegurar qualidade e melhora na sobrevida dos pacientes com câncer. Essa associação terapêutica tem sido utilizada, por diferentes razões, com adoção de estratégias também diferenciadas. Com base em ampla experiência clínica e experimental, alguns quimioterápicos têm-se firmados como de grande utilidade prática na integração quimioterapia-radioterapia (ROTMAN et al., 1997; SIMON, 1999). Dentre os tumores malignos, os de cabeça e pescoço são rotineiramente tratados com esta associação. A toxicidade da combinação radio-quimioterapia requer atenção especial, uma vez que os danos causados aos tecidos normais aumentam, em geral, por conta dessa modalidade combinada. Esse aumento de toxicidade pode ser influenciado pelo aumento dos parâmetros da radioterapia, quando associada à quimioterapia, ou vice-versa, pela soma de toxicidades distintas, em um mesmo tecido, ou em tecidos distintos, em um mesmo órgão, ou seja, os efeitos da combinação radioterapia e quimioterapia podem ser descritos como aditivos, interativos ou independentes (ROTMAN et al., 1997; SIMON, 1999).

Tais efeitos ou complicações decorrentes da radioterapia ou de combinação terapêutica podem ser classificados em agudos ou tardios, a depender da época em que acontecem. As complicações agudas ocorrem, principalmente, em tecidos com alta taxa de renovação celular, ou seja, tecidos de proliferação rápida como a mucosa oral. Dentre as reações adversas agudas da cavidade oral, a mucosite é uma das complicações mais frequentes nos pacientes submetidos à radioterapia, com aceleradores lineares ou cobaltos. Durante o tratamento, o oncologista está mais preocupado com a reação aguda, pois é a sua toxicidade que determina a tolerância e a possibilidade da continuidade do tratamento (WITHERS et al., 1997).

A mucosite oral ou estomatite, que consiste na resposta inflamatória da mucosa oral à ação dos agentes antineoplásicos ou radioterapia, é importante fator limitante do tratamento oncológico.(SONIS, 1998; SONIS et al., 2002, 2004; VERA-LIONCH et al., 2005). A incidência da agressão à mucosa tem variado com a intensidade e padrão de radioterapia e ainda de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento dos tumores de cabeça e pescoço (BENSADOUN et al., 2001; TROTTI et al., 2003). Regimes de hiperfracionamento e o uso de quimioterapia concomitante, em particular, aumentam o risco, a gravidade e a duração da agressão à mucosa (FU et al., 2000; TROTTI et al., 2003).

Estima-se que em torno de 60% dos pacientes recebendo radioterapia isolada, e mais de 90% dos que estão fazendo uso da modalidade experimental combinada (radioterapia e quimioterapia) desenvolverão mucosite oral grave (MERLANO et al., 1991).

Em trabalhos randomizados controlados a mucosite grave tem sido reportada em cerca de 60% para a radioterapia convencional e 100% para os regimes de radioterapia hiperfracionada ou hiperfracionada acelerada (SANCHIZ et al., 1990; TROTTI et al., 2003). VERA-LIONCH et al., em 2005, relataram 83% de mucosite oral em pacientes tratados com radioterapia associada ou não à quimioterapia e 29% de mucosite grave. TROTTI et al., em 2003, em meta-análise de trabalhos randomizados de pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia com ou sem quimioterapia relataram 97% de mucosite oral para a radioterapia convencional, com 34% de graus 3 e 4; 100% para os regimes de fracionamentos alterados com 57% de graus 3 e 4; 89% quando a radioterapia foi associada à quimioterapia com 45% de graus 3 e 4.

De forma aproximada, 15% dos pacientes recebendo radioterapia requerem hospitalização para controle da dor e suporte nutricional, como resultado da mucosite oral grave (PETERS et al., 1992).

A mucosite oral pode ocorrer em 100% dos pacientes submetidos à quimioterapia de alta dose e transplante de medula óssea (TMO), e em 80% a 100% dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço, recebendo radioterapia. Dos pacientes submetidos à TMO, dois terços desenvolvem mucosite ulcerativa graus 3 ou 4 (SCULLY et al., 2003). Mucosite nestes pacientes causa dor importante, restringe a alimentação, e serve como porta de entrada para infecções oportunistas. Resultados de novos protocolos de tratamento envolvendo radioterapia isolada ou associada à quimioterapia sugerem que cerca de 60% dos pacientes desenvolvem mucosite graus 3 e 4 (PICO et al., 1998; MABRO et al., 1999; VOKES et al., 2000; AIROLDI et al., 2004).

Caracterizada, pois, como um efeito colateral agudo de maior frequência, além de um importante fator dose-limitante para a radioterapia da região de cabeça e pescoço, a mucosite é, na verdade, e muitas vezes, grave e persistente, levando a uma piora da qualidade de vida dos pacientes e controle da sua doença (ARCHIBALD et al., 1986; BERGER et al., 1997; VERA-LIONCH et al., 2005).

Nos últimos anos tem sido observado um aumento significativo na incidência de mucosite em função dos tratamentos com altas doses de quimioterapia, das modalidades de radioterapia com hiperfracionamentos e de esquemas terapêuticos curativos concomitantes. Em consequência, há um interesse renovado em prevenção e tratamento de mucosite oral. No entanto, pouco ainda tem sido descoberto para evitá-la, a não ser prevenir complicações, como as infecções, e aliviar a dor e o desconforto, buscando melhor qualidade de vida para estes pacientes (SCULLY et al., 2003; BONASSA, 2005).

O mecanismo pelo qual ocorre a mucosite baseia-se no fato de que a mucosa oral apresenta um alto grau de descamação, havendo a necessidade contínua de multiplicação celular para sua reposição adequada. A radioterapia age, primariamente, nas células de alta atividade mitótica, de forma que a mucosa é intensamente afetada, perdendo sua capacidade de superar o processo normal de esfoliação. Esse fato, associado à inflamação e ao edema decorrente da ação da radioterapia, determina o aparecimento de um quadro evolutivo caracterizado por palidez da mucosa, eritema, pseudomembranas, úlceras e abscessos, caracterizando a mucosite oral humana nos seus diversos estágios (DIB et al., 1999).

SONIS em 2004b caracterizou a mucosite oral experimental induzida por radioterapia ou quimioterapia em cinco fases: fase de iniciação, também chamada de vascular ou inflamatória, fase de geração de mensagens, fase de amplificação, fase de ulceração e fase de cicatrização. Na fase vascular ou inflamatória ocorre a liberação de citocinas que causam dano tecidual local e iniciam uma resposta inflamatória, que resulta em aumento da vascularidade. Na segunda e terceira fases ocorre o efeito direto da radioterapia ou quimioterapia sobre as células epiteliais da mucosa oral que resulta em redução da reposição celular, atrofia e ulceração, havendo também a produção local de citocinas que aumentam o processo de destruição celular, amplificando, portanto, o processo inflamatório. Na fase ulcerativa ocorre a erosão tecidual e colonização bacteriana secundária, que provavelmente leva a uma nova liberação de citocinas e, conseqüentemente, mais dano tecidual. Na última fase ocorrem renovação e proliferação epitelial e restabelecimento da flora microbiana local com o processo de cicatrização da

mucosa (Figura 5). PARSONS et al, em 1994 advertem que o mecanismo patológico e os sintomas da mucosite por radioterapia são similares a aqueles quimio-induzidos.

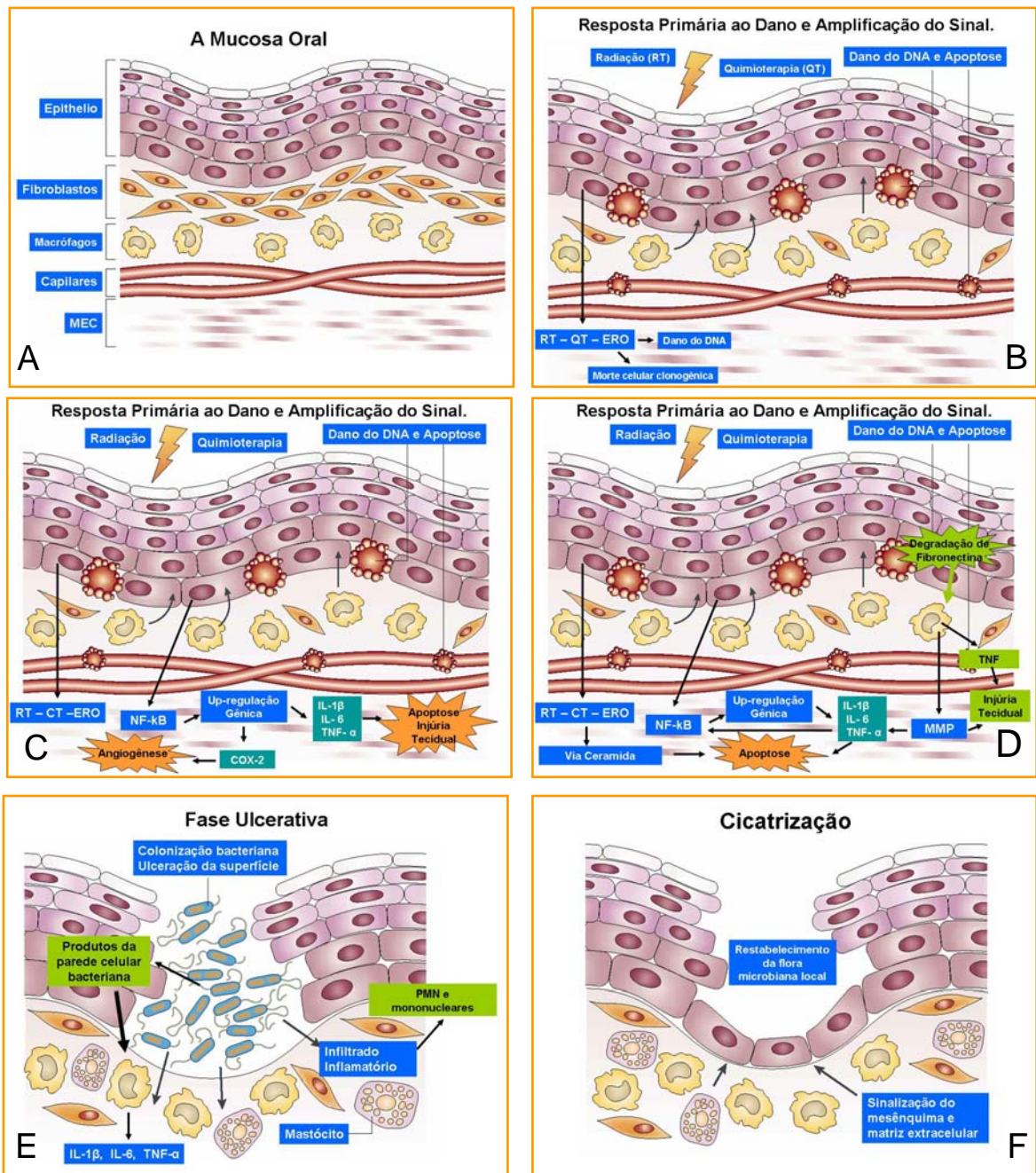
Nesse contexto, a graduação da mucosite foi estabelecida conforme o *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) como segue: escore ou grau 0 – mucosa sem alterações; grau 1 – mucosa apresentando eritema puntiforme, podendo haver dor branda, sem a necessidade de analgésicos; grau 2 – mucosite em placas que podem produzir uma secreção serossangüínea inflamatória, podendo haver dor moderada e necessidade de analgésicos; grau 3 – mucosite fibrinosa confluyente associada à dor intensa e necessidade de narcóticos, e grau 4 – quadro de ulceração, hemorragia ou necrose da mucosa (COX et al., 1995).

Via de regra, a mucosite tem início com uma queixa de sensibilidade maior aos alimentos ácidos, como sucos de frutas cítricas, e intolerância aos alimentos muito quentes ou muito frios. Sua ocorrência compromete a ingestão de alimentos sólidos e líquidos, a comunicação verbal, a higiene oral e a auto-imagem, além de provocar dor e desconforto, às vezes, de difícil controle, e ainda infecções secundárias associadas (SONIS et al., 2004a; BONASSA, 2005). Por acometer praticamente, 100% dos pacientes irradiados, mais de 25% deles apresentarão uma forma mais grave, necessitando da interrupção do tratamento por apresentar quadro de deficiência nutricional grave, levando, inclusive, à necessidade de alimentação enteral (MORAES et al., 2006; SONIS et al., 1998; SONIS, 1995; SONIS, 1998; PEREZ et al., 1997). Essa evolução grave da mucosite (Figura 6) pode também comprometer a qualidade de vida dos pacientes, além de elevar o custo do tratamento, e conseqüentemente interferir no controle local do tumor e colaborar para diminuição da sobrevida. (VERA-LIONCH et al., 2005; SONIS, 2004; BONASSA, 2005).

Estudos demonstram que a interrupção do tratamento tem impacto no controle local e sobrevida global dos pacientes, principalmente se o tempo de parada for superior a duas semanas (MACIEJEWSKI et al., 1983; PEREZ et al., 1997).

Essa mucosite torna-se mais freqüente e intensa quando a quimioterapia está associada à radioterapia. A mielossupressão associada às drogas e a própria doença oncológica, por si só, contribuem para o aparecimento da mucosite, tornando o epitélio mais suscetível à ulceração, infecção, necrose e sangramento.





**FIGURA 5 - Representações esquemáticas das fases e dos principais mecanismos e mediadores envolvidos nos danos à mucosa oral (MO), induzidos pela radioterapia (RXT) e/ou quimioterapia (QT). A: camadas da Mucosa Oral normal. B: fase de iniciação, vascular ou inflamatória. C: fase de geração de mensageiros. D: fase de amplificação. E: fase de ulceração. F: fase de cicatrização**

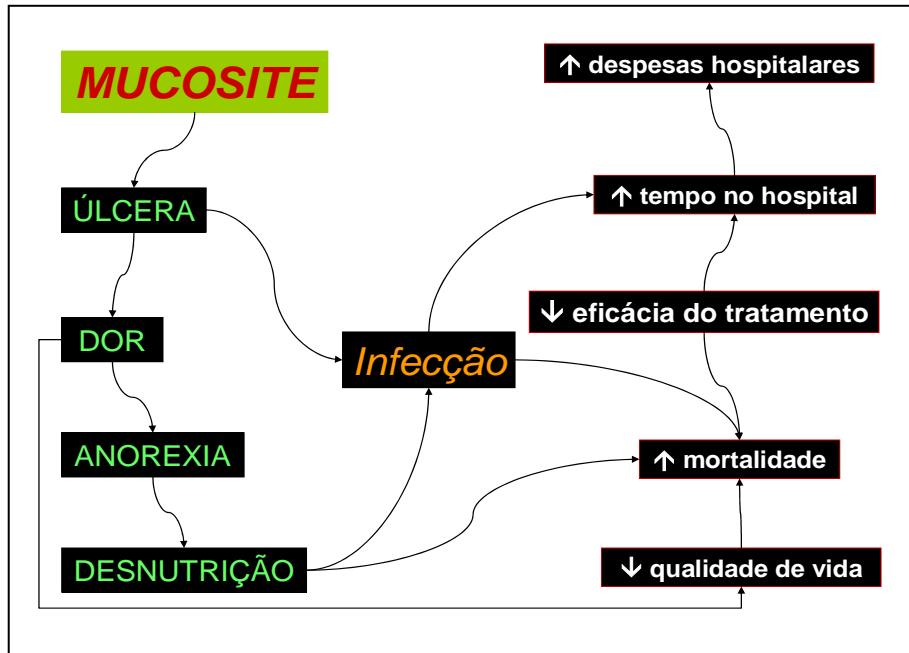


FIGURA 6 - Representação esquemática da evolução da mucosite oral.

Existem fatores ou efeitos colaterais que tendem a piorar a evolução da mucosite, e.g.: da xerostomia, alteração do paladar, disfagia, odinofagia, infecções oportunistas como a candidíase, más condições de higiene da cavidade oral e trauma funcional, quase sempre presentes nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (BONASSA, 2005; SONIS et al., 2000). Na presença de neutropenia, a mucosite pode predispor a quadro de septicemia, bacteremia e fungemia podendo levar o paciente a óbito. (SCULLY et al., 2003).

Enquanto a mucosite induzida por quimioterapia tipicamente acontece de 7 a 14 dias após o tratamento, com duração de 1 a 2 semanas (SCULLY et al., 2004), o início da mucosite induzida por radioterapia, normalmente, acontece a partir da segunda semana de tratamento, correspondendo a uma dose de 1800 a 2000 cGy, podendo se manter por 2 semanas a 3 meses após o final da radioterapia. Nessa fase inicial do tratamento, já é possível observar uma mucosa com eritema de grau variado, em intensidade, em associação a sintomas de dor e desconforto oral. Tais manifestações representam a evidência clínica das alterações vasculares, aumento da permeabilidade e congestão dos vasos sanguíneos, e diminuição da repopulação tecidual normal, produzindo influência direta na espessura epitelial. A partir dessa fase, com o aumento da dose absorvida e dependendo da resposta individual do paciente, tem início um processo progressivo de acometimento da mucosa, caracterizando a mucosite nas suas diversas fases. Nesse caso, a radioterapia induz mucosite em função da dose acumulada nos tratamentos fracionados, podendo a forma

ulcerativa acontecer a partir da dose acumulada de 3000 cGy (SCULLY et al., 2004). O uso de técnicas computadorizadas em radioterapia, tais como as modalidades de radioterapia conformacional e de feixes modulados (IMRT) ajudam a minimizar a mucosite em decorrência da diminuição das áreas expostas à radiação.

Apesar de muitos aspectos importantes estarem relacionados ao tratamento do câncer contribuindo sobremaneira para a evolução da própria oncologia, muitos mecanismos específicos implicados à etiopatogenia dessa doença, bem como à gênese dos efeitos colaterais relevantes como a mucosite, ainda estão por ser compreendidos completamente.

É fundamental conhecer os fatores implicados com a etiopatogênese da mucosite oral, especialmente em quadros de evolução grave.

A etiopatogênese da mucosite oral ainda permanece pouco compreendida, pois se trata de um processo biológico extremamente complexo, e ainda em fase de exploração científica. Sabe-se, no entanto que existem os fatores inerentes ao tratamento, como também aos pacientes, além dos mediadores da resposta inflamatória da mucosa oral que influenciam o surgimento e evolução das mucosites orais induzidas por radioterapia e quimioterapia (SONIS, 2004a; SONIS, 1998; SONIS et al., 1999; SONIS, 2004b).

Fatores intrínsecos à radioterapia, como o tipo de irradiação, volume de tecido irradiado, dose diária e total e esquemas de fracionamento, guardam relação com a intensidade ou grau da mucosite (BENSADOUN et al., 2001). Outros como o volume de saliva, o nível e concentração de EGF na mucosa oral parece modificar ou atenuar o grau de mucosite oral. A radioterapia hiperfracionada e a combinação de radio e quimioterapia aumenta a prevalência, gravidade e duração da mucosite (SCULLY et al., 2003; EPSTEIN et al., 2004). Além disso, fatores relacionados aos pacientes como idade avançada, gênero, consumo de cigarros e álcool, má higiene oral, doenças periodontais pré-existentes, baixo peso, *status* funcional ruim, leucopenia, doença avançada e outras co-morbidades estão relacionadas com o aumento da incidência de mucosite oral (VERA-LIONCH et al., 2005).

Vários estudos são descritos na literatura para prevenção ou mesmo diminuição de eventos adversos da radioterapia, entretanto, até o presente momento, o tratamento da mucosite oral é considerado paliativo e de efetividade limitada, tido como suporte, até pelo fato de se restringir às complicações, como as infecções, e no alívio do quadro de dor e desconforto dos pacientes. Nenhum agente terapêutico tem-se mostrado eficaz a ponto de ser considerado como terapia padrão nas mucosites radio e quimioinduzidas (PLEVOVÁ, 1999). Essa é, ainda, uma complicação inevitável para pacientes irradiados na região da

cabeça e pescoço, muito embora, medidas de proteção da mucosa venham sendo propostas, com o objetivo de evitar ou reduzir a intensidade dessas lesões. Em recente meta-análise envolvendo 15 trabalhos que avaliaram e testaram diferentes formas de tratamento, não foram encontradas evidências definitivas que recomendem uma prática clínica de prevenção ou tratamento para a mucosite oral (SCULLY et al., 2004). No entanto, diversos trabalhos na literatura têm discutido vários protocolos da boa prática clínica quanto ao tratamento e prevenção da mucosite oral (PETERSON et al., 2006; KEEFE et al., 2006; McGUIRE et al., 2006; BRENNAN et al., 2006;). Uma meta-análise da Cochrane Library utilizou 52 “trials”clínicos envolvendo 3594 pacientes sob 21 intervenções diferentes para mucosite oral. Nove das 21 intervenções demonstraram alguma evidência de benefício, embora fraco, em prevenir ou diminuir a gravidade da mucosite (CLARKSON, 2006). Destas potenciais intervenções destacaram-se: bochechos com alopurinol, amisfotina, antibióticos tópicos, benzidamina, fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos, enzimas hidrolíticas, cubos de gelo durante a infusão de quimioterapia, povidone comparada com água e cuidados orais. Estudo experimental com ratos submetidos à radioterapia e quimioterapia e tratados com palifermin (fator de crescimento de keratinócito humano recombinante) tem demonstrado redução da mucosite induzida por radioterapia e quimioterapia (WOLFGANG DORR et al., 2005).

Recentemente, com o desenvolvimento dos modificadores de resposta biológica e dos agentes biológico-moleculares ou alvos-específicos, na oncologia clínica, e em função dos avanços tecnológicos, na radioterapia, grande tem sido a contribuição para a diminuição dos efeitos colaterais e das toxicidades, aumentando a efetividade do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente oncológico (FERREIRA et al., 2006). A abordagem preventiva e o tratamento das complicações da cavidade oral decorrentes das terapêuticas antineoplásicas são importantes para melhorar a qualidade de vida, diminuir as morbidades e reduzir os custos dos tratamentos, assim como influenciar no controle local e na sobrevida dos pacientes (EPSTEIN et al., 2004).

### 1.1. Mediadores inflamatórios na mucosite oral

A mucosite oral induzida por radioterapia deve ser entendida como um efeito adverso agudo, evidenciado, clinicamente, por um quadro sintomático e etiopatogênico complexo. Caracteriza-se por um processo inflamatório onde diversos mediadores estão envolvidos de forma direta ou indireta (KUMAR et al., 2005).

A inflamação é a reação de um tecido e de sua micro circulação a uma lesão patogênica, tendo por característica a produção de mediadores inflamatórios e movimentação de líquidos e leucócitos do sangue para os tecidos extravasculares. O processo inflamatório, na verdade caracteriza-se por uma complexa gama de ativação de enzimas, liberação de mediadores, extravasamento de fluidos, migração de células e destruição e reparo teciduais. Historicamente, ela tem sido denominada aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão, sintomas clínicos e natureza da resposta inflamatória (FANTONE et al., 2002).

Dentre esses mediadores do processo inflamatório relacionado com a mucosite oral, destacam-se as prostaglandinas e, principalmente, as citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), desempenhando, estes, importantes funções nas mucosites orais induzidas por radioterapia e quimioterapia (LIMA et al., 2005).

Os mediadores originam-se de proteínas plasmáticas ou de células. Os derivados do plasma encontram-se na forma de precursores, os quais devem ser ativados, por meio de uma série de clivagens proteolíticas, para adquirir suas propriedades biológicas. Aqueles derivados de células, normalmente, estão armazenados em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados, ou são sintetizados *de novo*, em resposta a um estímulo, como as prostaglandinas e citocinas (KUMAR et al., 2005).

As principais fontes destes mediadores são as plaquetas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos, além de células mesenquimais e a maioria dos epitélios. A produção dos mediadores ativos é desencadeada por produtos microbianos ou por proteínas do hospedeiro, tais como as proteínas dos sistemas do complemento, cininas e coagulação, que são, por sua vez, ativadas por microorganismos e tecidos danificados (KUMAR et al., 2005).

A maioria dos mediadores desempenha sua atividade biológica ligando-se, inicialmente, a receptores específicos nas células-alvos. Entretanto, alguns possuem atividade enzimática direta ou causam dano oxidativo. Um mediador pode, por si só, estimular a liberação de outros mediadores pela célula-alvo, agir em um ou em alguns tipos

de células, terem vários alvos ou mesmo apresentar efeitos diferentes em tipos celulares diversos (FANTONE et al., 2002).

Os mediadores, uma vez ativados e liberados pelas células, apresentam meia-vida curta, podendo ser deteriorados rapidamente, inativados por enzimas, eliminados ou inibidos. Logo, existe um sistema de verificação e equilíbrio que regula as ações dos mediadores (RANG et al., 2003).

Dentre esses mediadores, destaca-se o TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, que tem sido implicada em muitas neoplasias malignas, assim como em terapêuticas oncológicas como a quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea, que podem induzir sua expressão (YANG et al., 1995).

## **1.2. Citocinas como mediadores da resposta inflamatória**

Citocinas são mediadores protéicos ou peptídicos de baixo peso molecular que, nas reações imunológicas e inflamatórias, são liberados principalmente por macrófagos e linfócitos, regulando a ação das células inflamatórias e do sistema imune. Atualmente, são identificados mais de 100 tipos desses mediadores. O termo citocinas refere-se a um grupo de reguladores celulares peptídicos que inclui as linfocinas (fatores derivados de linfócitos), as quimiocinas, as monocinas (fatores derivados de monócitos), as interleucinas, interferons, fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônia. Desde há muito se sabe de seu envolvimento nas respostas imunológicas celulares, e seus produtos possuem efeitos adicionais importantes tanto na inflamação aguda quanto na crônica (RANG et al., 2003).

As citocinas envolvidas com a resposta imunológica e inflamatória são peptídios, tanto pró-inflamatórios quanto antiinflamatórios. Dentre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se o TNF- $\alpha$  e a IL-1 (RANG et al., 2003). Estas citocinas são consideradas as mais importantes nos processos inflamatórios agudos e crônicos, e nos processos de reparo, sendo suas fontes celulares primárias os macrófagos e monócitos, além dos lipopolissacarídeos responsáveis pela sua liberação (DI GIROLAMO et al., 1997). A secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 pode ser estimulada por endotoxina e outros produtos microbianos, complexos imunes, lesão física, e vários tipos de estímulos inflamatórios. Age na inflamação por seus efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos e por indução de reações sistêmicas na fase aguda.

No endotélio, tais mediadores induzem um espectro variado de alterações, sendo a maioria regulada na transcrição genética, chamadas de ativação endotelial. Estes mediadores induzem a síntese das moléculas de adesão endotelial e mediadores químicos, incluindo outras citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico. O TNF- $\alpha$  também estimula os neutrófilos, levando a um aumento das respostas dessas células a outros mediadores (MANTOVANI et al., 1997).

Estas citocinas atuam sobre as células endoteliais vasculares das vênulas pós-capilares causando aumento da permeabilidade e a produção de mais mediadores da inflamação. Em geral, a ação das citocinas se dá através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos, funcionando como hormônios inflamatórios (FANTONE et al., 2002). Os efeitos biológicos dependem do tipo de citocina e do meio celular que está envolvido, porém estas moléculas atuam na ativação e na divisão celular, e ainda na apoptose (PARKIN et al., 2001). Como exemplo do mecanismo endócrino, temos o envolvimento do TNF- $\alpha$  na patogênese do choque séptico induzido por lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas. O TNF- $\alpha$  também atua através de mecanismo parácrino, mediando os vários eventos que ocorrem nos processos inflamatórios agudos e crônicos e na forma autócrina para ativar os macrófagos, aumentando ainda mais a produção de IL-8 e mercaptopurinas (MCP) (RANG et al., 2003).

A IL-1 e o TNF- $\alpha$  induzem as respostas sistêmicas da inflamação, onde as mais proeminentes são as seguintes: febre, choque, leucocitose, leucopenia e resposta da fase aguda associadas a infecções ou traumas. Essas respostas incluem febre, perda de apetite, sono de ondas lentas, liberação de neutrófilos na circulação, liberação de corticotrofina e corticosteróides. Dentre os vários efeitos fisiopatológicos do TNF- $\alpha$  estão o choque, a citotoxicidade e a caquexia. O TNF- $\alpha$  regula a massa corpórea, promovendo a mobilização de lipídios e proteínas e suprimindo o apetite. A produção continuada de TNF- $\alpha$  contribui para a caquexia, um estado patológico caracterizado pela perda de peso e anorexia que acompanha algumas infecções e doenças neoplásicas (ARGILES et al., 1997). Estas citocinas também induzem a síntese de quimiocinas similares nos fibroblastos e células epiteliais, e o próprio TNF- $\alpha$  pode promover a liberação de IL-1 a partir dos macrófagos, e tanto a IL-1 como o TNF- $\alpha$  induzem a síntese hepática de IL-6 (FANTONE et al., 2002).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1, consideradas as duas citocinas que mais participam do processo inflamatório, são produzidas, principalmente, por macrófagos ativados e linfócitos (KUMAR et al., 2005). Tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 induzem vias de sinais que levam à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Em estudos clínicos tem sido descrito que tal fator

de transcrição controla a expressão da IL-1 e do TNF- $\alpha$ , enquanto a administração de seus inibidores seletivos anula a expressão dessas citocinas em modelos animais de inflamação crônica, sugerindo que tais inibidores possam ser de valor clínico. Por conseguinte, esse fator desempenha um papel chave na indução das respostas inflamatórias e imunes. Há de se deduzir que quando uma célula é estimulada, ocorre liberação de NF- $\kappa$ B, que penetra no núcleo e inicia a transcrição de genes para uma variedade de mediadores inflamatórios e imunológicos (RANG et al., 2003).

Dentro desse contexto, tem sido estabelecido que a radioterapia seja capaz de iniciar uma cascata de eventos envolvendo citocinas pro-inflamatórias, tais como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  em tecidos irradiados. O aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi detectado em células da submucosa de hamsters, após radioterapia da mucosa jugal, em decorrência do processo inflamatório, sendo que a interferência na produção de TNF- $\alpha$  está relacionada com a diminuição da mucosite (SONIS, 2000). Dessa forma, a inibição dos efeitos dessas citocinas pode ser benéfica tanto para a mucosite, como para uma variedade de doenças inflamatórias, incluindo o choque séptico.

### **1.3. Pentoxifilina**

A pentoxifilina (PTX), 1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina (Figura 7), é uma metilxantina muito utilizada no tratamento de doenças vasculares. Diferentemente da teofilina, é um agente hemorreológico, que interfere na viscosidade do sangue e favorece a perfusão da microcirculação sangüínea de leitos periféricos e cerebrais. Promove um aumento da deformidade das células sangüíneas, reduzindo a sua viscosidade, a agregação plaquetária e as concentrações plasmáticas de fibronogênio, com diminuição da formação de trombos e melhorando a perfusão na circulação microvascular (WARD et al., 1987).



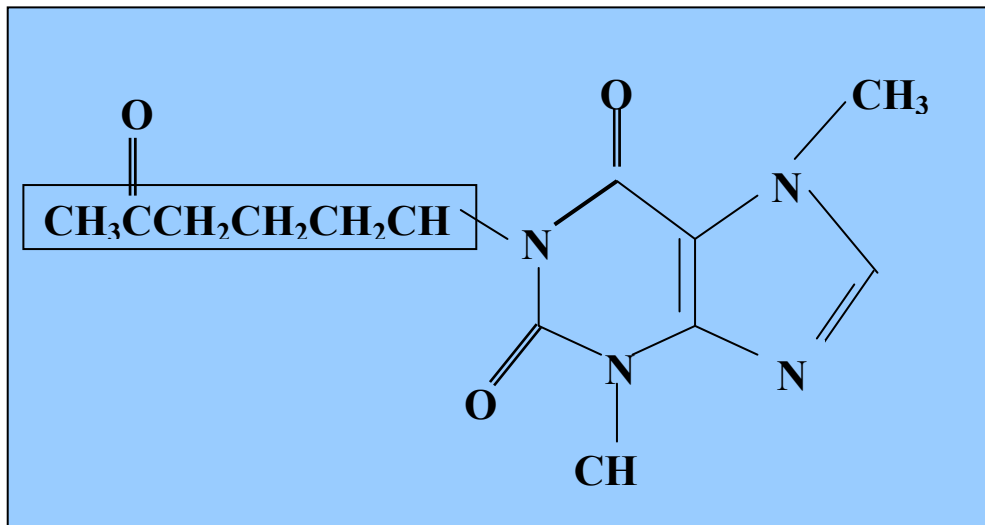


FIGURA 7 - Estrutura química da pentoxifilina

Além da sua função nas desordens vasculares, apresenta também importantes efeitos adicionais, dentre eles inibição do processo inflamatório. Mesmo que o seu mecanismo de ação ainda não tenha sido claramente elucidado, tem-se descrito que este fármaco inibe a produção de citocinas inflamatórias, como a síntese do TNF- $\alpha$  *in vitro* (STRIETER et al., 1988; HAN et al., 1990), e *in vivo* (LeMAY et al., 1990; ZABEL et al., 1993; NEUNER et al., 1994). Existem também evidências que a pentoxifilina pode influenciar outras citocinas inflamatórias, tais como as interleucinas 1, 2, 6, 12 e o IFN- $\gamma$  (THANHAUSER et al., 1993; MOLLER et al., 1997).

A pentoxifilina tem mostrado efeitos benéficos em processos inflamatórios agudos, como no choque séptico, na diminuição da agressão pulmonar e na modulação da inflamação meníngea em modelos experimentais. Dados de estudos animais sugerem que a inibição da transcrição do TNF- $\alpha$ , ou mesmo da sua produção, pode ser um dos mecanismos de ação da pentoxifilina nos processos inflamatórios. Este agente pode aumentar a quimiotaxia dos neutrófilos, sendo este efeito decorrente da inibição da ação das citocinas inflamatórias sobre a função dos neutrófilos. Pode também diminuir o dano tecidual causado pelos neutrófilos em condição como no choque séptico (DOHERTY et al., 1991).

Além dessas funções, a pentoxifilina pode atuar como inibidor da fosfodiesterase 4 (PDE4), inibindo, a liberação de TNF- $\alpha$  e estimulando assim a produção e a inibição de IL-10, uma citocina antiinflamatória (BESSLER et al., 1986; ROGER, 1997). D'HELLEN COURT et al., em 1996, descreveram que a regulação da IL-10 pela

pentoxifilina ocorre de forma dependente de sua concentração, pois quando na concentração de  $10^{-4}$  foi capaz de estimular a produção de IL-10 e na concentração de  $10^{-3}$  a inibiu, sugerindo, portanto, uma regulação dose-dependente. A inibição da PDE4 leva a um aumento dos níveis de cAMP intracelular, redução da síntese de tromboxano assim como aumento da produção das prostaglandinas (WARD et al., 1987; SCHANDENE et al., 1992; YANG et al., 1995).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado os efeitos antiinflamatórios da pentoxifilina inibindo citocinas como a IL-2, IL-6, IL-12 e o IFN- $\gamma$  (THANHAUSER et al., 1993; MOLLER et al., 1997), e seu papel protetor na mucosite oral experimental induzida por quimioterápicos (LIMA et al., 2005). Inibe também a produção de TNF- $\alpha$  em resposta a endotoxinas via inibição da transcrição de gene TNF, diminuindo, assim, sua concentração no plasma (DOHERTY et al., 1991).

Ainda, a pentoxifilina regula a produção de outras citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, sendo muitos dos seus efeitos antiinflamatórios decorrentes da inibição da PDE4 (DOHERTY et al., 1991; BADGER et al., 1994; HOLZHEIMER et al., 1995; LIANG et al., 1998). A pentoxifilina também pode ser efetiva no tratamento de distúrbios auto-imunes e processos inflamatórios mediados pelo óxido nítrico (BESHAY et al., 2001). SLIWA et al., em 2004, mostraram que a pentoxifilina foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  no plasma em pacientes com miocardiopatia isquêmica, caracterizando-se, portanto, como agente anticitocinas. Pentoxifilina também tem a função de inibir a apoptose em diferentes tipos celulares humanos, tanto *in vitro*, como *in vivo* (NIEDER et al., 2005).

Ela com o passar do tempo, tem sido cada vez mais estudada na oncologia por diversas razões, como por exemplo, a melhora da perfusão tumoral. Essa poderia resultar em melhor oxigenação e conseqüentemente aumento da radiosensibilidade e maior ação dos agentes antineoplásicos nos tumores. Sua atuação, tanto na produção quanto na inibição dos mediadores inflamatórios como as citocinas, cria oportunidades de seu uso associado à radioterapia ou quimioterapia com o intuito de diminuir ou entender melhor os efeitos colaterais agudos e tardios pós-tratamento nos tumores e nos tecidos normais (NIEDER et al., 2005). Estudos mostram que a pentoxifilina pode intervir na cascata das citocinas pós-radioterapia, podendo, portanto, aliviar ou mesmo reverter alguns dos seus efeitos tardios, como a fibrose (OKUNIEFF et al., 2004; AYGENC et al., 2004). OZTURK et al., em 2004, mostraram um efeito protetor significativo da pentoxifilina nas reações agudas e tardias em pacientes submetidos à radioterapia para câncer de pulmão e mama.

Como resultado da ação da pentoxifilina sobre os mediadores inflamatórios, temos, então, a oportunidade de usar este agente em vários estudos clínicos, buscando, portanto, um melhor entendimento de processos inflamatórios como a mucosite radio e quimio-induzidas. Vários estudos pré-clínicos mostraram que a pentoxifilina pode elevar a radiosensibilidade dos tumores, como também proteger os tecidos normais, porém estudos clínicos somente sugerem que a pentoxifilina tenha um efeito radiosensibilizante (NIEDER et al., 2005).

Desse modo, considerando estes aspectos, somados ao fato de que a radioterapia induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  relacionadas ao dano tecidual (SONIS, 2004a), é razoável pensar que a pentoxifilina também pode ter um papel importante na proteção da mucosite oral experimental radioinduzida, justificando-se, portanto, o seu uso na mucosite ulcerativa induzida por radiação em hamsters.

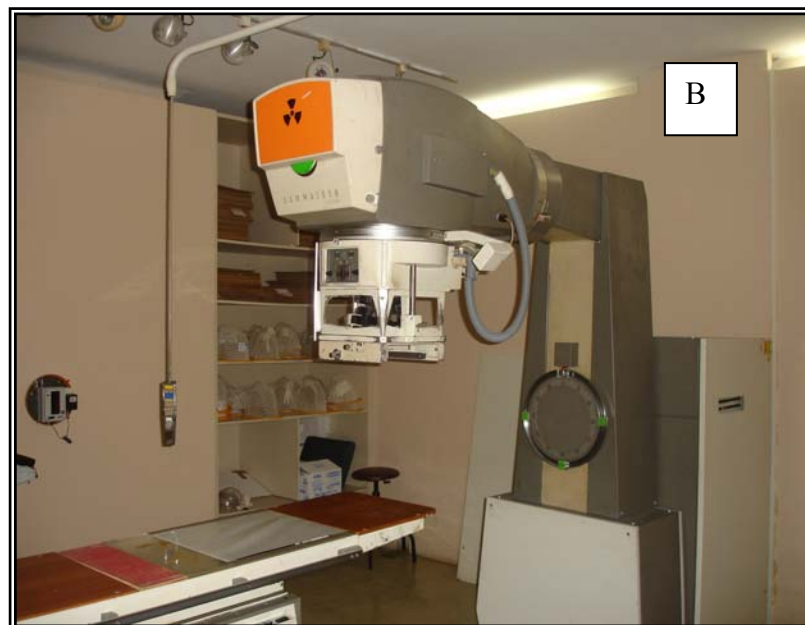
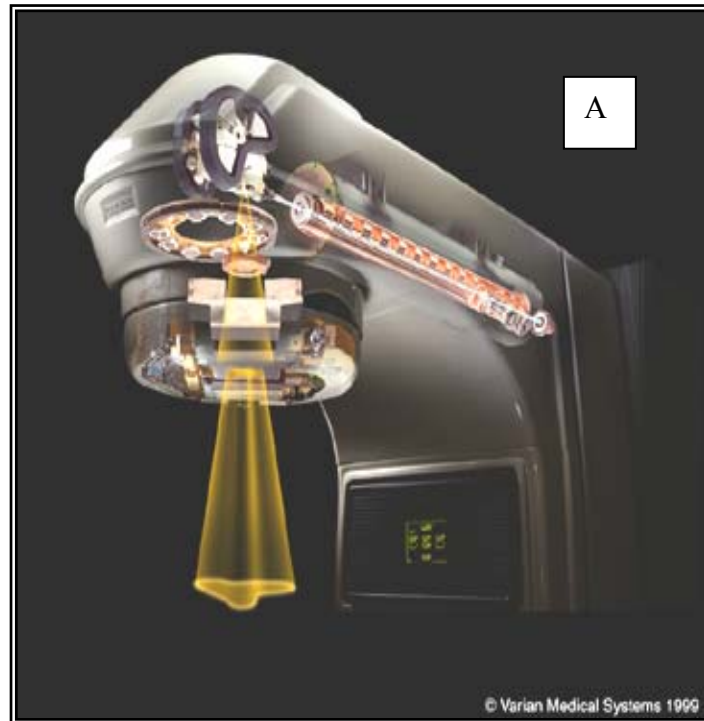
#### 1.4. Justificativas

O manejo de diversas toxicidades relacionadas à radioterapia tem evoluído. No entanto, a incidência de mucosite tem aumentado. .Dentre os eventos adversos, a mucosite ainda representa o efeito agudo de maior frequência e o maior fator dose-limitante para a radioterapia na região da cabeça e pescoço.

Atualmente o tratamento consiste apenas em uma abordagem essencialmente paliativa, não existindo um protocolo de atendimento preventivo e eficaz. Mesmo havendo uma extensa literatura a esse respeito, falta ainda uma resposta definitiva sobre o papel da inflamação na mucosite. Isso, provavelmente, está relacionado a pouca compreensão dos mecanismos específicos, através dos quais o processo inflamatório pode mediar tais lesões teciduais. Entretanto, alguns grupos de compostos, chamados citocinas, que devido às suas origens celulares e efeitos sobre as células alvo, podem fornecer alguma informação para a compreensão da fisiopatologia da mucosite. Assim, mediadores como o TNF- $\alpha$  podem potencialmente participar nesse processo inflamatório, pois tal citocina está relacionada com a modulação dessas lesões, em associação a outros mediadores inflamatórios como as interleucinas.

Em síntese, a despeito de todos os trabalhos abordando os possíveis papéis dos mediadores inflamatórios na mucosite induzida por radioterapia, ainda não existem dados conclusivos acerca da relação desses mediadores com a mucosite oral.

Nesse contexto, considerando estes aspectos, somados ao fato de que a radioterapia induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  relacionadas à agressão tecidual (SONIS, 2004a), foi decidido por desenvolver um modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem (Figura 7) em hamsters e avaliar o papel dos possíveis mediadores implicados nesse processo inflamatório, como o TNF- $\alpha$  .



**FIGURA 8 - Aparelhos de megavoltagem: A. Acelerador Linear – Varian-Acuity. B. Cobalto 60.**

## 2. OBJETIVOS

1. Desenvolver um modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem em hamsters;
2. Avaliar o curso temporal da resposta inflamatória nesse modelo, através do uso de parâmetros histológicos e bioquímicos;
3. Avaliar o papel de TNF- $\alpha$ , como marcador de intensidade da lesão nesse modelo;
4. Validar o modelo, através da observação de efeito protetor de um agente inibidor da síntese de citocinas, pentoxifilina, na intensidade da lesão inflamatória.

### 3. MÉTODO

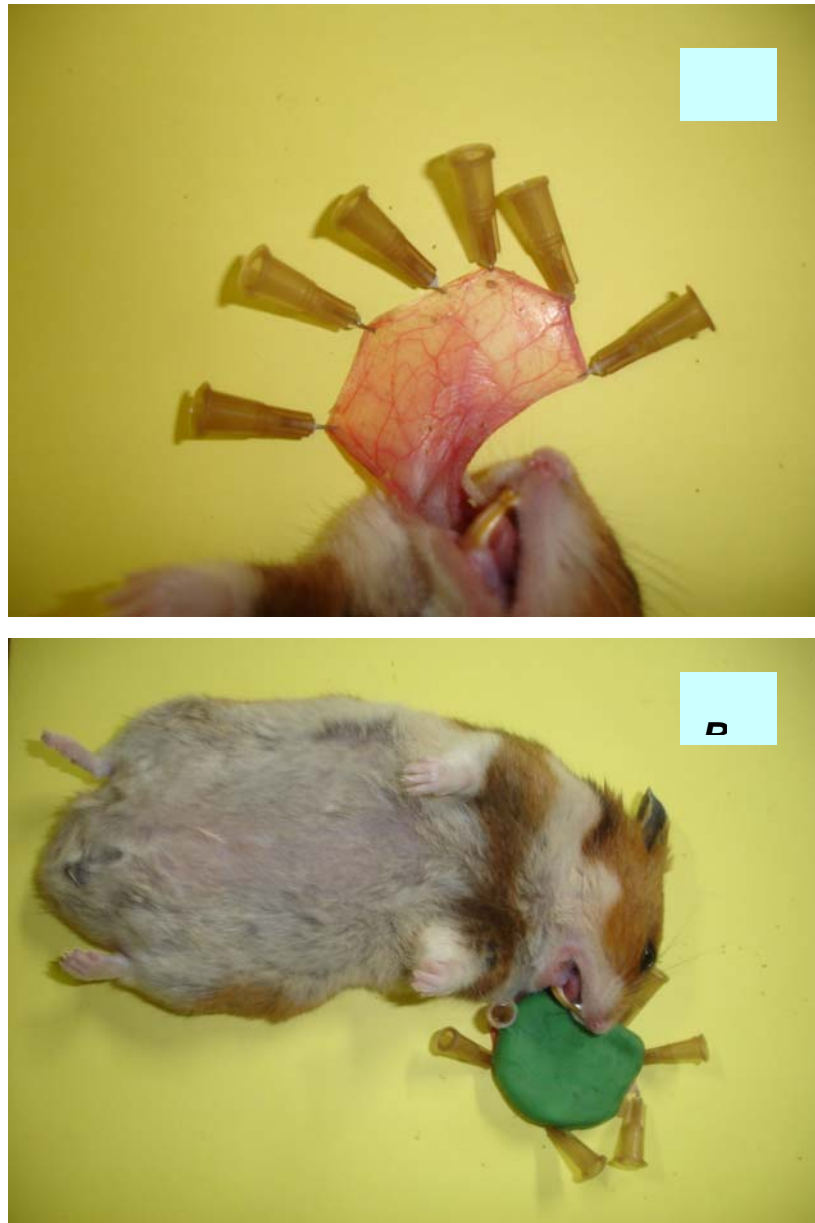
#### 3.1. Animais

Foram utilizados 156 hamsters Golden Siriam machos, com massa corporal média de  $139 \pm 38$  gramas, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos os animais receberam alimentação vegetal (abóboras) e água à vontade. Os animais foram usados respeitando as diretrizes aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC para uso de animais experimentais. Foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

#### 3.2. Radioterapia

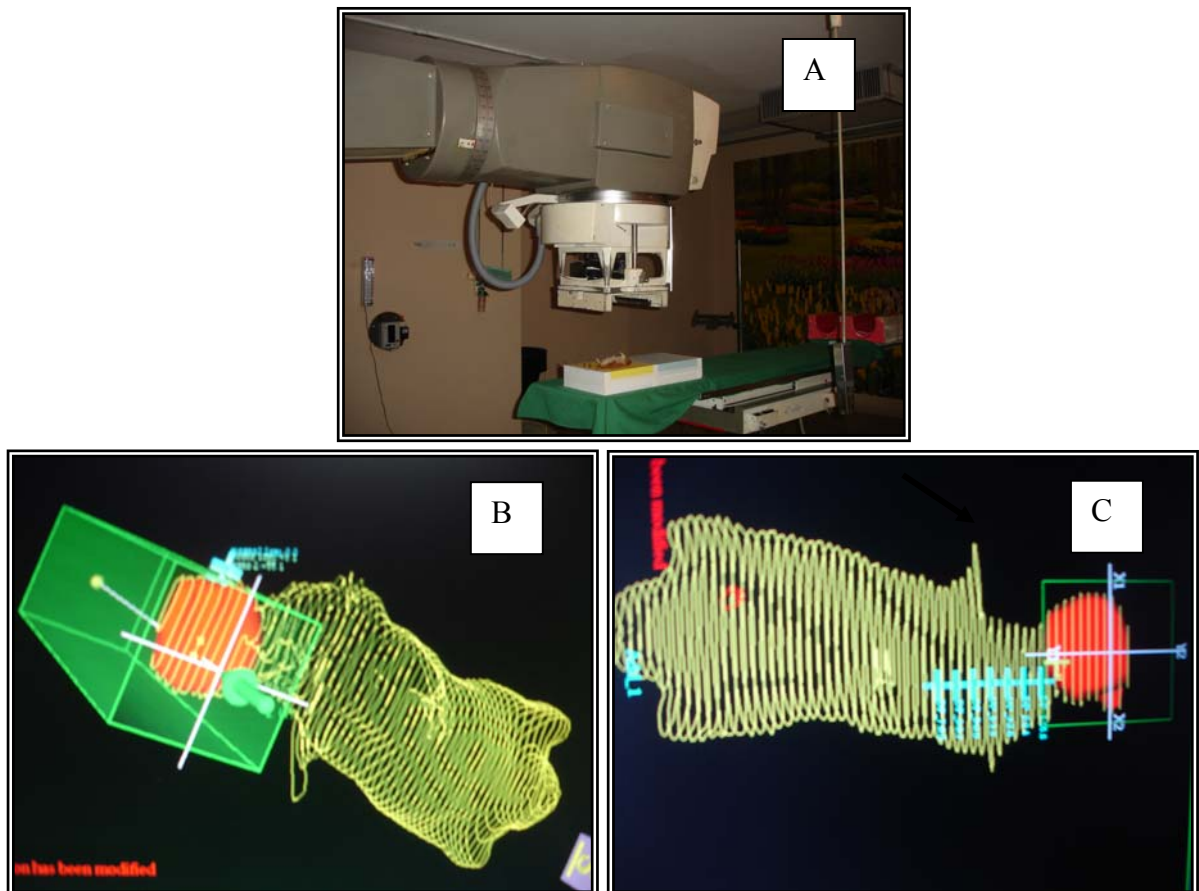
Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (250 mg/kg ip) e sua mucosa jugal direita foi exposta e fixada em mesa de isopor para, em seguida, ser irradiada em aparelho de megavoltagem cobalto-60, com dose única de 3500 cGy deliberada no *target* (mucosa jugal) com campo direto e uso de *bolus* para superficializar a dose na mucosa (Figura 8 e 9).

A máquina utilizada foi um Gamatron-S com energia de cobalto-60 (Figura 8-B), sendo os animais irradiados com campo de 5,0 x 5,0 cm, na profundidade 0,5 cm e uma distância foco-superfície de 50 cm. O rendimento médio da máquina foi de 47,11 cGy/min, sendo o tempo de exposição em torno de 30 minutos para cada animal.



**FIGURA 9 - Animal anestesiado e preparado para ser submetido à radioterapia em aparelho de megavoltagem cobalto-60 com o uso de bolus. A: mucosa jugal exposta; B: mucosa jugal exposta e colocação de bolus sobre a mesma para superficializar a dose na mucosa. O bolus é um material utilizado para superficializar a dose na mucosa do animal.**





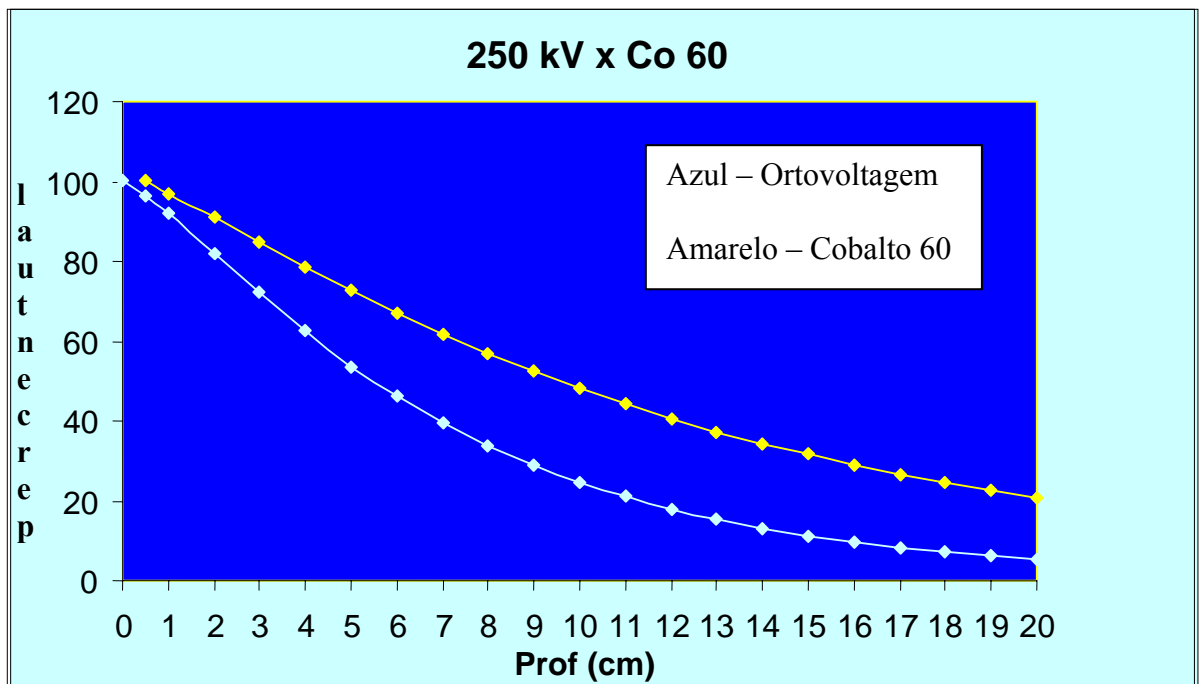
**FIGURA 10 - Radioterapia da mucosa jugal do hamster em aparelho de megavoltagem cobalto 60. A:** Hamster sendo irradiado. **B e C:** Reconstrução tridimensional do hamster através de tomografia computadorizada para avaliação dos pontos de dose (seta) no corpo do animal (Tabela 1).

**TABELA 1 - Dose secundária decorrente da irradiação da mucosa jugal do hamster.**

Localização	Dose
Centro do campo	3500 cGy
Borda do campo	3317,2 cGy
0,3 cm	1246,1 cGy
0,9 cm	120,1 cGy
1,5 cm	70,9 cGy
2,1 cm	46,3 cGy
2,6 cm	31,9 cGy
3,2 cm	24,1 cGy
3,8 cm	18,1 cGy

**TABELA 2 - Percentual de dose na profundidade para o cobalt-60 e ortovoltagem.** Valores em percentuais da dose de irradiação nas profundidades de 0 e 0,5 cm para o aparelho de ortovoltagem e cobalto 60, onde podemos observar que 100% da dose na irradiação com a megavoltagem encontram-se a 0,5 cm da superfície irradiada (SMITH et al., 1983; GODDEN, 1983).

Percentual de dose na profundidade		
Aparelho	0 cm	0,5 cm
Ortovoltagem	100%	96,9%
Cobalto-60	91,4%	100%



**FIGURA 11 - Gráfico do percentual de dose na profundidade para energias de cobalto 60 e 250 kV de ortovoltagem.** Observa-se pelo gráfico que a dose de 100% para o cobalto 60 encontra-se a 0,5 cm de profundidade, enquanto que 100% da dose para a energia de 250 kV esta na superfície irradiada.

### 3.3. DROGAS, ANTICORPOS, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES

- Pentoxifilina: ampolas de 5 ml (20 mg/ml) – Trental<sup>®</sup> (Hoechst, São Paulo, Brasil);
- Anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  anti-murino (Vector<sup>®</sup>, USA);
- Anticorpo secundário anti-IgG anti-carneiro (Vector<sup>®</sup>, USA);
- Heparina 5.000 UI/ml (Roche, Rio de Janeiro, Brasil);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Hidrato de cloral 10% (Reagen);
- Formaldeído 40% (Reagen);
- Solução aquosa de NaCl a 0,9% (15M), frasco de 500 ml (Tayuyna);
- Líquido de Turk (diluidor para contagem total de células)
 

Ácido acético glacial P. A (Merck) .....	20,0 ml
Violeta de genciana .....	2,0 ml
Água destilada .....	1000 ml;
- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merck);
- Anticorpo primário carneiro anti-TNF de rato, murino e humano.  
(Santa Cruz - Biotechnology, California - USA);
- Anticorpo secundário (anti-carneiro IgG H+L – Biogen) (Vector<sup>®</sup>, USA);

- Tampão citrato 0,1 M pH 6,0

- Citrato de sódio monohidratado .....21g

- H<sub>2</sub>O destilada .....1L;

- Solução PBS-BSA 5%

- PBS (pH 7,3) .....10ml

- Albumina bovina ..... 0.5mg;

- Complexo ABC (Kit Vectastain<sup>R</sup>)

- Reagente A (avidina DH) .....1 gota

- Reagente B (peroxidase biotilada H) .....1 gota

- PBS .....2,5 ml;

- Solução peróxido de hidrogênio 3%

- Solução DAB/peróxido (DAKO<sup>R</sup>)

- Tablete de DAB diluído em H<sub>2</sub>O destilada .....2 ml

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% .....15 µl

### **3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

#### **3.4.1 Modelo de mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica em hamsters**

Para o estabelecimento do modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem, um estudo piloto foi realizado inicialmente onde mucosas jugais de 16 hamsters foram irradiadas em acelerador linear com energia de elétrons e cobalto 60, com doses de 1000, a 3500 cGy.. A seguir, a cada dois dias tais mucosas foram visualizadas diretamente, fotografadas e avaliadas quanto ao grau de mucosite induzida, até o 16º dia. Contudo, visto que o simples procedimento de irradiação dessas mucosas não foi suficiente para induzir mucosite de forma significativa nesses animais foi adicionada irritação mecânica nas mucosas após o terceiro dia de irradiação, com o objetivo de potencializar as alterações inflamatórias locais e, com isso, permitir lesões caracterizadas por aumento da vascularização, áreas hemorrágicas, úlceras extensas e abscessos. Tal procedimento teve como base experiência anterior em modelos de mucosite oral (Figura 12) induzida por antineoplásico e radioterapia de ortovoltagem em hamsters (SONIS et al., 2000; LIMA et al., 2005). Nessa etapa foram avaliados quatro grupos de 10 animais divididos da seguinte forma: animais submetidos à radioterapia mais irritação mecânica, animais submetidos somente à irritação mecânica, animais submetidos somente à radioterapia e um grupo controle. As irritações mecânicas foram realizadas utilizando agulha de ponta romba conferindo cinco escoriações na mucosa, cruzadas entre si por mais cinco, em ambas as faces (Figura 13).

Uma vez definido o tipo de radiação e a dose a ser utilizada, foi realizado um outro estudo com o objetivo de se delinear o curso temporal das lesões induzidas por radiação e irritação mecânica e, conseqüentemente, determinar o dia ideal para se observar o efeito modulador de um importante agente antiinflamatório como a pentoxifilina. Assim, quatro grupos de 15 animais foram irradiados no dia 1, receberam irritação mecânica no 4º dia e foram mortos nos dias 7, 10, 13 e 16 do experimento, sendo nessas datas avaliados os seguintes parâmetros: análise macroscópica e microscópica das mucosas jugais, dosagem da mieloperoxidase, detecção de TNF- $\alpha$ , contagem total e diferencial dos leucócitos, variação de massa corpórea e curva de sobrevivência dos animais (Figura 13).

Assim, em função dos dados obtidos, o 13º dia foi o escolhido para a subsequente modulação farmacológica por apresentar mucosite significativa com

hiperemia, áreas hemorrágicas, úlceras e abscessos intensos. Nesse momento, foram avaliados quatro grupos de 10 animais, sendo três grupos submetidos à radioterapia mais irritação mecânica e tratados com PTX nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup> e um grupo controle submetido à radioterapia mais irritação mecânica que recebeu salina (grupo salina). A pentoxifilina foi administrada durante os 13 dias do experimento.

### Primeiro estudo

#### Dose de 1000 a 3500 cGy

16 hamsters \_\_\_\_\_ D16

### Segundo estudo

#### Radioterapia + irritação mecânica

10 hamsters \_\_\_\_\_ D16

#### Irritação mecânica

10 hamsters \_\_\_\_\_ D16

#### Radioterapia

10 hamsters \_\_\_\_\_ D16

#### Controle (animais normais)

10 hamsters \_\_\_\_\_ D16

### Terceiro estudo

#### RXT + IM

15 hamsters \_\_\_\_\_ D7

#### RXT + IM

15 hamsters \_\_\_\_\_ D10

#### RXT + IM

15 hamsters \_\_\_\_\_ D13

#### RXT + IM

15 hamsters \_\_\_\_\_ D16

**Quarto estudo**

10 hamsters	<b>RXT + IM / PTX 5 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>D13</b>
10 hamsters	<b>RXT + IM / PTX 15 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>D13</b>
10 hamsters	<b>RXT + IM / PTX 45 mg mkg<sup>-1</sup></b>	<b>D13</b>
10 hamsters	<b>RXT + IM / salina</b>	<b>D13</b>

**D – representa dia**

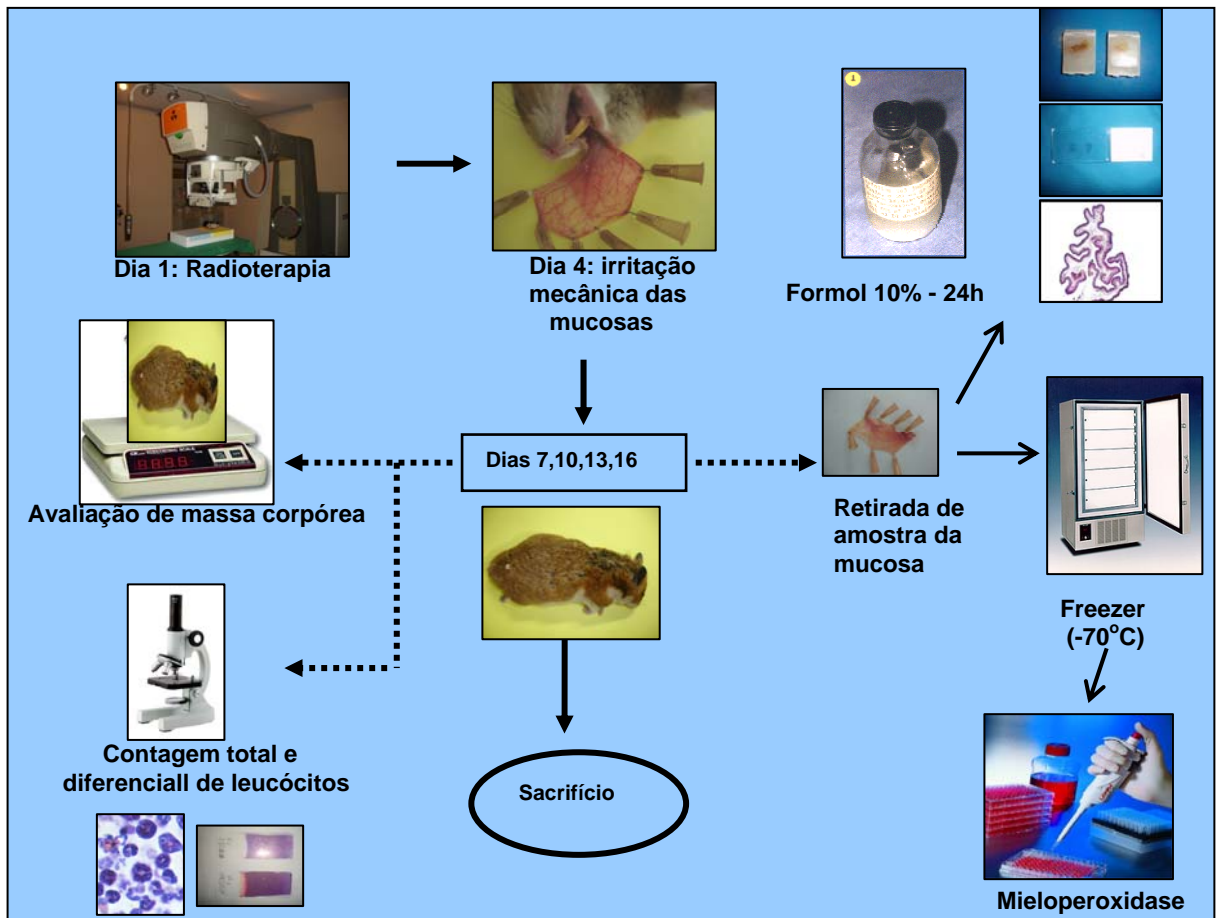
**Variáveis estudadas**

- **Macroscopia das mucosas jugais**
- **Microscopia das mucosas jugais**
- **Dosagem sérica de mieloperoxidase**
- **Imunohistoquímica para TNF -  $\alpha$**
- **Leucograma : estudo da contagem total e diferencial dos leucócitos**
- **Massa corpórea**
- **Curva de sobrevida**



**FIGURA 12 – A. mucosite oral experimental induzida por quimioterapia. B. aparelho de ortovoltagem usado para induzir mucosite oral experimental em hamsters.**





**FIGURA 13 - Roteiro da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica.** Os animais foram anestesiados e submetidos à radioterapia com dose 3500 cGy em aparelho de megavoltagem cobalto-60 com o uso de bolus para superficializar mais a dose na mucosa no primeiro dia. No 4º dia foram realizadas escoriações na mucosa irradiada, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potencializador. As escoriações foram distribuídas em número de cinco tanto no sentido horizontal quanto vertical em ambas as faces da mucosa. Nos dias 7, 10, 13 e 16 experimentais, as mucosas foram avaliadas macroscopicamente e fotografadas. Nesses dias foi colhido sangue para a contagem total e diferencial dos leucócitos e depois os animais foram sacrificados e suas mucosas removidas e enviadas para o estudo da mieloperoxidase, análises histopatológica e imunohistoquímica.

### 3.4.2. Parâmetros avaliados

#### 3.4.2.1. Análise da estrutura das mucosas jugais

##### A. Análise macroscópica das mucosas jugais

Como dito anteriormente, foi realizado um estudo para escolher o dia ideal para o sacrifício dos animais e avaliação das mucosas. Nesse estudo, estes animais foram

avaliados em diferentes dias, onde suas mucosas foram fotografadas e avaliadas macroscopicamente. Nesta análise foram considerados os aspectos inflamatórios, como presença e intensidade do eritema, hiperemia, hemorragias, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório de Inflamação e do Câncer – LAFICA/UFC, citados a seguir:

- **Escore 0:** hiperemia e eritema ausentes ou discretos; hemorragia ausente; ausência de úlceras; ausência de abscessos.
- **Escore 1:** hiperemia e eritema moderados; hemorragia ausente; ausência de úlceras; ausência de abscessos ou presença de tecido cicatricial.
- **Escore 2:** hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, de úlceras pequenas, de tecido cicatricial e ausência de abscessos.
- **Escore 3:** hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, de úlceras extensas e abscessos.

## **B. Análise microscópica das mucosas jugais**

Os animais foram sacrificados nos dias 7, 10, 13 e 16, sendo suas mucosas fotografadas, retiradas e conservadas em formol a 10% por 24 horas, para serem estudadas ao microscópio ótico. Os estudos histológicos foram realizados em microscópio ótico (40x). Nessa análise foram avaliados os parâmetros inflamatórios, como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados pelo LAFICA/UFC, como se segue:

- **Escore 0:** epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; hemorragia ausente; ausência de edema; ausência de úlceras e abscessos.
- **Escore 1:** ingurgitamento vascular discreto; áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto (células mononucleares); hemorragia ausente; ausência de edema; ausência de úlceras e abscessos.

- **Escore 2:** ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado; áreas hemorrágicas presentes; ausência de abscessos; presença de edema e eventuais úlceras pequenas.
- **Escore 3:** ingurgitamento vascular e infiltrado inflamatório acentuados; áreas hemorrágicas presentes; presença de edema; presença de abscessos e úlceras extensas.

### **C. Dosagem da mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e que tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. Resumidamente, 50 a 100 mg de tecido da mucosa, depois de pesados, são colocados em um tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e, a posterior homogeneizados em aparelho específico. A seguir, o homogenato é centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. A atividade da MPO por mg de tecido foi mensurada através de leitura da absorbância (BRADLEY et al., 1982), utilizando 0,0005% de peróxido de nitrogênio como substrato para a MPO. A unidade de atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1  $\mu$ mol de peróxido de nitrogênio em água, em 1 minuto.

### **D. Estudo imunohistoquímico para detecção de TNF- $\alpha$**

Os animais submetidos à mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica foram sacrificados no 13º dia e suas mucosas removidas, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas, processadas em parafina e cortes seriados de 5  $\mu$ m foram realizados em lâminas adequadas. Para o estudo imunohistoquímico, os cortes seriados foram desparafinizados, hidratados e imersos em tampão de citrato 0,01 M (pH 6,0) sob aquecimento a 100° C, por 15 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram realizadas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas pelo bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a

3%. A seguir, a incubação com o anticorpo primário anti-TNF murino, camudongo e humano feito em carneiro foi realizada durante a noite. No dia seguinte, após lavagem das lâminas foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de carneiro, por 30 minutos. O complexo estreptoavidina-peroxidase (complexo ABC) foi preparado para incubação posterior. Após nova lavagem com PBS foi feita coloração de base com o DAB/peróxido, seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e as respectivas montagens das lâminas.

Foram utilizadas amostras de mucosa jugal de animais normais e animais submetidos somente à radioterapia ou irritação mecânica como controle positivo e amostra de mucosa jugal de animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica como controle negativo (sem incubação do Ac primário) para a marcação do TNF- $\alpha$ .

#### **3.4.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais**

##### **A. Estudo hematológico (análise do leucograma)**

Nos dias 7, 10, 13 e 16, os animais foram anestesiados com Hidrato de cloral a 10% (250 mg kg<sup>-1</sup>; ip). Em seguida, foi colhido, por punção do coração do animal, sangue para a realização do esfregaço, corado pelo método H&E, para as contagens diferenciais dos leucócitos. Adicionalmente, 20  $\mu$ l de sangue foram diluídos em 380  $\mu$ l de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

##### **B. Análise da variação de massa corpórea**

Para a avaliação da massa corpórea, os animais foram pesados todos os dias durante o experimento. Os valores encontrados foram expressos como uma variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

#### **3.5. Grupos de animais tratados**

Os hamsters foram divididos em quatro grupos de 10 animais, dos quais três grupos foram submetidos à radioterapia e irritação mecânica e tratados com pentoxifilina

(Trental – Hoechst do Brasil: São Paulo) nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, administradas por via subcutânea, uma hora antes da radioterapia com cobalto-60 e diariamente, por um período de 13 dias. O quarto grupo de animais foi submetido à radioterapia e irritação mecânica e recebeu salina nas mesmas condições da pentoxifilina em termos de via de administração e dose (grupo salina).

### 3.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média ± epm ou como mediana seguida de valores extremos do rol de dados observados. Para os dados paramétricos foram utilizados Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos, os testes utilizados foram Kruskal-Wallis e teste de Dunn. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo teste de Kaplan-Meyer e a diferença de sobrevida entre os grupos pelo teste de Long-Rank. Os dados foram analisados utilizando o programa de computação SPSS (SPSS for windows Software). Em todas as situações, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

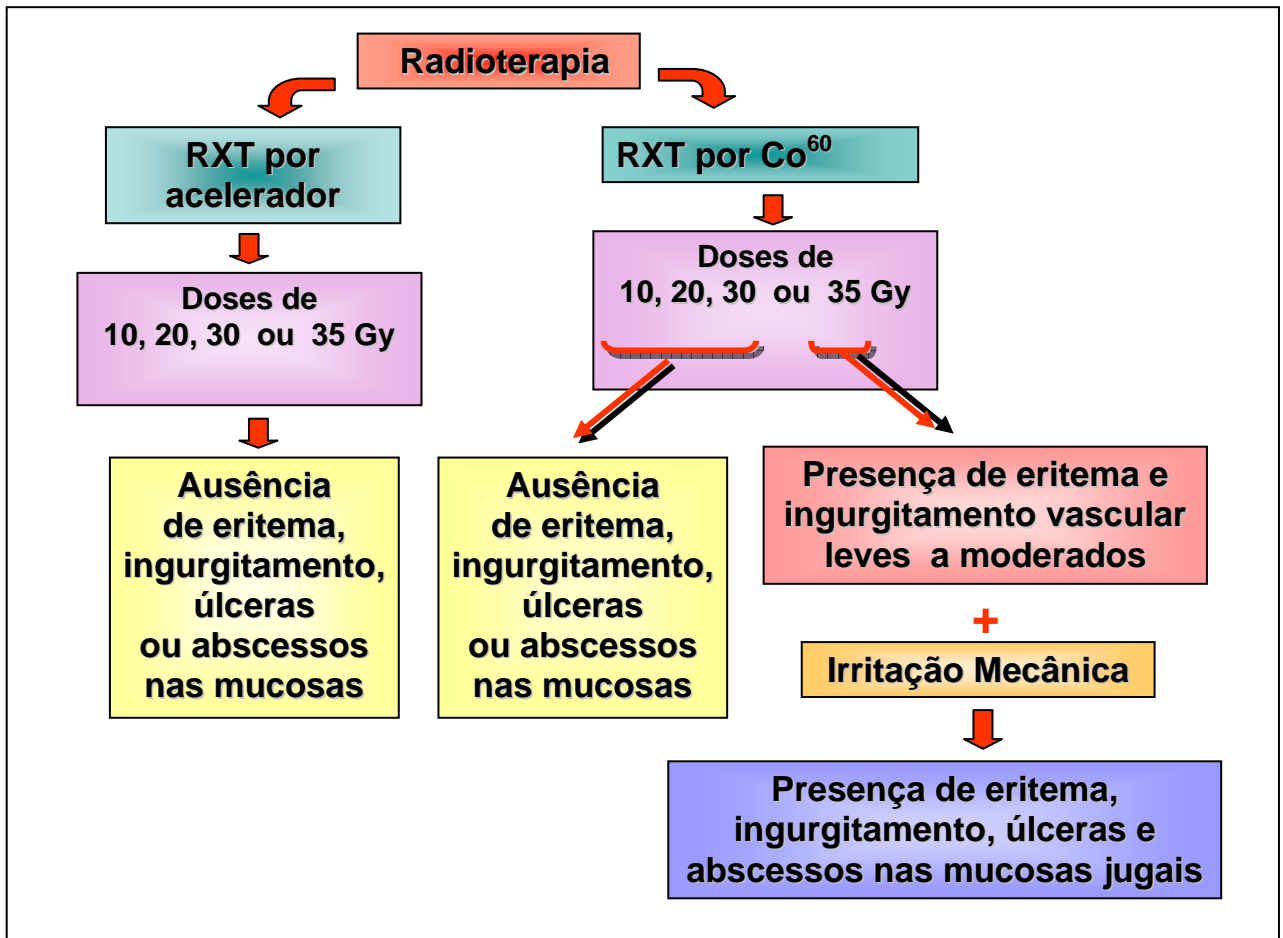
### 4.1. Escolha do tipo de radiação para indução da mucosite oral em hamsters

Para o modelo de mucosite oral induzida por radioterapia nesse trabalho, foi usado inicialmente aparelho de megavoltagem com elétrons e, em seguida, cobalto-60 em hamsters, baseado no modelo de mucosite oral experimental por radioterapia de ortovoltagem, descrito por SONIS et al., em 2000.

A mucosa jugal dos animais foi irradiada com energia de elétrons (4 MeV) com ou sem *bolus* e doses que variaram de 10 a 35 Gy. Os animais foram observados a cada dois dias até o 16º dia. Ao final deste período somente hiperemia e eritema das mucosas (grau 1) sem outros achados foram observados.

A seguir, usou-se o aparelho de megavoltagem cobalto-60 para a indução da mucosite oral. A dose utilizada foi de 35 Gy com campo direto e *bolus*, e os animais acompanhados como anteriormente, a cada dois dias até o 16º dia. Neste período foi

observado um quadro de lesão da mucosa jugal, com hiperemia e eritema moderados (grau 1) ou hiperemia e eritema acentuados, presença de hemorragia e úlceras pequenas (grau 2), não sendo, contudo, possível induzir mucosite significativa, com a presença de úlceras e abscessos (grau 3). Quando se associou irritação mecânica à radioterapia os animais apresentaram um quadro de mucosite ulcerativa (figura 14) caracterizada por hiperemia e eritemas acentuados, hemorragia, úlceras extensas e abscessos. Quanto aos animais submetidos somente a radioterapia só foi observado hiperemia e eritema acentuado associados a pequenas úlceras e hemorragia, compatível, portanto com um grau de mucosite 2. O grupo submetido só a irritação mecânica apresentou hiperemia e eritema moderados com eventuais úlceras pequenas compatível portanto com um grau de mucosite 1 ou 2.



#### 4.2. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos macroscópicos das mucosas dos hamsters

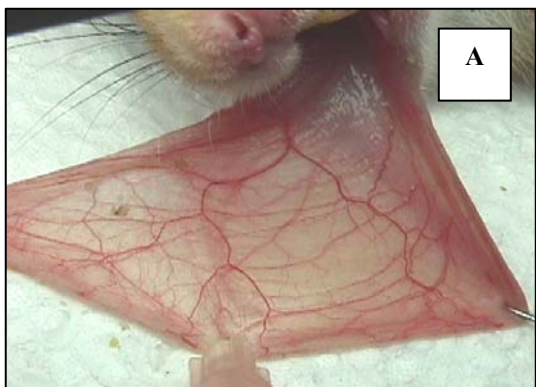
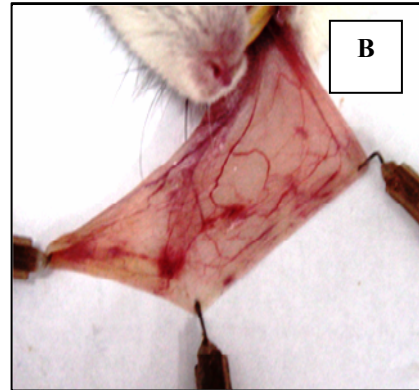
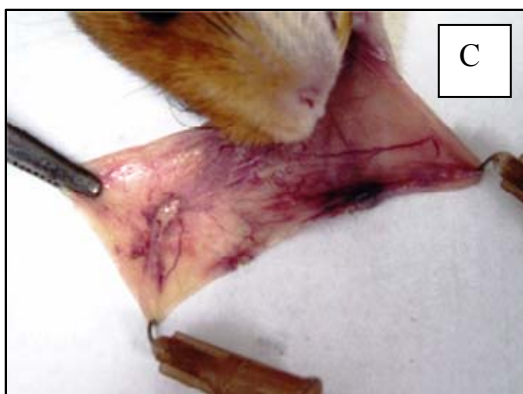
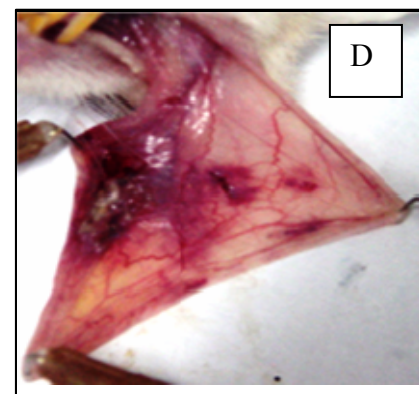
A tabela 3 mostra que a radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM) nas mucosas jugais causaram lesões significantes quando comparadas aos respectivos grupos de animais que receberam apenas IM (0; 0-1) ou RXT (0; 0-2). RXT e IM induziram lesões significantes a partir do 10º dia (1; 0-3), apresentando eritema, aumento da vascularização ou edema e raras áreas hemorrágicas, e atingindo valores máximos no 13º dia (3; 0-3) e 16º dia (3; 3-3), com presença de hiperemia e eritema acentuados, áreas hemorrágicas, úlceras extensas e abscessos. A partir desse período, não foi possível verificar redução das lesões, dada ao aumento da mortalidade dos animais. Na figura 15 observam-se os achados macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral nos dias 7, 10, 13 e 16 experimentais.

**TABELA 3 - Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associada entre si (RXT+IM) sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters:** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação de cobalto 60 (RXT) no dia 1 e/ou irritação mecânica (IM) no dia 4, com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais, e sendo avaliada nos dias 7, 10, 13 e 16.

	Tempo de indução (dias)							
	Normal	IM	RXT		RXT + IM			
		13ºd	13ºd	20ºd	7ºd	10ºd	13ºd	16ºd
<b>Escores</b>	0(0-0)	0(0-1)	0(0-2)	1,5(0-2)	0(0-3)	1(0-3)*	3(0-3)*	3(3-3)*

*RXT – radioterapia. IM – irritação mecânica. RXT + IM – radioterapia mais irritação mecânica*

Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, cinco hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de hiperemia, de eritema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística dos animais submetidos à radiação e/ou à irritação mecânica, em relação aos animais normais (Kruskal-Wallis; Dunn).

**MUCOSA NORMAL****MUCOSITE GRAU 1****MUCOSITE GRAU 2****MUCOSITE GRAU 2 ou 3****MUCOSITE GRAU 3**

**FIGURA 15 - Aspectos macroscópicos das mucosas jugais de hamster normal (A) ou submetido à radioterapia e irritação mecânica nos dias 7 (B), 10 (C), 13 (D) e 16 (E). A mucosite oral foi induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica nas mucosas. Os animais foram mortos nos dias 7, 10, 13 e 16 e suas mucosas fotografadas para posterior análise.**



### 4.3. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos histológicos das mucosas jugais dos hamsters.

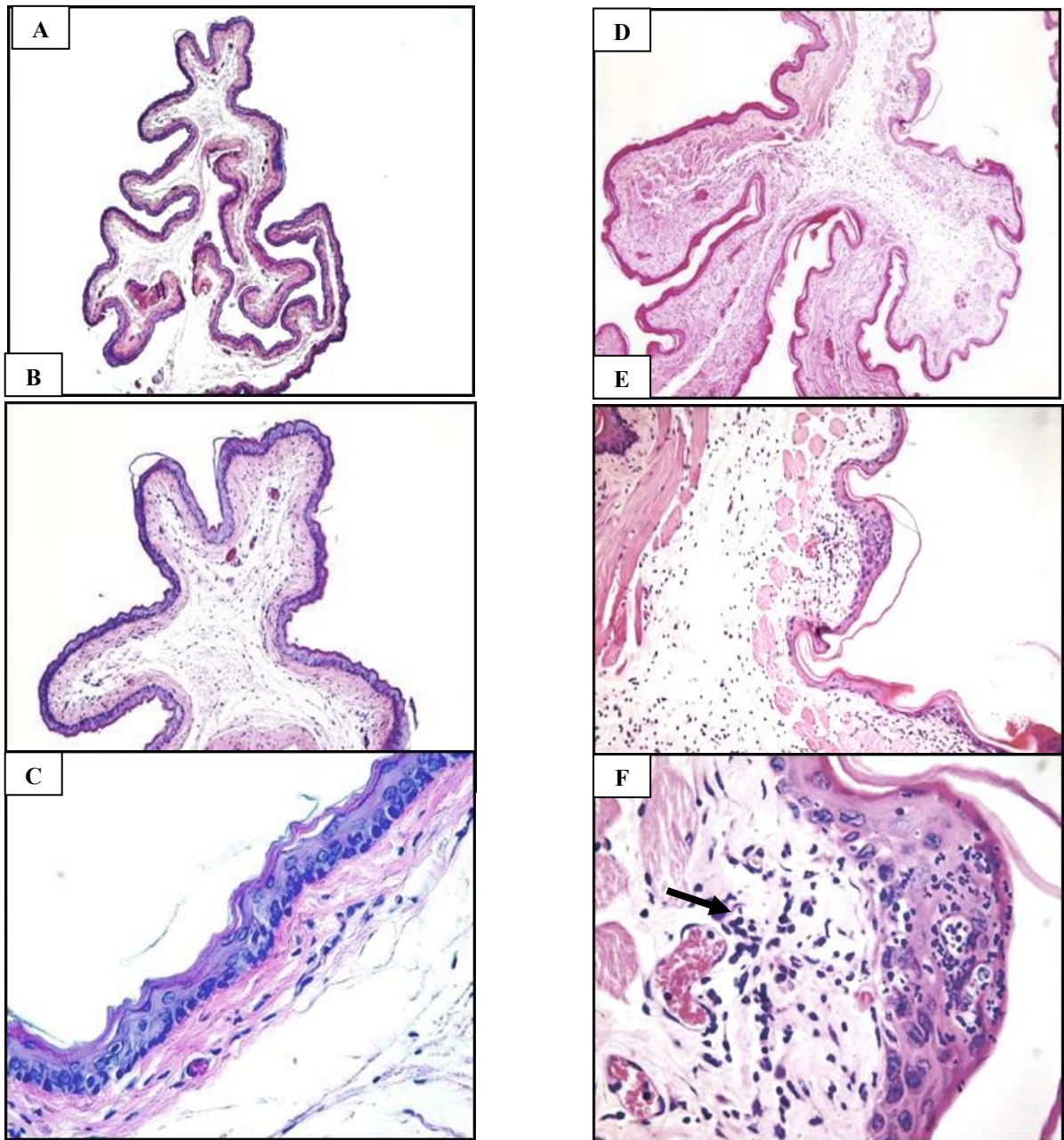
A tabela 4 ilustra que a radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM) nas mucosas jugais causaram lesão estatisticamente significativa quando comparados aos respectivos grupos de animais que receberam apenas IM (1; 0-1) ou RXT (0; 0-3). RXT e IM induziram lesões significantes a partir do 10º dia (2; 1-3), apresentando ingurgitamento vascular, infiltrado inflamatório moderado, áreas hemorrágicas presentes e edema, atingindo valores máximos no 13º dia (2; 1-3) e 16º dia (3; 1-3), com presença de ingurgitamento vascular e infiltrado inflamatório acentuados, áreas hemorrágicas presentes, presença de edema, presença de abscessos e úlceras extensas (Figuras 16, 17, 18).

**TABELA 4 - Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associada entre si (RXT + IM) sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters.** A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação de cobalto-60 (RXT) no dia 1, ou irritação mecânica (IM) no dia 4, com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais, e sendo avaliada nos dias 7, 10, 13 e 16.

		Tempo de indução (dias)						
		IM	RT		RXT + IM			
	Normal	13ºd	13ºd	20ºd	7ºd	10ºd	13ºd	16ºd
<b>Escores</b>	0(0-0)	1(0-1)	0(0-3)	1,5(1-3)	1(0-3)	2(1-3)*	2(1-3)*	3(1-3)*

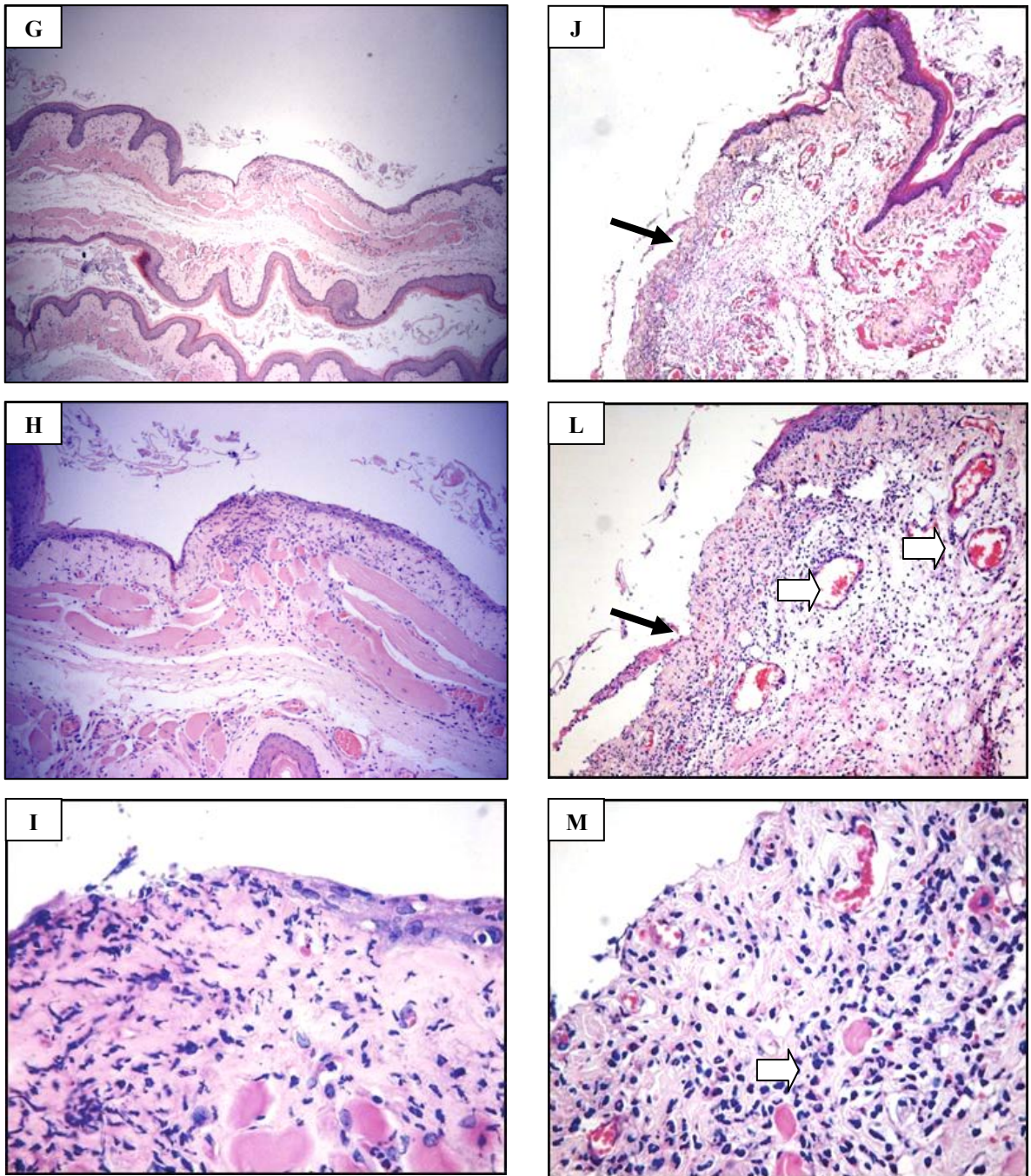
*RXT – radioterapia. IM – irritação mecânica. RXT + IM – radioterapia mais irritação mecânica*

Os dados representam mediana e variação de, pelo, menos 5 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença de infiltrado celular; de vasodilatação e ingurgitamento vasculares, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. \*P<0,05 representa diferença estatística dos animais submetidos à radiação e/ou à irritação mecânica, em relação aos animais normais (Kruskal-Wallis; Dunn).

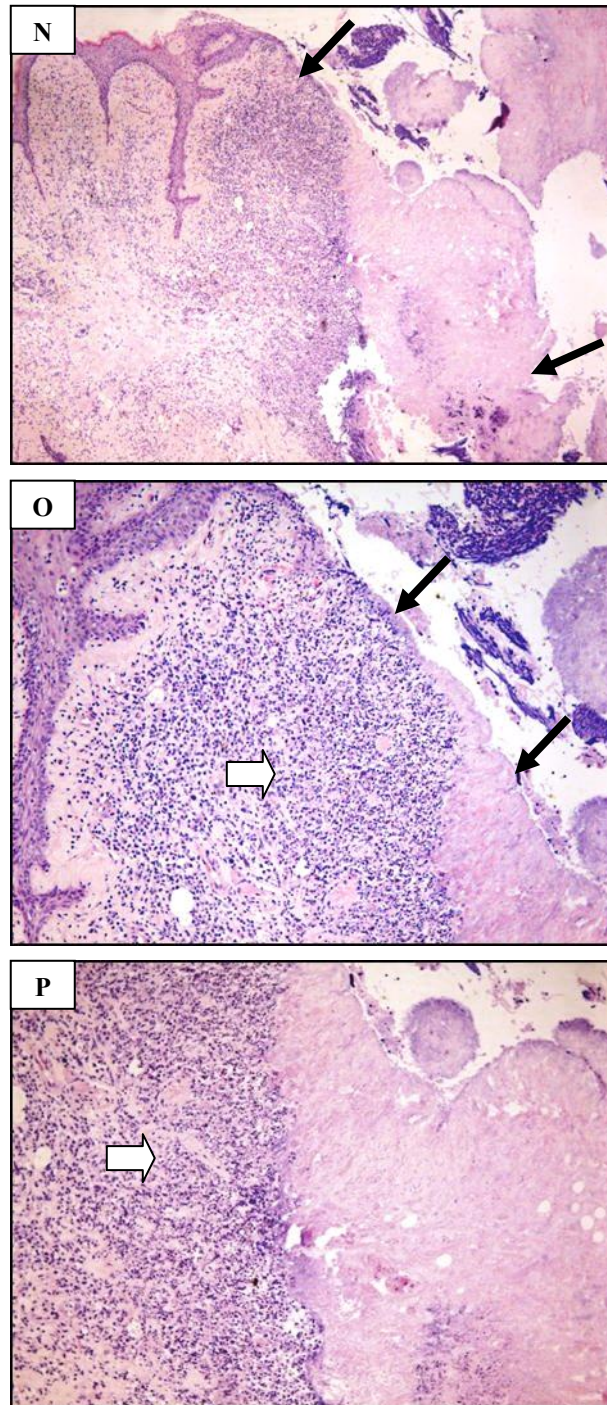


**FIGURA 16 - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C) e animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica (D, E, F):** as mucosas dos animais D, E, F, foram submetidas à radioterapia e irritação mecânica e correspondem ao 7º dia experimental e nessas pode-se observar somente um quadro de um processo inflamatório leve (seta) caracterizado por ingurgitamento vascular discreto, áreas de re-epitelização e infiltrado celular discreto (escore 1). Coloração por HE (A e D – 40X; B e E – 100X; C e F – 400X).





**FIGURA 17 - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias experimentais.** As mucosas dos animais G, H, I correspondem ao 10<sup>o</sup> dia e apresentam um processo inflamatório de leve a moderado, onde se pode observar ingurgitamento vascular moderado, degeneração hidrópica epitelial, infiltrado celular moderado, áreas hemorrágicas presentes, edema e úlceras pequenas (escore 2). As mucosas dos animais J, L e M correspondem aos animais no 13<sup>o</sup> dia experimental e nessas pode-se observar um quadro de processo inflamatório intenso caracterizado por ingurgitamento vascular e infiltrado inflamatório acentuados (setas largas), presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e de úlceras (escore 3) (setas pretas). Exame histopatológico corado pela HE (G e J – 40X; H e L – 100X; I e M – 400X).

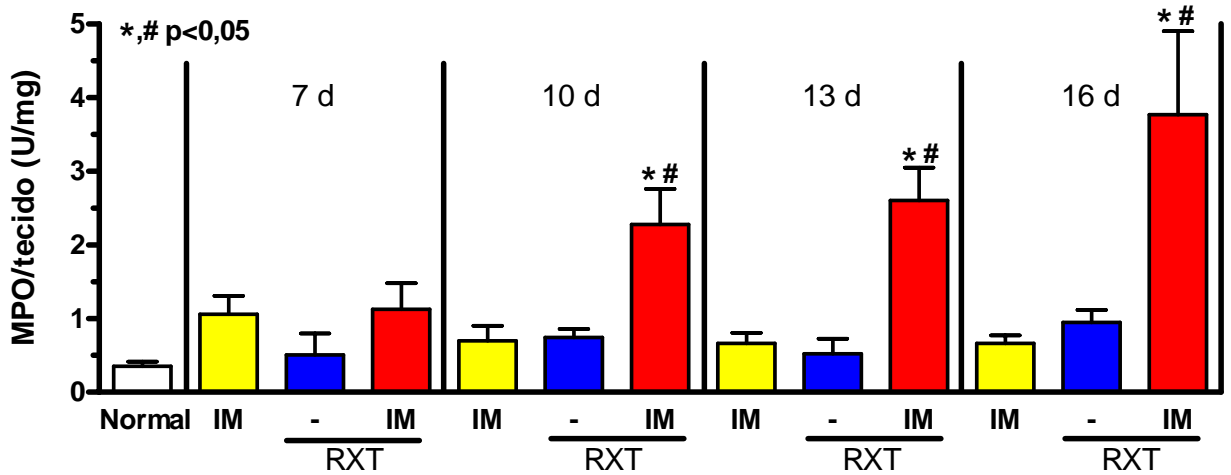


**FIGURA 18 - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica no 16º dia experimental:** As mucosas dos animais N, O e P correspondem aos animais no 16º dia experimental e observa-se um quadro de processo inflamatório intenso, com acentuado infiltrado celular (setas largas) e extensas úlceras (escore 3) (setas pretas). Exame histopatológico corado pela HE ( N – 40X; O – 100X; P – 400X).



#### 4.4. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a atividade da mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters.

A figura 19 mostra que a associação entre RXT e IM nas mucosas jugais dos hamsters foi capaz de aumentar o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN), quantificados indiretamente através da atividade da enzima mieloperoxidase, a partir do 10º até o 16º dia, quando comparados aos respectivos controles positivos, só IM ou RXT, ou aos animais normais (controle negativo).



**FIGURA 19 - Dosagem da enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica.** A mucosite oral foi induzida por radioterapia e irritação mecânica. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados nos dias 7, 10, 13 e 16. As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de MPO  $\times 10^6$ /grama de mucosa jugal. O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo Normal; # $p < 0,05$  indica diferença em relação aos grupos IM, nos seus respectivos dias. (Anova; Bonferroni). O (-) representa o grupo de animais submetidos à radioterapia sem irritação mecânica. IM – irritação mecânica. RXT – radioterapia. IM + RXT – irritação mecânica + radioterapia. 7d, 10d, 13d e 16d – dias do sacrifício dos animais.

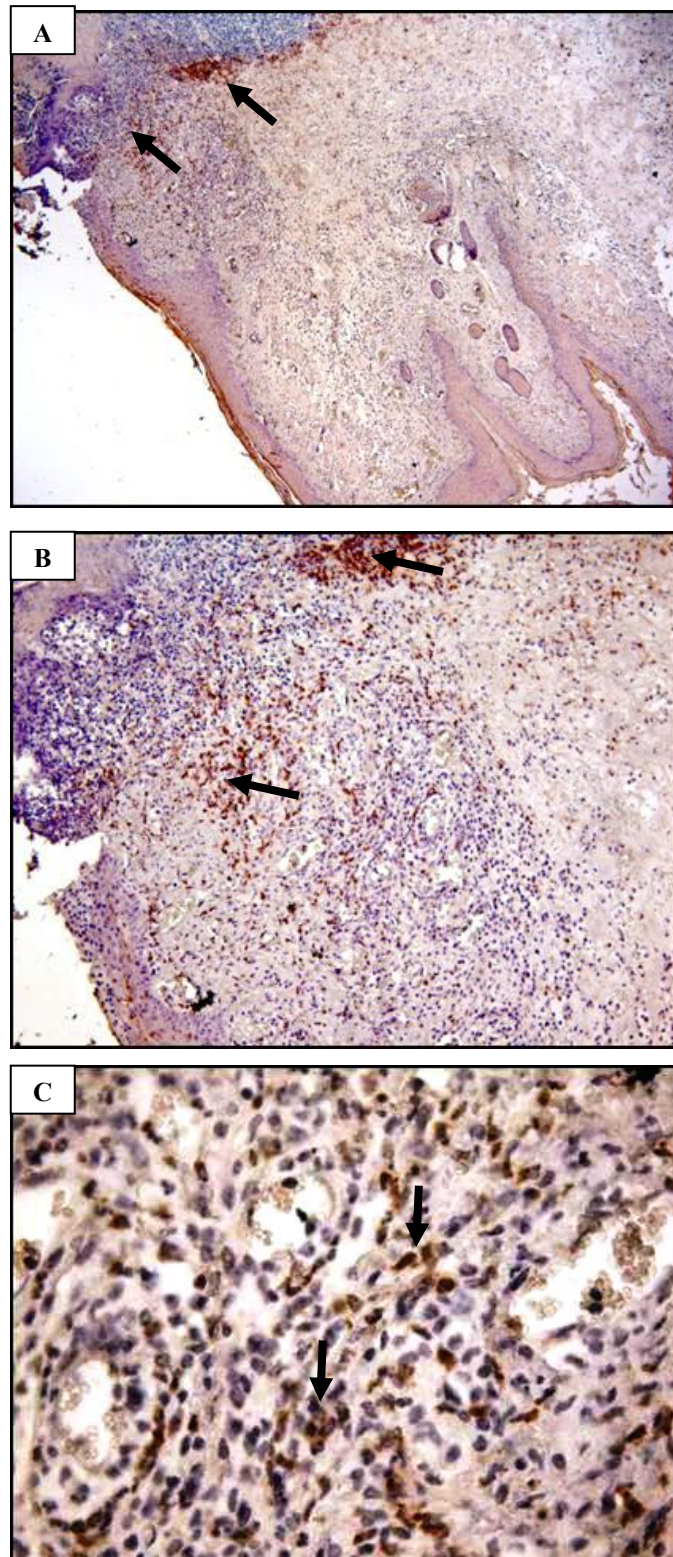
#### 4.5. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a detecção de TNF- $\alpha$ por método de imunohistoquímica.

Na tabela 5 observam-se as graduações de marcações de TNF- $\alpha$  pelo estudo imunohistoquímico das mucosas jugais de hamsters normais, animais submetidos somente à radioterapia, animais submetidos somente à irritação mecânica e animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica. No grupo de animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica observa-se uma forte marcação de TNF- $\alpha$  (figura 20), sugerindo, portanto, um processo inflamatório mais intenso, quando comparado com os animais somente submetidos à radioterapia ou irritação mecânica.

**TABELA 5 - Imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  em hamsters normais, submetidos à radioterapia (RXT) ou irritação mecânica isoladas (IM) e radioterapia + irritação mecânica RXT + IM).**

	RXT+IM©	Normal	RXT	IM	RXT+IM
Escores	0 (0-0)	0,5 (0-1)	0,5 (0-3)	0 (0-1)*	2 (1-3)

© refere-se ao controle negativo, sem incubação por Ac primário. \*P<0,05 representa diferença estatística na marcação de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo Normal. (Kruskal-Wallis; Dunn).



**FIGURA 20 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica – marcação do TNF- $\alpha$ .** Nas figuras A, B, e C observa-se forte marcação de TNF- $\alpha$  em polimorfonucleares neutrófilos próximo a áreas de necrose (setas). Técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  ( A – 40X; B – 100X; C e - 400X).



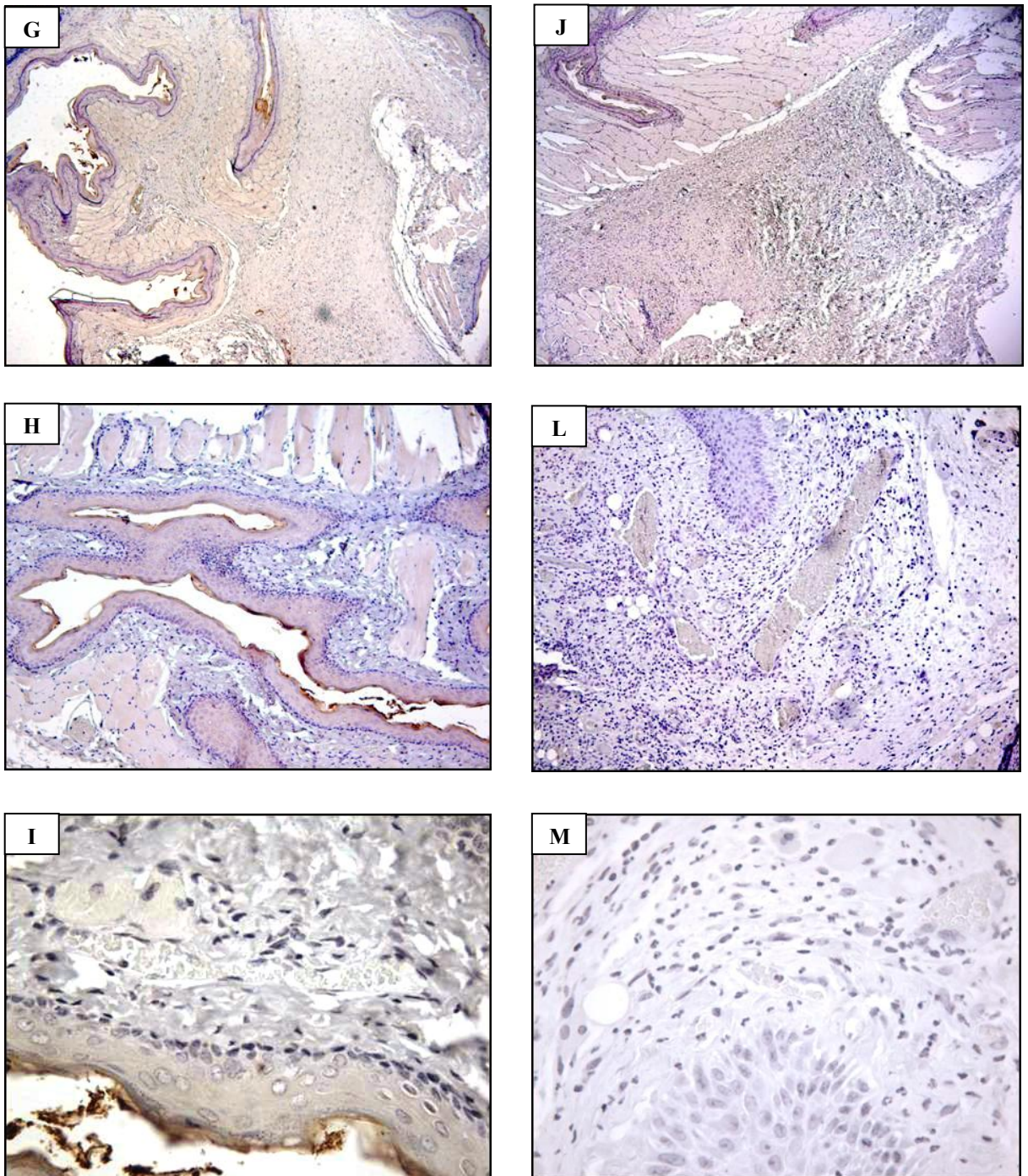
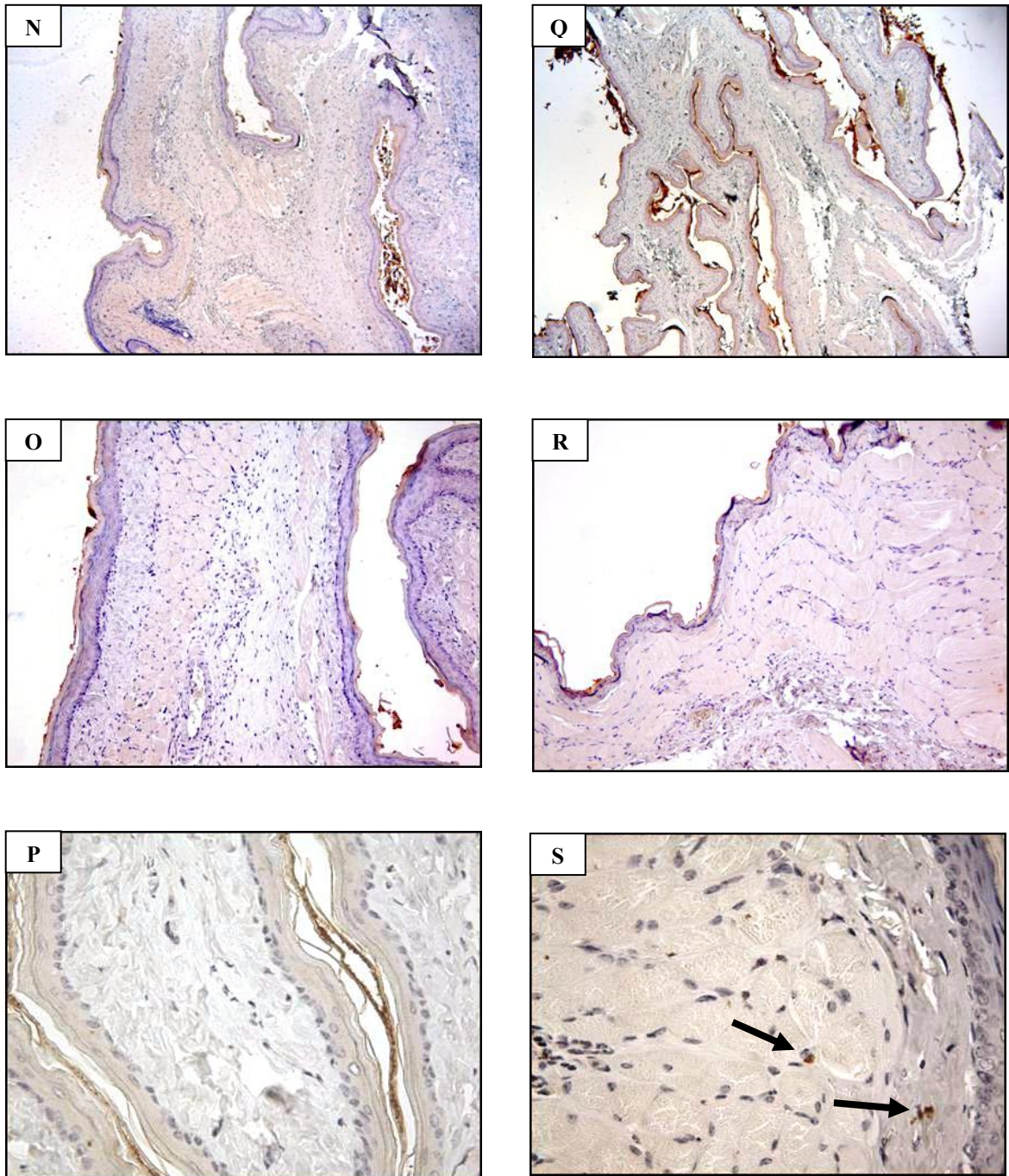


FIGURA 21 - Fotomicrografias de controles negativos. G, H e I representam mucosas jugais de hamsters normais na presença de anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . J, L e M são de animais com mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica, na ausência de anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . ( G e J – 40X; H e L – 100X; I e M- 400X)

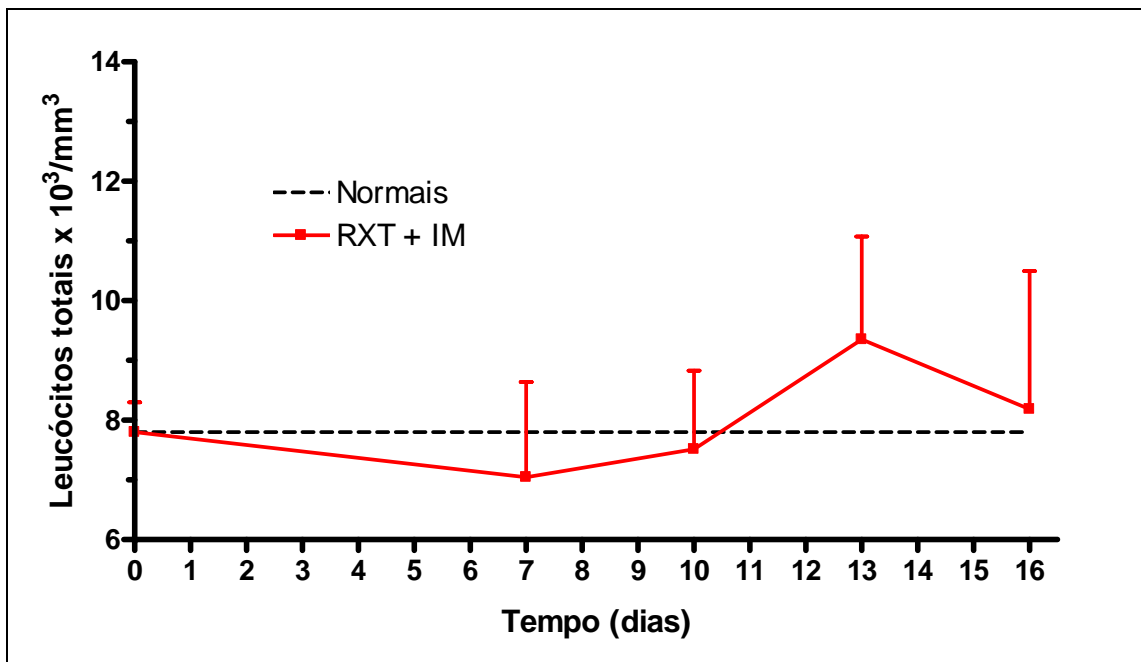




**FIGURA 22 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem isolada (N, O, P), e irritação mecânica isolada (Q, R, S) por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ . Escasso infiltrado inflamatório e raras células marcadas pelo anticorpo anti- TNF- $\alpha$**

#### 4.6. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre o leucograma dos hamsters

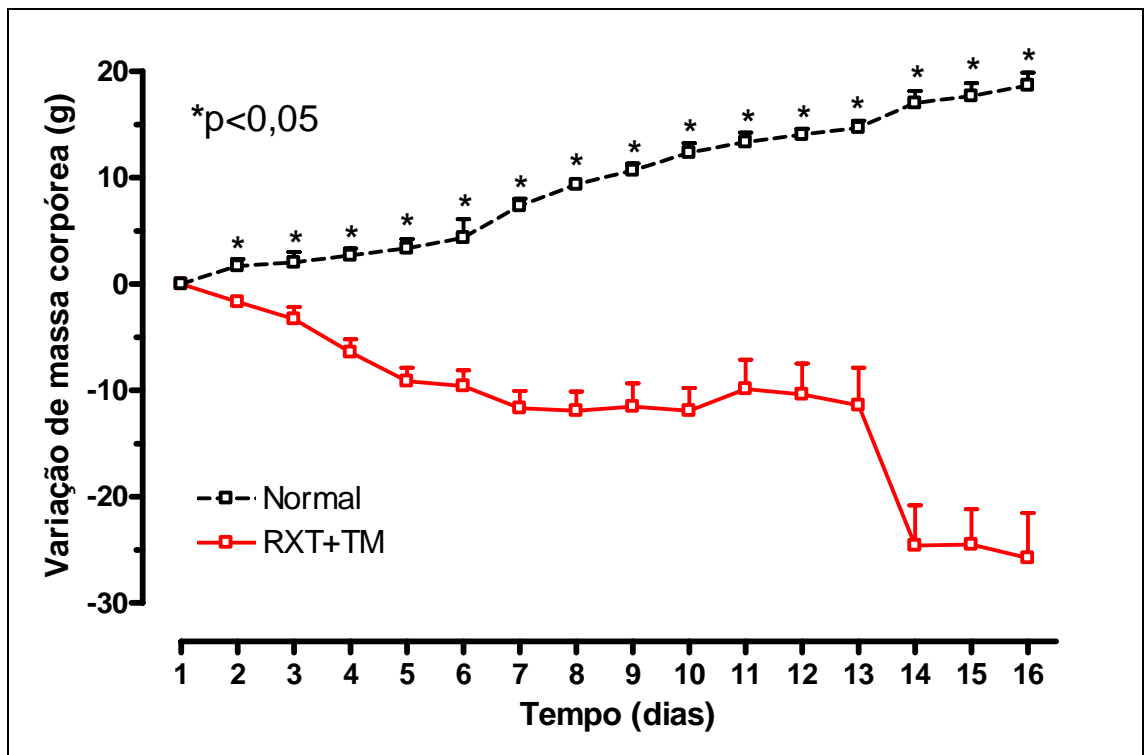
A figura 23 mostra o efeito da radioterapia e irritação mecânica na contagem sérica de leucócitos dos animais. Apesar de se observar uma tendência a leucopenia no 7º dia ou a leucocitose no 13º, de fato não se verificou diferença estatística no leucograma desses animais quando submetidos a mucosite oral até o 16º dia.



**FIGURA 23 - Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre o leucograma dos hamsters.** A mucosite oral em hamsters foi induzida por RXT + IM. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião dos sacrifícios realizados nos dias 7, 10, 13 e 16 dias. Os pontos representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>. O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco. RXT + IM – radioterapia + irritação mecânica. D7, D10, D13 e D16 – leucogramas nos dias 7, 10, 13 e 16.

#### 4.7. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a variação de massa corpórea dos hamsters

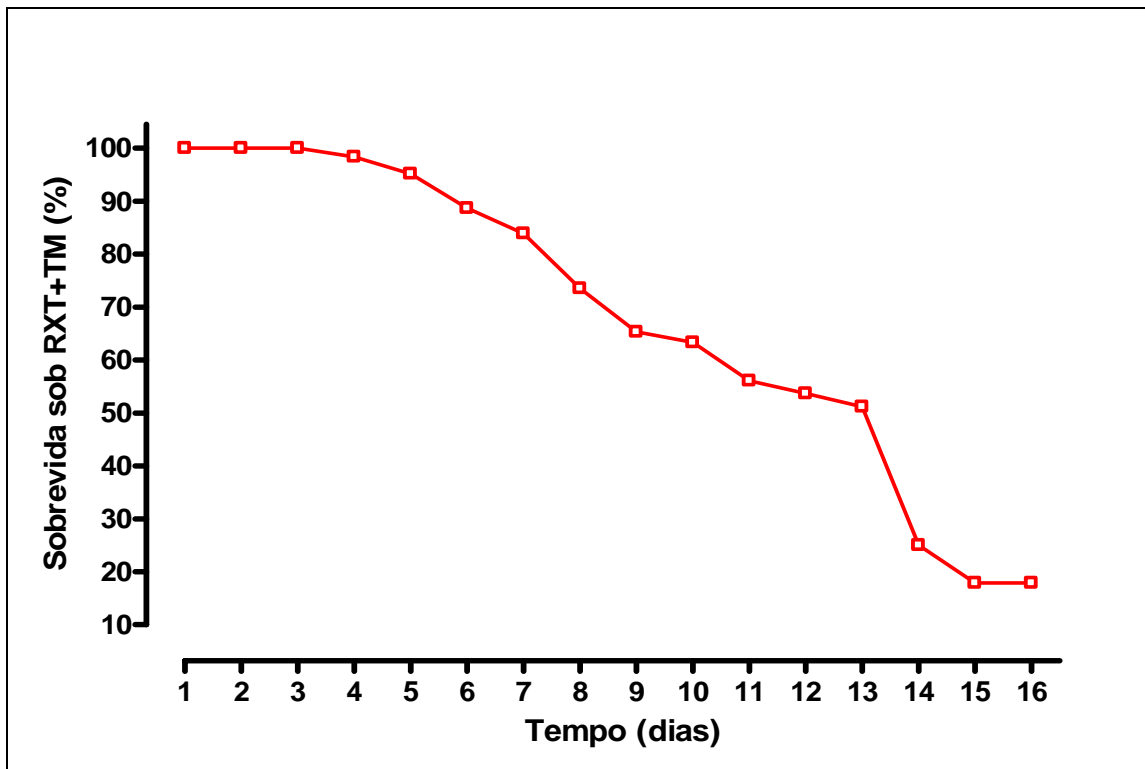
Como mostra a figura 24 os animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica apresentaram perda de massa corpórea significativa a partir do 2º dia, quando comparados à variação de massa corpórea dos animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esta perda tornou-se progressiva até o 5º dia, permanecendo estável até o 13º dia, quando, então, observou-se queda brusca e significativa. Paralelamente a esses achados, observou-se que a perda da massa observada nesse período correspondeu ao aumento da mortalidade nesses animais (Figura 25).



**FIGURA 24 - Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a variação de massa corpórea dos hamsters.** As massas corpóreas dos animais foram medidas diariamente até o 16º dia. Os pontos representam Média  $\pm$  EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas dos hamsters, durante 16 dias, em relação a suas massas iniciais. \*P < 0,05 representa diferenças estatísticas dos animais submetidos à mucosite oral em relação aos hamsters normais, sem mucosite oral (Normal). O número de animais utilizados em cada ponto foi, no mínimo, cinco. RXT + IM – radioterapia + irritação mecânica.

#### 4.8. Efeito da radioterapia sobre a curva de sobrevida dos hamsters

De acordo com a figura 25 pode-se observar que a indução da mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica em hamsters causou diminuição significativa de sobrevida e, em consonância à perda acentuada de massa corpórea, observou-se intensa redução a partir do 13º dia.



**FIGURA 25 - Curva de sobrevida dos hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica da mucosa jugal.** A mucosite oral foi induzida por radioterapia e irritação mecânica. A sobrevida foi determinada diariamente até o 16º dia. Os pontos representam Média  $\pm$  EPM da sobrevida (%). O número de animais utilizados em cada ponto foi, no mínimo, cinco.

#### 4.9. Efeito do tratamento farmacológico no grupo experimental

Em função dos dados obtidos, o 13º dia foi o escolhido para a modulação farmacológica com pentoxifilina na mucosite oral induzida por radioterapia. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: análises macroscópica, histológica e detecção de TNF- $\alpha$  por imunohistoquímica das mucosas jugais, avaliação do leucograma e da variação de massa corpórea dos animais.

#### 4.10. Tratamento com pentoxifilina

##### 4.10.1 Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica

Os dados da tabela 6 representam o efeito da pentoxifilina nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup> ou da solução salina a 0,9% sobre os achados macroscópicos das mucosas jugais dos animais com mucosite oral.

**TABELA 6 - Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM).**

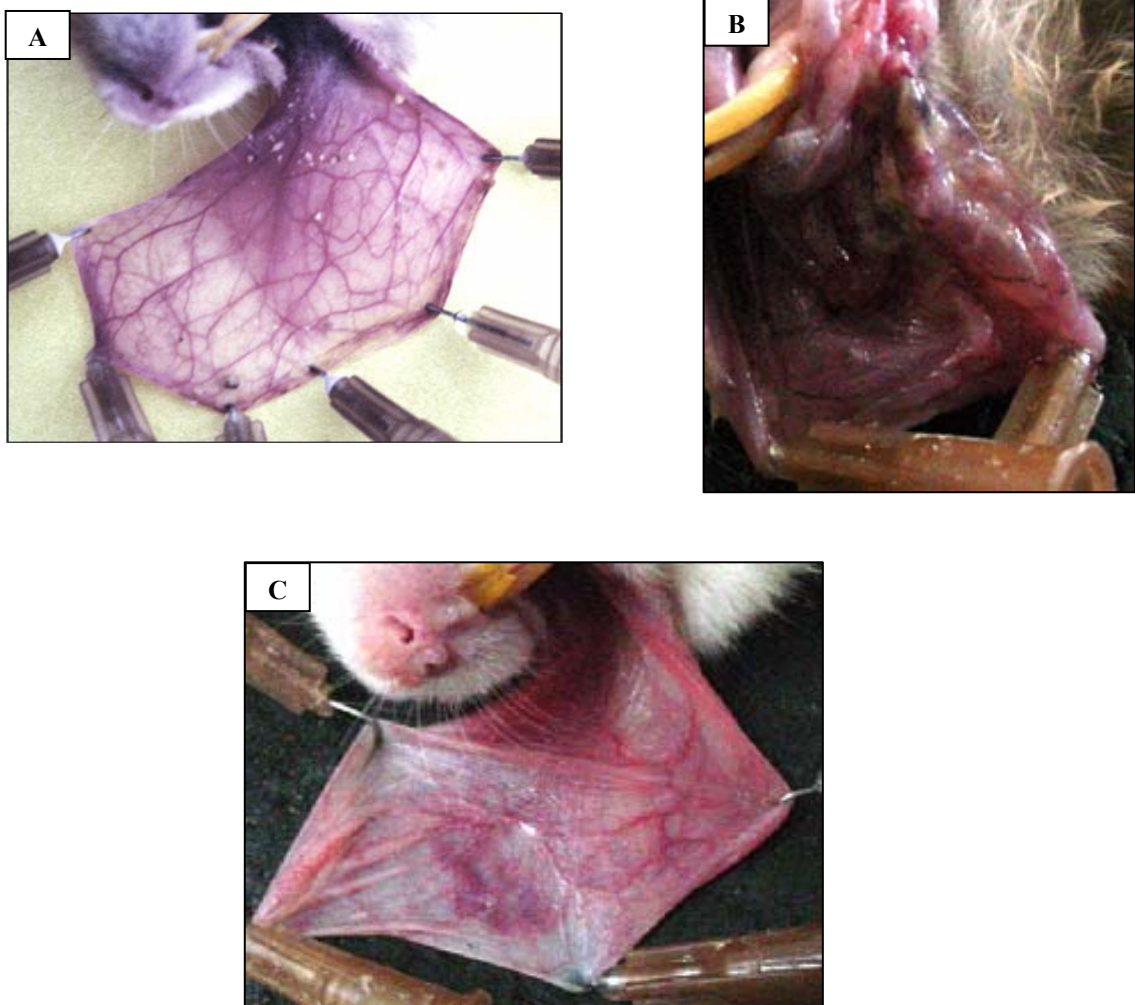
	<b>Tratamento (mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
	Normal	RXT+IM	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Escores	0 (0-0)	3 (2-3) <sup>#</sup>	1 (0-2)	0 (0-2)*	3 (1-3)

RXT + IM – radioterapia + irritação mecânica. PTX5, 15, 45 – doses de pentoxifilina

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação de cobalto-60 (RXT) e irritação mecânica (IM). Os animais receberam PTX (5, 15 e 45 mg kg<sup>-1-sc</sup>) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes das irradiações ou irritações mecânicas, diariamente, durante 13 dias. Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, 7 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. <sup>#</sup>p<0,05 representa diferença estatística dos animais com mucosite oral não tratada, em relação aos animais

normais; \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral, tratados com PTX, em relação aos animais não tratados RXT+IM (Kruskal-Wallis; Dunn).

Apesar da pentoxifilina, nas doses de 5 ou 45 mg kg<sup>-1</sup> não demonstrarem proteção significativa, observou-se que na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup> ela foi capaz de inibir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os parâmetros inflamatórios da mucosite como o eritema, hiperemia, edema, hemorragia, úlceras e abscessos, quando comparados aos animais não tratados (salina). Na figura 26 observam-se os aspectos macroscópicos das mucosas jugais com 13 dias de mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.



**FIGURA 26 - Aspectos macroscópicos das mucosas jugais com 13 dias de mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica. A mucosa jugal normal. B mucosite oral experimental tratada com salina. C mucosite oral experimental tratada com pentoxifilina 15 mg.kg<sup>-1</sup>.**



#### 4.10.2. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações histológicas das mucosas jugais dos hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica

Os dados da tabela 7 representam o efeito da pentoxifilina nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup> ou da solução salina a 0,9% sobre as mucosas jugais dos animais com mucosite oral. A pentoxifilina foi administrada via subcutânea, uma hora antes da radioterapia ou da irritação mecânica e diariamente por um período de 13 dias. Corroborando os achados macroscópicos, observou-se que apenas a pentoxifilina na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup> foi capaz de diminuir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o quadro de mucosite ulcerativa, com redução do eritema, da hiperemia, do edema, das áreas hemorrágicas, úlceras e abscessos, quando comparados às mucosas dos animais não tratados (salina). Na figura 27 observam-se os aspectos microscópicos das mucosas jugais com 13 dias de mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.

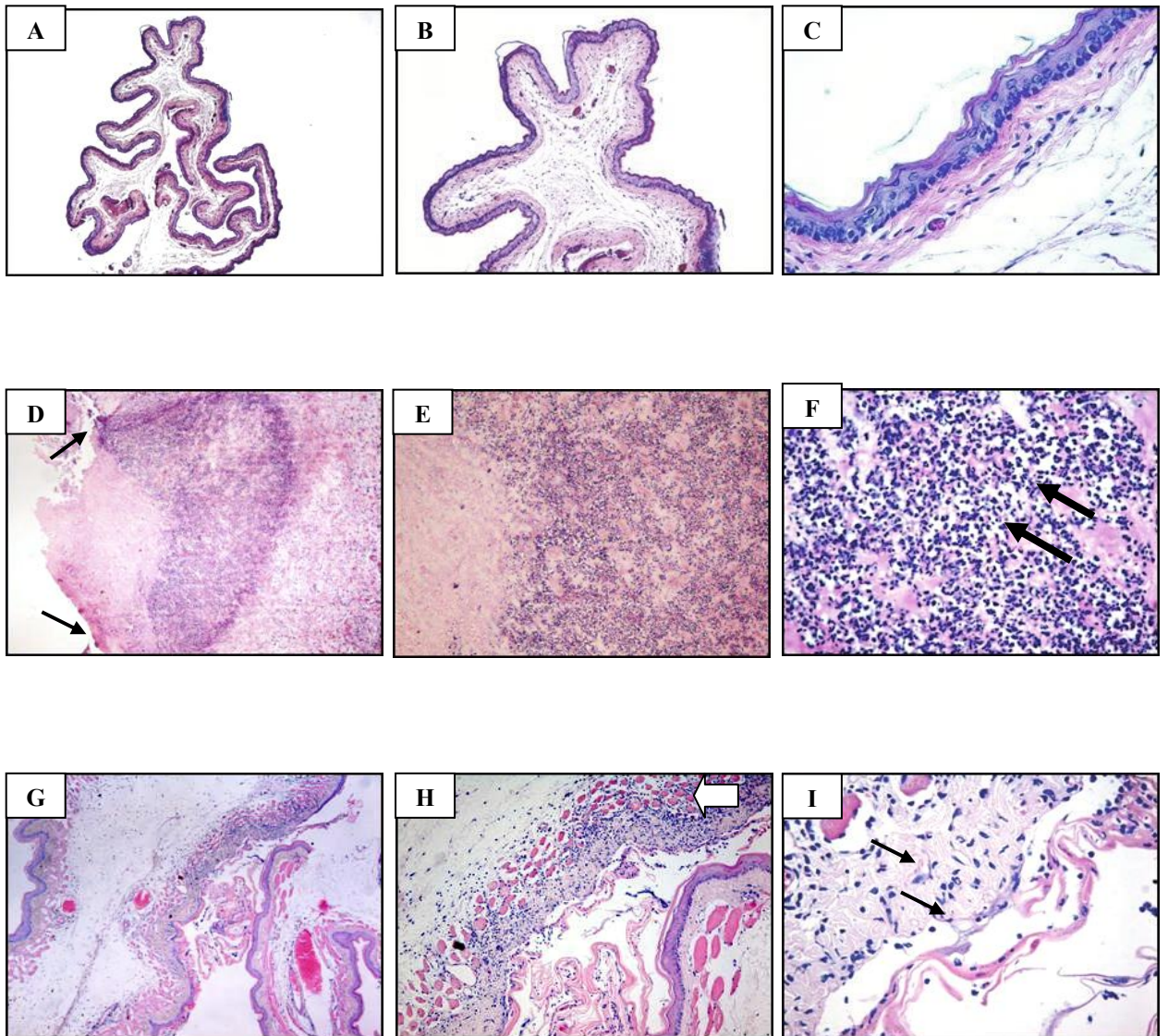
**TABELA 7 - Efeito da pentoxifilina sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters com mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).**

	<b>Tratamento (mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
	Normal	RXT+IM	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Escores	0 (0-0)	3 (1-3) <sup>#</sup>	1 (1-3)	1 (1-3)*	2,5(3-3)

RXT + IM – radioterapia mais irritação mecânica. PTX5, 15, 45 – dose de pentoxifilina

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação de cobalto-60 e irritação mecânica (IM). Os animais receberam PTX (5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup>-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes da irradiação ou irritações mecânicas, diariamente, durante 13 dias. Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, sete hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença de infiltrado celular; de vasodilatação e ingurgitamento vasculares, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. <sup>#</sup> $p < 0,05$  representa diferença estatística dos animais com mucosite oral com radiação e IM não tratada em relação aos animais normais; \* $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas dos

animais com mucosite oral tratados com PTX em relação aos animais não tratados RXT+IM (Kruskal-Wallis; Dunn).

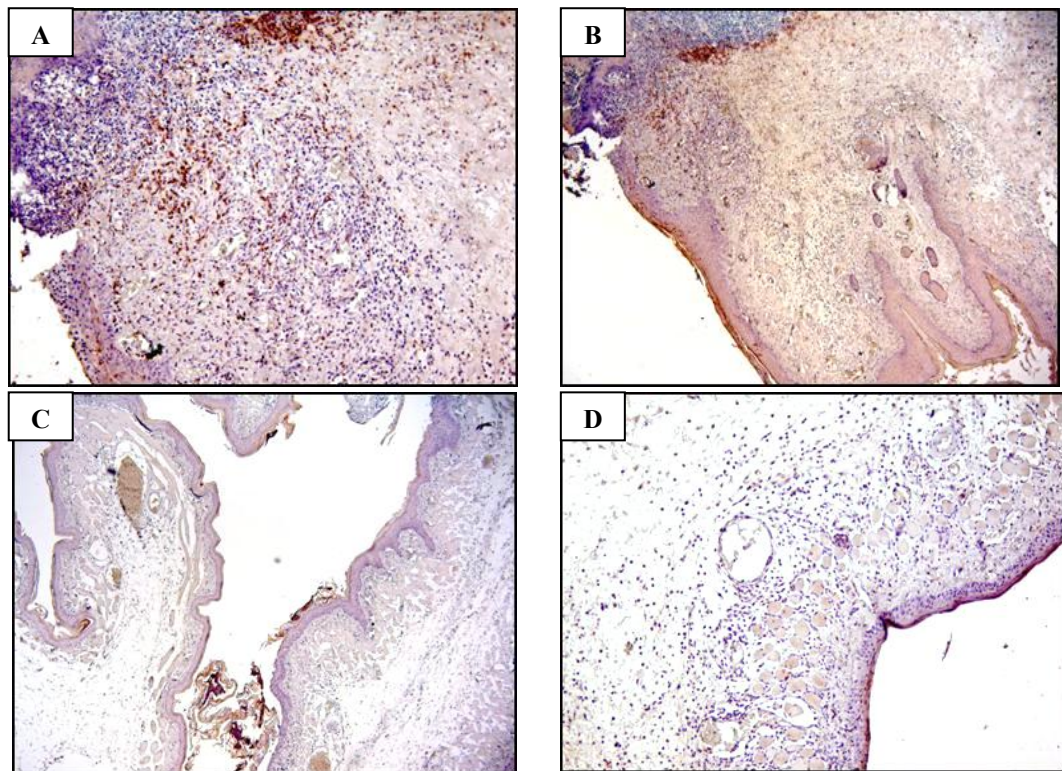


**FIGURA 27 - Fotomicrografias da mucosa oral de hamsters normais (A, B, C), animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina (D, E, F) e animais tratados com pentoxifilina  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  (G, H, I):** Nos animais submetidos a RXT e IM e tratados com PTX  $15 \text{ mg kg}^{-1}$ , observou-se que houve uma proteção da mucosa jugal, pois nos achados histológicos só foi encontrado um processo inflamatório de grau leve (setas), ao contrário do que foi observado na mucosa submetida a RXT e IM, sem o uso da PTX, a qual apresentou um processo inflamatório intenso caracterizado por acentuado infiltrado celular (setas largas) e úlceras extensas (setas pretas). Exame histopatológico corado pela HE (A, D e G – 40X; B, E e H – 100X; C, F e I – 400X).

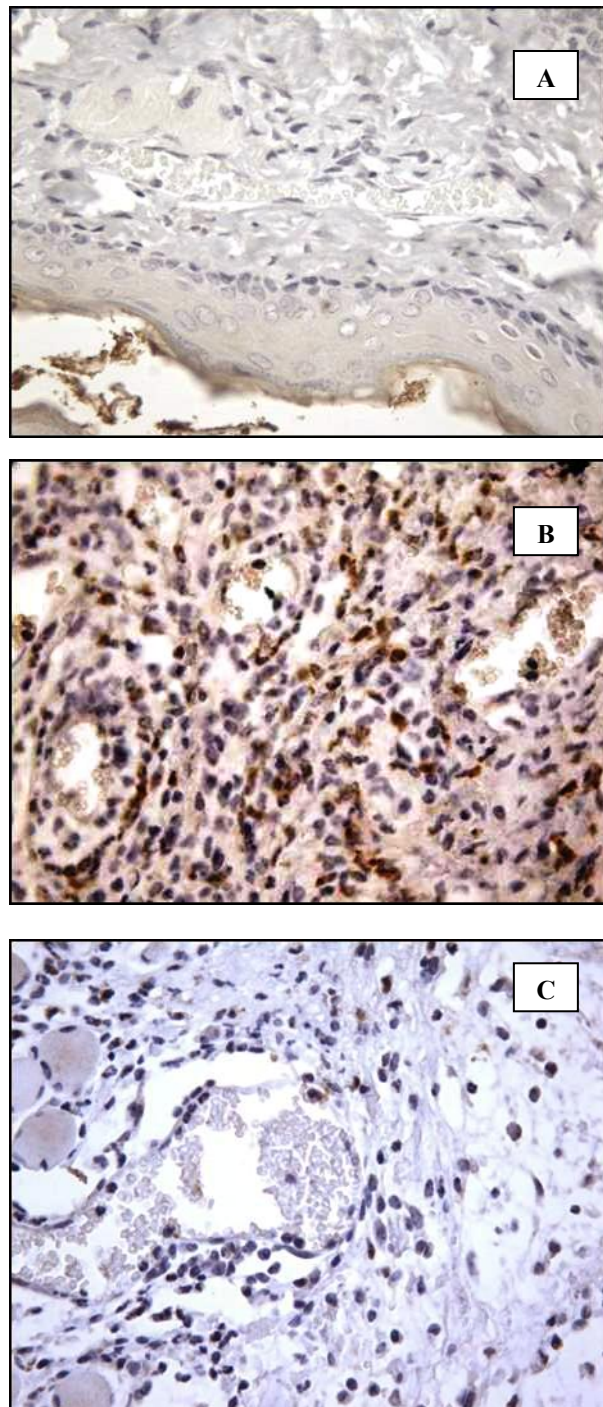


#### 4.10.3 Imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ em hamsters com mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica e tratados com pentoxifilina na dose 15 mg kg<sup>-1</sup>

Na figura 28 observa-se o resultado do efeito da pentoxifilina, na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup>, na marcação de TNF- $\alpha$ , por imunohistoquímica, da mucosa oral de hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica. A fotomicrografia A e B mostra a mucosa jugal de um animal submetido a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica, onde, além das marcações de TNF- $\alpha$  ao nível do epitélio oral, surgem células na lâmina própria, mostrando, assim, um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  como mediador inflamatório. Na fotomicrografia C e D (animais tratados com PTX 15) pode-se observar uma redução evidente da marcação do TNF- $\alpha$  tanto ao nível de epitélio de revestimento da mucosa, como também, na lâmina própria, quando comparada aos animais não tratados.



**FIGURA 28 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica tratados com salina (A e B) e tratados com pentoxifilina 15 mg kg<sup>-1</sup> por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  (C e D) No grupo tratado com PTX observa-se evidente redução da imunomarcagem. Técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  (A e C – 40X; B e D – 100X).**



**FIGURA 29 - Fotomicrografias das mucosas de animais normais, submetidos à radioterapia e irritação mecânica tratados com salina ou pentoxifilina. A:** mucosa jugal de um animal normal, sem imunomarcção para TNF- $\alpha$  em células da lâmina própria da mucosa oral. **B:** mucosa jugal de um animal submetido à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica, onde se observam células inflamatórias na lâmina própria com forte expressão de TNF- $\alpha$ . **C:** (animais tratados com PTX 15) redução evidente da marcação do TNF- $\alpha$  em células do tecido conjuntivo quando comparada à fotomicrografia B. (Imuno-histoquímica – 400X).

#### 4.10.4. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica

Na tabela 8 observa-se que a pentoxifilina não causou alterações significantes no número total de leucócitos, nem o número de neutrófilos ou de mononucleares, quando comparados aos animais não tratados (salina) ou aos normais.

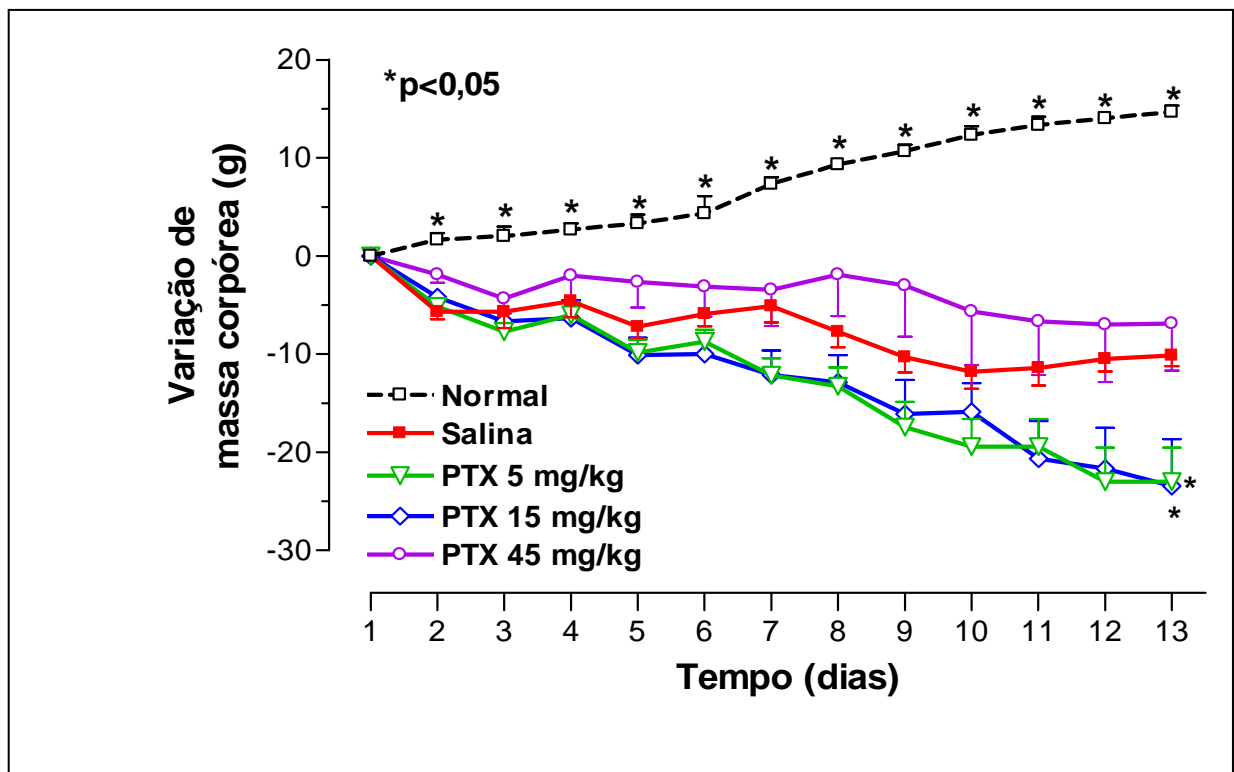
**TABELA 8 - Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma de hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

	<b>Tratamento (mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
	Normal	Salina	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Leucócitos totais	7,8±0,5	8,8±0,7	6,9±1,8	6,2±1,0	8,9±1,1
Neutrófilos	1,9±0,2	1,5±0,3	1,9±0,6	1,4±0,3	-
Mononucleares	5,9±0,4	7,1±0,5	4,9±1,2	4,9±1,0	-

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação de cobalto-60 e de irritação mecânica (IM). Os animais receberam, diariamente, 0,5 ml de salina ou pentoxifilina (PTX) uma hora antes da irradiação ou da irritação mecânica. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>. O número de animais utilizados foi, no mínimo, de sete (Anova; Bonferroni).

#### 4.10.5. Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters submetidos à radioterapia e irritação mecânica

A figura 30 mostra que o tratamento com pentoxifilina nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup> não preveniu a perda de massa corpórea observada nos animais submetidos a mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica.



**FIGURA 30 - Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea de hamsters com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.** Os pontos representam Média  $\pm$  EPM da variação de massas corpóreas (g), calculadas a partir das massas iniciais. \* $p < 0,05$  equivale a diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos à mucosite oral por irradiação e irritação mecânica e tratados com PTX, em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais, em cada grupo, foi, no mínimo, de sete (Anova; Bonferroni).

## 5. DISCUSSÃO

Grandes avanços têm sido observados nas abordagens terapêuticas de diversos tipos de cânceres. Seus tratamentos vêm tornando-se cada vez mais complexos, onde as terapias por radiação ou por agentes químicos ocupam lugar de destaque. Contudo, a toxicidade em tecidos de alta taxa de replicação, como a mucosa do trato gastrointestinal, ainda se apresenta como um importante fator limitante (PARKINS, 1983; XU, 1984; MOSES et al., 1986; SONIS, 1990). A fisiopatologia da mucosite induzida tanto por quimioterapia como por radioterapia é um processo multifatorial e tem sido bastante estudada por vários autores, mas ainda não completamente compreendida. Entretanto, sabe-se que, historicamente, a mucosite é uma toxicidade que envolve células em divisão do epitélio basal da mucosa, além de mudanças no endotélio e no tecido conjuntivo, e a maioria dessas alterações são estimuladas por um número variado de mediadores inflamatórios (SONIS, 1998; SONIS et al., 2004).

Na tentativa de se conhecer a etiopatogênese dessas lesões, vários modelos animais têm sido descritos para o estudo especialmente da mucosite oral. Dessa forma, um maior conhecimento dos mediadores envolvidos nesse processo tem sido observado. O intuito é, sobretudo, reconhecer um tratamento profilático efetivo da mucosite oral, ou pelo menos, um manejo adequado desta complicação (PARKINS, 1983; XU, 1984; MOSES et al., 1986; SONIS, 1990; SONIS et al., 2004).

Nestes modelos experimentais, a mucosite oral foi induzida por aparelhos de baixa energia (Ortovoltagem; Figura 12B). WARDLEY et al., em 1998, para avaliar a citotoxicidade a partir da mucosite induzida por radioterapia em ratos, também se valeu de aparelhos de ortovoltagem, tendo utilizado energia de 300 kV de raios X e doses de 10, 20 ou 30 Gy. Outros modelos têm sido realizados para avaliar a mucosite oral, usando tanto dose única como regimes fracionados em aparelhos de ortovoltagem (PARKINS et al., 1983; XU et al., 1984; MOSES et al., 1986; SONIS et al., 1990; DORR et al., 1990, 1991; ANG et al., 1985). Adicionalmente, SONIS et al., em 2000 demonstraram que o uso de 35 a 40 Gy deliberada por aparelhos de ortovoltagem, com energia de 250 kV, foi suficiente para a produção de um quadro de mucosite ulcerativa. Neste modelo descrito por SONIS e colaboradores, além da dose de 35 a 40 Gy foi também utilizada a irritação mecânica como possível fator potencializador no desenvolvimento do quadro de mucosite ulcerativa. A irritação mecânica também tem sido descrita em modelo de mucosite oral experimental induzido por quimioterapia (LIMA et al., 2005; SONI et al., 1990).

Estudos têm demonstrado que a radioterapia é capaz de iniciar uma cascata de eventos envolvendo citocinas pro-inflamatórias, entre as quais, a interleucina 1- $\beta$  e o TNF- $\alpha$  tem lugar de destaque. Tem sido descrito que tais mediadores potencialmente participam da mucosite oral radio-induzida (ANTIN et al., 1992; SONIS, 2004). Estudos sobre a microbiota e o papel dos modificadores da resposta biológica na mucosa oral irradiada têm contribuído para o entendimento da evolução da mucosite radioinduzida, embora ainda não exista um consenso a respeito de todos os fatores implicados neste processo inflamatório (SONIS, 1998).

A radioterapia pode ser realizada tanto com aparelhos de ortovoltagem, como de megavoltagem. A literatura registra que radioterapia de ortovoltagem é capaz de causar lesões ulcerativas significantes nas mucosas jugais de hamsters (SONIS et al., 2000). Para se estudar a evolução e os possíveis fatores relacionados com a mucosite induzida por radioterapia, buscou-se desenvolver nesse trabalho um modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem cobalto-60 nas mucosas jugais de hamsters, e avaliar a ação da pentoxifilina, como um agente protetor nessas lesões. Nesse modelo, a irritação mecânica foi também utilizada como fator potencializador para se obter o grau de mucosite ulcerativa. Acredita-se que nesses modelos tanto induzidos por aparelhos de ortovoltagem quanto de megavoltagem e por quimioterapia, a irritação mecânica simule os possíveis fatores relacionados aos pacientes, que pioram o processo inflamatório da mucosa oral como: higiene oral inadequada, presença de doenças inflamatórias periodontais, próteses orais mal ajustadas (trauma funcional), xerostomia e trismo (SONIS et al., 1990; DIB et al., 1999; SONIS et al., 2000; BONASSA, 2005).

Nesse modelo de mucosite oral, o hamster foi o animal escolhido por apresentar características teciduais de mucosa oral que em muitos aspectos se assemelham às mucosas jugais do homem. Possui boa tolerabilidade ao tratamento e apresenta flora bacteriana similar à humana. Além disso, esse animal tem uma mucosa jugal ampla e móvel, de fácil manipulação, o que facilita sobremaneira a irradiação (SONIS et al., 1990; SONIS, 2004a).

O desenvolvimento e a graduação da mucosite induzida nos grupos de animais irradiados foram observados no decorrer dos dias 7, 10, 13 e 16 pela análise macroscópica das mucosas jugais, e confirmadas pela análise histológica e atividade da mieloperoxidase em cada fase do experimento. Estes achados parecem ser compatíveis com o que se observa no quadro evolutivo da mucosite oral humana, uma vez que esta se caracteriza por várias alterações ou fases como: palidez da mucosa, eritema, presença de



pseudomembranas e de úlceras (DIB et al., 1999). Tem sido sugerido que as mucosites radioinduzidas utilizando aparelhos de ortovoltagem se desenvolvem em um número maior de fases, uma vez que as mesmas parecem ser mais delimitadas entre si (SONIS et al., 1995; SONIS et al., 1998; SONIS, 2004b). As alterações encontradas nos dias seqüenciais após a radioterapia e potencializadas pela irritação mecânica estão em consonância com as fases descritas por SONIS e colaboradores em 2004.

Na fase de iniciação, também chamada vascular ou inflamatória, as células dos tecidos epitelial, conectivo e sanguíneo são afetadas por diversos mecanismos, como através da agressão dos tecidos pelos radicais livres formados a partir dos danos no DNA causados pela irradiação, iniciando, assim uma cascata de eventos biológicos que podem culminar com a morte celular. Uma vez tenha ocorrido a fase de iniciação, um número de mudanças biológicas começa com a fase de geração de mensagens. Nesta fase fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, pode ser ativado por radioterapia ou quimioterapia, os quais serão responsáveis pela síntese de proteínas biologicamente ativas como as citocinas que são encontradas e aumentadas na circulação sistêmica por toxicidade não hematológica, e serão responsáveis pelo aumento da agressão tecidual com quadro de dor associada. Aqui a radioterapia e a quimioterapia podem induzir a produção e ativação de enzimas que aumentam a taxa de apoptose. Sequencialmente, os próprios mediadores que causam danos aos tecidos são responsáveis pelo controle de elementos que vão comandar o processo de amplificação do quadro inflamatório (feedback), caracterizando, portanto a fase de amplificação ou terceira fase da mucosite. Nesse momento, mediadores como o TNF- $\alpha$  estão aumentados na submucosa em consequência à radioterapia ou quimioterapia e citocinas pró-inflamatórias apresentam a habilidade de regular fatores de transcrição ou ativar enzimas para produzir ceramidas, culminando com aumento do dano tecidual e consequentemente entrando na fase de ulceração da mucosite, que caracteriza a quarta fase do processo inflamatório. Nessa fase a integridade da mucosa é quebrada, havendo colonização de bactérias e piora da mucosite, que associada a quadro de neutropenia pode culminar com bacteremia ou mesmo sepse. Nesse período normalmente aumenta o quadro de dor, internações hospitalares, uso de analgésicos e antibióticos, e consequentemente os custos. Na quinta fase, ocorre a cicatrização concomitante com a proliferação e diferenciação celular, havendo um retorno da flora microbiana à normalidade e recuperação dos leucócitos (SONIS, 2004b).

No presente estudo, apesar de no 7º dia as alterações macroscópicas induzidas pela radioterapia (megavoltagem cobalto-60) e irritação mecânica terem sido

caracterizadas como ausentes ou discretas (0, 0-3) (Tabela 3, pg 59), a análise microscópica evidenciou ingurgitamento vascular e infiltrado celular discretos (1, 0-3) (Tabela 4, pg 61). Esses achados possivelmente correspondem à fase seguinte da iniciação observada imediatamente à radioterapia, onde as células dos tecidos epitelial, conjuntivo e sanguíneo são afetadas por diversos mecanismos (SONIS, 2004b). Uma vez que a fase de iniciação já tenha ocorrido, um número de mudanças biológicas se sucede caracterizando a fase de geração de sinais mensageiros (fase de sinalização). As alterações vistas no sétimo dia desse estudo são, portanto, bastante condizentes com estes estágios, onde fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B pode ser ativado pela radioterapia. A ativação desse fator é responsável pela síntese de proteínas biologicamente ativas, como citocinas e outros mediadores (SONIS, 2004a).

Considerando que as mudanças iniciais do processo inflamatório são histologicamente inespecíficas, a concentração de mieloperoxidase é uma maneira interessante de quantificação da resposta inflamatória precoce (BRADLEY et al., 1982). Tem sido sugerido, nesse sentido, que tal enzima é um importante marcador da presença neutrofílica em áreas inflamadas (LIMA et al., 2005). Assim, ao se analisar a atividade da mieloperoxidase no sétimo dia de mucosite radioinduzida, verificou-se que sua quantidade foi insignificante, condizente com a leve intensidade das alterações observadas até então (Figura 19, pg 65).

Quando se avaliou o 10<sup>o</sup> dia, observou-se que a radioterapia seguida de irritação mecânica causou alterações significantes nas mucosas jugais dos hamsters, evidenciando hiperemia e eritema moderado (1; 0-3) (Tabela 3, pg 59). À análise histológica, a intensidade do ingurgitamento vascular e do infiltrado inflamatório tornou-se moderada, além do surgimento de áreas hemorrágicas, de edema e eventuais úlceras pequenas (2; 1-3) (Tabela 4, pg 61). Esses aspectos foram confirmados pela atividade da mieloperoxidase, a qual foi significativamente aumentada a partir desse período (Fig 19, pg 65). Tais achados podem corresponder à fase onde os próprios mediadores estariam causando injúria aos tecidos e, portanto, responsáveis pelo controle dos elementos que vão determinar o processo de amplificação do quadro inflamatório, caracterizando, portanto, a fase de amplificação ou terceira fase da mucosite (SONIS, 2004b). Nesta etapa, mediadores como TNF- $\alpha$ , com concentração aumentada na submucosa em consequência da radioterapia, e outras citocinas pró-inflamatórias apresentam a habilidade de regular fatores de transcrição ou ativar enzimas para produzir ceramidas. Esta capacidade culmina com aumento da agressão tecidual e, conseqüentemente, favorecendo a fase seguinte



ulcerativa da mucosite, que caracteriza a quarta fase neste processo inflamatório (SONIS, 2004b).

A partir do 13º até o 16º dia, as alterações das mucosas jugais aqui induzidas pela radioterapia + irritação mecânica caracterizaram-se por hiperemia e eritemas acentuados, áreas de hemorragia, além de franca perda da solução de continuidade, onde úlceras extensas e abscessos estão presentes (Figura 15 D e E, pg 60). Esses achados foram confirmados pelas análises microscópicas, as quais mostraram ingurgitamento vascular e infiltrado inflamatórios acentuados e presença de áreas hemorrágicas, edema, abscessos e úlceras extensas, caracterizando, assim, um quadro de mucosite ulcerativa (Figura 17, pg 63; Figura 18, pg 64). Sabe-se que a integridade da mucosa uma vez quebrada favorece a colonização de bactérias e piora dessas lesões. Este quadro associado à neutropenia comumente culmina com bacteremia ou mesmo sepse (SONIS, 2004b). Tem sido descrito que a mucosite ulcerativa especialmente induzida por radioterapia, frequentemente é referida como um processo inflamatório (SONIS et al., 2004). Na inflamação existem células chamadas residentes que estão presentes nos tecidos (células endoteliais, mastócitos e macrófagos teciduais) e outras que têm acesso à área de inflamação a partir do sangue (plaquetas e leucócitos). Dentre os leucócitos, os neutrófilos polimorfonucleares constituem as principais células sanguíneas a alcançar a área de reação inflamatória, participando, portanto, da sua fisiopatologia. Os neutrófilos têm a capacidade de englobar, matar e digerir microrganismos, podendo atuar tanto no controle quanto na exacerbação da resposta inflamatória (KUMAR et al., 2005). Apesar de se considerar que um infiltrado inflamatório agudo não seja facilmente identificável histologicamente nos estágios iniciais das mucosites induzidas por radioterapia (SONIS et al., 2004), os resultados aqui apresentados evidenciaram que níveis importantes de neutrófilos parecem tomar parte nesse processo, uma vez que a atividade da mieloperoxidase, enzima presente abundantemente nos grânulos azurófilos desses leucócitos, mostrou-se significativamente aumentada nessa fase (Figura 9, pg 65). Ainda, dados da literatura também reforçam o papel da inflamação via outros mediadores não menos importantes na mucosite. Nesse sentido, tem sido descrita uma correlação positiva de macrófagos em resposta a doses crescentes de radiação (SONIS et al., 2004). A radioterapia induz a produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à lesão tecidual, onde um aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  tem sido detectado nas células das camadas submucosas jugais de hamsters (SONIS et al., 2000). Nesse contexto, este estudo demonstrou que o uso isolado de irradiação ou de irritações mecânicas nas mucosas jugais de hamsters não foi capaz de

causar alterações nas marcações de TNF- $\alpha$ , aqui determinadas por imunohistoquímica, quando comparadas às de animais normais (Figura 22, pg 69). No entanto, o uso associado de radioterapia e irritações nas mucosas causou aumento importante dessas marcações, sugerindo, assim, que exista uma correlação desse mediador com a intensidade da mucosite ulcerativa induzida por radioterapia e irritação mecânica nesse modelo (Figura 20, pg 67).

Vale salientar, ainda, que as alterações sistêmicas subjacentes ao desenvolvimento da mucosite nesses animais são tipicamente semelhantes àquelas vistas em humanos com áreas tumorais delimitadas, submetidas à radioterapia. À avaliação do leucograma, a mucosite induzida por irradiação e irritação mecânica, apesar da tendência a leucopenia no 7º dia ou mesmo à leucocitose no 13º dia, não se observou alterações significantes até o 16º dia experimental (Figura 23, pg 70). Isso pode ser compreendido, uma vez que os efeitos da radioterapia são, sobretudo, localizados. De fato, radioterapia isolada em tumores de cabeça e pescoço normalmente não induz quadro de leucocitose ou leucopenia, visto se tratar de uma terapêutica muito localizada e em região anatômica que não envolvem sítios produtores de células sanguíneas, como os leucócitos. SONIS et al em 2000, descrevem que o mecanismo de agressão à mucosa por radioterapia é similar o que ocorre com a quimioterapia, porém a mielossupressão não acontece na patogênese da lesão induzida por radioterapia. Esses achados são importantes, uma vez que os animais irradiados não sofreram os efeitos da radiação secundária, o que pode ser corroborado não apenas pela normalidade do hemograma, enquanto parâmetro relevante para denotar que não houve efeito mielossupressor, mas também por cálculos matemáticos que definiram a dose de irradiação secundária, espalhada para o restante do corpo dos animais. Em contrapartida dados da literatura mostram que, na mucosite oral experimental induzida por quimioterapia, ocorre clara leucocitose à custa de neutrófilos (LIMA et al, 2005; SONIS et al., 1990; LEITÃO et al., 2006).

Outro parâmetro avaliado nesse trabalho foi a variação de massa corpórea dos animais. Observou-se que eles perderam peso de forma significativa em relação aos animais normais a partir do 5º dia pós-radioterapia e 1º dia pós-irritação mecânica (Figura 24, pg 71). Essa perda deve-se, possivelmente, à dificuldade ou redução da tendência dos animais de comerem os alimentos sólidos oferecidos, uma vez que seus hemogramas não evidenciaram alterações significativas, tanto que se observa maior intensidade das lesões induzidas por radioterapia e irritação mecânica, o que coincide com aumento de mortalidade entre os animais, a partir do 13º até o 16º dia. Esta idéia parece ser razoável,

pois animais apenas irradiados, sem irritação mecânica, sobreviveram além dos 16 dias, indo até 20º dia quando foram sacrificados. A perda de massa corpórea tem sido descrita por diversos autores em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia associada ou não à quimioterapia. Tal perda correlaciona-se à intensidade do processo de mucosite oral, que quando grave, impossibilita uma ingestão adequada de alimentos necessária aos pacientes, principalmente em decorrência da dor desencadeada nessas lesões (VERA-LLONCH et al., 2005).

Tem sido descrito que, após a fase ulcerativa dessas lesões, processos de proliferação e diferenciação celulares são observados, concomitantemente à normalidade da microbiota oral e à recuperação dos leucócitos (SONIS, 2004b). Em nosso estudo, a alta taxa de mortalidade observada em consonância à perda de peso, parece ser a responsável por não se ter observado grupos de animais com lesões cicatrizadas após o 16º dia (Figura 25, pg 72).

A despeito da significância clínica da estomatotoxicidade induzida por radioterapia ou quimioterapia, ainda existe certa dificuldade de se estudar mecanismos específicos inerentes, o que, em última instância, restringe as abordagens profiláticas ou mesmo um tratamento adequado para esta condição. Existem vários modelos descritos de mucosite oral induzida por radioterapia de ortovoltagem para o estudo da citotoxicidade, onde o processo biológico tem sido foco de estudos de inúmeros autores (WARDLEY et al., 1998). No entanto, ainda não há consenso a respeito dos fatores implicados na evolução da mucosite radioinduzida, e seu tratamento, na verdade, ainda é dirigido à palição de sinais e sintomas, confirmando, portanto, a necessidade de terapias profiláticas dessas lesões.

Logo, a criação deste modelo experimental de mucosite oral radioinduzida em hamsters com aparelho de megavoltagem, cria uma oportunidade para conhecer melhor a fisiopatologia e os possíveis mediadores que estão envolvidos neste processo inflamatório, permitindo, assim, o estudo de novas estratégias preventivas ou terapêuticas.

Considerando que as peculiaridades deste modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia serem muito semelhantes às formas humanas, e que a sua etiopatogênese possivelmente envolve vários mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas, buscou-se utilizar uma estratégia simples que permitisse a modulação da mucosite aqui induzida. Assim, a pentoxifilina, um agente hemorreológico com importantes ações antiinflamatórias, foi escolhida como modulador farmacológico nessas lesões.

A pentoxifilina é uma metilxantina que atua como inibidor da fosfodiesterase 4, o que tem favorecido a sua utilização em larga escala em distúrbios cerebrais e vasculares (YANG et al., 1995; NIEDER et al., 2005). Além disso, inibe, de forma não seletiva, a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (DOHERTY et al. 1991; MITCHELL et al. 1994; NEUNER et al. 1994).

Assim, a pentoxifilina foi utilizada nas doses de 5, 15 e 45 mg kg<sup>-1</sup>-sc, uma hora antes da indução da mucosite oral por radioterapia e irritação mecânica e, diariamente, até o 13º dia. Observou-se que este fármaco na dose de 5 mg kg<sup>-1</sup> apresentou apenas uma tendência a proteção dessas lesões. Quando, contudo, foi utilizada na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup>, a pentoxifilina foi capaz de inibir de forma significativa as alterações vistas nesse período, reduzindo, assim, a intensidade do eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos (Tabela 6, pg 73). Tais aspectos foram confirmados pela análise histopatológica, com redução significativa da intensidade do infiltrado celular e da dilatação e ingurgitamento vascular, além de diminuir hemorragia, edema, úlcera e abscessos (Tabela 7, pg 75). Esse papel protetor do processo inflamatório pode ser explicado inicialmente sob diversas formas de atividade antiinflamatória, uma vez que a pentoxifilina tem mostrado possuir a capacidade diferenciada em modular a produção de citocinas importantes. De fato, quando utilizada na concentração de 10<sup>-3</sup> M pode inibir a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, porém em concentração de 10<sup>-4</sup> M aumenta a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória. De acordo com estes dados pode-se sugerir que esta droga possui padrões diferenciados de regulação que pode ser dependente da dose (THANHAUSER et al., 1993; D'HELLENCOURT et al., 1996).

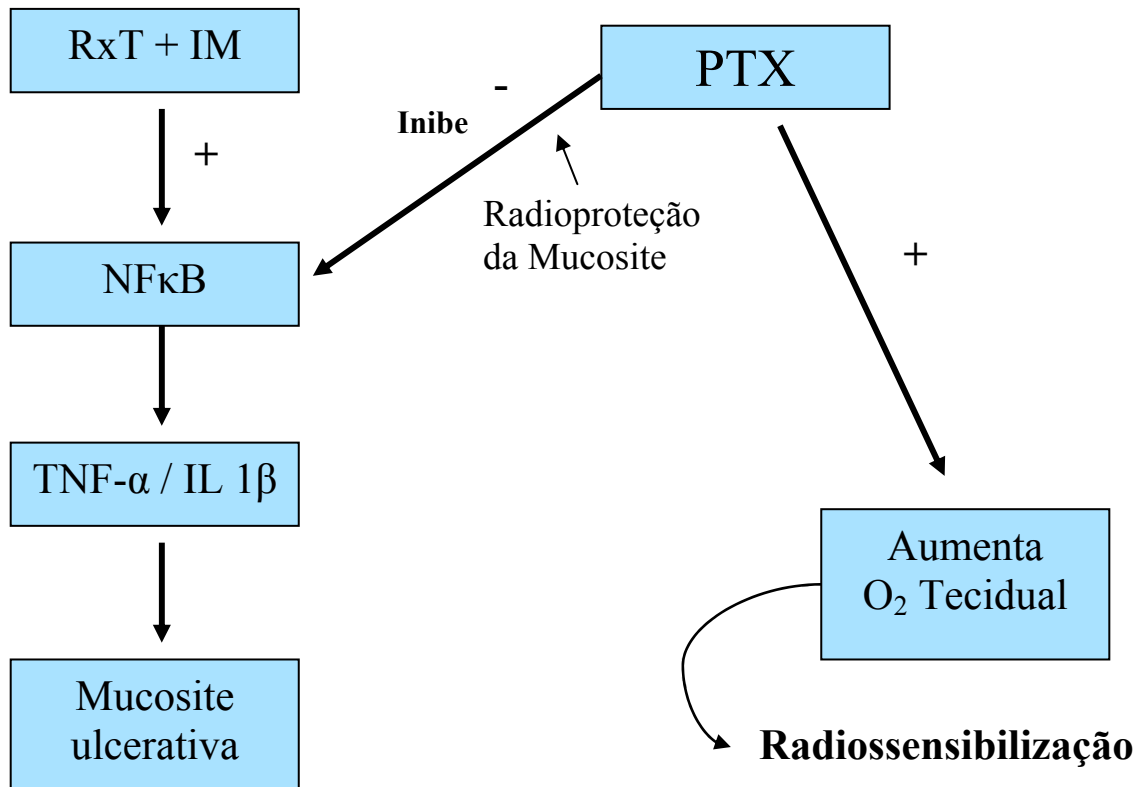
Adicionalmente, a pentoxifilina também está particularmente relacionada à redução da produção de TNF- $\alpha$ , via supressão da transcrição de seu gene. Tem sido demonstrado que essa ação supressora ocorre através da inibição da PDE4, o que resulta em aumento das concentrações de AMPc e, conseqüentemente, em inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, do qual a síntese de TNF- $\alpha$  é dependente (DOHERTY et al., 1991; NEUNER et al., 1994; JIMENEZ et al., 2001). Nesse contexto, nossos dados mostraram que a pentoxifilina, na dose de 15 mg kg<sup>-1</sup> reduziu marcadamente os níveis de TNF- $\alpha$ , evidenciados por estudo imunohistoquímico, em mucosas jugais de animais submetidos à mucosite por radioterapia + irritação mecânica quando comparados aos não tratados. Esses achados sugerem, portanto, que a pentoxifilina possui um papel protetor nessas lesões, no mínimo, por interferir nos níveis aumentados de TNF- $\alpha$ .

Além do papel radioprotetor da pentoxifilina, possivelmente relacionado ao seu perfil antiinflamatório nas lesões induzidas por radioterapia, vários pesquisadores oncologistas vêm estudando este fármaco também sob outros aspectos. Corroborando com estes achados, recentemente demonstrou-se que a pentoxifilina tem importante efeito antinociceptivo em diversos modelos experimentais analisados e que este efeito deve-se à inibição de citocinas hiperálgicas entre as quais o TNF- $\alpha$  tem destaque (VALE et al., 2004). Considerando, então, ser extremamente útil na perfusão tecidual, a pentoxifilina tem recebido destaque devido à sua capacidade radiosensibilizante por melhorar a oxigenação dos tecidos e do tumor (NIEDER et al., 2005). No presente estudo, quando utilizada na dose de 45 mg kg<sup>-1</sup>, a pentoxifilina não foi capaz de reduzir significativamente o eritema, a hiperemia, o edema, as úlceras ou abscessos, quando comparada aos animais não tratados. Possivelmente, esse achado se deveu a um aumento da sensibilidade da mucosa jugal aos efeitos da radioterapia adotada, tanto que pentoxifilina nessa maior dose não afetou o hemograma ou a variação de massa corpórea nesses animais com mucosite oral induzida.

Em resumo, os resultados deste estudo considerando os parâmetros avaliados, o modelo de mucosite oral induzida por radioterapia cobalto-60 mais irritação mecânica aqui apresentado está de acordo com os modelos de mucosites radioinduzidas já descritos da literatura (SONIS et al., 2000), podendo, portanto, ser usado para o estudo da mucosite oral na tentativa de um melhor conhecimento da etiopatogenia deste processo inflamatório.

Quanto aos efeitos da pentoxifilina (Figura 31) neste modelo como droga protetora do processo inflamatório, provavelmente sua ação antiinflamatória tenha sido em decorrência da sua função como inibidor de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , atuando, portanto, como um agente radioprotetor ou, dependendo da dose utilizada, a pentoxifilina, por melhorar a perfusão tecidual, pode atuar como um agente radiosensibilizante.

**Diagrama esquemático representativo do possível efeito da pentoxifilina na mucosite oral induzida por radioterapia em hamsters.**



**FIGURA 31 - Papel modulador da pentoxifilina na mucosite induzida por radioterapia.** A pentoxifilina tem a função de inibir a produção de TNF- $\alpha$  via inibição do NF $\kappa$ B, podendo nesse modelo assumir o papel de possível radioprotetor na mucosite oral radioinduzida. No entanto, a pentoxifilina por apresentar a capacidade de aumentar o oxigênio tecidual poderia funcionar também como radiossensibilizante, pois nesse modelo na dose 45 mg kg<sup>-1</sup> não mostrou nenhuma proteção da mucosa e sim piora do quadro inflamatório.

## 6. CONCLUSÕES

1. Foi desenvolvido de forma inédita, um modelo de mucosite oral experimental induzida por radioterapia com aparelho de megavoltagem cobalto-60 associada à irritação mecânica.
2. Os parâmetros utilizados na avaliação do curso temporal da resposta inflamatória como análise macroscópica das mucosas, escores histopatológicos e dosagem de mieloperoxidase, mostraram-se coerentes com as alterações típicas encontradas no curso do processo inflamatório.
3. A expressão de TNF se correlacionou positivamente com a intensidade da lesão da mucosa, desde que se encontrou particularmente aumentado nos animais submetidos a radioterapia associada a irritação mecânica.
4. A pentoxifilina apresentou um efeito protetor na mucosite (dose de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$ ) oral experimental radioinduzida, possivelmente via inibição de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ .

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANG, K.K.; XU, F. X.; LANDUYT, W.; VAN DER SCHUEREN, E. The kinetics and capacity of repair of sublethal damage in mouse lip mucosa during fractionated irradiations. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.11, p.1977-1983, 1985.

AIROLDI, M.; CORTESINA, D.; GIORDANO, C.; PEDANI, F.; GABRIELE, A.M.; MARCHIONATTI, S.; BUMMA, C. Postoperative adjuvant chemoradiotherapy in older patients with head and neck cancer. **Arch.Otolaryngol. Head Neck Surg.**,v.130, p.161-166, 2004.

ANTIN, J. H.; FERRARA, J.L. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.10, p.510-520, 1992.

ACELERADOR LINEAR. Disponível em: <http://www.turvillebay.com/assets/varian-acuity-IMRT150.jpg>. Acesso em 12 Dez. 2006.

ARCHIBALD, D.; LOCKHART, P.B.; SONIS, S.T.; ERVIN, T.J.; FALLON, B.G.; MILLER, D.; CLARK, J.R. Oral complications of multimodality therapy for advanced squamous cell carcinoma of head and neck. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 61, n.2, p.139-141, 1986.

ARGILÉS, J.M.; LÓPEZ-SORIANO, J.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Journey from cachexia to obesity by TNF. **FASEB J.**, v.11, p. 743-751, 1997.

AYGENC, E.; CELIKKANAT, S.; KAYMAKCI, M.; AKSARAY, F.; OZDEM, C. Prophylactic effect of pentoxifylline on radiotherapy complications: a clinical study. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.130, p.351-356, 2004.

BADGER, A.M.; OLIVEIRA, D.L.; ESSER, K.M. Beneficial effects of the phosphodiesterase inhibition BRL 61063, pentoxifylline, and rolipram in a murine model of endotoxin shock. **Circ. Shock**, v.44, p.188-195, 1994.

BENSADOUN, R.J.; MAGNÉ, N.; MARCY, P. Y.; DERMARD, F. Chemotherapy and radiotherapy induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.258, p.481-487, 2001.

BERGER, A.M.; KILROY, T. J. Oral complications. In: De VITA, V.T.; HELMAN, S.; ROSENBERG, S.A.; (Eds.). **Cancer: principles & practice of oncology**. 3.ed. Philadelphia, Lippincout-Raven, 1997. cap. 10, p.2714-2725.



BESHAY, E.; CROZE, F.; PRUD'HOMME, G.J. The phosphodiesterase inhibition pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. **Clin. Immunol.**, v.98, p.272-279, 2001.

BESSLER, H.; GILGA, R.; DJALDETTI, M.; ZAHAVI, I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J. Leukoc. Biol.**, v.40, p.747-754, 1986.

BONASSA, E. M. A . Toxicidade gastrointestinal. In: \_\_\_\_\_ . ; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.5, p. 101-130.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.** , v.78, p.206-209, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

BRENNAN, M.T.; von BÜLTZINGSLÖWEN, I.; SCHUBERT, M.M.; KEEFE, D. Alimentary mucositis: putting the guidelines into practice. **Supp. Care Cancer**, v.14, p.573-579, 2006.

BRIZEL, D. M. The role of combined radiation therapy and chemotherapy in the management of locally advanced squamous carcinoma of the head and neck. In: PEREZ, C. A.; BRADY, L. W.; HALPERIN, E.C.; SCHMIDT-ULLRICH, R.K. **Principles and practice of radiation oncology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott,2004, cap. 33, p.905-917.

CLARKSON, J. E.; WORTHINGTON, H.V.; EDEN, O.B. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (**Cochrane Review**). Em: The Cochrane Library, n.1, 2006. Oxford: Update Software.

COX, J.D.; STETZ, J.; PAJAK, T. F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Int. J. Radiat.Oncol. Biol. Phys.**,v.31, p.1341-1346, 1995.

D'HELLEN COURT, C.L.; DIAW, L.; CORNILLET, P.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 by pentoxifylline. **Int. J. Immunopharmac.**, v.18, p.739-748, 1996.

DI GIROLAMO, N.; VISVANATHAN, K.; LODY, A.; WAKEFIELD, D. Expression of TNF- $\alpha$  by human plasma cells in chronic inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v.61, p.667-678, 1997.

DIB, L.L.; CURI, M.M. Complicações orais em oncologia. In: SALVAJOLI, J. V.; SOU HAMI, L.; FARIA, S. L. (Eds.). **Radioterapia em oncologia**. São Paulo: MEDSI, 1999, cap.41, p.1145-1164.

DOHERTY, G.M.; JENSEN, J. C.; ALEXANDER, H.R.; BURESH, C. M.; NORTON, J. A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery** (St.Louis), v.110, p.192-198, 1991.

DORR, W.; KUMMERMEHR, J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal condition and following single dose irradiation Virchows. **Arch. B. Cell Pathol. Inci. Mol. Pathol.** v.60, p.287-294, 1991.

DORR, W.; KUMMERMEHR, J. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. **Radiother. Oncol.** v.17, p.249-259, 1990.

EPSTEIN, J.B.; PARKER, I. R.; EPSTEIN, M. S.; STEVENSON-MOORE, P. Cancer related oral health care services and resources: a survey of oral and dental care in Canadian cancer centres. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.70, n.5, p.302-304, 2004.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A.; Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap.3, p.35-73.

FERREIRA, C. G.; DIENSTMANN, R.; RODRIGUES, A.N. Drogas novas em oncologia. In: GUIMARÃES, J. R. Q. (Ed.). **Manual de oncologia**. 2.ed. São Paulo: BBS, 2006. cap. 127, p.1329-1344.

FU, K.K.; PAJAK, T.F.; TROTTI, A.; JONES, C.U.; SPENCER, S.A.; PHILLIPS, T.L.; GARDEN, A.S.; RIDGE, J.A.; COOPER, J.S.; ANG, K.K. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.48, p.7-16, 2000.

GODDEN, T. J. Gamma radiation from cobalt 60 teletherapy units. **Br. J. Radiol. Suppl.** 17, p. 45-59, 1983.

HALL, E J. The Physics and Chemistry of Radioation Absorption. In: \_\_\_\_\_. **Radiobiology for the Radiology**. 5 ed. Philladelphia: Lippincott, 2000. cap.1, p.5 – 16.

HAN, J.; THOMPSON, P.; BEUTLER, B. Dexametasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. **J. Exp.Med.**, v.172, p.391-394, 1990.

HOLZHEIMER, R.G.; MOLLOY, R. G.; RIORDAIN, D. S.; MENDEZ, M. V.; CURLEY, P.; COLLINS, K.; NESTOR, M.; SAPOROSCHETZ, I. B.; MANNICK, J.A.; RO DRICK, M.L. Long-term immunotherapeutic intervention with pentoxifylline in a mouse model of thermal injury and infection. **J. Trauma**, v.38, p.757-762, 1995.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R.C.; GHAFOR, A.; FEVER, E.J.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J. Clin.** v.55, p. 10-30, 2005.

JIMENEZ, J. L.; PUNZON, C.; NAVARRO, J.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.299, p.753-759, 2001.

KEEFE, D.M.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.M. Developing evidence-based guidelines for management of alimentary mucositis : process and pitfalls. **Supp. Care Cancer**, v.14, p.492-498, 2006.

KUMAR, V.; ABAS, A K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS, S. L.;COTRAN, R. S. **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: 2005. cap.2, p.49-89.

LEE, N.; PHILLIPS, T. L. Cancer of the oral cavity. In: LEIBEL, S. A.; PHILLIPS, T.L. **Textbook of radiation oncology**. 2.ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. cap.29, p.631-655.

LEHERT, S. Radiobiologia. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L. ; FARIA, S. L. (Eds.). **Radioterapia em oncologia**. São Paulo: MEDSI, 1999. cap.5, p.91-118.

LEITÃO, R.F.C.; RIBEIRO, R.A.;BELLAGUARDA, E. A .L.; MACEDO, F.D.B.; SILVA, L.R.; ORIÁ, R.B.; VALE, M.L.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A.C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluoracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Agosto/2006.

LeMAY, L.G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. The effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF) in the rat. **Cytokine**, v.2, n.4, p.300-306, 1990.

LIANG, L.; BESHAY, E.; PRUD'HOMME, G.J. The phosphodiesterase inhibition pentoxifylline and rolipran prevent diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v.47, p.570-575, 1998.

LIMA, V.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A. A.; AUGUSTO, R.F.; SOUZA, M.L.P.; LEITÃO, B.T.; RIBEIRO, R.A. Effects of the tumour 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.

LOPES, A.; MELLO, C.A.L. Tratamento multidisciplinar do câncer. In: \_\_\_\_\_.; IYEYASU, H.; LOPES, L. F.; CASTRO, R.M.R.P.S.; ALMEIDA, E.S. **Oncologia para a graduação**. São Paulo: TECMED, 2005. cap.10, p.137-142.

MABRO, M.; FAIVRE, S.; RAYMOND, E. A risk-benefit assessment of amifostine in cytoprotection. **Drug Saf.** v.21, p.367-387, 1999.

MACIEJEWSKI, B.; PREUSS-BAYER, G.; TROTT, K. R. The influence of the number of fractions and overall treatment time on local control and late complication rate in squamous cell carcinoma of the larynx. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.9, p.321-328, 1983.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; INTRONA, M. Endothelial activation by cytokines. **Ann. NY. Acad. Sci.** , v.832, p. 93-116, 1997.

MARTELLA, E.; MOLE, R.D. ; MOUTINHO, K.; LARA, V. C. Fundamentos de radioterapia. In: GUIMARÃES, J. R. Q. (Ed.). **Manual de oncologia**. 2.ed. São Paulo : BBS, 2006. cap. 6, p. 100-113.

McGUIRE, D.B.; CORREA, M.E. P.; JOHSON, J.; WIENANDTS, P. The role of basic oral care and good clinical practice principles in the management of oral mucositis. **Supp. Care Cancer**, v.14, p.541-547, 2006.

MERLANO, M.; CORVO, R.; MARGARINO, G.; BENASSO, M.; ROSSO, R.; SERTOLI, M.R.; CAVALLARI, M.; SCALA, M.; GUENZI, M.; SIRAGUSA, A. Combined chemotherapy and radiation therapy in advanced inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. The final report of a randomized trial. **Cancer**, v.67, p.915-921, 1991.

MITCHELL, J.A.; AKARAREREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.11693-11697, 1994.

MOLLER, D.R.; WYSOCKA, M.; GREENLEE, B.M.; MA, X.; WAHL, L.; TRINCHIERI, G.; KARP, C.L. Inhibition human interleukin-12 production by pentoxifylline. **Immunology**, v.91, p.197-203, 1997.

MORAES, E.D.; LESSA, G.S.; CARVALHO, E.S.; AGRA, I. Tumores de cabeça e pescoço-quimioterapia. In: GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de oncologia**. 2.ed. São Paulo: BBS, 2006. cap.83, p.867-901.

MOSES, R.; KUMMERMEHR, J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. **Br. J. Cancer**, suppl. 7, p.12-15, 1986.

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; SCHAUER, E.; POURMOJIB, M.; MACHEINER, W.; GRUNWALD, D.; KNOBLER, R.; SCHWARZ, A.; LUGER, T.A.; SCHWARZ, T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cell. **Immunology**, v.83, p.262-267, 1994.

NIEDER,C.; ZIMMERMANN, F.B.; ADAM, M.; MOLI, M. The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. **Cancer Treat. Rev.** v.31, p.448-455, 2005.

NOVAES, P. E. R. S. Radioterapia. In: BRETANI, M. M. ; COELHO, F. R. G. ; IYEYASU, H. ; KOWALSKI, L. P. (Eds.). **Bases da oncologia**. São Paulo: LEMAR, 1998. cap.22, p.441-455.

OKUNIEFF, P.; AUGUSTINE, E.; HICKS, J.E.; CORNELISON, T. L.; ALTEMUS, R.M.; NAYDICH, B.G.; DING, I.; HUSER, A.K.; ABRAHAM, E.H.; SMITH, J.J.; COLEMAN, N.; GERBER, L.H. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. **J. Clin. Oncol.**, v.22, p.2207-2213, 2004.

OZTURK, B.; EGEHAN, I.; ATAVCI, S.; KITAPCI, M. Pentoxifylline in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer: a double-blind randomized trial. **Int. J. Radiat.Oncol. Biol. Phys.**, v.58, p.213-219, 2004.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Immunology**, v.357, p.1777-1789, 2001.

PARKINS, C.S.; FOWLER , J. F.;YU, S. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to X-irradiation. **Radiother. Oncol.**, v.1, p.159-165, 1983.

PARSONS, J. The effect of radiation on normal tissues of the head and neck. In: MILLION, R. R.; CASSINI, N. J. (Eds.). **Management of head and neck cancer : a multidisciplinary approach**. 2.ed.Philadelphia:JB Lippincott, 1994, cap. 13, p.245-289.

PEREZ, C.A. ; BRADY, L. W. ; ROTI, J. L. R. Overview. In: PEREZ, C. A. ; BRADY, L. W. **Principles and practice of radiation oncology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. cap. 1, p.1-78.

PETERS, L. J.; ANG, K.K.; THAMES, H.D. Altered fractionation schedules. In: PEREZ, C.A.; BRADY, L.W. (Eds.). **Principles and practice of radiation oncology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992, p.97-113.

PETERSON, D.E.; KEEFE, D.M.; HUTCHINS, R.D.; SCHUBERT, M. M. Alimentary tract mucositis in cancer patients: impact of terminology and assessment on research and clinical practice. **Supp. Care Cancer**, v.14, p.499-504, 2006.

PICO, J. L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **Oncologist**, v.3, p.446-451, 1998.

PINTO, A. C.; LEITE, M.T.T. História da radioterapia. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. **Radioterapia em oncologia**. São Paulo: MEDSI, 1999. cap. 2, p. 7-18.

PLEVOVÁ, P. Prevention and treatment of chemotherapy and radiotherapy induced oral mucositis: a review. **Oral Oncol.**,v.30, p.453-470, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; MOURE, P. K. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: \_\_\_\_\_. **Farmacologia** 5.ed. São Paulo: Elsevier, 2003. cap.15, p.246-276.

ROCHA, J.C.C.; KAGOARA, L.T. Oncogenética e farmacogenética. In: GUIMARÃES, J. R. Q. (Ed.). **Manual de oncologia**. 2.ed. São Paulo: BBS, 2006. cap.2, p. 57-66 .

ROGER, A. The role of IL-10 in the inhibition of LPS-mediated TNF- $\alpha$  release from human PBMCs by phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors. **Inflamm. Res.**, v.46, suppl 3, p.S218, 1997.

ROTMAN, M.; AZIZ, H.; WASSERMAN, T.H. Chemotherapy and irradiation. In: PEREZ, C. A.; BRADY, L. W. **Principles and practice of radiation oncology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.705-722.

SALVAJOLI, J.V.; SILVA, M.L.G. Radioterapia. In: IKEMORI, E.H.A.; OLIVEIRA, T.; SERRALHEIRO, I. F.D.; SHIBUYA, E.; COTRIM, T.H.; TRINTIN, L. A.; ASSAF, L. **Nutrição em oncologia**. São Paulo: LEMAR/TECMEDD, 2003. cap.8, p.189-203.

SANCHIZ, F.; LILLA, A.; TOMER, J. Single fraction per day versus two fractions per day versus radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.19, p. 1347-1359, 1990.

SCAFF, L.A.M. Máquinas de teleterapia. In: \_\_\_\_\_. **Física da radioterapia**. São Paulo: Sarvier, 1997. cap.12, p.233-252.

SCHANDENÉ, L.; VANDENBUSSCHE, P.; CRUSIAUX, A.; ALEGRE, M.L.; ABRAMOWICZ, D.; DUPONT, E.; CONTENT, J.; GOLDMAN, M. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. **Immunology**, v.76, p.30-40, 1992.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. T. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 2, diagnosis and management of mucositis. **Head Neck**, v.26, p.77-84, 2004.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S.T. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head Neck**, v.25, p. 1057-1070, 2003.

SEGRETO, H.R.C., SEGRETO, R.A. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. **A folha médica**. São Paulo: 2000. n. 4 v.119, p. 9-27.

SIMON, S.D. Interações entre radioterapia e quimioterapia. In: SALVAJOLI, J. V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S. L. (Eds.). **Radioterapia em oncologia**. São Paulo: MEDSI, 1999. cap.10, p.231-236.

SLIWA, K.; WOODIWISS, A.; KONE, V.N.; CANDY, G.; BADENHORST, D.; NORTON, G.; ZAMBAKIDES, C.; PETERS, F.; ASSOP, R. Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. **Circulation**, v.109, p.750-755, 2004.

SMITH, C.W.; SUTHERLAND, W.H. X rays: half-value layer range 0.5 mm-4.0 mm Cu. **Br. J. Radiol.** Suppl.17, p.23-36, 1983.

SONIS, S. T. ; ELTING, L. S.; KEEFE, D. ; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; JENSEN, M. H.; BEKELE, N.; DURLACHER, J. R.; DONNELLY, J.P.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology and consequences for patients. **Cancer**, v.100, 9 suppl., p.1995-2025, 2004.

SONIS, S. T.; TRACY, C.; SHKLAR, G.; JENSON, J. ; FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.69, p.437-443, 1990.

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

SONIS, S.T. Pathobiology of mucositis. **Sem. Oncol. Nurs.**,v.20, p.11-15, 2004a

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nat. Rev. Cancer**, v.4, p.277-284, 2004b

SONIS, S.T.; EDWARDS, L.; LUCEY, C. The biological basis for the attenuation of mucositis: the example of interleukin-11. **Leukemia**, v.13, p.831-834, 1999.

SONIS, S.T.; KUNZ, A. Impact of improved dental services on the frequency of oral complications of cancer therapy for patients with non – head – neck malignancies. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.65, p.19-22, 1998.

SONIS, S.T.; MUSKA, A.; O'BRIEN, J.; VAN VUGT, A.; LANGER-SAFER, P.; KEITH, J. Alterations in frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, v.31B, p.261-266,1995.

SONIS, S.T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L.J.; LUCEY, C.A.; WANG, L.; MASON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES,G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L.L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A.J. Defining mechanism of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**,v.36, p. 373-381, 2000.

SONIS,S.T.; FEY, E. G. Oral complication of cancer therapy. **Oncology**. V.16, p.680-686, 2002.

STRIETER, R. M.; REMICK, D. G.; WARD, P.A.; SPENGLER, R. N.; LYNCH, J. P.; LARRICK, J.; KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor alpha production by pentoxifylline. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.155, p. 1230-1236, 1988.

THANHAUSER, A.; REILING, N.; BOHLE, A.; TOELLNER, K.M.; DUCHROW, M.; SCHEEL, D.; SCHLUTER, C.; ERNST, M.; FLAD, H. D.; ULMER, A.J. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity. **Immunology**, v.80, p. 151-156, 1993.

TROTTI, A.; BELLM, L.A.; EPSTEIN, J.B.; FRAME, D.; FUCHS, H. J.; GWEDE, C. K.; KOMAROF, E.; NALYSNYK, L.; ZILBERBERG, M.D. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother. Oncol.**, v.66, p.253-262, 2003.



VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A C.; ROCHA, F.A.C.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.**, v.143, p.833-844, 2004.

VERA-LIONCH, M.; OSTER, G.; HAGIWARA, M.; SONIS, S. T. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma-risk factors and clinical consequences. **Cancer**, v.106, p.329-336, 2005.

VOKES, E.E.; KIES, M. S.; HARAF, D. J.; STENSON, K.; LIST, M.; HUMERICK - HOUSE, R.; DOLAN, M. E.; PELZER, H.; SULZEN, L.; WITT, M. E.; HSIEH, Y. C.; MITTAL, B. B.; WEICHSELBAUM, R.R. Concomitant chemoradiotherapy as primary therapy for locoregionally advanced head and neck cancer. **J. Clin. Oncol.**,v.18, p.1652-1661, 2000.

WARD, A.; CLISSOLD, S.P. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. **Drugs**, v.34, p.50-97, 1987.

WARDLEY, A. M.; BOOTH, D.; ROBERTS, S.A.; SCARFFE, J.H.; POTTEN, C.S. A quantitative histometric murine in vivo model of radiation-induced oral mucositis. **Arch. Oral Biol.**, v.43, p.567-577, 1998.

WOLFGANG DORR, D. V. M.; STEFAN BÄSSLER, M. D.; SANDRA REICHEL, M. D. S.; KATHRIN SPEKL, D. V. M. Reduction of radiochemotherapy-induced early oral mucositis by recombinant human keratinocyte growth factor (palifermin): experimental studies in mice. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v.62, n. 3, p.881-887, 2005.

WITHERS, H. R.; MCBRIDE, W. H. Biologic basis of radiation therapy. In: PEREZ, C.A.; BRADY, L. W. **Principles and practice of radiation oncology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997, cap.2, p.79-118.

XU, F. X.; VAN DER SCHUEREN, E.; ANG, K.K. Acute reactions of the lip mucosa of mice to fractionated irradiations. **Radiother. Oncol.**, v.1, p.369-374, 1984.

YANG, K.D.; CHUEN, H. L.; SHAIQ, M. F. Pentoxifylline augments but does not antagonize TNF alpha-mediated neuroblastoma cell differentiation: modulation of calcium mobilization but not cAMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.211, p.1006-1014, 1995.

ZABEL, P.; SCHADE, F. U.; SCHLAAK, M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. **Immunobiology**, v.187, p.447-463, 1993.

