

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

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) E ÓXIDO  
NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM - EFEITO  
PROTETOR DA PENTOXIFILINA, INIBIDOR DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUZIDA E DE FITOTERÁPICOS**

**FORTALEZA**  
**2012**

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

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) E ÓXIDO  
NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM - EFEITO  
PROTETOR DA PENTOXIFILINA, INIBIDOR DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUZIDA E DE FITOTERÁPICOS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará-UFC, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

**Orientador:** Prof.Dr.Ronaldo de A. Ribeiro  
**Co-Orientadora:** Profa.Dra. Vilma de Lima

**FORTALEZA**  
**2012**

**JOSÉ FERNANDO BASTOS DE MOURA**

**ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) E ÓXIDO  
NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE ORAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR RADIOTERAPIA DE MEGAVOLTAGEM - EFEITO  
PROTETOR DA PENTOXIFILINA, INIBIDOR DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUZIDA E DE FITOTERÁPICOS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará-UFC, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

**BANCA EXAMINADORA DE TESE DE DOUTORADO**

---

**Prof.Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Profa. Doutora Vilma de Lima**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Doutor Herbert Arlindo Terebien**  
**Universidade Federal do Paraná**

---

**Prof. Doutor Renato José Affonso Junior**  
**Hospital do Câncer de Barretos**

---

**Profa. Doutora Ana Paula Negreiros Nunes Alves**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

**“É belo dar quando solicitado; é mais belo, porém,  
dar sem ser solicitado, por haver compreendido.”**

**Khalil Gibran**

## **À DEUS**

Pela dádiva da vida e luz que ilumina meus caminhos,  
e por orientar-me em todos os momentos dessa  
jornada, a quem devo todas as oportunidades, graças e  
fé em acreditar nas realizações dos meus sonhos.

Aos meus pais, irmãos e irmãs, pela compreensão das ausências, porém sempre presentes nos principais momentos da minha vida, formação pessoal, assim como a dedicação de fazerem sempre o melhor e estarem sempre ao meu lado.

À minha esposa Raquel Bastos e meus lindos filhos  
Izabel, Alice, Maria Júlia e Arthur Jota,  
companheiros, amigos e razões do meu viver, da  
minha esperança e da minha alegria.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela confiança e pelos ensinamentos, incentivo, caráter e seu compromisso na orientação científica e inquestionável dedicação à conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Vilma de Lima pelo seu incentivo, competência e dedicação com que desenvolve suas atividades e pela importante orientação deste trabalho.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Cirurgia Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, uma referência de dedicação à assistência, ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, por sua inquestionável e incondicional dedicação para conclusão deste trabalho e em tudo o que faz.

À nossa bibliotecária Cynthia Brasil pela revisão das referências bibliográficas, amizade, inquestionável incentivo e dedicação para conclusão desta tese

Ao Hospital Haroldo Juaçaba - Instituto do Câncer do Ceará e, em especial, ao Departamento de Radioterapia e todos os colegas e amigos de trabalho, por terem participado da realização deste estudo.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pelo seu incentivo à pesquisa e disponibilidade para ajudar sempre.

À Dra. Lúcia Alcântara, pela amizade e seu inquestionável incentivo para o término deste trabalho.

A todos os amigos e amigas do Laboratório LAFICA, especialmente Antoniella Sousa Gomes, Roberto César Pereira Lima Júnior, Deysi Viviana, Caroline Addison, Rosemayre Sousa Freire pelo incentivo e incondicional dedicação ao término deste trabalho e por me fazerem sentir tão a vontade e confiante no laboratório.

Ao amigo e companheiro de trabalho Dr. Jocilber Lima e Silva pela convivência e contribuir de forma imensurável nas últimas etapas deste trabalho.

Aos estudantes de Iniciação Científica Raul e Rafael pelo apoio inestimável durante toda a fase do experimento permitindo a realização deste trabalho.

A Doutoranda em Farmacologia Iracema Matos Melo pelo apoio e correção de todos os dados referentes aos resultados da tese.

Aos meus colegas de trabalho e residentes da radioterapia, em especial Dra. Sara Leal e Conceição Machado pelo apoio incondicional durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Maria Silvandira Pinnheiro e Ivan Rodrigues de Sousa pela dedicação e carinho manifestados em tudo que fazem.

Às minhas amigas, funcionárias do HAJ-ICC, Luciana Silva da Costa, Camila Marques e Jucileide Rodrigues de Andrade pelo companheirismo e inestimável colaboração na execução deste trabalho.

À senhora Elsie Sturdart Gurgel de Oliveira pelo apoio na revisão e correção deste trabalho.

Às secretárias do programa de pós-graduação em Cirurgia, Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, pela importante colaboração e relevante ajuda durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

A todas as pessoas e profissionais que direto e indiretamente contribuíram de alguma forma nesta minha jornada.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A mucosite oral (MO) radioinduzida é o principal efeito colateral agudo e o mais impactante fator dose limitante da radioterapia (RXT) de pacientes em tratamento para tumores de cabeça e pescoço. À despeito da importante incidência, sua patogênese ainda não está completamente esclarecida. **OBJETIVOS:** Avaliar o envolvimento de citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da MO experimental induzida por RXT, assim como estudar possíveis agentes protetores. **MÉTODOS:** A MO foi induzida por RXT de megavoltagem em hamsters. Os animais foram tratados com inibidor de citocinas (pentoxifilina-15mg/kg), inibidor da óxido nítrico sintase induzida (NOSi), aminoguanidina (AG), nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg), ou salina (0,5ml/kg), uma hora antes da RXT e diariamente, até o sacrifício, no 13<sup>o</sup> dia. Em outro grupo experimental, os animais foram tratados com dois fitoterápicos: Myracrodruon urundeuva (Aroeira-do-sertão) na forma de gel nas concentrações de 5, 10 e 20% e Aloe barbadensis Miller (Aloe vera) na forma de gel nas concentrações de 25, 50 e 100%, ou receberam gel inerte através de aplicação tópica, uma hora antes da RXT, e duas vezes ao dia, até o sacrifício, no 13<sup>o</sup> dia. Para avaliação de resultados foram utilizados os seguintes parâmetros: análises macro e microscópicas das mucosas jugais, atividade de mieloperoxidase e de NOSi, dosagens teciduais de nitrito e de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10), imunohistoquímica para citocinas e NOSi, assim como, expressão de NOSi por western blot. **RESULTADOS:** Os animais com MO induzida por RXT apresentaram aumento significativo dos seguintes parâmetros inflamatórios: histopatológico, atividade de mieloperoxidase, dosagem de citocinas e de nitrito e intensa imunexpressão de NOSi quando comparado com grupos controles. AG reduziu de forma significativa e dose-dependente os parâmetros macro e microscópicos nos animais com MO, bem como a infiltração de neutrófilos e a dosagem de nitrito e de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1). Reduziu também a atividade da NOSi e imunomarcagem para citocinas e NOSi. O tratamento com PTX atenuou significativamente os parâmetros inflamatórios (histopatológico, atividade de MPO, níveis teciduais de citocinas), e a imunexpressão de NOSi e de citocinas. A Aroeira, à despeito de ter inibido a produção de nitrito e de TNF- $\alpha$  tecidual, não foi capaz de atenuar os parâmetros macro e microscópicos da MO. Por outro lado, o Aloe vera, na concentração de 100% inibiu de forma significativa os parâmetros inflamatórios (histopatológico, atividade de MPO, níveis teciduais das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 e dosagem de nitrito). **CONCLUSÕES:** Os dados permitiram concluir que: TNF- $\alpha$  e IL-1 via ativação de NOSi e consequente produção de NO parecem desempenhar um papel importante na patogênese da MO experimental induzida por RXT de megavoltagem. PTX, AG e Aloe vera (na concentração de 100%) foram capazes de inibir de forma significativa a MO induzida por RXT.

**Palavras-chave:** Mucosite oral experimental, Radioterapia, Pentoxifilina, Aminoguanidina, Fitoterápicos, Inflamação.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The radiation-induced oral mucositis (OM) is the most important acute toxicity and the most impacting dose-limiting factor in head and neck cancer patients. Despite its major incidence, the pathogenesis is not well known. **OBJECTIVES:** Evaluate the role of the cytokines and the nitric oxide (NO) in the pathogenesis of the experimental radiation-induced oral mucositis (OM) as well as indicate possible protector agents. **METHODS:** The OM was induced with only one fraction of megavoltage radiation (RT) in hamsters. The animals were treated with: cytokines inhibitors (PTX 15 mg/Kg), nitric oxide synthase inhibitor (NOSi), aminoguanidine (AG 10, 30 and 90 mg/Kg) or saline solution (0.5 ml) just one hour before RT and daily until the animals' sacrifice (13<sup>th</sup> day). Another group of animals were treated with two different phytotherapy using: Myracrodruon urundeuva (Aroeira-do-sertao) topical gel 5, 10 and 20% or Aloe barbadensis Miller (Aloe vera) topical gel 25, 50 and 100%. The control group received biologically inert topical gel. The animals were treated just one hour before RT and twice daily until their sacrifice (13<sup>th</sup> day). For the evaluation of the results, the following parameters were used: histopathology analysis of the oral mucosa (macro and microscopically), MPO and NOSi activity, nitrite and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-10) tissue levels, cytokines and NOSi immunohistochemistry as well as NOSi expression by Western blot. **RESULTS:** The animals with radiation-induced OM showed increased inflammatory parameters: on histopathology, myeloperoxidase activity, cytokines and nitrite levels and intense NOSi immune expression when compared to the control group. AG significantly reduced in a dose-dependent effect the macro and microscopically parameters in animals with OM as well as the neutrophil infiltration and nitrite and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1) levels. AG also reduced the NOSi activity and the cytokines and NOSi immune expression. The PTX treatment significantly reduced the inflammatory parameters (on histopathology, MPO activity, and cytokines tissue levels) and the cytokines and NOSi immune expression. The Aroeira, despite of inhibiting the nitrite and tissue TNF- $\alpha$  production, did not reduce the micro and macroscopically parameters of OM. On the other hand, the Aloe vera 100%, significantly inhibited the inflammatory parameters (on histopathology, MPO activity, tissue cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 and nitrite levels). **CONCLUSIONS:** The data suggested that TNF- $\alpha$  and IL-1 by NOSi activation and consequently NO production seem to play an important role in the pathogenesis of the experimental radiation-induced OM. PTX, AG and Aloe vera 100% were able to significantly reduce the OM.

**Key-words:** experimental oral mucositis, radiotherapy, pentoxiline, aminoguanidine, phytotherapy, inflammation

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A. Máquina de Teleterapia. B. Máquina de Braquiterapia. C. Diagrama simplificado do mecanismo de ação da radioterapia sobre o DNA das células .....	29
FIGURA 2 - Representação esquemática da evolução da mucosite oral .....	32
FIGURA 3 - Mucosite oral grau 3 induzida por radioterapia e/ou quimioterapia .....	33
FIGURA 4 - Fases de desenvolvimento da mucosite (A: fase de iniciação, resposta primária ao dano e amplificação do sinal; B: fase ulcerativa; C: fase de cicatrização) .....	38
FIGURA 5 - Mediadores envolvidos no processo inflamatório da mucosite oral .....	44
FIGURA 6 - Esquema ilustrativo da via L-arginina / NO .....	49
FIGURA 7 - Estrutura química da pentoxifilina .....	52
FIGURA 8 - Fotos ilustrativas da árvore de aloe vera e de sua folha .....	57
FIGURA 9 - Fotos ilustrativas da árvore da aroeira-do-sertão (A e B) e do seu caule.	61
FIGURA 10 - Animal anestesiado e preparado para ser submetido à radioterapia em aparelho de megavoltagem cobalto - 60 com uso de bolus .....	67
FIGURA 11 - Aspectos clínicos e modelos experimentais de mucosite oral induzida por A e B: radioterapia e C e D: quimioterapia .....	71
FIGURA 12 - Desenho esquemático da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica .....	72
FIGURA 13 - Desenho esquemático dos grupos experimentais e modulação farmacológica .....	75

FIGURA 14 - Graduação por escores de 0 a 3 quanto aos aspectos macroscópicos de mucosas jugais de hamsters com mucosite oral .....	77
FIGURA 15 - Graduação por escores de 0 a 3 quanto aos aspectos microscópicos de mucosas jugais de hamsters com mucosite oral .....	79
FIGURA 16 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos à radioterapia isolada (C e D) ou submetidos à irritação mecânica isolada (E F) ou submetidos a radioterapia associada a irritação mecânica (G e H) .....	87
FIGURA 17 - Dosagem da enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	88
FIGURA 18 – Dosagens dos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	90
FIGURA 19 – Dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	91
FIGURA 20 - Dosagem da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters submetido a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	92
FIGURA 21 - Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica e que receberam salina (C e D) ou pentoxifilina na dose de 15 mg/kg (E e F) .....	94
FIGURA 22 - Efeito da pentoxifilina na atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	95
FIGURA 23 - Efeito da pentoxifilina nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à MO induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	97

- FIGURA 24 - Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$ ) na mucosa jugal de hamsters: A - mucosa normal. B. mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ . C - mucosa com mucosite oral apresentando intensa marcação de TNF- $\alpha$  nas células do conjuntivo (setas). D- mucosa com mucosite oral tratado com PTX, mostrando redução acentuado da marcação de TNF- $\alpha$  na células mononucleares do tecido conjuntivo ..... 98
- FIGURA 25 - Fotomicrografias da marcação de citocinas (IL-1 $\beta$ ) na mucosa jugal de hamsters: A - mucosa normal. B. mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-IL-1 $\beta$ . C - mucosa com mucosite oral apresentando intensa marcação de IL-1 $\beta$  nas células do conjuntivo (setas). D- mucosa com mucosite oral tratado com PTX, mostrando redução acentuado da marcação de IL-1 $\beta$  na células mononucleares do tecido conjuntivo ..... 99
- FIGURA 26 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) na mucosa jugal de hamsters. A – mucosa normal. B - controle negativo que representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi. C - mucosa com mucosite ou submetido à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica sem tratamento. D - mucosa com mucosite oral tratada com PTX..... 101
- FIGURA 27 – Efeito da pentoxifilina na expressão de óxido nítrico sintase induzida nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM)..... 102
- FIGURA 28 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters normal (A e B); submetidos à radioterapia e irritação mecânica (C e D); tratados com aminoguanidina nas doses de 30 mg/kg (E e F), 90 mg/kg (G e H) ..... 105
- FIGURA 29 - Efeito dos inibidores da NOS, aminoguanidina na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM)..... 106

- FIGURA 30 - Efeito da aminoguanidina sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia (RXT + IM) ..... 107
- FIGURA 31 - Efeito da aminoguanidina na atividade da óxido nítrico sintase (NOSi) nas mucosas jugais dos hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) ..... 108
- FIGURA 32 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters. A - mucosa normal. B - mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ . C - mucosa com mucosite oral tratado com salina. D - mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina ..... 110
- FIGURA 33 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters. A - mucosa normal. B - mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-IL-1. C - mucosa com mucosite oral tratado com salina. D - mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina..... 111
- FIGURA 34 – Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters: A: mucosa normal; B: mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência do anticorpo primário anti-NOSi. C: mucosa com mucosite oral tratado com salina. D: mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina..... 112
- FIGURA 35 - Efeito do inibidor da NOS, aminoguanidina nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM)..... 114
- FIGURA 36 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (A e B) e animais submetidos a tratamento com radioterapia e irritação mecânica seguido por: gel base (C e D); gel de aroeira a 5% (E e F) ..... 116
- FIGURA 37 - Efeito da aroeira na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) ..... 117

FIGURA 38 - Efeito da aroeira sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	118
FIGURA 39 - Efeito da aroeira na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	119
FIGURA 40 - Efeito da aroeira nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	121
FIGURA 41 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (A e B) e animais submetidos a tratamento com radioterapia e irritação mecânica seguido por: gel base (C e D); gel de babosa a 50% (E e F) .....	123
FIGURA 42 - Efeito da Aloe vera na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	124
FIGURA 43 - Efeito da Aloe vera sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	125
FIGURA 44 - Efeito do Aloe vera na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	126
FIGURA 45 - Efeito do aloe vera nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) .....	128
FIGURA 46 – Modelo hipotético proposto da patogênese da mucosite oral experimental induzida pela radioterapia.....	138

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 - Escores associados à mucosite oral .....	40
TABELA 1 - Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters .....	86
TABELA 2 - Análise macroscópica e microscópica de mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica e tratados com pentoxifilina.....	93
TABELA 3 - Efeito da aminoguanidina (AG) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (avaliação por escores) .....	104
TABELA 4 - Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia .....	115
TABELA 5 - Efeito do extrato de Aloe vera sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>Anova</b>	Análise de variância
<b>cGy</b>	Centi-Gray
<b>COX2</b>	Cicloxigenase 2
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimento Animal
<b>CEPA</b>	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>EDRF</b>	Fator de relaxamento dependente do endotélio
<b>Epm</b>	Erro padrão da média
<b>Gy</b>	Gray
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IFN-</b>	Interferon
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IM</b>	Irritação mecânica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>IARC</b>	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
<b>IGRT</b>	Radioterapia guiada por imagem
<b>IMRT</b>	Rdioterapia de feixes modulados
<b>Ip</b>	Via intra-peritoneal
<b>kV</b>	Kilovoltagem

<b>kVp</b>	Kilovoltagem de pico
<b>LAFICA</b>	Laboratorio de Farmac. da Inflamação e do Câncer
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>LTB</b>	Leucotrienos
<b>M</b>	Molar
<b>MCP</b>	Mercaptopurinas
<b>MeV</b>	Mega-Eletrons-Volts
<b>mmAl</b>	Milímetros de Alumínio
<b>mmCu</b>	Milímetros de Cobre
<b>mmHg</b>	Milímetros de Mercúrio
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MV</b>	Mega-Volts
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>NCI</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDE</b>	Fosfodiesterase
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PGE</b>	Prostaglandinas
<b>PTX</b>	Pentoxifilina
<b>AG</b>	Aminoguanidina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOSi</b>	Óxido nítrico sintase induzida

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RTOG</b>	Grupo Oncológico de Radioterapia
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RXT</b>	Radioterapia
<b>sc</b>	Via subcutânea
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>TLE</b>	Transferência Linear de Energia
<b>TMO</b>	Transplante de Medula Óssea
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TGFB</b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>5-FU</b>	5- fluorouracil
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\gamma</math></b>	Gama
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>mol</b>	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
1.1. Câncer .....	24
1.2. Radioterapia como modalidade terapêutica .....	26
1.3. Mucosite oral.....	31
1.4. Classificação e manejo da mucosite oral .....	39
1.5. Mediadores envolvidos na mucosite oral.....	42
1.5.1 Citocinas.....	45
1.5.2 Óxido nítrico.....	48
1.6. Abordagens farmacológicas .....	51
1.6.1 Pentoxifilina (PTX) .....	51
1.6.2 Inibidor enzimático (aminoguanidina) .....	54
1.6.3 Fitoterápicos .....	55
1.6.3.1 Aloe Vera (Babosa) .....	56
1.6.3.2 Aroeira - do - Sertão - Myracrodruon urundeava .....	59
<b>2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1. Animais .....	65
3.2. Radioterapia .....	63
3.3. Aparelhos e instrumentos utilizados .....	68
3.4. Fármacos, anticorpos, soluções, líquidos e corantes.....	68
3.5. Protocolos experimentais .....	70
3.5.1. Modelo de mucosite oral experimental induzida por rxt em hamsters.....	70
3.5.2 Grupos experimentais e modulação farmacológica.....	73
3.5.2.1. Grupos controles .....	73
3.5.2.2. Grupos tratados .....	73
3.5.3. Parâmetros avaliados.....	76
3.5.3.1. Análise macroscópica das mucosas jugais.....	76

3.5.3.2. Análise microscópica das mucosas jugais .....	78
3.5.4. Dosagem da mieloperoxidase - MPO.....	80
3.5.5. Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL -1 $\beta$ e NOSi.....	80
3.5.6. Dosagem de nitrito - determinação da produção de óxido.....	81
3.5.7. Determinação da atividade de óxido nítrico sintase induzida (NOSi) .....	82
3.5.8. Dosagens de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) por ensaio imunoenzimático (ELISA) na mucosa jugal oral.....	83
3.5.9. Avaliação da expressão de NOSi por Western Blotting.....	83
3.5.10. Análise estatística .....	84
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
4.1. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters .....	85
4.2. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre os aspectos microscópicos das mucosas jugais dos hamsters .....	85
4.3. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a atividade da mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters .....	88
4.4. Dosagem de citocinas no tecido da mucosa jugal de hamsters submetidos a radioterapia e irritação mecânica.....	89
4.5. Efeito da radioterapia e irritação mecânica sobre a dosagem de nitrito das mucosas jugais de hamsters.....	91
4.6. Efeito da radioterapia e irritação sobre a atividade do óxido nítrico sintase na mucosa jugal de hamsters.....	92
4.7. Efeito do tratamento farmacológico.....	93
4.7.1. Tratamento com inibidor de citocinas - pentoxifilina .....	93
4.7.1.1. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.....	93
4.7.1.2. Efeito da pentoxifilina sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia .....	95
4.7.1.3. Efeito da Pentoxifilina nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica por ensaio de imunoabsorbância - Elisa	96
4.7.1.4. Efeito da pentoxifilina na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1) por imunohistoquímica na mucosa jugal de animais com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.....	98

4.7.1.5. Efeito da pentoxifilina na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida na mucosa jugal de animais com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	100
4.7.1.6. Western blot para óxido nítrico sintase induzida na mucosa jugal de hamsters submetido à mucosite oral experimental induzida por radioterapia .....	102
4.8. Tratamento com inibidor da enzima NOSi (aminoguanidina).....	103
4.8.1. Análise Macroscópica .....	103
4.8.2. Análise Microscópica .....	103
4.8.3. Efeito da aminoguanidina sobre a atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental .....	106
4.8.4. Efeito da aminoguanidina sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	107
4.8.5. Efeito da aminoguanidina sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	108
4.8.6. Efeito da aminoguanidina na marcação por imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ e IL-1 .....	109
4.8.7. Efeito da aminoguanidina na marcação imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) .....	111
4.8.8. Aminoguanidina reduz os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ e IL-1 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	113
4.9. Efeito dos fitoterápicos sobre a mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.....	114
4.9.1. Tratamento com M.Urundeuva (extrato de aroeira) .....	114
4.9.1.1. Efeito do extrato de aroeira sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	114
4.9.1.2. Efeito da aroeira sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral induzida por radioterapia Câncer.....	117
4.9.1.3. Efeito da aroeira sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	118
4.9.1.4. Efeito da aroeira sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	119
4.9.1.5. Efeito da Aroeira sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	120
4.9.2. Tratamento com extrato de aloe vera.....	122

4.9.2.1. ....Efeito do Aloe vera sobre os aspectos macroscópicos e microscópicos observados na mucosite oral .....	122
4.9.2.2. Efeito do Aloe vera sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral induzida por radioterapia .....	124
4.9.2.3. Efeito da Aloe vera sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	125
4.9.2.4. Efeito da Aloe vera sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.....	126
4.9.2.5. Efeito do Aloe vera sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica .....	127

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>129</b>
---------------------------	------------

<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>139</b>
----------------------------	------------

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>140</b>
----------------------------	------------

## **ANEXOS**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. CÂNCER**

A oncologia é uma das áreas da medicina, com maior evolução, nas últimas décadas, constituindo-se a cura do câncer um dos mais significativos desafios para a comunidade científica.

O câncer é consequência de alterações moleculares que resultam da quebra da integridade funcional do ciclo celular. Essas alterações moleculares conferem à célula, habilidades capazes de determinar modificações em seu comportamento. Tais habilidades adquiridas resultam em alterações na fisiologia celular que, em última instância, são responsáveis pela biologia do câncer (BALMAIN; GRAY e PONDER, 2003; PARMIGIANI e CAMARGO, 2004).

Na verdade, o câncer é uma doença genética, e seu início e progressão envolvem passos nos quais o DNA acumula uma série de lesões, ou seja, são necessárias múltiplas alterações genéticas para dar origem ao câncer (SHIELDS e HARRIS 2000; BALMAIN; GRAY e PONDER, 2003; SILVA et al., 2005).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) e Organização Mundial de Saúde (OMS), o impacto global das neoplasias malignas mais que dobrou em 30 anos. Em 2008, a IARC/OMS estimou a ocorrência de 12,4 milhões de casos novos e 8.096.676 mortes, representando 13,8% do total de óbitos registrado no mundo. Esse número foi superado apenas pelas doenças cardiovasculares (30,4%) e infecciosas (14,3%) (INCA - 2010). Esse impacto tem gerado influência, principalmente nos países de médio e baixo desenvolvimento, como o Brasil. A OMS estimou, em 2008, que cerca da metade dos casos novos e dois terços dos óbitos por câncer ocorreu nesses países (INCA - 2010).

De acordo, com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2010, dois em cada 1000 brasileiros desenvolveram alguns dos 11 tipos de câncer mais comuns no país, perfazendo um total de 489.270 casos novos diagnosticados (INCA - 2010).

O câncer de cabeça e pescoço envolve vários sítios, sendo que cerca de 40% dos casos ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe, 15% na faringe, 7% nas glândulas salivares e 13% nos demais locais. Em 2010 foram estimados cerca de 49.260 casos novos

de câncer de cavidade oral, faringe e laringe no mundo, sendo que, nesse mesmo período, ocorreram, aproximadamente, 11.480 óbitos por tumores de cabeça e pescoço (INCA - 2010).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, também válidas para 2013, apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer. As neoplasias da cavidade oral apresentam estimativa de 9.990 casos novos em homens e 4.180 casos novos em mulheres, representando a quarta e a oitava localizações de maiores incidências, no Nordeste, em homens e mulheres, respectivamente (INCA - 2012).

Atualmente, as neoplasias malignas são responsáveis pela segunda causa de óbito da população brasileira, constituindo-se, portanto, em um importante problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil (ROCHA e KAGOHARA, 2006, INCA - 2012). Apenas na região Nordeste as neoplasias representam a terceira causa de morte, por doença e, nas demais regiões, seguem-se às doenças cardiovasculares (INCA - 2012).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações para o controle do câncer. A principal estratégia contra o câncer caminha no conhecimento de suas relações causais, características biológicas e clínicas, no sentido de estabelecer abordagens populacionais mais eficazes, tanto na prevenção como no diagnóstico precoce.

A abordagem terapêutica das neoplasias malignas tem evoluído bastante nos últimos anos, em decorrência dos avanços tecnológicos e das mudanças introduzidas pela medicina baseada em evidências. A radioterapia continua sendo uma das principais e mais eficazes modalidades de tratamento do câncer (CARDOSO et al., 2005; LIU e ROBINS, 2006).

As modalidades de tratamento do câncer incluem a utilização da radioterapia, quimioterapia e cirurgia, associadas a outras formas terapêuticas, no contexto interdisciplinar (SNELL; MANCINO e EDWARDS, 2006; PEREZ et al., 2009; BALLAS e SHAH, 2011). O emprego da radioterapia e cirurgia tem como objetivo, o controle local da doença, ao contrário da quimioterapia, cuja ação é sistêmica (MANTRAVADI et al., 1983; WALDRON e O'SULLIVAN, 2006; SNELL; MANCINO e EDWARDS, 2006).

No contexto de muitas doenças, o câncer deve ser combatido com métodos mais efetivos e com os menores efeitos colaterais possíveis, visando, principalmente, oferecer uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Com o avanço no conhecimento da fisiopatogênese do câncer, ocorrido nas últimas décadas, e o emprego de ferramentas importantes no diagnóstico e tratamento das neoplasias, novas modalidades terapêuticas estão sendo incorporadas ao arsenal terapêutico contra o câncer. Cada vez mais, o tratamento dessa doença está sendo realizado de forma direcionada e específica, certamente com base na melhor compreensão da biologia e da história natural das neoplasias malignas (LIU e ROBINS, 2006).

## **1.2. RADIOTERAPIA COMO MODALIDADE TERAPÊUTICA**

A radioterapia é uma modalidade efetiva de tratamento que utiliza radiações ionizantes, ou seja, é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixes de radiações ionizantes, representando, portanto, uma das principais opções de tratamento do câncer (NOVAES, 1998; MARTELLA et al., 2006; WALDRON e O'SULLIVAN, 2006; BALLAS e SHAH, 2011).

Os tipos de radiações ionizantes mais utilizados na clínica médica são as radiações eletromagnéticas, como o raio-x, raio gama e as radiações de partículas ou corpusculares, como os elétrons, as partículas beta, alfa, os nêutrons e prótons (PEREZ; BRADY e ROTI, 1997; BALLAS e SHAH, 2011).

A radioterapia pode ser dividida em duas modalidades: radioterapia externa ou teleterapia e a radioterapia interna ou braquiterapia (Figura 1). Quando as radiações ionizantes são depositadas nos tecidos, a partir de uma fonte produtora distante do paciente, é chamada de radioterapia externa; quando está em contato direto ou muito próximo do tumor, é chamada de braquiterapia (AISEN; CARVALHO e HADDAD, 1999; HADDAD; AISEN e CARVALHO, 1999; SALVAJOLI e SILVA, 2003; WALDRON e O'SULLIVAN, 2006).

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 (NOVAES, 1998; SALVAJOLI; SOUHAMI e FARIA, 1999).

Quando aplicada aos tecidos, a radiação interage de duas maneiras distintas: a primeira chamada direta, atingindo os componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos, provocando alterações estruturais e constituindo cerca de 30% do efeito biológico. Na ação direta, a molécula de DNA é clivada, o que interfere no processo de duplicação. A segunda chamada indireta, produzindo radicais livres a partir da água intracelular e respondendo por 70% dos danos, em virtude de a água ocupar parcela substancial da composição celular (LEHNERT, 1999; HALL, 2000; SEGRETO e SEGRETO, 2000; FANTONE e WARD, 2002) (Figura1).

Desde a descoberta dos raios-X e da radioatividade natural, o emprego das radiações como modalidade de tratamento passou por profundas modificações. 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 (megavoltagem). Posteriormente, ocorreram notáveis avanços no conhecimento da radiobiologia, produziram-se novos isótopos radioativos e incorporaram-se os conhecimentos e recursos da informática e da robótica aos tratamentos, evitando a exposição desnecessária à radiação dos tecidos normais consequente diminuição dos efeitos colaterais (PEREZ, 1999; BALLAS e SHAH, 2011; ALMEIDA; HADDAD e FERRIGNO, 2011).

O desenvolvimento tecnológico tem possibilitado que técnicas mais precisas e sofisticadas de administração da radiação ionizante sejam progressivamente incorporadas à prática clínica, melhorando resultados terapêuticos e proporcionando segurança, humanização e qualidade à assistência, assim como diminuição da intensidade dos efeitos colaterais (ALMEIDA; HADDAD e FERRIGNO, 2011).

Dentre as diferentes formas de tratar o câncer, a radioterapia constitui uma modalidade terapêutica local e/ou regional, sendo indicada, de forma exclusiva, ou associada, à cirurgia e/ou quimioterapia. Nesse sentido, ela pode ser utilizada pré-, per- ou pós-operatória, assim como antes, durante ou após a quimioterapia (ROTMAN; AZIZ e WASSERMAN; 1997; BRIZEL, 2004; LEE e PHILLIPS, 2004).

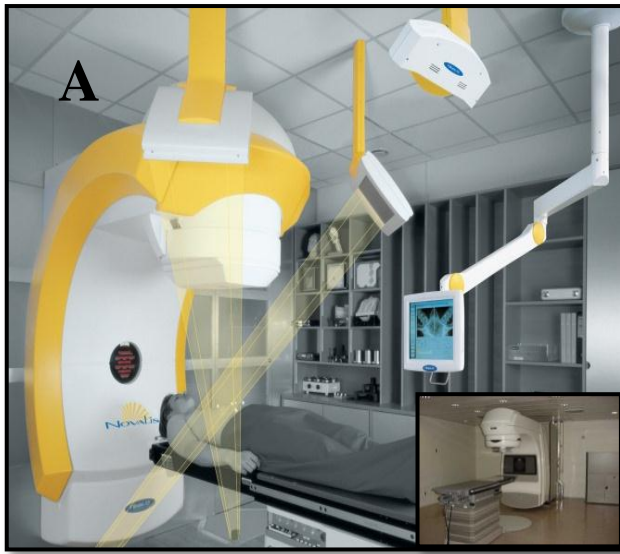
De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), dois terços dos pacientes com câncer utilizam radioterapia em alguma fase do tratamento da doença, seja de maneira isolada ou associada a outras formas de terapia oncológica (INCA -2010).

Segundo relatos de Bhadrasain e Codon (2005), cerca de 50 a 60% dos pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna vão necessitar de radioterapia em alguma fase do seu tratamento.

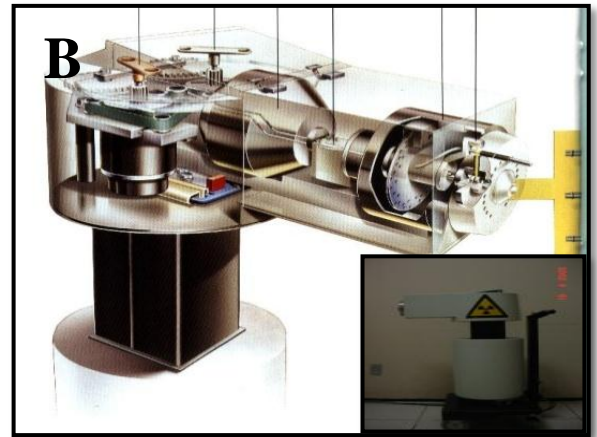
A radioterapia pode ser realizada em esquemas de curta duração até protocolos extremamente protraídos, durante várias semanas (THAMES et al., 1987; HORIOT et al., 1992; SEGRETO e SEGRETO, 2011). A justificativa das aplicações, em pequenas frações diárias, tem sua fundamentação nos 5Rs da radiobiologia: reoxigenação, redistribuição, recrutamento, repopulação e regeneração (LEHNERT, 1999; SEGRETO e SEGRETO, 2011). A maioria dos pacientes submetidos à radioterapia recebe uma dose total de 50 - 70 Gy como dose curativa. Essas doses são fracionadas em um período de 5-7 semanas, uma vez ao dia, 5 dias por semana, com dose diária de 1.8 a 2 Gy. Como terapêutica, as doses mais comumente utilizadas são 45 - 50 Gy neoadjuvante ou adjuvante, e 60 a 70 Gy nos tratamentos exclusivos (TSUJLI, 1985; LEE e PHILLIPS, 2004).

A radioterapia é uma modalidade de tratamento amplamente empregada no tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, sendo, hoje, um recurso bem estabelecido para a terapêutica desses tumores (NOVAES 1998, SALVAJOLI e SILVA, 2003; EMIDIO; MAEDA e CALDO-TEIXEIRA, 2010). Essa modalidade pode ser utilizada na forma exclusiva, adjuvante à cirurgia, ou paliativa em tumores localmente avançados ou metastáticos.

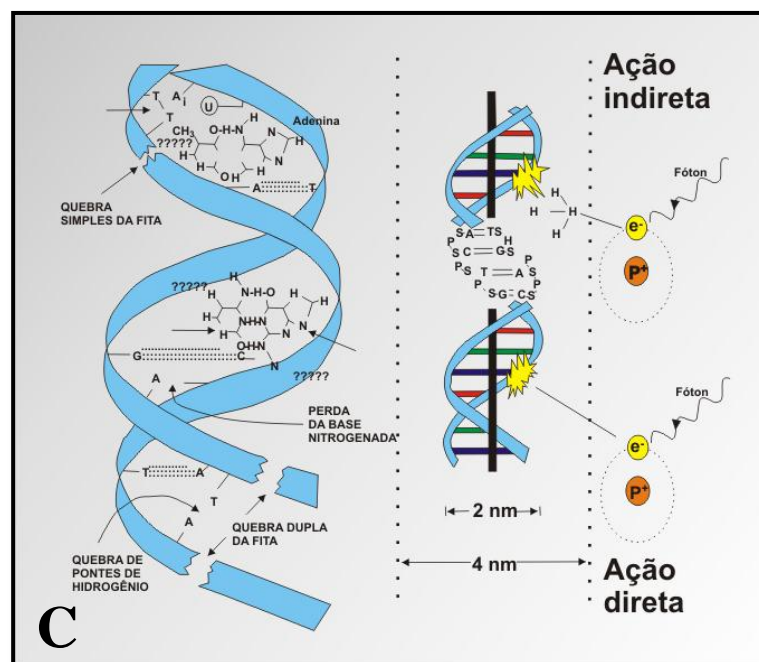
Com os avanços da informática e dos exames de imagem, o tratamento, tanto com a teleterapia, quanto com a braquiterapia, ganhou mais precisão e segurança. Atualmente, com os dados obtidos por tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, pode-se identificar o tumor com mais precisão e tratá-lo com exatidão. Tem-se como evidência o surgimento de técnicas avançadas, como a radioterapia conformada (RT 3D), a radioterapia com modulação do feixe (IMRT) e a radioterapia guiada por imagem (IGRT) (HAZUKA et al., 1993; LEE et al., 2002; ARRUDA et al., 2006; ALMEIDA; HADDAD e FERRIGNO, 2011; SHER et al., 2011).



TELETERAPIA



BRAQUITERAPIA



**FIGURA 1 - A. Máquina de Teleterapia. B. Máquina de Braquiterapia. C. Diagrama simplificado do mecanismo de ação da radioterapia sobre o DNA das células. Ação direta e Ação indireta sobre o DNA (H: Ion de hidrogênio – radical livre) (Modificado de MARTELLA et al., 2006; Varian, 2008).**

Apesar de todos os avanços tecnológicos na radioterapia e um conhecimento substancial da ação da radiação sobre os tecidos, os efeitos colaterais permanecem ainda como um grande desafio para os profissionais envolvidos no manejo dos pacientes irradiados (WILLERS e HELD, 2006).

Os efeitos colaterais da radioterapia são decorrentes de alterações na estrutura e no funcionamento dos tecidos ou órgãos, e podem ser classificados em agudos, subagudos ou tardios. Existem vários fatores que estão relacionados com a maior ou menor incidência desses efeitos colaterais, como dose diária (fracionamento diário) e total de irradiação (quanto maior a dose diária ou total, maior a incidência de complicações); campos de irradiação (quanto maior o campo, maior o risco de complicações); idade do paciente (crianças e idosos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de efeitos colaterais); tratamento combinado, ou seja, utilização de quimioterapia concomitante ou seqüencial à radioterapia, assim como as condições clínicas do paciente (PARSONS et al., 1984; ARCHIBALD et al., 1986; COSSET, 1999; STOKMAN et al., 2003; ALBUQUERQUE e CAMARG, 2007; KUMAR; SEQUEIRA e SHENOY, 2008; ANTUNES, 2011).

As reações agudas ocorrem durante o curso do tratamento e, em geral, são reversíveis, apresentando alívio com o uso de medicação sintomática e, em casos extremos, com a suspensão do tratamento. Essas reações acometem geralmente tecidos que têm alta taxa de renovação celular, como as mucosas oral e do trato gastrointestinal.

Complicações como mucosite (TROTTI et al., 2003; SONIS, 2009; SONIS, 2011); xerostomia (DIB e CURI, 1999; HENSON et al., 2001), alteração do paladar (VISSINK et al., 2003; CACCELLI e RAPOPORT, 2008); trismo (O'SULLIVAN, 2003; DIJKSTRA; KALK e ROODENBURG, 2004; TEGUH et al., 2008), cáries e doença periodontal (KARMIOL e WALSH, 1975; EPSTEIN et al., 1998; DIB et al., 2000); assim como osteorradionecrose (JERECCZEK, 2002; MENDENHALL, 2004), continuam sendo efeitos adversos importantes nos pacientes submetidos à radioterapia, associada ou não à quimioterapia, e acarretam impacto importante na qualidade de vida desses pacientes.

Levando em consideração todos esses aspectos, o tratamento ideal é aquele que maximiza a cura e minimiza os efeitos colaterais.

### 1.3. MUCOSITE ORAL

Dentre as reações adversas observadas na cavidade oral, a mucosite é uma das toxicidades mais freqüentes e limitantes em pacientes tratados com radioterapia, tanto com o uso de aceleradores lineares como de cobaltos (PLEOVÁ, 1999; PINTO e LEITE, 1999; SONIS, 2005; ROCHA e KAGOHARA, 2006; YEOH et al., 2006; FERREIRA; DIENSTMANN e RODRIGUES,2006; SONIS, 2011; KEE e FOOTE, 2011).O termo mucosite oral surgiu em 1980, para descrever uma lesão que ocorre na superfície da mucosa oral, causada pela quimioterapia e/ou radioterapia, representando uma entidade distinta das lesões orais denominadas, genericamente, de estomatite (GONDIM; GOMES e FIRMINO, 2010).

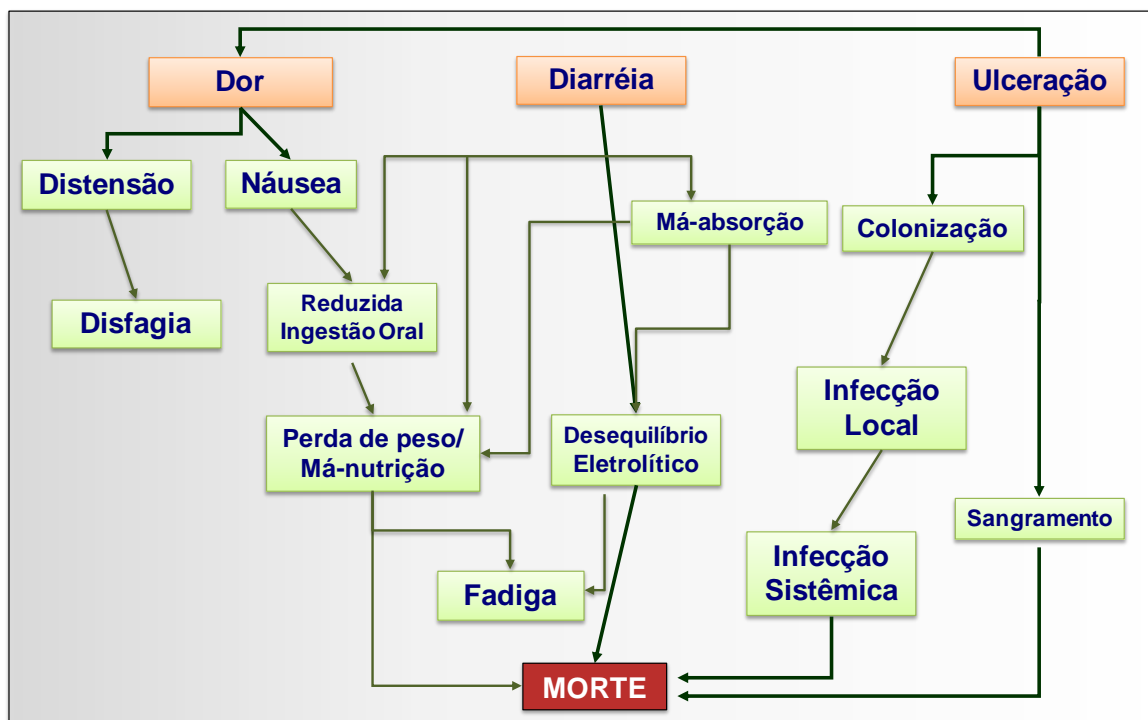
A mucosite oral consiste na resposta inflamatória da mucosa à ação de fármacos ou radioterapia, sendo definida como uma inflamação ou irritação da mucosa que, clinicamente, se manifesta por eritema, descamação, ulceração, com ou sem exsudatos (SONIS e FEY, 2002b; LALLA; SONIS e PETERSON, 2008; LOGAN et al., 2007).

Caracteriza-se a mucosite oral, como um efeito colateral agudo, de maior freqüência, e um importante fator dose-limitante para a radioterapia da região de cabeça e pescoço, sendo ainda inevitável, além de grave e persistente (ARCHIBALD et al. 1986; BERGER e KILROY, 1997; LOGAN et al., 2007).

O quadro álgico normalmente ocasionado pela mucosite leva o paciente a limitar a comunicação, suas atividades e ingesta alimentar, podendo resultar em estado de desnutrição, desidratação, anorexia e predisposição a infecções oportunistas ou até o óbito(SCULLY; EPSTEIN e SONIS, 2003;SCULLY; EPSTEIN e SONIS, 2004)(Figura 2).

O mecanismo pelo qual ocorre a mucosite baseia-se no fato de que a mucosa oral apresenta um alto *turnover* celular, ou seja, uma alta atividade mitótica. A radioterapia age primariamente nas células de alta atividade mitótica, de forma que a mucosa é intensamente afetada, perdendo a capacidade de superar o processo normal de esfoliação. Tais fatos, associados à inflamação e ao edema decorrente da ação da radioterapia, determinam o aparecimento de um quadro evolutivo caracterizado por esbranquiçamento da mucosa, eritema, pseudomembranas, úlceras e abscesso, caracterizando a mucosite nos

seus diversos estágios (Figura 3) (DIB e CURI, 1999; SONIS et al., 2004a; SONIS, 2004b).

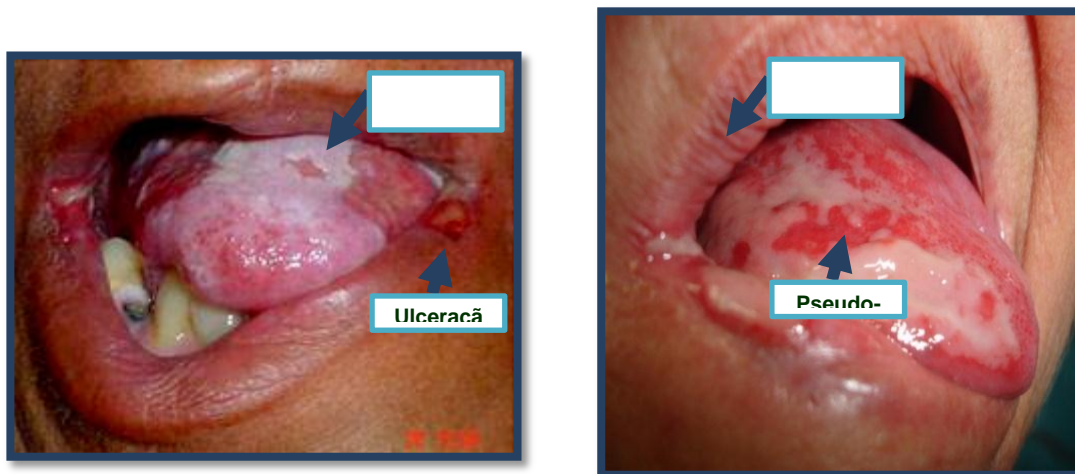


**FIGURA 2 - Representação esquemática da evolução da mucosite oral** (Adaptado de Keefe, MD et al. Cancer 109(5), 830: 2007).

Na maioria das vezes, quanto mais acentuada a mucosite, há a necessidade de interrupção da radioterapia, podendo comprometer tanto a qualidade de vida dos pacientes, elevar o custo do tratamento, bem como influenciar, negativamente, no controle local e sobrevida dos pacientes tratados (SONIS 1997; SONIS 1998a; BRADY e ROTI, 1997; HENKE et al., 2011). Esse tipo de mucosite torna-se mais freqüente e intenso, quando a quimioterapia está associada à radioterapia. A mielossupressão associada às drogas e a própria doença oncológica contribuem para o aparecimento da mucosite, tornando o epitélio mais suscetível à ulceração, infecção, necrose e sangramento (RUBENSTEIN et al., 2004; BRIZEL, 2008).

A ocorrência de mucosite oral, durante o curso do tratamento antineoplásico, pode ser decorrente de diversos fatores; sua intensidade e duração variam, individualmente,

iniciando-se por volta da segunda semana de radioterapia, ou após doses superiores a 20 Gy. Doses de radiação em torno de 50 a 70 Gy são consideradas de alto risco para o desenvolvimento de mucosite oral importante (STOKMAN et al., 2003; SONIS, ELTING e KEEFE, 2004c; KUMAR; SEQUEIRA e SHENOY, 2008; SONIS, 2011).



**FIGURA 3 - Mucosite oral grau 3 induzida por radioterapia e/ou quimioterapia (Hospital Haroldo Juaçaba – 2010).**

De acordo com Trotti et al. (2003) cerca de 97% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia convencional (uma dose/dia), 100% dos pacientes submetidos à radioterapia com fracionamento alterado (duas ou mais doses/dia - hiperfracionamento), e 89% dos pacientes recebendo quimioterapia de altas doses desenvolverão mucosite oral.

Estima-se que em torno de 60% dos pacientes submetidos à radioterapia, e mais de 90% dos pacientes recebendo modalidade experimental combinada (radioterapia e quimioterapia), desenvolverão mucosite oral grave (MERLANO et al., 1991; BROWMAN et al., 1994), enquanto, aproximadamente, 15% dos pacientes recebendo radioterapia, requerem hospitalização para controle da dor e suporte nutricional, como resultado da mucosite oral grave (PETER et al., 1992).

Segundo Trotti et al. (2003) e Kelner et al. (2007), cerca de 90% a 97% dos pacientes que recebem radioterapia, concomitante ou não à quimioterapia, experimentam a

ocorrência de mucosite oral. Desses, 34% a 43% apresentam características de mucosite grave (graus III e IV).

A complexidade da mucosite oral tem sido melhor reconhecida e entendida atualmente, através dos conhecimentos da biologia molecular e da epidemiologia dessa toxicidade. Historicamente, a mucosite oral sempre foi vista como um evento mediado pelo epitélio e causado por efeitos tóxicos na divisão celular desse tecido. Atualmente, entende-se que a mucosite oral não é um processo tão simples como sempre se acreditou e muito menos está limitado ao epitélio. Sonis e colaboradores referem que, ao microscópico eletrônico, foram observadas evidências morfológicas como danos no endotélio e no tecido conjuntivo, antes de serem observados danos epiteliais na mucosa oral irradiada, sugerindo que a agressão aos tecidos mais profundos ocorre, precocemente, no desenvolvimento da mucosite oral (SONIS et al., 2004b; SONIS, ELTING e KEEFE, 2004c).

Segundo Sonis et al. (2004), a mucosite induzida por radioterapia ou quimioterapia é resultado de uma seqüência de eventos biológicos interligados, caracterizados em cinco etapas: iniciação, geração de mensageiros intracelulares (resposta primária ao dano), sinalização e amplificação, ulceração com inflamação e, finalmente, cicatrização.

A figura 4 resume os mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da mucosite oral. A manifestação de todos os estágios não ocorre, obrigatoriamente, em 100% dos pacientes. Há sim, uma mucosite branda, com poucos danos à mucosa. Rápida recuperação e proliferação epitelial evitam a ocorrência da fase ulcerativa, que é a mais sintomática (SONIS et al., 1998a, SONIS e FEY, 2002b).

A fase de iniciação ocorre logo após a exposição à radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais basais ocorre, simultaneamente, com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS, 2004a). Verifica-se, adicionalmente, dano ao DNA que leva à morte celular do epitélio basal e de células da submucosa.

Através da ativação de várias vias de sinalização, é deflagrado um processo biológico que resulta na lesão da mucosa. A resposta primária ao dano, observada nas células e tecidos da submucosa, é caracterizada pelo aumento na expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (SCULLY; SONIS e DIZ, 2006).

O NF- $\kappa$ B regula a expressão de, aproximadamente, 200 genes, muitos dos quais possuem papel na patogênese da mucosite (SONIS, 2002a). Por exemplo, o NF- $\kappa$ B regula importantes citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que são de grande relevância para o desenvolvimento da lesão e cujo aumento se correlaciona com a toxicidade da radioterapia e quimioterapia.

A participação do NF- $\kappa$ B, na patogênese da mucosite oral, foi corroborada por trabalhos da Universidade Federal do Ceará - Departamento de Farmacologia, os quais mostraram que a pentoxifilina e a talidomida, envolvidas na inibição da síntese de TNF- $\alpha$ , reduzem, significativamente, a lesão da mucosa oral induzida por 5-Fluorouracil, ou radioterapia em hamsters (LIMA et al., 2005; MOURA, 2006).

De forma inédita, também foi demonstrado, recentemente, que o óxido nítrico liberado, seqüencialmente, após ativação de TNF- $\alpha$ , é um mediador com ações deletérias na mucosa (LEITÃO et al., 2006). Através desse estudo, foi demonstrado, também, que a modulação negativa da óxido nítrico sintase induzida, enzima responsável pela ativação do óxido nítrico em condições inflamatórias, atenua, significativamente, as lesões teciduais, por reduzir o infiltrado de células inflamatórias, o edema, a hemorragia e as formações ulcerosas e de abscessos.

Em paralelo à ativação do NF- $\kappa$ B, enzimas como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalizam a síntese de ceramida, são ativadas, diretamente, pela radioterapia e/ou quimioterapia, ou, indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio e TNF- $\alpha$ .

A via da ceramida induz apoptose, tanto em células submucosas, como epiteliais (MADDENS et al., 2002). Adicionalmente, a destruição da fibronectina ocorre, ainda, nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e subseqüente lesão tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- $\alpha$ .

A fase de amplificação de sinal é decorrente de eventos observados nas duas primeiras. A liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimioterapia ou radioterapia, resulta, por conseguinte, em uma série de retroalimentações positivas, amplificando e prolongando a agressão ao tecido, através de seus efeitos sobre os fatores de transcrição e as vias da ceramida e caspases, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6.

A fase seguinte, denominada ulcerativa, é a mais sintomática, clinicamente, e, usualmente, ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. As ulcerações

geralmente são profundas, amplas e acompanhadas de dor. A lesão e morte das células basais epiteliais resultam em mudanças atróficas que culminam na real deterioração e quebra da integridade da barreira da mucosa.

Nessa fase, é comum a ocorrência de infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos. Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa, estimulando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas, cuja, associação à neutropenia, induzida pela quimioterapia ou radioterapia, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING et al., 1992; SONIS et al., 2004a).

A fase de cicatrização é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observa-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS et al., 2004a). Essa fase é caracterizada pelo restabelecimento do aspecto aparentemente normal da mucosa.

De todas as fases da mucosite, a fase de cicatrização é a menos compreendida. Especula-se que a enzima COX-2, por estar presente em fibroblastos e no endotélio vascular, possui papel sobre a reconstrução da arquitetura da submucosa, por favorecer a angiogênese, um evento observado durante a fase ulcerativa (SONIS et al., 2004d).

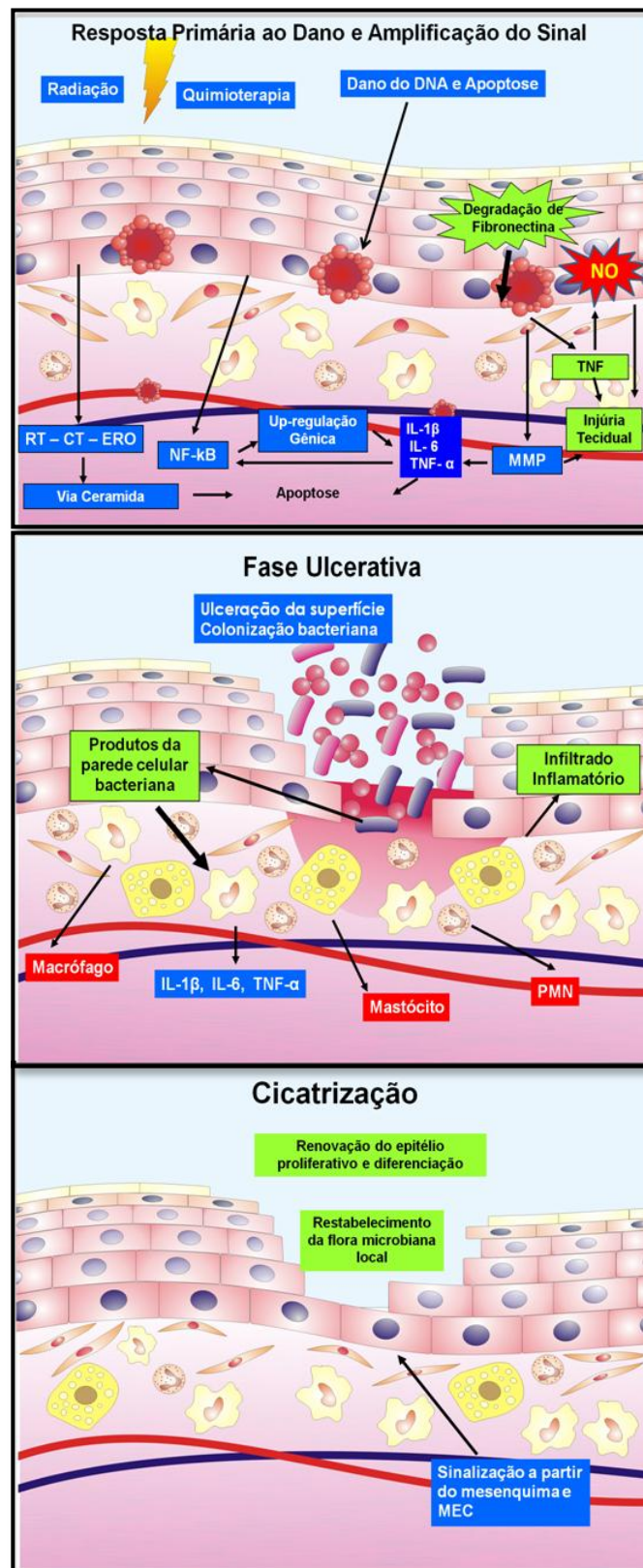
Embora a aparência, nessa etapa, seja de uma mucosa completamente restaurada, persiste, de fato, algumas alterações, mesmo que em menor intensidade, como a angiogênese. Esse fato torna os pacientes agora sob maior risco de novos episódios de mucosite, em tratamentos subsequentes.

A etiopatogênese da mucosite oral permanece, ainda, pouco compreendida. Sabe-se, no entanto, que existem os fatores inerentes ao tratamento, como também aos pacientes, além de estudos de microbiologia e modificadores da resposta biológica da mucosa oral irradiada que influenciam o surgimento e evolução da mucosite oral radioinduzida ou quimioinduzida (SONIS, 2004a; SONIS et al., 2004b). Contudo, não se pode afirmar, de forma conclusiva, que já se sabe a natureza dos fatores implicados com o desenvolvimento da mucosite induzida por radioterapia, pois se trata de um processo biológico complexo, embora bastante explorado, cientificamente, quanto à sua etiopatogênese etiopatogênese

(SONIS 1998a; SONIS; EDWARDS e LUCEY, 1999; SONIS, 2000; SONIS e FEY, 2002b; SONIS 2004a).

Nesse contexto, existem fatores ou efeitos colaterais que vão piorar a evolução da mucosite, como a xerostomia, alteração do paladar, disfagia, odinofagia, infecções oportunistas, como a candidíase e as más condições da higiene da cavidade oral, os quais estão quase sempre presentes nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (SCULLY; EPSTEIN e SONIS, 2003).

Fatores relacionados à radioterapia, como o tipo de irradiação, volume de tecido irradiado, dose e a duração do tratamento, assim como esquemas de fracionamentos alterados (hiperfracionamento ou fracionamento acelerado), estão relacionados com a intensidade ou grau da mucosite, ou seja, constituem os principais fatores que afetam o desenvolvimento e a gravidade da mucosite por radiação (ARCHIBALD et al., 1986; PARSONS et al., 1994; FU et al., 2000).



**FIGURA 4 - Fases de desenvolvimento da mucosite (A: fase de iniciação, resposta primária ao dano e amplificação do sinal; B: fase ulcerativa; C: fase de cicatrização).** Adaptado de Sonis (2004), Keefe et al (2007) e Leitão et al (2007). RT: Radioterapia; CT: Quimioterapia; ERO: Espécies reativas de oxigênio; NFκB: Fator nuclear kappa B; TNF-α: Fator de necrose tumoral α; IL: Interleucinas; NO: Óxido nítrico; COX 2: Cicloxigenases; PMN: Polimorfonucleares; MEC: Meio extracelular; MMP: Metaloproteinases.

#### 1.4. CLASSIFICAÇÃO E MANEJO DA MUCOSITE ORAL

Existem várias classificações para graduar a intensidade de mucosite oral, no sentido de avaliar tanto a incidência, quando auxiliar na escolha do tratamento mais adequado, ou seja, para que ocorra uma adequada intervenção terapêutica. É fundamental, também, que exista uma correta avaliação do grau de comprometimento da mucosa (KEEFE; SCHUBERT e ELTING, 2007; SONIS, 2011).

As escalas de classificação da mucosite oral foram criadas a partir da necessidade de se avaliar a gravidade da lesão da mucosa resultante de terapêuticas com radioterapia e quimioterapia isoladas ou associadas, em pacientes com câncer (Quadro 1). Nessas escalas de avaliação são levados, em consideração, fatores como os aspectos clínicos da mucosa oral, graduação de dor e preservação de funções como a deglutição e a capacidade de falar. Dentro dessas escalas, as mais apropriadas para conduzir o tratamento clínico foram desenvolvidas pela OMS, Instituto Nacional de Câncer (NCI) e Grupo Oncológico de Radioterapia (RTOG).

As orientações atualmente preconizadas para a prevenção e o tratamento da mucosite oral são encontradas em consensos publicados (KEEFE; SCHUBERT e ELTING, 2007; PETERSON; BENSADOUN e ROILA, 2009; WORTHINGTON et al., 2011; CLARKSON; WORTHINGTON; CLARKSON e EDEN, 2006). No entanto, um protocolo padronizado, relacionando tratamento e medidas preventivas, faz-se ainda necessário, visto que muitos regimes terapêuticos não possuem sua eficácia claramente estabelecida (SONIS, 2011). Não existe um consenso sobre a melhor abordagem terapêutica para a mucosite oral. Os tratamentos são diversificados e buscam atenuar a sintomatologia dolorosa das lesões ou mesmo preveni-las (ANTUNES, 2011).

Vários estudos são descritos, na literatura, com foco na 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 (KEEFE; SCHUBERT e ELTING, 2007). 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 (WORTHINGTON; CLARKSON e EDEN, 2006; WORTHINGTON et al., 2011).

**QUADRO 1 - Escores associados à mucosite oral.** Fonte: Graus para mucosite definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) e National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria for Adverse Events v3.0 (NCI-CTC).

Escore para Lesão	Mucosite Oral	Mucosite Oral por Radiação	
	OMS	NCI-CTC	RTOG
<b>Grau 0 (Nenhum)</b>	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos
<b>Grau 1 (Leve)</b>	Descamação associada ou não com eritema e dor	Eritema da Mucosa	Irritação, possível quadro de dor leve que não requer analgesia
<b>Grau 2 (Moderado)</b>	Ulcerações com ou sem eritema. Capacidade de ingestão de sólidos	Com manchas, reações pseudomembranosas (manchas de maiores dimensões > 1,5cm, não contíguas)	Mucosite com manchas que podem produzir um exsudato inflamatório; dor moderada que requer analgesia
<b>Grau 3 (Grave)</b>	Ulcerações com ou sem eritema extenso. Capacidade de ingestão de líquidos somente	Reação Pseudomembranosa (manchas contíguas às de maiores dimensões > 1,5cm, não contíguas)	Mucosite confluyente fibrinosa; dor grave que requer narcótico
<b>Grau 4 (Risco à Vida)</b>	Ulceração, alimentação não é possível. Líquidos apenas na forma de suspensão para medicação. Nutrição parenteral requerida	Úlceras ou sangramentos ocasionais, não causados por traumas menores ou abrasões	Úlceras hemorrágicas ou necróticas
<b>Grau 5 (Morte)</b>	-	Morte devido à Toxicidade	-

Em uma 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; EPSTEIN e

SONIS, 2004). Não obstante, diversos trabalhos na literatura têm discutido vários protocolos da boa prática clínica, quanto ao tratamento e prevenção da mucosite oral (PETERSON; BENSADOUN e ROILA, 2009; KEEFFE; SCHUBERT e ELTING, 2007; McGUIRE et al., 2006; BRENNAN et al., 2006).

Uma meta-análise da Cochrane Library utilizou 131 estudos clínicos, envolvendo 10.514 pacientes, para avaliar a efetividade de agentes profiláticos na mucosite oral (WORTHINGTON al., 2011); outros 32 estudos clínicos foram utilizados, envolvendo 1505 pacientes, para avaliar a efetividade de agentes no tratamento da mucosite oral (WORTHINGTON; CLARKSON e EDEN, 2006). Alguns dos trabalhos demonstraram evidências de benefício, em prevenir, tratar, ou mesmo diminuir a gravidade da mucosite. Dessas potenciais intervenções, destacaram-se: uso de aloe vera, amisfotina, antibióticos tópicos, benzidamina, fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos, glutamina intravenosa, crioterapia, laserenzimas hidrolíticas.

Um estudo experimental com ratos, assim como estudos clínicos com pacientes 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., 2006; HENKE et al., 2011; LE et al., 2011).

A terapia com laser em baixa intensidade tem sido investigada em recentes estudos para prevenir e tratar a mucosite oral, pois se presume que essa modalidade tem efeitos analgésico, antiinflamatório e cicatrizante, além de não apresentar efeitos tóxicos (GENOT-KLASTERSKY et al., 2008; FRANÇA et al., 2009; BJORDAL et al., 2011; LINO et al., 2011).

Alguns estudos clínicos com laser de baixa intensidade mostram resultados positivos na redução da gravidade da mucosite oral e da dor, principalmente em ensaios randomizados que envolvem pacientes com doenças hematológicas que necessitam de transplante de medula óssea. A Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC) sugere a utilização de laser nesses pacientes, mas não faz nenhuma recomendação específica sobre a utilização do laser para mucosite radioinduzida em pacientes com câncer em cabeça e pescoço (ROSENTHAL e TROTTI, 2009).

Recentemente, com o desenvolvimento dos modificadores de resposta biológica e dos agentes biológico-moleculares, tidos como 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; DIENSTMANN e RODRIGUES, 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).

### **1.5. MEDIADORES ENVOLVIDOS NA MUCOSITE ORAL**

A mucosite induzida por radioterapia é resultante de danos às células epiteliais e endoteliais, com uma subsequente indução local da resposta inflamatória, podendo apresentar ou não repercussões sistêmicas.

Essa mucosite deve ser entendida como um efeito adverso agudo, evidenciado, clinicamente, por uma sintomatologia e etiopatogênese de complexidade elevadas. Caracteriza-se o processo como inflamatório, em que diversos mediadores estão envolvidos de forma direta ou indiretamente (SONIS et al., 2004a; SONIS, 2011).

A inflamação é uma resposta dos tecidos às lesões, envolvendo a ativação de enzimas, extravasamento de fluidos, migração de células, liberação de mediadores, destruição e reparo dos tecidos, ou seja, é uma reação de um tecido e de sua microcirculação a uma lesão patogênica. Sua caracterização se dá pela produção de mediadores inflamatórios e movimentação de líquidos e leucócitos do sangue para os tecidos extravasculares. Historicamente, ela tem sido denominada aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão, sintomas clínicos e natureza da resposta inflamatória (FANTONE e WARD, 2002).

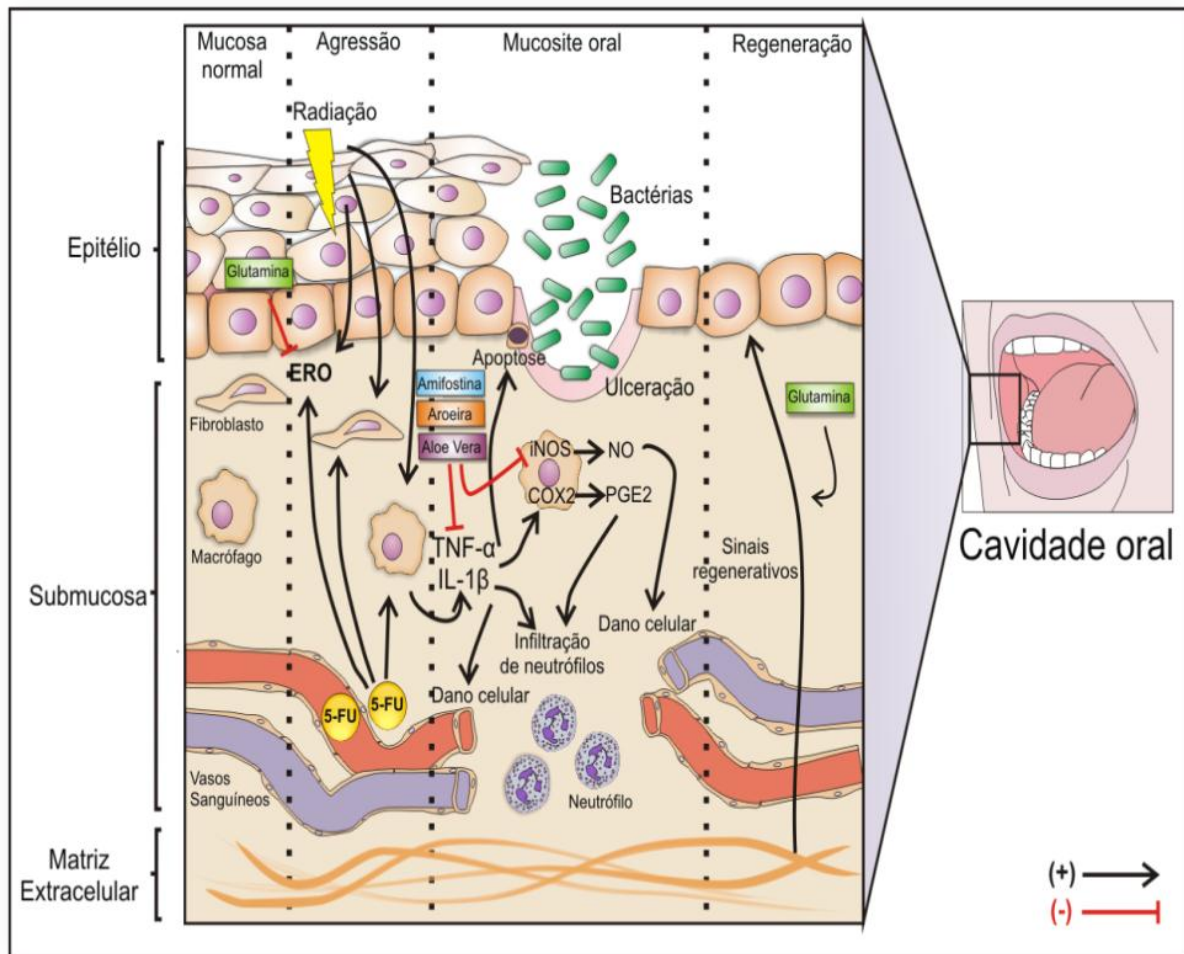
A inflamação aguda caracteriza-se como uma resposta rápida a um agente nocivo, sendo responsável pela migração de mediadores da defesa do hospedeiro, como leucócitos e proteínas plasmáticas ao local da lesão. São três os componentes principais apresentados: alterações vasculares, que levam a um aumento do fluxo sanguíneo; alterações estruturais na microcirculação, que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a

circulação; e a emigração dos leucócitos da microcirculação, para eliminar o agente nocivo (ROBBINS e COTRAN, 2005).

Dentre os vários mediadores inflamatórios liberados, destacam-se as prostaglandinas, citocinas (interleucinas (IL-) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o óxido nítrico, os quais desempenham importantes papéis na mucosite induzida por radioterapia ou quimioterapia (LIMA et al 2005; MOURA, 2006; LEITÃO et al., 2006; MELO et al., 2007).

Os mediadores se originam de proteínas plasmáticas ou de células. Os mediadores derivados do plasma estão presentes no plasma, na forma de precursores, os quais devem ser ativados, via de regra, por meio de uma série de clivagens proteolíticas, para adquirir suas propriedades biológicas. Os mediadores derivados de células estão normalmente armazenados em grânulos intracelulares que precisam ser secretados, ou são sintetizados, de novo, em resposta a um estímulo, como as prostaglandinas e citocinas (PALMEIRO, 2005).

As citocinas e o óxido nítrico, por possuírem um papel de grande relevância na regulação do processo inflamatório, têm se mostrado como fortes candidatos a serem agentes endógenos liberados em resposta aos agentes quimioterápicos e à radioterapia (WILLIAMS, 2001; SONIS et al., 2002a; LIMA et al., 2005; DE KONING et al., 2006; LEITÃO et al., 2006; MOURA, 2006). Sabe-se que esses mediadores estão envolvidos na patogênese da mucosite oral (Figura 5). Agentes ou fármacos que possam causar depleção ou inibição desses mediadores podem atenuar ou inibir a mucosite em modelos animais e humanos (SONIS, 2000a; EPSTEIN, 2001; SONIS et al., 2002a; LIMA et al., 2005; MOURA, 2006).



**FIGURA 5 - Mediadores envolvidos no processo inflamatório da mucosite oral.** ERO: Espécies reativas de oxigênio; iNOS: Óxido nítrico sintase induzida; NO: Óxido nítrico; COX2: Cicloxigenase 2; PGE2: Prostaglandinas 2; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ : interleucina 1; 5-FU: 5 fluoracil; (+): estímulo; (-): inibição.

### 1.5.1. CITOCINAS

Citocinas são mediadores protéicos ou peptídicos, as quais, nas reações imunológicas e inflamatórias, são liberadas, regulando a ação das células inflamatórias e do sistema imune, ou seja, são glicoproteínas de baixo peso molecular, com capacidade para modular a atividade celular, em condições fisiológicas e patológicas (VILCEK e LE, 1994).

As citocinas podem ser produzidas por vários tipos celulares, como linfócitos, macrófagos ativados, células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, os quais modulam a função de outros tipos celulares. Além de suas próprias ações diretas sobre as células, algumas citocinas aumentam o processo inflamatório, induzindo a formação de outros mediadores, na inflamação (PARKIN e COHEN, 2001).

As citocinas são divididas em dois grandes grupos: citocinas envolvidas na indução da resposta imunológica e citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, que estão envolvidas com a fase efetora da resposta imunológica-inflamatória (RANG et al, 2003).

Hoje, são identificados mais de 100 tipos. As citocinas podem ser sintetizadas por todas as células nucleadas do corpo, mas são liberadas, principalmente, por macrófagos e linfócitos. O termo citocinas refere-se a um grupo de reguladores celulares peptídicos que inclui as linfocinas, as quimiocinas, as interleucinas e os interferons, dentre outros (RANG et al., 2003).

Considera-se importante o papel desempenhado pelas citocinas na transmissão de mensagens às células, atuando no processo inflamatório, sendo que seus efeitos biológicos são dependentes do tipo de citocina e do ambiente celular envolvido. Tradicionalmente, essas moléculas interferem na ativação e na divisão celular, assim como na apoptose (PARKIN e COHEN, 2001).

As citocinas envolvidas com a resposta imunológica e inflamatória são peptídeos tanto pró-inflamatórios quanto antiinflamatórios. Segundo Williams (2001), citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-2; e antiinflamatórias, antagonista de receptor de IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-11 estão envolvidas na lesão e reparo da mucosa. As pró-inflamatórias são citocinas que participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos de reparo, destacando-se o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Di GIROLAMO et al., 1997; RANG et al 2003).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  representam as duas citocinas primárias que participam do processo inflamatório e são produzidas, principalmente, pelos macrófagos ativados e linfócitos, e liberadas pelos lipopolissacarídeos. A IL-1 $\beta$  é liberada por macrófagos, entre outras células, durante o processo inflamatório, podendo também ser responsável pela síntese e liberação de uma cascata de citocinas secundárias, como as quimiocinas (DI GIROLAMO et al., 1997; PALMEIRO 2005). O TNF- $\alpha$  é uma proteína pleotrópica, isolada, inicialmente, de camundongos expostos a uma toxina bacteriana. Fundamentalmente, se expressa por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T, e possui dois tipos de receptores: TNF-R1 e TNF-R2, os quais podem ser expressos em células endoteliais ou imunes (RANG et al., 2003).

A secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pode ser estimulada por endotoxinas, complexos imunes, lesão física e vários tipos de estímulos inflamatórios. Suas ações mais importantes, na inflamação, são seus efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos, além da indução de reações sistêmicas da fase aguda. De acordo com o trabalho de Orlicek et al. o estreptococos viridans é capaz de induzir a produção de TNF por macrófagos murinos, e pelo fato dessas bactérias estarem presentes na boca, essa citocina produzida é importante para o desenvolvimento da mucosite oral.

No endotélio, eles 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 também induz o *priming* dos neutrófilos, levando a um aumento das respostas dessas células a outros mediadores (MANTOVANI; SOZZANI e INTRONA, 1997).

Citocinas antiinflamatórias têm ação inibitória sobre a produção de outras citocinas. Como exemplo, tem-se a ação da IL-10, que pode inibir as citocinas liberadas por linfócitos Th1 ou por monócitos e macrófagos, assim como a ação inibitória da IL-4, na produção de TNF, ou IL-1 $\beta$ , por monócitos.

As 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, as citocinas atuam através de mecanismos autócrinos, parácrinos (tecidos específico) e endócrinos (sistêmicos), funcionando como hormônios inflamatórios (FANTONE e WARD 2002).

A título de exemplificação do mecanismo endócrino há 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 (RANG et al. 2003).

Tanto o TNF- $\alpha$ , quanto a IL-1 $\beta$ , induzem vias de sinais que levam à ativação de fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O fator de transcrição NF- $\kappa$ B controla a expressão da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , em estudos clínicos, enquanto a administração de inibidores seletivos de NF- $\kappa$ B anula a expressão dessas citocinas em modelos animais de inflamação crônica, sugerindo que estes inibidores possam ser de valor clínico. Por conseguinte, esse fator de transcrição desempenha um papel chave na indução das respostas inflamatórias e imunes (RANG et al. 2003; RANG et al., 2008).

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. Na verdade, o fator de transcrição NF $\kappa$ B, possui um papel chave no desenvolvimento da mucosite oral, pois modifica a expressão de citocinas e enzimas que estão relacionadas com a sua patogênese (SONIS, 2002a; SONIS, 2004a; SONIS et al., 2004b), ou seja, a ativação do NF- $\kappa$ B induz a suprarregulação de vários genes, incluindo aqueles que são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Estas citocinas têm estado presente na mucosa e sangue periférico de pacientes, com neoplasia, tratados com agentes anti-neoplásicos, sendo essas citocinas responsáveis por lesão tecidual e a apoptose (HALL et al., 1995).

Tem sido estabelecido que a radioterapia seja capaz de iniciar uma cascata de 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 detectada em células da submucosa de hamsters, após radioterapia da mucosa jugal, decorrente do processo inflamatório, e a interferência na produção de TNF- $\alpha$  está relacionado, com a diminuição da mucosite (SONIS 2000; MOURA, 2006).

No contexto geral, as citocinas são pleiotrópicas, ou seja, apresentam vários efeitos, pois uma citocina isolada pode interagir com mais de um tipo de célula, ter várias atividades biológicas, interagir com outras citocinas, apresentando atividades sinérgicas ou antagônicas. Todos esses processos vão resultar em múltiplos efeitos nas células de sistema imunológico, com modulação das respostas inflamatórias (RANG et al., 2008).

### 1.5.2.ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é um gás de radical livre que foi largamente estudado pelos químicos inorgânicos em reações na atmosfera, pois representa um gás potencialmente tóxico, e só recentemente é que se descobriu a sua importância para os organismos vivos.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki relataram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era mediado por um fator conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). Clancy et al. (1987) demonstraram que o EDRF era o Óxido Nítrico (NO). Atualmente, sabe-se que o NO é produzido por várias células e que, além de regular a vasodilatação, desempenha outros papéis relevantes, como na transmissão de estímulos nervosos, na fisiologia pulmonar, na coagulação sanguínea e na resposta inflamatória (MONCADA; HIGGS e FURCHGOTT,1997; CLANCY; AMIN e ABRAMSON,1998).

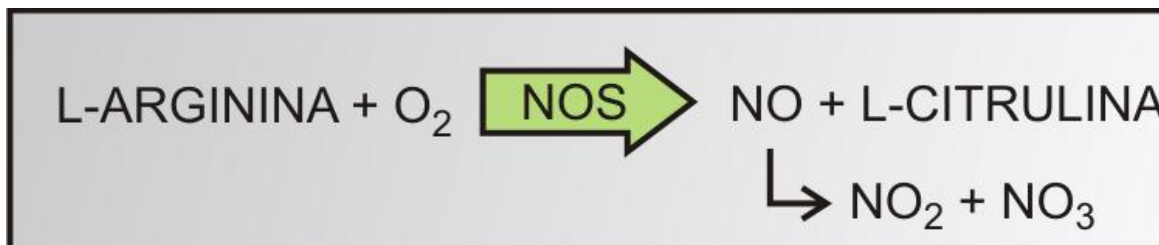
A par disso foi descoberto, também, que o NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (cGMP), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculos liso, monócitos e plaquetas (RANG et al., 2003; RANG et al., 2008).

O NO é formado por uma molécula pequena, relativamente instável, composta por um átomo de oxigênio e nitrogênio, que, por apresentar um elétron desparelhado, torna-se altamente reativo, apresentando meia-vida de 2 a 30 segundos. Nesse sentido, após transmitir um sinal, transforma-se, espontaneamente, em nitrito e nitrato (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997; KENDALL; MARSHALL e BARTOLD, 2001), sendo, portanto, considerado um mensageiro molecular ideal. Caracterizado como um radical livre, dependendo da sua quantidade, ele pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo.

O NO apresenta importantes funções nos sistemas neurológico, cardiovascular e imunológico, ou seja, é um mediador onipresente, com diversas funções. Várias linhas de pesquisa mostram que o NO constitui uma molécula sinalizadora chave nos sistemas cardiovasculares e nervosos e tem importante função de defesa (SPIEKER et al., 1997; NASEEM, 2005).

O óxido nítrico é formado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), através de uma reação do oxigênio molecular com o nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina, que

libera L-citrulina como co-produto, ou seja, o NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (Figura 6) (NATHAN et al., 1997).



**FIGURA 6 - Esquema ilustrativo da via L-arginina / NO**

A enzima NOS<sub>i</sub> é sintetizada como uma nova proteína, em resposta a uma mistura de citocinas. Essa enzima é induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e/ou citocinas sintetizadas, em resposta ao LPS, notavelmente interferon-gama. Logo, em resposta ao interferon-gama e ao TNF- $\alpha$ , que atua de modo sinérgico com o interferon-alfa, seqüências do DNA do macrófago, relativas à síntese da NOS<sub>i</sub>, são transcritas no núcleo, para formar o RNA mensageiro; depois de processado, esse mRNA é liberado para o citosol, onde será traduzido em proteína, pelos ribossomos.

Tem-se, assim, que na presença de cofatores apropriados, a cadeia de proteína nascente enovela-se e monta a forma ativa da NOS<sub>i</sub>. A nova enzima produzida começa, imediatamente, a converter L-arginina em NO e L-citrulina.

Os ativadores mais relevantes da NOS<sub>i</sub> são: interferon-gama, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, e lipopolissacarídeos, que são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. Os glicocorticóides e algumas citocinas, assim como o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), podem inibir a NOS<sub>i</sub> (MONCADA et al., 1991; RANG; DALE e RITTER, 2001).

As enzimas NO sintases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO. Existem três isoformas diferentes de NOS: a isoforma neuronal, que foi inicialmente isolada do cérebro (SESSA, et al., 1992; BREDT e SNYDER, 1994), a endotelial, isolada do endotélio (LAMAS et al, 1992) e a isoforma induzida, isolada do endotélio (XIE et al, 1992). Tanto a isoforma neuronal, como a endotelial, são consideradas constitutivas e expressas nos tecidos de origem, sendo, portanto consideradas como enzimas NOS constitutivas.

A NO sintase induzida é a principal isoforma relevante na inflamação, e, praticamente, todas as células inflamatórias expressam essa enzima, em resposta à estimulação de citocinas.

As enzimas constitutivas são responsáveis pela síntese de pequenas quantidades de NO e são reguladas, principalmente, pela concentração de cálcio intracelular. A atividade da NOSi é independente da concentração de cálcio e produz muito mais NO (cerca de mil vezes maior), por conta da sua alta atividade e por causa da grande quantidade em que está presente, pelo menos em estados patológicos associados (MONCADA et al., 1997; CLANCY; AMIN e ABRAMSON, 1998; ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

Tais enzimas produzem óxido nítrico, que atua no mecanismo da transdução, regulando muitas respostas fisiológicas (EVANS e RALSTON, 1996). Já a óxido nítrico sintase induzida é regulada a nível transcripcional, e a sua produção de óxido nítrico age como uma molécula citotóxica contra microorganismos invasores e células tumorais, podendo também ter uma ação de vasodilatação e causar danos teciduais ao hospedeiro (MONCADA et al., 1991; SZABÓ, 1996).

O NO desempenha um importante papel nos componentes celulares e vasculares das reações inflamatórias. Caracterizado como um potente vasodilatador, também reduz a agregação e a adesão plaquetárias, assim como pode inibir várias facetas do processo inflamatório induzido pelos mastócitos (LAROUX FS et al., 2001). Admite-se o seu efeito global pró-inflamatório, pois aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas.

O NO também possui ação citotóxica, aumentando os mecanismos de defesa local, porém, quando produzido em excesso, pode prejudicar as células do hospedeiro. O NO pode induzir a apoptose de diversos tipos celulares e está associado ao p53 e às alterações nos membros da família do Bcl-2, o que justificaria os achados da toxicidade intestinal, sugerindo um importante papel desse mediador no desencadeamento da mucosite, tanto oral, como intestinal (LEITÃO et al., 2006; MELO et al., 2007).

Nesse sentido, pode-se avaliar o papel do óxido nítrico através do bloqueio farmacológico da sua síntese, usando análogos estruturais de L-arginina, que podem atuar como falsos substratos enzimáticos, ocupando os sítios de ligação entre a L-arginina e a óxido nítrico sintase (KNOWLES e MONCADA, 1994).

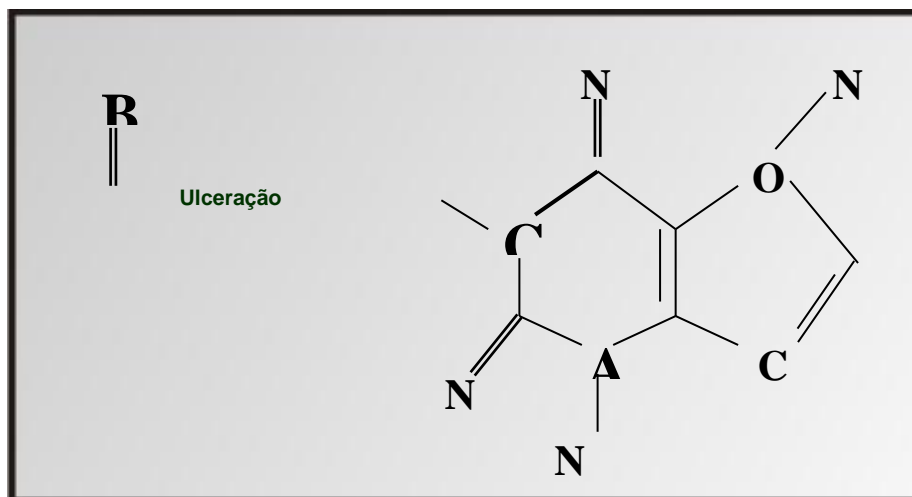
A literatura mostra que o óxido nítrico tem importante função nos processos inflamatórios, em que se dá a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ESTRADA et al., 1992; RALSTON et al., 1994; SOUSA-FILHO et al., 1997; LAPPIN et al., 2000; ROCHA et al., 2002; LIU; BUVINGTON e TJALKENS,2005; LEITÃO et al., 2006), assim como em outras patologias inflamatórias (HUTCHESON; WHITTLE e BOUGHTON-SMITH, 1990; PETROS; BENNETT e VALLANCE,1991; BOUGHTON-SMITH et al., 1993; CHEN; INOUE e OKADA,1996; DICKSON et al., 1999; LAPIN et al., 2000).

## **1.6. ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS**

### **1.6.1. PENTOXIFILINA (PTX)**

A pentoxifilina (PTX), 1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina é uma metilxantina muito utilizada no tratamento de doenças vasculares (Figura 7). 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. A par disso, 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 e CLISSOLD,1987).

Além da sua função nas desordens vasculares, a pentoxifilina apresenta, também, importantes efeitos adicionais, dentre eles a 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 PTX 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).



**FIGURA 7 - Estrutura química da pentoxifilina**

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. Esse agente pode aumentar a quimiotaxia dos neutrófilos, sendo tal efeito decorrente da inibição da ação das citocinas inflamatórias sobre a função dos neutrófilos. É possível ocorrer, também a diminuição do dano tecidual, causado pelos neutrófilos, em determinadas condições, 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'Heliencourt et al. (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  $10^{-3}$  conseguiu inibi-la, 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 e CLISSOLD, 1987; SCHANDENE et al., 1992; YANG; CHUEN e SHAIQ, 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 tornando evidente o seu papel protetor na mucosite oral experimental, induzida por quimioterápicos, além do que 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).

Há a destacar ainda, que a pentoxifilina regula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , sendo muitos dos seus efeitos antiinflamatórios decorrentes da inibição da PDE4 (DOHERTY et al., 1991; BADGER; OLIVEIRA e ESSER, 1994; HOLZHEIMER et al., 1995; LIANG; BESHAY e PRUD'HOMME, 1998; VILMA et al., 2005; MOURA, 2006; MELO et al., 2007). A pentoxifilina também pode ser efetiva no tratamento de distúrbios auto-imunes e processos inflamatórios mediados pelo óxido nítrico (BESHAY; CROZE e PRUD'HOMME, 2001). SLIWA et al. (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. De tal modo ela agrega a função de inibir a apoptose, em diferentes tipos celulares humanos, tanto *in vitro*, como *in vivo* (NIEDER et al., 2005).

O fármaco, em referência, com o passar do tempo, tem sido cada vez mais estudado 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, favorecem 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. (2004), mostraram um efeito protetor significativo da pentoxifilina nas reações agudas e tardias em pacientes submetidos à radioterapia, para câncer de pulmão e de mama. Como resultado da ação da pentoxifilina sobre os mediadores inflamatórios, tem-se, então, a oportunidade de usar esse 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, bem assim proteger os tecidos normais, porém estudos clínicos somente sugerem que a pentoxifilina tenha um efeito radiosensibilizante (NIEDER et al., 2005).

### **1.6.2. INIBIDOR ENZIMÁTICO (AMINOGUANIDINA)**

O óxido nítrico está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, como a inibição da agregação plaquetária (MELLION et al., 1981) e relaxamento da musculatura lisa vascular (REES et al., 1990a), assim como sua produção e liberação em excesso tem sido associada a muitos eventos patológicos, tais como choque séptico (THIEMERMANN e VANE, 1990) e patologias inflamatórias como artrite reumatóide (PALMER et al., 1993), mucosite oral (LEITÃO et al., 2006) e intestinal (LEITÃO et al., 2006, MELO et al., 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2012). Considerando estes aspectos, fármacos que modulem a atividade do NO, em particular os que reduzem sua produção a partir da NOSi, podem ser de considerável valor terapêutico.

O bloqueio da síntese de NO, por meio de análogos estruturais da L-arginina pode ser realizado por inibidores enzimáticos, os quais atuam como falsos substratos enzimáticos e ocupam sítios de ligação entre a L-arginina e a NOS (KNOWLES e MONCADA, 1994). Os fármacos podem inibir a síntese ou a ação do NO, através de vários mecanismos (KNOWLES e MONCADA, 1994). Como exemplo desses inibidores temos L-NMMA (N-monometil-L-arginina) (PALMER et al., 1988, MONCADA; PALMER e HIGGS, 1989), L-NIO (L-iminoetil-L-ornitina), L-NA (N-nitro-L-arginina) e seu metil-éster L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster (GARDINER et al., 1990).

A pesar dos análogos estruturais da L-arginina serem potentes inibidores da NOS, no geral apresentam baixa seletividade para as isoformas da NOS e inibem preferencialmente as isoformas constitutivas (REES et al., 1990b; GROSS et al., 1990).

Na tentativa de uma maior seletividade em relação a NOS tem-se investigado outros fármacos que não análogos da L-arginina. Estudos têm demonstrado que as guaninas, como a aminoguanidina podem inibir de forma seletiva a NOSi (CORBETT et al., 1992; FUJI et al., 1996; SALVEMINI et al., 1996; RIDGER et al., 1997; LEITÃO et al., 2006), assim como o 1400W (N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina) que tem sido

mostrado inibir de forma bastante seletiva a NOSi (GARVEY et al., 1997; LEITÃO et al., 2006).

Esses inibidores da NOSi estão sendo investigados, com o intuito de tratar processos inflamatórios. No choque séptico, já foram utilizados inibidores da NOSi e na artrite experimental, os inibidores da NOSi reduziram a atividade da doença (PETROS et al., 1994; ROCHA et al., 2006). Na mucosite oral induzida por quimioterapia, Leitão et al. (2006), também mostraram que os inibidores enzimáticos são importantes no controle do processo inflamatório.

Existem disponíveis, para esse fim, vários inibidores enzimáticos, com seletividades diferentes para as diversas isoformas da NOS; dentre eles, tem-se o inibidor não-seletivo, N $\phi$ -Nitro-L-arginina methyl Ester (L-NAME), a aminoguanidina, mais seletiva para a NOSi, e o N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W), um dos inibidores disponíveis mais seletivos para NOSi, cuja potência e seletividade foi demonstrada tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (GRIFFITHS et al., 1993; GARVEY et al., 1997; MUSCARA e WALLACE, 1999, LEITÃO et al., 2004; LEITÃO et al., 2006).

Desta forma, considerando todos esses aspectos, somados ao fato de que a radioterapia pode induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias relacionadas à injúria tecidual (SONIS 2004), particularmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aos quais induzem a expressão da NOSi, e formação de grandes quantidades de NO, será abordado o papel do óxido nítrico e de seus inibidores na mucosite oral induzida por radioterapia, assim como o efeito protetor da pentoxifilina.

### **1.6.3. FITOTERÁPICOS**

Os fitoterápicos estão sendo incorporados aos vários programas de fitoterapia como opção terapêutica eficaz e de baixo custo. O incentivo em investimento tanto na área privada como pública das plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia pelos profissionais de saúde e um aumento do seu uso pela população (HOMAR, 2005; FUNARI e FERRO, 2005).

A OMS estima que 80% da população de países em desenvolvimento são tratadas com técnicas de medicina popular e desse total, 85% usam produtos de origem vegetal (HOMAR, 2005). O crescente interesse da comunidade científica pela fitoterapia nas duas

últimas décadas levou ao desenvolvimento de várias pesquisas baseadas em práticas populares.

Entre os fitoterápicos de uso popular existentes no Brasil, o Aloe vera (babosa), aroeira e a camomila são bastante utilizadas no nosso estado. Diversas pesquisas têm evidenciado as propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes destas plantas (DAVIS et al., 1989; HUTTER et al., 1996; WILLIAMS et al., 1996; VÁZQUEZ et al., 1996; VIANA et al., 1997; REYNOLDS e DWECK, 1999; VOGLER e ERNST, 1999; HERENÇA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2002; VIANA et al., 2003; LANGMEAD et al., 2004; SU et al., 2004; SANT'ANA, 2006; MAENTHAISONG et al., 2007; ALVES et al., 2009; PAVESI et al., 2011; MAIA-FILHO et al., 2011).

#### **1.6.3.1. ALOE BARBADENSIS MILLER (ALOE VERA - Babosa)**

*O Aloe vera (Aloe barbadensis Miller)* é uma planta da família das Liliáceas com inúmeras propriedades regeneradoras, curativas, umectantes, lubrificantes, antiinflamatórias e nutritivas. Chamada de a planta da saúde e beleza tem seu uso documentado desde a época do antigo Egito, com passagens na Bíblia e antigos documentos fenícios. Popularmente conhecida como babosa, é caracterizada como uma planta de caule curto e estolonífero e raízes abundantes, longas e carnosas, sendo cultivada, principalmente, na região subtropical dos Estados Unidos, para uso cosmético (SCHMID, 1991; VOGLER e ERNST, 1999; ZHANG et al., 2006; MAENTHAISONG et al., 2007). Sua folha tem uma polpa mucinosa que contém gel de Aloe vera (Figura 8). O Aloe barbadensis Miller é a espécie mais utilizada na medicina curativa e mais popular no mundo (NI e TURNER, 2004).



**FIGURA 8 - Fotos ilustrativas da árvore de Aloe vera e de sua folha** (Ilustrações retiradas da internet – Google Imagens).

Muito conhecida no Brasil, essa planta, rica em vitamina A, com uso recomendado para os cabelos e pele, agrega, também, vitaminas: B1, B5, B12 e C. As substâncias contidas na babosa podem agir com larga eficiência, graças à capacidade que tem a seiva de penetrar nos tecidos, fazendo com que a ação dos seus nutrientes naturais, como os minerais, as vitaminas, os aminoácidos e as enzimas, melhorem e estimulem a vitalidade das células (CAPASSO e GAGINELLA, 1997). Porém, apesar do seu uso em ampla escala, ainda pouco se conhece do seu mecanismo de ação e efeitos patofisiológicos (VOGLER e ERNST, 1999; RAJASEKARAN et al., 2006).

Como usos rotineiros existem duas preparações: o exsudato da folha (Aloe) e o gel mucogelatinoso (Aloe vera). Segundo provas laboratoriais, tanto o exsudato da folha (Aloe) como o gel mucogelatinoso (Aloe Vera) são utilizados e apresentam as seguintes propriedades: ação anestésica, ao ser aplicado no leito do ferimento, devido à sua grande capacidade de penetração, e presença de lignina, que hidrata as terminações nervosas (CAPASSO e GAGINELLA, 1997). Sua ação antiinflamatória é similar à dos esteróides, como a cortisona, porém sem causar efeitos colaterais, como os provocados pelo uso destes (VÁZQUEZ et al., 1996). Além de outras propriedades, apresenta ação antioxidante (YAGI et al., 2004), anti-câncer (SU et al., 2005), imunomoduladora (IM et al., 2005) e cicatrizante (DAVIS et al., 1988; MAENTHAISONG et al., 2007).

A presença de potássio, na babosa, provoca a formação de uma rede de fibras, que retém os eritrócitos do sangue, ajudando no processo de coagulação e de cicatrização. O cálcio também está presente, sendo esse elemento necessário ao bom funcionamento do sistema nervoso, ação muscular, além do que se mostra importante catalisador em todo o

processo de cicatrização (ROBERT, 1979; VISUTHIPANICH, 1988; DAVIS, 1989; SCHMIDT et al., 1991; PARISH; WITKOSKI e MILIKAN,1991; MAHATTANADUL, 1995).

A ação queratolítica permite que a pele danificada ou ferida se desprenda, provocando uma renovação de tecidos, com células novas. À sua conta, favorece um maior fluxo sanguíneo, através de veias e artérias, livrando-as de pequenos coágulos. O *Aloe vera* contém ácido urônico, o qual elimina as toxinas, ao nível celular. Como reidratante, tem o poder de penetrar, profundamente, na pele, e de restituir os líquidos perdidos, além de restaurar os tecidos danificados, de dentro para fora, como nos casos das queimaduras provocadas por fogo, radiação ou exposição ao sol (YAGE, 1982; MAENTHAISONG et al., 2007).

O *Aloe vera* apresenta dois componentes fenólicos, com atividades antioxidantes, que inibem a produção de superóxido e radicais hidroxilas, em torno de 30 a 40%, respectivamente. Além disso, um desses componentes diidrocomarínicos tem demonstrado aumentar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais isolados de ratos (ZHANG et al., 2005).

Vários estudos pré-clínicos têm demonstrado que o *Aloe vera* apresenta uma importante atividade antiinflamatória e cicatrizante (HEGGERS et al., 1980; FIORENTINO, 1991; TIZARD, 1994; VAZQUEZ, 1996; ROBBERS; SPEEDE e TYLE, 1996; KONTUREK, 2000; DORNELES et al., 2003; REYNOLDS, 2004; EAMLAMNAM et al., 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que o *Aloe vera* é capaz de induzir angiogênese (MOON, 1999).

Fiorentino et al. (1991) demonstrou que o *Aloe vera* reduz a inflamação e promove a cicatrização gástrica. Esse efeito parece estar relacionado com a produção de IL-10 pelo *Aloe vera* e redução dos níveis de TNF- $\alpha$  na indução de úlcera (EAMLAMNAM et al., 2006). Segundo Chen; Inoue e Okada (2005), a cultura de queratinócitos humanos, estimulados com polissacarídeo de *A. barbadensis*, secretam TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF e podem sofrer inibição na produção de óxido nítrico.

A experiência clínica com o *Aloe vera* é bastante limitada na literatura, sendo seus resultados ainda escassos e contraditórios, com relação aos estudos pré-clínicos (WILLIAMS et al., 1996; VOGLER e ERNST, 1999; SU., 2004). Tais resultados

são criticados pela falta de padronização da escala de escores, não padronização da amostra da planta, métodos de preparação, extração e concentração do gel passível de erro, incluindo os de utilização pelos pacientes.

Su et al. (2004) relataram em um estudo randomizado fase II comparando o Aloe vera com placebo, para prevenir mucosite oral em pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço, que não houve melhora significativa da mucosite com o uso do Aloe vera. Davis et al. (1989) demonstrou que o uso do Aloe vera tanto com a formulação tópica quanto oral foram efetivas no processo de cicatrização de feridas.

Em um estudo fase III duplo cego avaliando o Aloe vera como agente profilático para a radiodermite, os autores mostraram que o mesmo não foi efetivo na proteção da dermatite induzida pela radioterapia (WILLIAMS et al., 1996). Langmead et al. (2004) em um estudo randomizado com o uso do Aloe vera na forma oral para colite ulcerativa, mostrou que o fitoterápico era seguro e apresentava resposta clínica satisfatória, porém não significativa com relação ao grupo controle (placebo).

Sant'ana et al. (2006) demonstraram que o uso tópico de Aloe vera na mucosa jugal de hamsters submetidos à quimioterapia com 5-Fluorouracil, inibiu, de forma significativa, o processo inflamatório da mucosite oral, possivelmente através da inibição de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e do óxido nítrico (inibição da enzima óxido nítrico sintetase), implicados na mucosite oral induzida pelo quimioterápico.

### **1.6.3.2. MYRACRODRUON URUNDEAVA (AROEIRA - DO - SERTÃO)**

A aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) é uma árvore da família Anarcadiacea, sendo típica da caatinga do Nordeste, principalmente no Ceará. No Brasil, a aroeira é um fitoterápico largamente empregado, sendo encontrado por todo o litoral do nordeste, sudeste, sul e centro-oeste (MATOS, 1989; OLIVEIRA et al., 1989). É uma árvore grande, de casca fina e escamosa, com cerca de 10 a 15 metros de altura, podendo atingir até um metro de diâmetro (VIANA et al., 1995). Possuem folhas compostas por folíolos lanceolados e pontiagudos, numerosas flores de cores brancas ou amarelas esverdeadas. É

originária do peru, podendo ser encontrada na Europa, Ásia e outras regiões da América, catalogadas em várias espécies diferentes (Figura 9)(LISBOA-NETO et al., 1998).

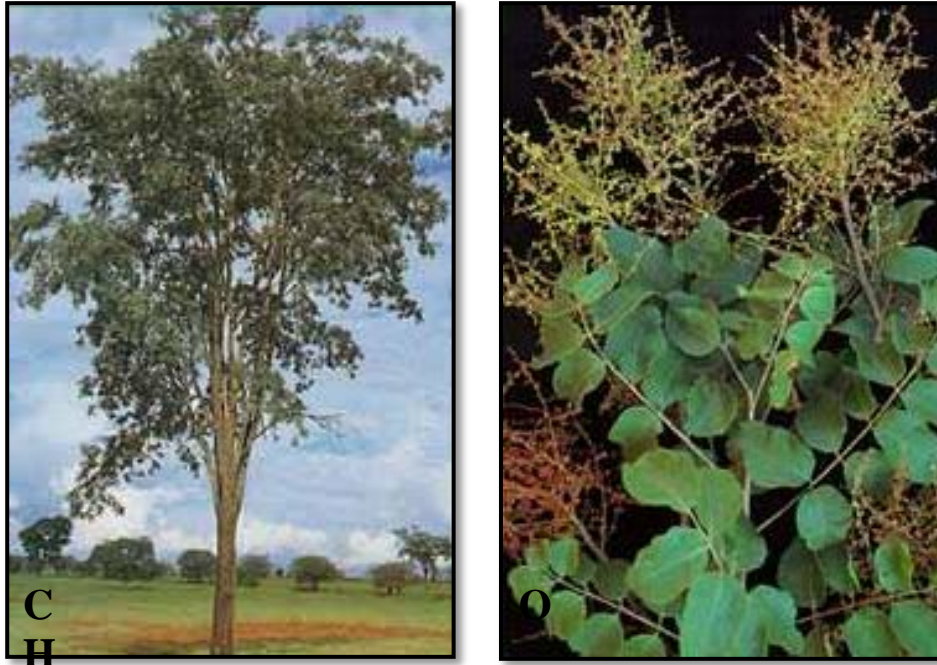
Conhecida como Aroeira-do-sertão, é popularmente utilizada no tratamento de processos inflamatórios ginecológicos, urinários, respiratórios e gastrointestinais (MENEZES; RAO e FONTELES, 1895; MENEZES, 1986; RAO et al., 1987; MENEZES e RAO, 1988; MATOS, 1989; VIANA et al., 1995; VIANA et al., 1997). Estudos científicos do extrato hidroalcoólico e aquoso da entrecasca procuram comprovar os efeitos adstringente, antimicrobiano in vitro, antiinflamatório e cicatrizante a que a ela são atribuídos (RAO et al., 1986, 1987; MENEZES e RAO, 1988; VIANA et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002).

Tem sido demonstrado através de estudos químicos e farmacológicos que a aroeira é um fitoterápico seguro, sem apresentar efeitos tóxicos e teratogênicos nas doses utilizadas (RAO et al., 1986; MENEZES, 1986; MENEZES e RAO, 1988; BANDEIRA, 1993; VIANA et al., 1995). É um fitoterápico de fácil aquisição, baixo custo e de uso popular no Nordeste do Brasil.

Vários estudos têm demonstrado a atividade da aroeira como ação antiinflamatória, analgésica, cicatrizante, antidiarréica e antiulcerogênica (MENEZES, 1986; RAO et al., 1986; RAO et al., 1987; VIANA et al., 1995; VIANA et al., 1997; VIANA, 1997; HSIEH et al., 1998; ZUANAZZI, 1999; RODRIGUES et al., 2000; HERENCIA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2002; VIANA et al., 2003).

Do extrato de aroeira foram isoladas sete frações, das quais duas apresentam atividade antiinflamatória: F(8-13) que contém uma mistura chalcônica, e F(18) que apresenta taninos catéquicos (BANDEIRA, 1993; VIANA, 1997).

Na Fração chalcônica foram isoladas três novas chalconas dimétricas demonimadas de: **urundeuvina A** (2<sup>o</sup>-hidroxi, 4, 4', 5, trimetoxichalcona (8 - 8'', 2 - 7'') - 2'', 4'' - dihidroxi - 4''' - metoxi-cis-7'', 8''- dihidroxichalcona); **urundeuvina B** (2<sup>o</sup>-hidroxi, 4, 4', 5, trimetoxichalcona (8 - 8'', 2 - 7'') - 2'', 4'' - dihidroxi - 4''' - metoxichalcona) e **urundeuvina C**.



3



3

**FIGURA 9 - Fotos ilustrativas da árvore da aroeira-do-sertão (a e b) e do seu caule (c). Ilustrações retiradas da internet – Google Imagens).**

As chalconas, assim como as dihidrochalconas, apresentam, também, atividade antioxidante, além da capacidade de fortalecer a parede dos vasos, facilitando tanto a circulação como a atividade antiinflamatória (ZUANAZZI, 1999). De acordo com os estudos pré-clínicos, as chalconas e seus derivados apresentam efeitos antiinflamatórios por vários mecanismos (HSIEH et al, 1998; VIANA et al., 2003).

Menezes et al. (1986) demonstrou em uma série de estudos com modelos experimentais de inflamação aguda e subaguda que a entrecasca da aroeira tem uma potente atividade antiinflamatória.

Em estudo conduzido por Rodrigues et al. (2000) houve demonstração da diminuição do edema e exsudato inflamatório, assim como um aumento significativo da regeneração epitelial do colon de rato apresentando colite induzida por ácido acético e tratada com enema de extrato de aroeira.

De acordo com Herencia et al. (2001) o tratamento com a chalcona 4-dimethylamino - 3', 4' - dimethoxychalcona (CH11), é capaz de inibir a liberação de ânion superóxido, em culturas de macrófagos ativadas por zymosan. A CH11 pode reduzir a expressão de NO sintase induzida e níveis de nitrito em macrófagos ativados em culturas expostas ao zymosan, assim como promover a diminuição da produção de superóxido, níveis de prostaglandinas E2 (PGE-2), TNF- $\alpha$  e leucotrienos B4 (LTB4).

Como já relatado anteriormente, tanto a babosa quanto a aroeira possuem propriedades antiinflamatória, imunomoduladora e cicatrizante demonstradas em vários trabalhos pré-clínicos e clínicos. Entre as atividades antiinflamatórias destacam-se a inibição da produção do NO, pela inibição da NO sintase induzida, inibição da produção de prostaglandinas, assim como produção de citocinas.

Utilizando o modelo de mucosite oral experimental já descrito foram avaliados os possíveis efeitos destas duas plantas na inibição do processo inflamatório induzido pela radioterapia.

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O manejo de diversas toxicidades relacionadas à radioterapia tem evoluído. No entanto, a incidência de mucosite tem aumentado. Dentre os eventos adversos, a mucosite oral 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 em uma abordagem essencialmente paliativa, não existindo um protocolo de atendimento preventivo e eficaz. Mesmo havendo uma extensa literatura a esse respeito, descrevendo o papel de diversos mediadores, não há ainda nenhuma demonstração definitiva da sequência hierárquica observada na cascata de mediadores bem como as suas interações que levam aos efeitos lesivos finais da mucosite oral induzida por radio e quimioterapia (LIMA et al., 2005; YEOH et al., 2006; LEITÃO et al., 2006; LOGAN et al., 2007).

Nos últimos anos têm surgido alguns novos candidatos a protetores da mucosite, entre eles amifostina, benzidamina, N-acetilcisteína, palifermina, alopurinol, antibióticos tópicos, enzimas hidrolíticas, fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos entre outros (WORTHINGTON; CLARKSON e EDEN, 2006; KEEFE; SCHUBERT e ELTING, 2007).

Com intuito de contribuir na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos desta afecção, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, tem se dedicado nos últimos 15 anos ao estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da mucosite oral e intestinal induzidas por radio e quimioterapia.

Nesse contexto, utilizando um modelo de mucosite oral induzida pelo agente antitumoral 5-fluorouracil em hamsters, já descrito na literatura, porém modificado e adaptado às nossas condições, tem sido possível se demonstrar o papel de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e, principalmente, de forma inédita, o papel do óxido nítrico na patogênese desta afecção. Sendo assim, foi mostrado que o pré-tratamento de animais com inibidores da enzima óxido nítrico sintase, aminoguanidina ou 1400W atenua de forma significativa os parâmetros macroscópicos e histológicos da MO, reduzindo o infiltrado inflamatório, detectado tanto pela histologia como pela atividade de

mieloperoxidase (MPO). Um aumento da atividade da NOS, assim como dos níveis de nitrito e da imunomarcção para NOSi foram também evidenciados. Dessa forma concluiu-se que o NO exerce um importante papel na patogênese da MO induzida por 5-FU, sendo a sua síntese estimulada por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou outras citocinas via indução da NOSi (LEITÃO et al., 2006).

Quanto aos efeitos de inibidores de citocinas, como a pentoxifilina e a talidomida, foi também possível se demonstrar seus efeitos protetores tanto na mucosite oral como na mucosite intestinal, ambas induzidas experimentalmente por agentes antineoplásicos (LIMA et al., 2005; MELO et al., 2007).

Adicionalmente, no LAFICA, foi desenvolvido como estudo de dissertação de mestrado um modelo inédito de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem, o qual diferia daquele até então vigente e considerado na literatura como modelo clássico, e que usava radioterapia de ortovoltagem. Utilizando tal modelo, foi possível se demonstrar embora de forma ainda preliminar, a participação de citocinas no processo inflamatório dessa mucosite assim como o efeito protetor da pentoxifilina (MOURA, 2006).

Em dissertação de mestrado em farmacologia foi descrito que fitoterápicos como o Aloe vera e a aroeira do sertão apresentavam um importante efeito protetor na mucosite induzida por quimioterapia, efeito este evidenciado através da inibição de citocinas e do óxido nítrico implicados no processo de patogênese dessa mucosite oral (SANT'ANA, 2006).

Logo, considerando estes aspectos, somado ao fato de que a radioterapia induz a produção de mediadores inflamatórios relacionados à agressão tecidual, o presente estudo tem como objetivos:

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o envolvimento de citocinas e do óxido nítrico na patogênese da mucosite oral experimental induzida por radioterapia.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a participação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 e do óxido nítrico sintase induzida (NOSi) na patogênese da mucosite oral induzida por radioterapia.
2. Avaliar o efeito protetor da pentoxifilina na mucosite oral experimental induzida por radioterapia.
3. Avaliar o efeito protetor da aminoguanidina na mucosite oral experimental induzida por radioterapia.
4. Avaliar o efeito protetor dos extratos de Aloe vera e Aroeira na mucosite oral experimental induzida por radioterapia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados hamsters Golden Siriam machos, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais receberam alimentação vegetal (abóboras) e água à vontade. Os animais eram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante o experimento. Os mesmos foram colocados em gaiolas apropriadas, plásticas laváveis e com tampas vazada de metal, permanecendo em média, 5 animais em cada uma delas, sobre maravalha de madeira de pinho e água trocadas a cada 2 dias.

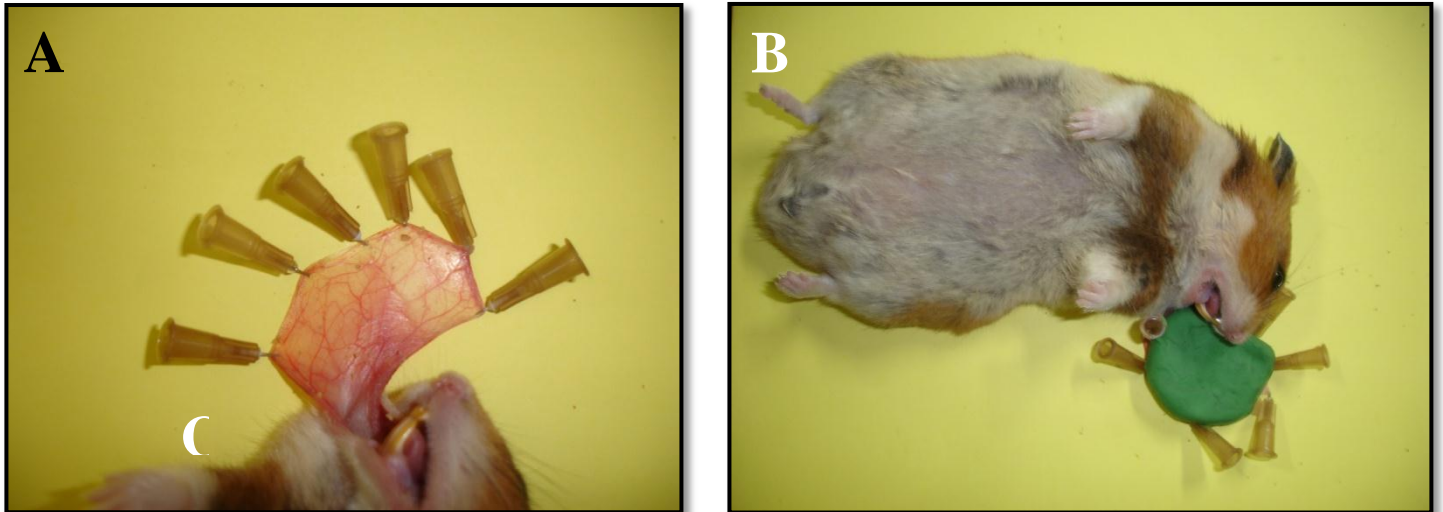
Os protocolos experimentais realizados nesse trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) com o protocolo para uso de animais em experimentação número 097/07.

#### 3.2. RADIOTERAPIA

Os hamsters foram anestesiados com hidrato de cloral (250 mg/kg - ip) e sua mucosa jugal direita exposta e fixada em mesa de isopor para, em seguida, ser irradiada em aparelho de megavoltagem Cobalto-60.

Em seguida, os animais foram irradiados com uma dose única de 35 Gy deliberada no *target* (mucosa jugal) com campo direto e *bolus* para superficializar a dose na mucosa.

A máquina utilizada foi um Gamatron-S com energia de Cobalto-60, sendo os animais irradiados com campo de 5,0 x 5,0 cm, na profundidade 0,5 cm e uma distância foco à superfície de 50 cm. (Figura 10).



**FIGURA 10 - 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. C: Animal sendo irradiado em aparelho de megavoltagem Cobalto-60.**

### 3.3. APARELHOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

- Balança analítica Ohaus AS2600
  - Balança analítica Marte AL200
  - Centrífuga Eppendorf 5804R
- ELISA ELX 800 - Biotex
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergierstation T\*.10 - Ika Labortechnik
- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000µl
- Microscópio Binocular Nikon Alphaphoyt 2 VS2
- Micrótomo Olympus
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)

### 3.4. FÁRMACOS, ANTICORPOS, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES

- Pentoxifilina: ampolas de 5 ml (20 mg/ml) - Trental<sup>®</sup> (Hoechst, São Paulo, Brasil);
- Aminoguanidina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO);
- Extrato de Aloe vera: extrato seco 200:1 distribuído pela Viafarma, lote 052, fabricado em 07/2006, válido até 07/2009. Foram utilizadas géis contendo Aloe vera a 25, 50 e 100%.
- Extrato de Aroeira do Sertão: extrato fluido preparado a partir das entrecascas dessecadas da espécie Myracrodruon urundeuva coletadas em Itaitia - CE, mantido conservado em geladeira para evitar oxidação prematura dos taninos e chalconas. Foram utilizados géis contendo aroeira a 5, 10 e 20%.
- Preparação dos Géis: usado como espessante o carbopol 940 a 1% em meio aquoso, neutralizado com trietanolamina, conservado com 0.15% de uma mistura

de nipagim e nipazol (18:2) e as quantidades de ativos que foram necessárias, como aroeira e Aloe vera.

- 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 biotinilada 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  $\mu$ l

### **3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.5.1. Modelo de mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem em hamsters**

Foi utilizado um modelo de mucosite oral experimental induzido por radioterapia de megavoltagem desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - UFC e o serviço de Radioterapia do Hospital do Câncer do Ceará - ICC.

A mucosite oral foi induzida em hamsters com radioterapia seguido de irritação mecânica da mucosa jugal após o terceiro dia da irradiação, com o objetivo de potencializar as alterações inflamatórias locais e, com isso induzir uma mucosite ulcerativa.

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.

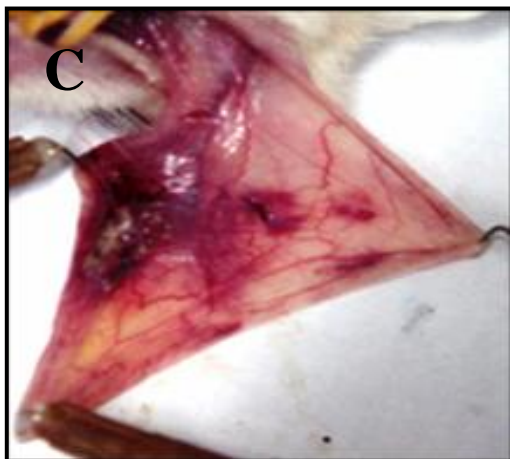
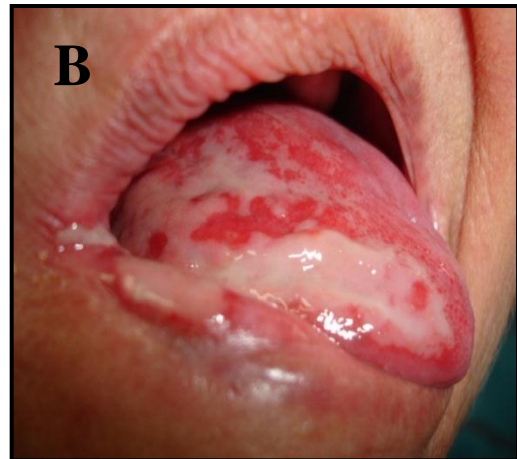
De acordo com o modelo de mucosite oral experimental já desenvolvido o 13º dia foi escolhido para o sacrifício dos animais, com o objetivo de avaliar o papel de citocinas e do óxido nítrico no processo inflamatório da mucosite oral, assim como a eficácia protetora da pentoxifilina e do inibidor seletivo da NOS (aminoguanidina) e ação protetora dos extratos de Aloe vera e aroeira na mucosite oral experimental induzida por radioterapia.

A radioterapia pode ser realizada tanto com aparelhos de ortovoltagem, como de megavoltagem no tratamento do câncer. A literatura registra que radioterapia de ortovoltagem é capaz de causar lesões ulcerativas significantes nas mucosas jugais de hamsters, de acordo com modelo desenvolvido por SONIS et al. (2000). No entanto, neste estudo, para se investigar e entender melhor os possíveis mediadores relacionados com o processo inflamatório da mucosite oral foi utilizado um modelo desenvolvido de forma inédita com radioterapia de megavoltagem. Considerando-se que, atualmente, o tratamento de pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço em aparelhos de ortovoltagem tornou-se praticamente obsoleto, desenvolver um modelo de irradiação de megavoltagem tem um impacto importante para estudos pré-clínicos, já que os tumores de cavidade oral são tratados com esta modalidade de irradiação nos dias atuais.

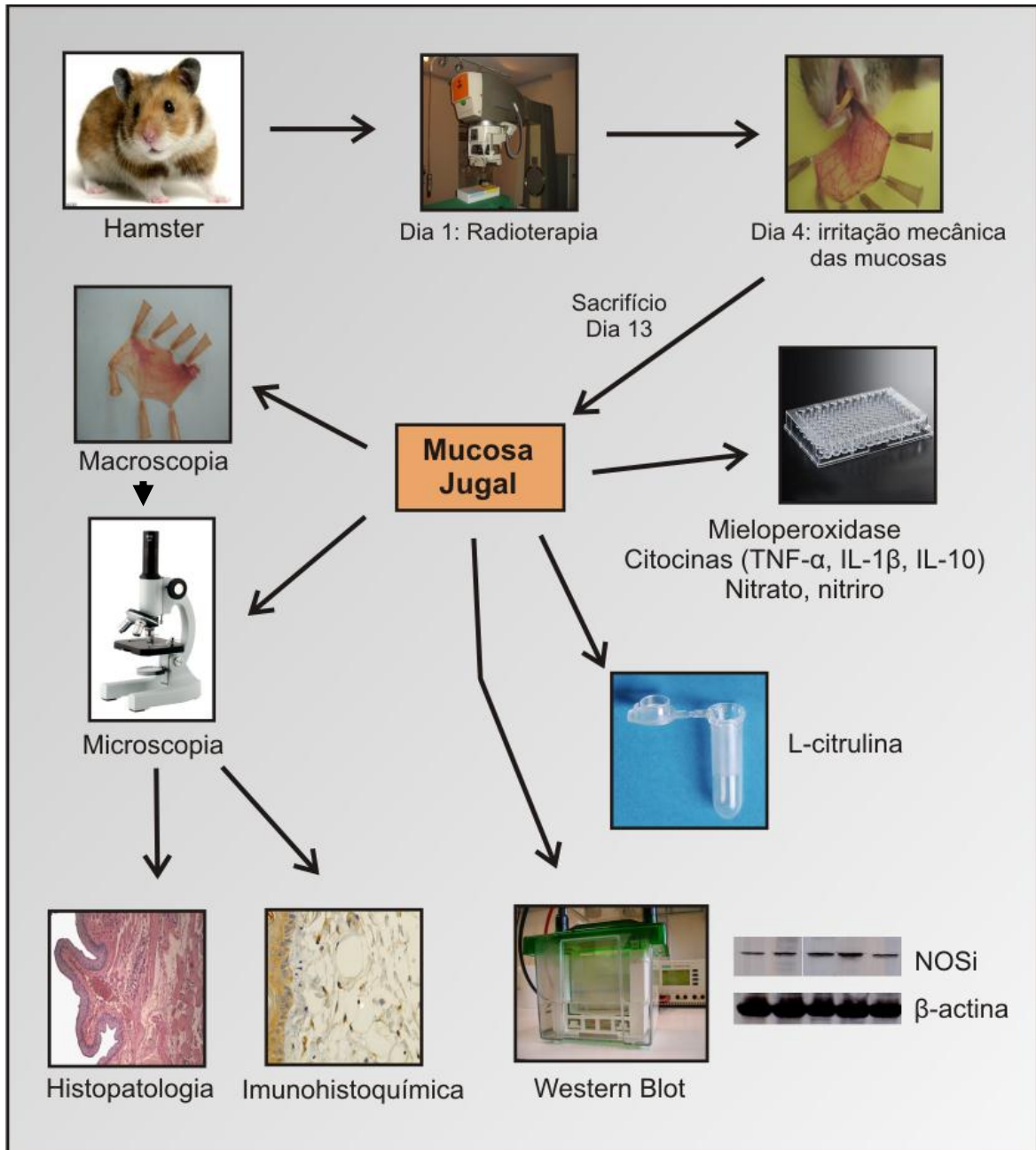
## RADIOTERAPIA



## QUIMIOTERAPIA



**FIGURA 11 - Aspectos clínicos e modelos experimentais de mucosite oral induzida por: A e B: radioterapia e C e D: quimioterapia.**



**FIGURA 12 - Desenho esquemático da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e irritação mecânica:** Roteiro dos protocolos experimentais realizados como análise macroscópica e microscópica das mucosas, dosagem de mieloperoxidase, imunohistoquímica para NOSi, TNF- $\alpha$ , IL-1, dosagem de citocinas nos tecidos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10), dosagem de nitrito e Western blot para NOSi. TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucinas; NOSi: óxido nítrico sintase induzida.

### **3.5.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA**

#### **3.5.2.1. GRUPOS CONTROLE: Animais foram divididos em grupos (n = 5 a 11 animais)**

- Grupo I: Controle normal (normal)
- Grupo II: Controle submetido à radioterapia isolada (RXT)
- Grupo III: Controle submetido à irritação mecânica isolada (IM)
- Grupo IV: Controle submetido à radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM)
- Grupo V: Controle normal tratado com gel de carbapol inerte (RXT + IM gel)

#### **3.5.2.2. GRUPOS TRATADOS: Animais foram divididos em grupos (n = 6 a 12 animais)**

- Grupo I: Animais tratados com PTX (PTX)
- Grupo II: Animais tratados com aminoguanidina (AG)
- Grupo III: Animais tratados com Aroeira (AR)
- Grupo IV: Animais tratados com Alo vera (AV)

- A radioterapia foi realizada com aparelho de megavoltagem cobalto-60 com dose única de 35 Gy no dia.

- 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.

- A irritação mecânica no grupo RXT + IM foi realizada a partir do terceiro dia da radioterapia.

- O gel carbapol inerte foi feito de forma tópica na mucosa jugal do animal com auxílio de uma pinça cirúrgica envolvida por algodão estéril duas vezes ao dia por um período de 13 dias.

- A aminoguanidina foi realizada nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg administrada por via subcutânea, uma hora antes da radioterapia e diariamente até a data do sacrifício no 13°.

- A pentoxifilina foi realizada na dose 15 mg/kg administrada por via subcutânea, uma hora antes da radioterapia e diariamente até a data do sacrifício no 13°.

- O gel de aroeira foi realizado nas concentrações de 5, 10 e 20 % através da aplicação tópica na mucosa jugal irradiada com auxílio de uma pinça cirúrgica envolvida por algodão estéril uma hora antes da radioterapia, duas vezes ao dia por um período de 13 dias. Após cada aplicação do gel, os animais ficavam em jejum de água e comida por uma hora.

- O gel de Aloe vera foi realizado nas concentrações de 25, 50 e 100% também através de aplicação tópica na mucosa jugal com auxílio de uma pinça cirúrgica envolvida por algodão estéril uma hora antes da radioterapia, duas vezes ao dia por um período de 13 dias. Após cada aplicação do gel, os animais ficavam em jejum de água e comida por uma hora.



FIGURA 13 - Desenho esquemático dos grupos experimentais e modulação farmacológica

### 3.5.3. PARÂMETROS AVALIADOS

#### 3.5.3.1. Análise macroscópica das mucosas jugais

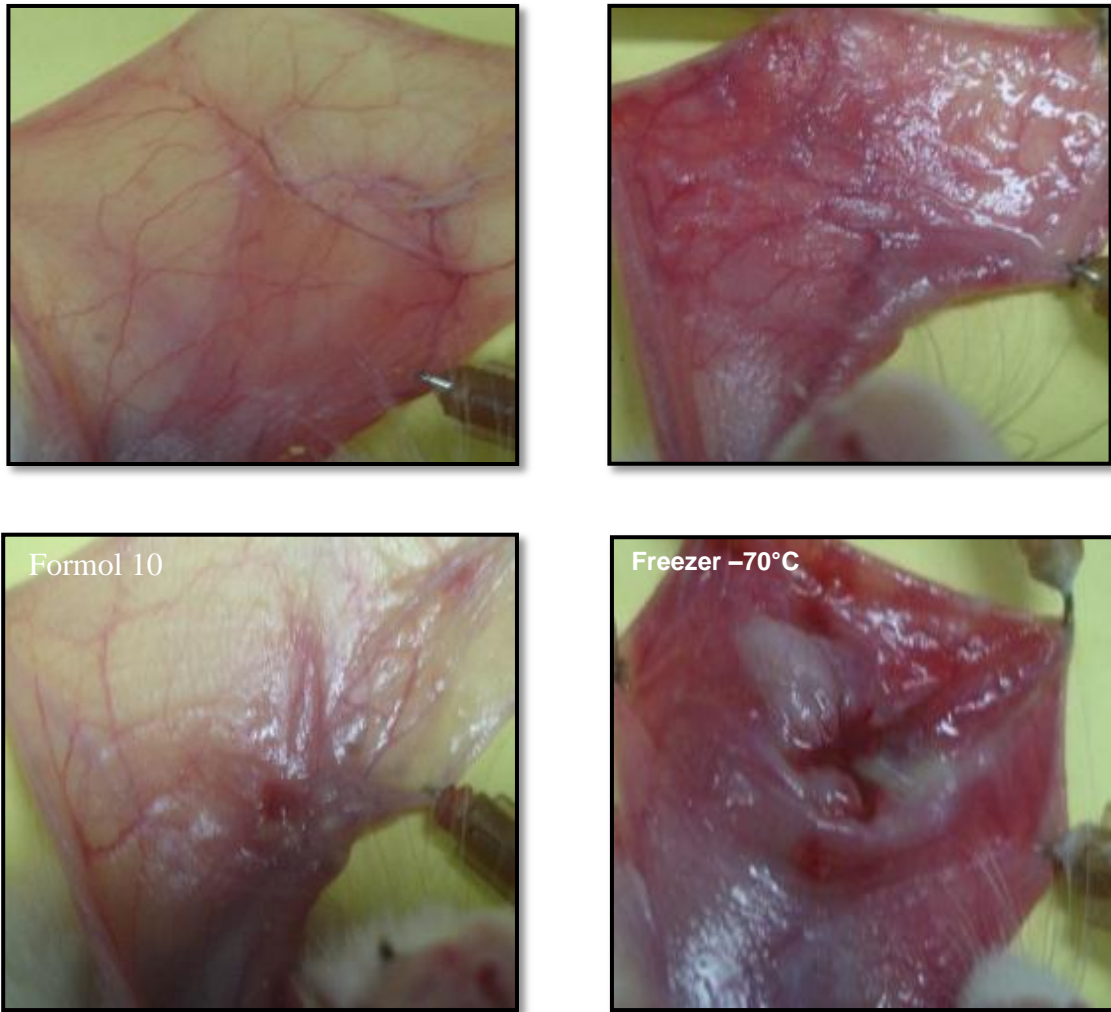
Na análise macroscópica foram avaliados os aspectos inflamatórios como presença e intensidade do eritema, hiperemia, hemorragias, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório de Inflamação e do Câncer – LAFICA/UFC, citados a seguir (Figura 14) (LIMA et al., 2005).

- **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; 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.



**Figura 14 - Graduação por escores de 0 a 3 quanto aos aspectos macroscópicos de mucosas jugais de hamsters com mucosite oral. Escore 0 (A); escore 1 (B); escore 2 (C) e escore 3 (D).**

### 3.5.3.2. Análise microscópica das mucosas jugais

Os animais foram sacrificados no 13º dia após a radioterapia, sendo suas mucosas fotografadas, retiradas e conservadas em formol a 10% por 24 horas, para em seguida serem estudadas do ponto de vista microscópico.

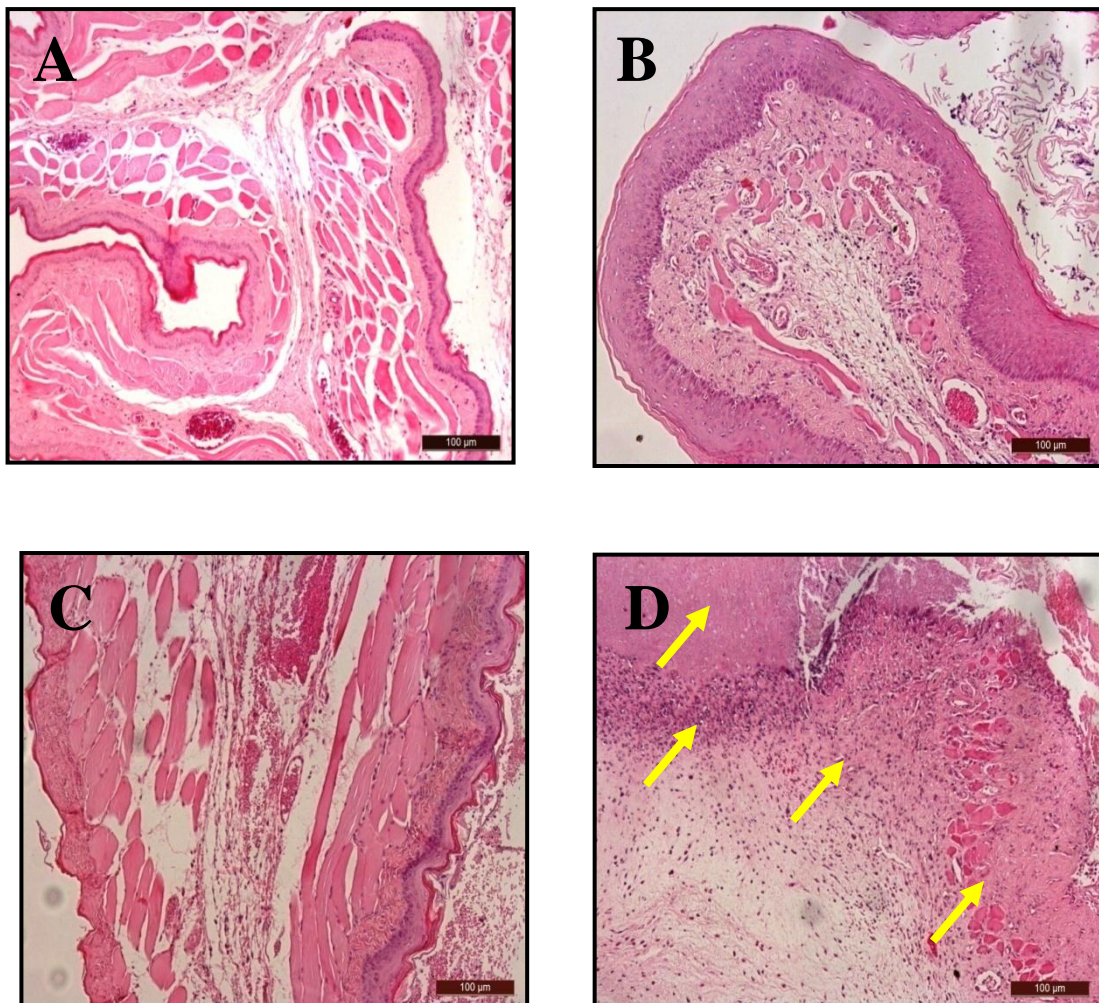
Os estudos histológicos foram realizados em microscópico ótico (x40). Na análise microscópica foram avaliados os parâmetros inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados pelo LAFICA/UFC como segue (Figura 15) (LIMA et al., 2005).

- **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 (vascuolização); infiltrado celular moderado(polimorfonucleares - PMN); áreas hemorrágicas presentes; ausência de abscessos; presença de edema e eventuais úlceras pequenas.

- **Escore 3:** ingurgitamento vascular acentuado(PMN); áreas hemorrágicas presentes; presença de edema; presença de abscessos e úlceras extensas.



**Figura 15 - Graduação por escores de 0 a 3 quanto aos aspectos microscópicos de mucosas jugais de hamsters com mucosite oral. Escore 0 (A); escore 1 (B); escore 2 (C) e escore 3 (D) onde se observa um processo inflamatório intenso, caracterizado por células inflamatórias, edema, ulceração e abscesso (setas).**

### 3.5.4. DOSAGEM DA MIELOPEROXIDASE - MPO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e 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, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados num politron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por 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 umol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto. Os resultados foram expressos como atividade de MPO/mg de tecido.

### 3.5.5. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e NOSi

A imunohistoquímica para NOSi, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi realizada usando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981). No 13º dia do protocolo experimental, os animais que receberam radioterapia + irritação mecânica, os que foram submetidos à radioterapia isolada ou irritação mecânica isolada e os tratados com pentoxifilina e o inibidor da NOS foram sacrificados e tiveram suas mucosas jugais removidas e, em seguida, fixadas em formol 10% por 24h. Após, foram desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em lâminas microscópicas de poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15 min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados *overnight* (4º C) com anticorpo primário anti-NOSi, anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  de coelho diluído 1:100 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Em seguida, foram incubados com “biotinylatedgoatanti-habbit”; diluído em 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavados, os cortes foram novamente incubados com o complexo conjugado “avidin-biotin-horseradishperoxidase” (Strep ABC complexo pela Vectastainr ABC Reagent e solução de peroxidase) por 30 minutos, de acordo com o protocolo da Vectastain. TNF- $\alpha$ , NOSi e IL-

1 $\beta$  foram visualizados com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine (DAB). Os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em uma série de concentrações de álcool, clareados com xilol e, por fim, a lâminula foi colocada. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%, e nenhum desses mostraram imunoreatividade para NOSi, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

### **3.5.6. DOSAGEM DE NITRITO - DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

A produção de óxido nítrico foi obtida através da determinação do conteúdo total de nitrito (NO) nas mucosas jugais através da concentração total nas amostras determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess. Utilizaram-se placas de 96 poços, e fizeram-se as determinações em duplicata. Colocou-se 50  $\mu$ L da amostra experimental (mucosa jugal) em cada poço. Uma série de diluições da curva padrão de referência de NO<sub>2</sub> (80  $\mu$ mol, 40  $\mu$ mol, 10  $\mu$ mol, 5  $\mu$ mol, 2,5  $\mu$ mol, 1,25  $\mu$ mol e 0,625  $\mu$ mol) foi preparada, e 50  $\mu$ L do padrão colocado em uma segunda placa de 96 poços em duplicata. A seguir, foram colocados 50  $\mu$ L de solução de sufamilamida em cada poço de ambas as placas e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após este período de incubação, adicionou-se 50  $\mu$ L de uma solução de dicloreto de N-1-naftiletlenodiamina e incubou-se novamente nas mesmas condições anteriores. A coloração púrpura/magenta apareceu imediatamente e foi medida em leitor de placas com filtro entre 520-550 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

### 3.5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (NOSi)

As medidas de atividade da NOS, foram realizadas a partir das amostras de mucosa jugal de hamsters, utilizando método previamente descrito (GOMES et al., 2004). No 13º dia, após a radioterapia, os animais foram sacrificados e porções de mucosa jugal foram coletadas, e mantidas em *freezer* a  $-70^{\circ}$  C até realização do ensaio. As amostras homogeneizadas (Polytron- PT 3100) em 0,3 mL de tampão de extração pH=7 (320 mM sucrose; 50 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10µg/mL leupeptina; 10µg/mL inibidor de tripsina de soja; 2µg/mL aprotinina; 2 mM PMSF) e centrifugados (9.000 g/10min/4°C). A seguir, 40 µL de cada sobrenadante foram incubados com 100 µL do tampão de ensaio pH=7,4 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,2 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,12 mM  $\beta$ -NADPH; 60 mM L-valina; 1 mM L-citrulina; 50µM  $\text{BH}_4$ ; 4µM FAD; 1 mM DTT) por 1 hora. As amostras foram preparadas em triplicata. **Tubo 1:** sem inibidores de NOS; **Tubo 2:** L-NAME (inibidor não-seletivo de NOS) e aminoguanidina (inibidor seletivo de iNOS); **Tubo 3:** EGTA (quelante de cálcio para as isoformas constitutivas). L-arginina- $^{14}\text{C}$  (270 µCi/ mMol) foi adicionada à razão de 5,4 µL para cada 1mL de tampão de ensaio. Como controles do ensaio, quatro grupos foram preparados: **grupo 1:** tubos para avaliar o background (este tubo não continha amostra); **grupo 2:** tubos para quantificar o total de cpm - contagens por minuto (neste tubo não foi adicionado o Dowex nem as amostras); **grupo 3:** tubos com  $7 \times 10^6$  macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  (controle NOS induzida); **grupo 4:** tubos com homogenato de cerebelo (controle NOS neuronal). Em seguida, 1mL de resina Dowex AG-50X8 sódica (1:1 em água, pH 6,0) foi adicionado aos tubos de ensaio, homogeneizados e centrifugados (9.000 g/10min/4°C). Foram colocados 400 µL do sobrenadante destes tubos beta em 3 mL de líquido de cintilação e, após agitação, a radioatividade foi quantificada por contador por 1 minuto para cada tubo. Também foi realizada a quantificação das proteínas totais de cada amostra pelo método de Comassie Blue (Comassie Blue Reagent; Pierce Chemical, Rockford, IL). Os resultados foram expressos como pmol de citrulina/hora/mg de proteína.

### **3.5.8. DOSAGENS DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NA MUCOSA JUGAL ORAL**

A produção de citocinas foi determinada através do conteúdo dessas citocinas no tecido da mucosa oral. Após o sacrifício dos animais foram removidos segmentos da mucosa oral e estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior homogeneização e coleta do sobrenadante para dosagem de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL10, segundo descrito por Safieh-Garabedian et al.,1995. A detecção das concentrações destas citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme protocolo de Cunha et al. (1993), o qual seguiu as etapas: (1) incubação com 2  $\mu\text{g/ml}$  de anticorpo anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL10 diluídos em tampão de bicarbonato (pH 8.2) - 100 $\mu\text{L/poço}$  (placa de 96 poços) por 16-24h a  $4^{\circ}\text{C}$ ; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100  $\mu\text{L/poço}$  por duas horas à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com curva padrão de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100  $\mu\text{L/poço}$  por 16 a 24h a  $4^{\circ}\text{C}$ ); (6) lavagem da placa (3x); (7) incubação com anticorpo biotilado diluído 1:1.000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por uma hora à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5.000 em tampão de lavagem, 100  $\mu\text{L/poço}$  por 15 minutos à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100  $\mu\text{L/poço}$ , cobriu-se a placa e deixou-se no escuro por 5-20 minutos à temperatura ambiente; (12) a reação foi paralisada com 150  $\mu\text{L/poço}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M; (13) leitura em espectômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL como curva padrão.

### **3.5.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NOS1 POR WESTERN BLOTTING**

Os animais foram sacrificados no 13<sup>o</sup> dia e segmentos da mucosa jugal oral foram removidos e mantidos em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o ensaio. As amostras foram submetidas à sonificação com solução de lise celular (Trinton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM), sendo transferidas posteriormente para tubos testes contendo inibidor de protease e

centrifugadas a 14000 rpm a 4° C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo ensaio de BCA-bicinchoninic acid (Pierce), em tubos eppendorf, com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 562nm). Foi padronizada a quantidade de proteína para 50µg, de acordo com uma curva padrão para proteína. Os lisados foram congelados a -70° C até a análise. Foi realizada a fervura das amostras para desnaturação das proteínas e, em seguida, foi feita a separação eletroforética (Bio Rad mini-gel) das amostras em gel de poliacrilamida 10% (SDS – Page), com o marcador de proteína (Invitrogen). O gel foi, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência 100v (Bio Rad mini-transfercell) durante 60 min. a 4° C. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com leite desnatado 5% overnight, a fim de bloquear outras proteases. Seguiu-se a incubação com anticorpo primário diluído 1:800 em BSA 5% durante 3 horas. Após lavagens com tampão contendo TRIS, glicina, Tween 20 e água destilada, foi feita a incubação com anticorpo secundário, diluído 1:1000 em leite desnatado, durante 1 hora, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana de nitrocelulose pela técnica de ECL, em filme de raio-X (Kodak X-Omat), em câmara escura, com posterior leitura e o diagnóstico das bandas.

### **3.5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM ou como mediana (seguida por valores expressos). Para os dados paramétricos, foram utilizados Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Dunn. Em todas as situações, foi adotado nível de significância de  $p < 0,05$ .

**R**

**A**

## **4. RESULTADOS**

No presente estudo foram reproduzidos com fidelidade todos os eventos inflamatórios observados anteriormente no desenvolvimento do modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem associada à irritação mecânica, desenvolvido em dissertação de mestrado defendida em 2006. Nesse sentido foram observadas todas as alterações das mucosas jugais caracterizadas pelo processo inflamatório da mucosite oral, como a hiperemia e eritema acentuado, áreas de hemorragia, além de franca perda da solução de continuidade, onde úlceras extensas e abscessos estavam presentes. Esses achados foram confirmados pelas análises microscópicas, as quais mostraram ingurgitamento vascular, infiltrado inflamatório acentuado, presença de áreas hemorrágicas, edema, abscessos e úlceras extensas, caracterizando, assim, um quadro de mucosite ulcerativa (Tabela 1 e Figura 16).

### **4.1. EFEITO DA RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA SOBRE OS ASPECTOS MACROSCÓPICOS DAS MUCOSAS JUGAIS DOS HAMSTERS**

Na análise macroscópica das mucosas jugais do grupo de animais submetidos à mucosite oral por radioterapia associada à irritação mecânica constatou-se a presença de hiperemia e eritema acentuados, hemorragia, úlceras extensas e abscessos [3(1-3)] (Figura 16 e Tabela 1), com diferença significativa quando comparado ao grupo controle (normal), [0(0 - 0)] (Figura 16 e Tabelas 1) ou a animais submetidos apenas a radioterapia ou irritação mecânica [1(0 - 1)] e [0(0 - 2)] respectivamente (Figuras 16 e Tabela 1).

### **4.2. EFEITO DA RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA SOBRE OS ASPECTOS MICROSCÓPICOS DAS MUCOSAS JUGAIS DOS HAMSTERS**

Na análise microscópica das mucosas jugais do grupo de animais submetidos à mucosite oral por radioterapia associada à irritação mecânica constatou-se a presença de ingurgitamento vascular, infiltrado inflamatório acentuado, áreas hemorrágicas presentes, edema, abscessos e úlceras extensas, [3(1-3)] (Figura 16 e Tabela 1), significativamente diferente do grupo controle (normal), [0(0 - 1)] (Figura 16 e Tabela 1) ou dos animais

submetidos apenas a radioterapia ou irritação mecânica[1(0 - 2)] e [0(0 - 3)] respectivamente (Figuras 16 e Tabela 1).

**TABELA 1** - Efeito da radioterapia (RXT) e da irritação mecânica (IM) isoladas ou associadas entre si (RXT + IM) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters.

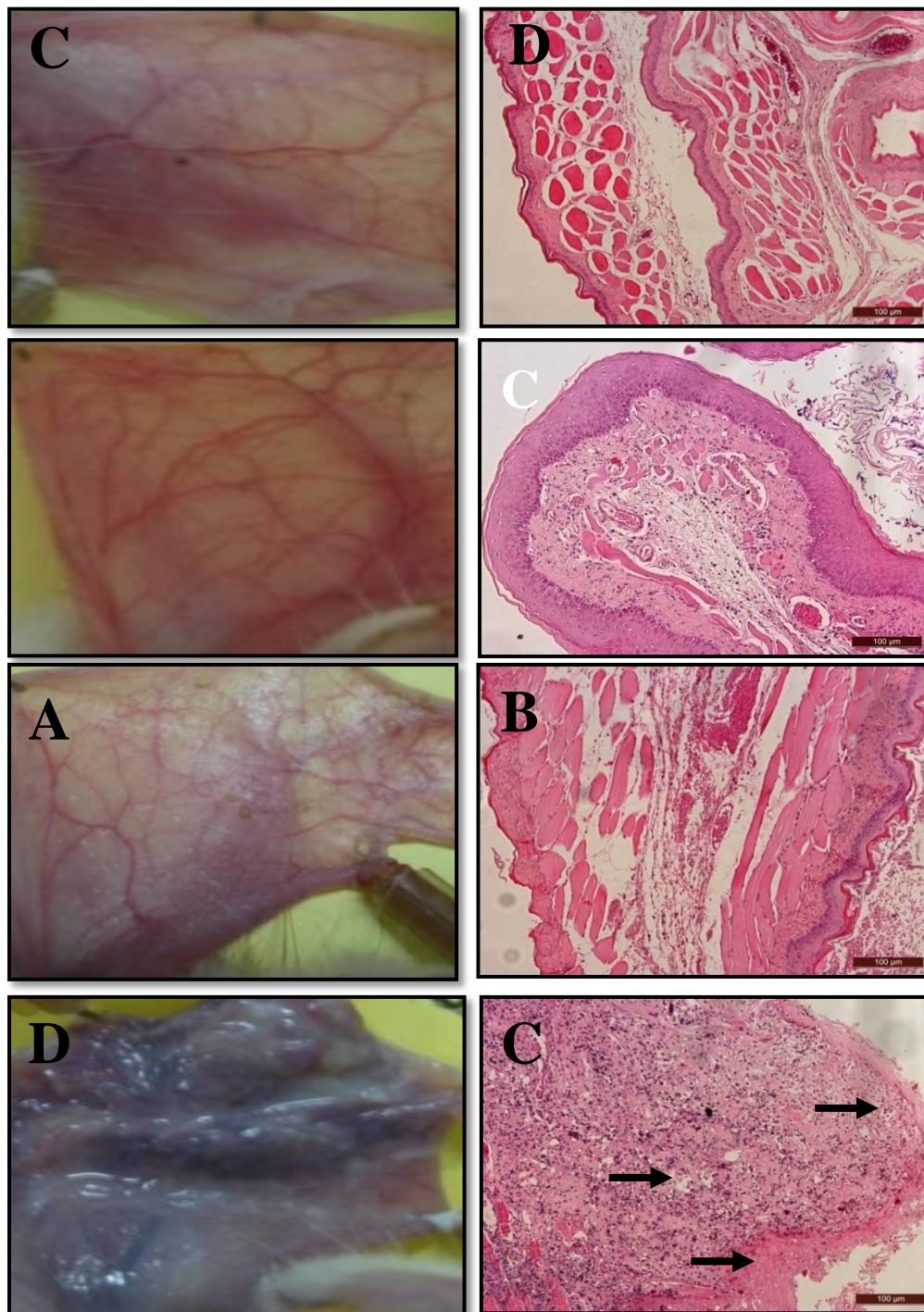
Grupos experimentais	Normal	RXT	IM	RXT + IM
<b>Análise macroscópica</b>	<b>0 (0 - 0)</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>0 (0 - 2)</b>	<b>3(1 - 3)<sup>#</sup></b>
<b>Análise microscópica</b>	<b>0 (0 - 1)</b>	<b>1 (0 - 2)</b>	<b>0 (0 - 3)</b>	<b>3(1 - 3)<sup>#</sup></b>

**RXT – radioterapia**

**IM – irritação mecânica**

**RXT + IM – radioterapia + irritação**

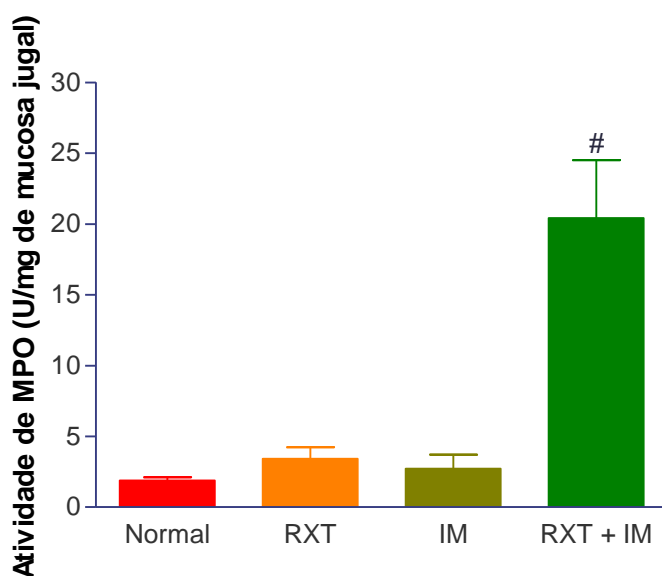
Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, dez hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de hiperemia, de eritema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. <sup>#</sup>p<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica, em relação aos animais normais (Kruskal-Wallis; Dunn).



**FIGURA 16-** Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos à radioterapia isolada (C e D) ou submetidos à irritação mecânica isolada (E e F) ou submetidos a radioterapia associada a irritação mecânica (G e H). Observa-se um quadro de processo inflamatório intenso, com acentuado infiltrado celular e úlceras extensa (setas) (Figuras G e H). Exame histopatológico corado pelo HE (100X).

### 4.3. EFEITO DA RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NAS MUCOSAS JUGAIS DE HAMSTERS

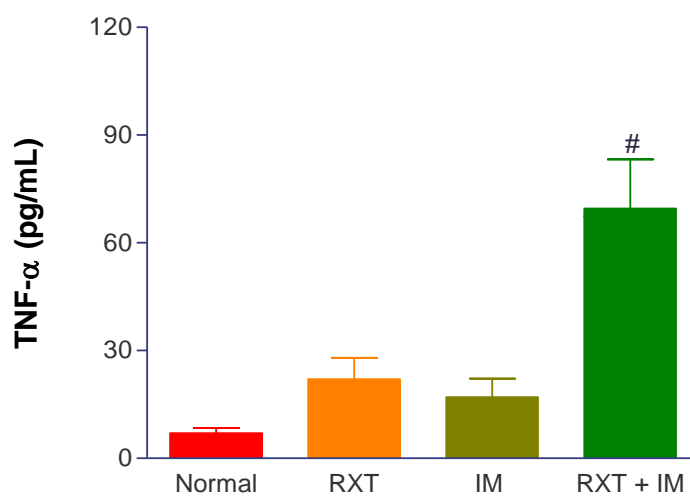
A figura 17 mostra que a associação entre RXT + IM nas mucosas jugais dos hamsters foi capaz de aumentar o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN), quantificados indiretamente através da atividade da enzima mieloperoxidase, quando comparado aos respectivos controles (animais normais, só RXT ou IM).

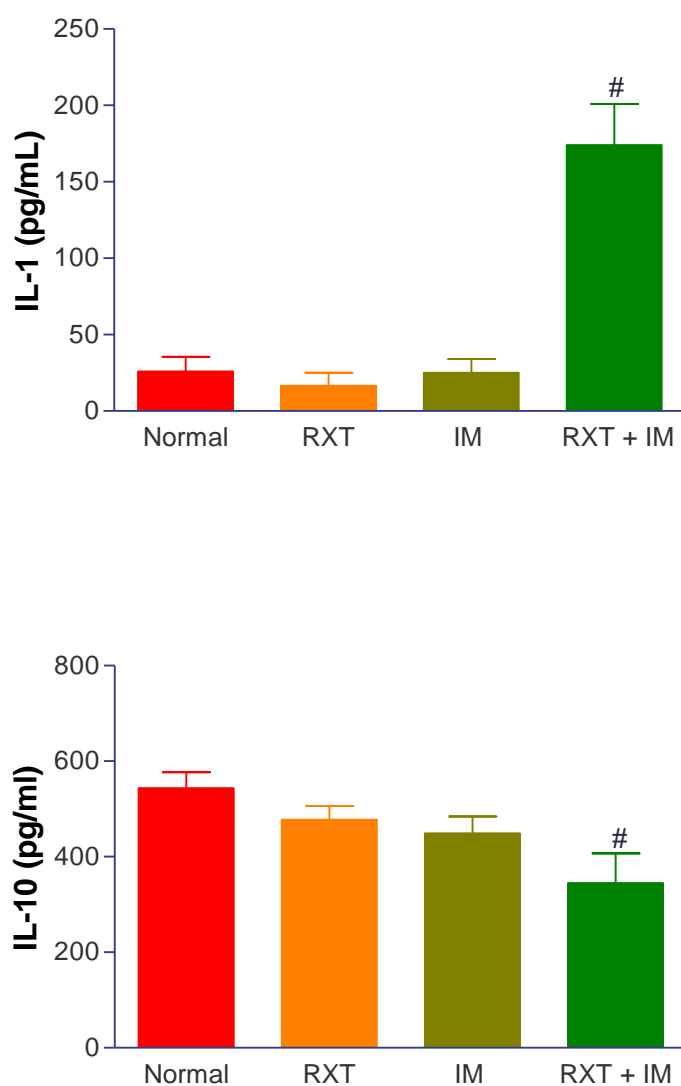


**FIGURA 17 - Dosagem da enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO  $\times 10^6$ /mg de mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM) e Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 10. # $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação aos grupos controle (Normal, RXT e IM) (Anova; Bonferroni).

#### 4.4. DOSAGEM DE CITOCINAS NO TECIDO DA MUCOSA JUGAL DE HAMSTERS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA

Na figura 18 observam-se as dosagens teciduais das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10. Os animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica apresentam um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da dosagem tecidual de TNF- $\alpha$  e IL-1, quando comparado com os animais normais e os somente submetidos à radioterapia ou irritação mecânica. Já, a dosagem tecidual da citocina antiinflamatória IL-10 encontra-se diminuída nesse grupo (RXT + IM).

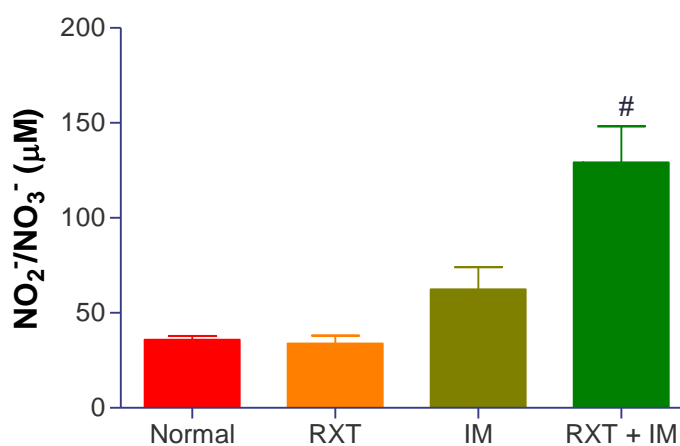




**FIGURA 18 - Dosagem dos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM) e Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 5. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal (Anova; Bonferroni).

#### 4.5. EFEITO DA RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA SOBRE A DOSAGEM DE NITRITO DAS MUCOSAS JUGAIS DE HAMSTERS

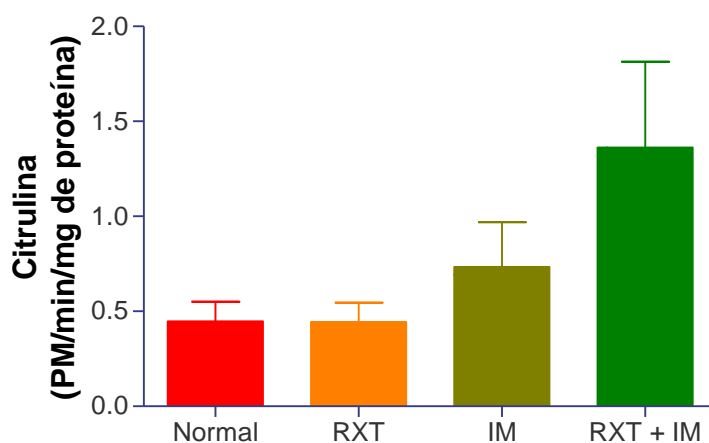
Na figura 19 observa-se que os níveis de nitrito encontrados nas mucosas jugais de animais submetidos à radioterapia e irritação mecânica estão significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo controle normal ou ao grupo submetido apenas a radioterapia ou irritação mecânica.



**FIGURA 19 - Dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{M}$ ) da mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM) e Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM). <sup>#</sup> $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos grupos controles (Normal, RXT e IM). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (Anova; Bonferroni).

#### 4.6. EFEITO DA RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA SOBRE A ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA MUCOSA JUGAL DE HAMSTERS

Na figura 20 a radioterapia associada à irritação mecânica resultou no aumento da atividade da NOS nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral experimental, quando comparado ao grupo controle normal e radioterapia isolada.



**FIGURA 20**–Dosagem da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM). As barras representam Média ± EPM da produção de citrulina (pmol/15 min/mg de proteína) na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM) e Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (ANOVA; Bonferroni).

## 4.7. EFEITO DO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

### 4.7.1. TRATAMENTO COM INIBIDOR DE CITOCINAS - PENTOXIFILINA

#### 4.7.1.1. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.

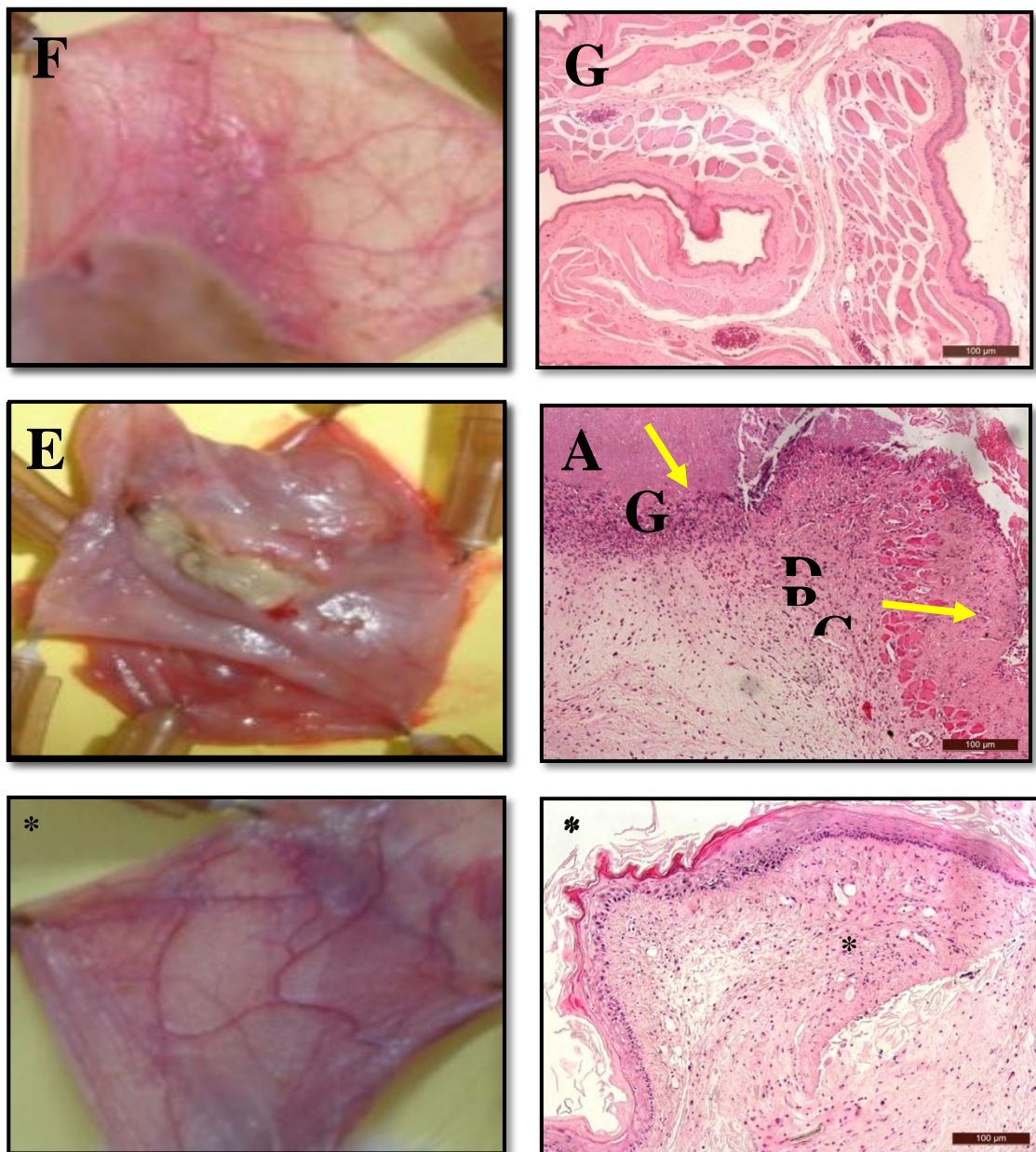
Os dados da tabela 3 representam o efeito da pentoxifilina na dose 15 mg/kg ou da solução salina a 0.9% sobre os achados macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais dos animais com mucosite oral. A pentoxifilina foi administrada via subcutânea, uma hora antes da radioterapia ou da irritação mecânica e diariamente por um período de 13 dias. A PTX na dose de 15 mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa ( $p < 0.05$ ) o quadro de mucosite oral tanto na avaliação macroscópica como na análise histopatológica com relação ao grupo de RXT + IM (Figura 21 e Tabela 2).

**TABELA 2 - Análise macroscópica e microscópica de mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica e tratados com pentoxifilina.**

Grupos experimentais	Normal	RXT + IM	PTX (15mg/kg)
Análise macroscópica	0(0 – 0)	3(3 – 3) <sup>#</sup>	1(0 – 1) <sup>*</sup>
Análise microscópica	0(0 – 1)	3(1 – 3) <sup>#</sup>	1(0 – 2) <sup>*</sup>

**RXT + IM : radioterapia + irritação mecânica    PTX: pentoxifilina**

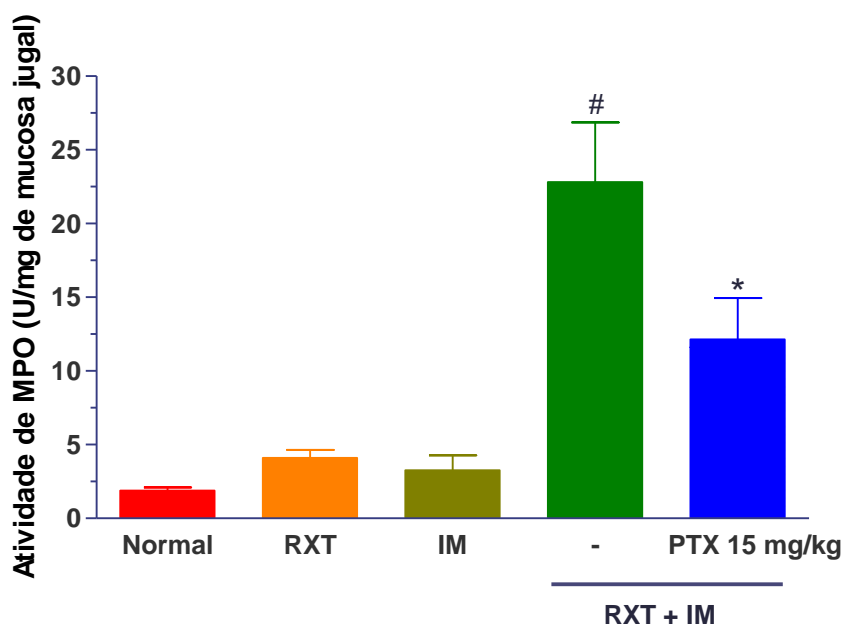
A mucosite oral foi induzida em hamsters através de irradiação e irritação mecânica. Os animais receberam PTX na dose de 15 mg/kg ou 0,5 ml de solução salina a 0,9% (salina) uma hora antes das irradiação ou irritação mecânica, diariamente, durante 13 dias. Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, 6 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 diferenças estatísticas em relação ao grupo Normal; <sup>\*</sup> $p < 0,01$  representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral, tratados com PTX, em relação aos animais não tratados - RXT + IM (Kruskal-Wallis; Dunn).



**FIGURA 21 - Aspectos macroscópicos e microscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A e B) ou submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM) e que receberam salina (C e D) ou pentoxifilina (PTX) na dose de 15 mg/kg (E e F).A mucosite oral foi induzida em hamsters através de radioterapia e irritação mecânica. Os animais receberam PTX na dose de 15 mg/kg ou 0,5 ml de solução salina a 0,9% (salina) uma hora antes das irradiação ou irritação mecânica, diariamente, durante 13 dias. Os asteriscos indicam infiltrado inflamatório e as setas amarelas indicam úlcera extensa. Exame histopatológico corado pela HE – 100X.**

#### 4.7.1.2. Efeito da pentoxifilina sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

A figura 22 mostra que a radioterapia associada à irritação mecânica nas mucosas jugais dos animais que receberam apenas solução fisiológica a 0,9% (salina), foi capaz de causar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos nas mucosas jugais dos animais, quantificados, indiretamente, no 13º dia, através da medida de atividade de suas enzimas mieloperoxidases, em comparação às quantidades dos animais do grupo controle, grupo de radioterapia ou irritação mecânica isolada. O tratamento com PTX na dose de 15mg/kg, reduziu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), o número de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos nas mucosas jugais dos animais, quantificados, indiretamente através da medida de atividade de sua enzima mieloperoxidase, quando comparadas às quantidades dessa enzima em animais do grupo salina, ou seja, submetidos à indução de mucosite oral.



**Figura 22 - Efeito da pentoxifilina na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO  $\times 10^6$ /mg de mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Pentoxifilina 15 mg/kg (PTX). # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos grupos controles (Normais, RXT e IM). \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais do RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

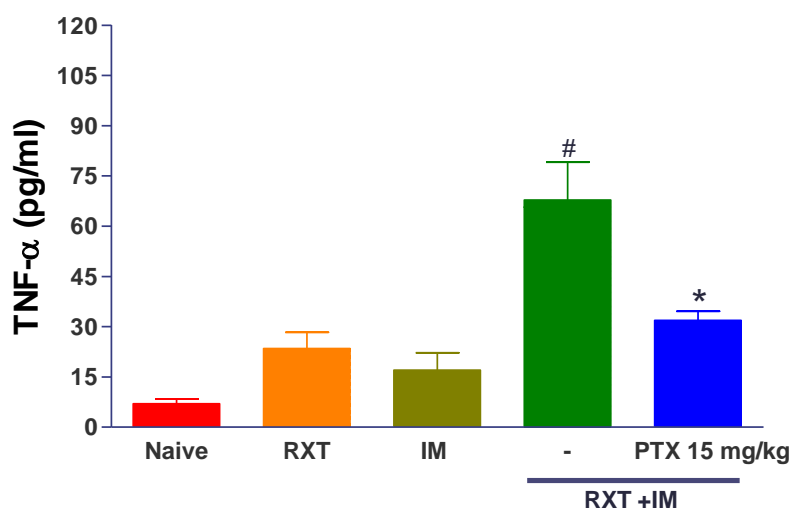
#### 4.7.1.3. Efeito da Pentoxifilina nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica por ensaio de imunoenzimático – Elisa.

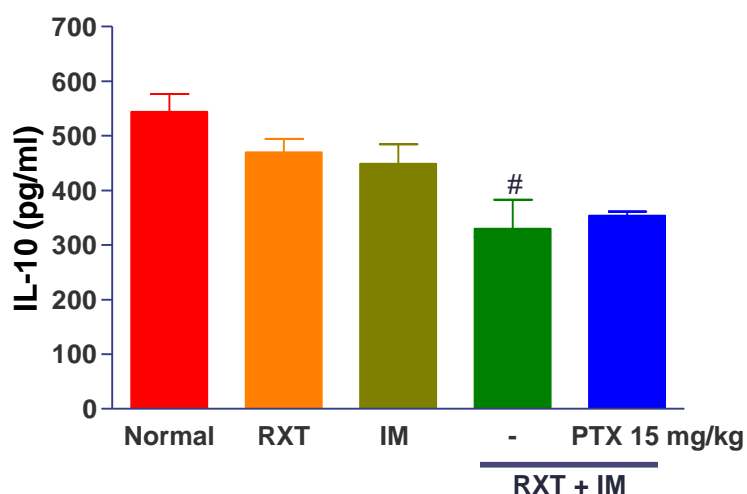
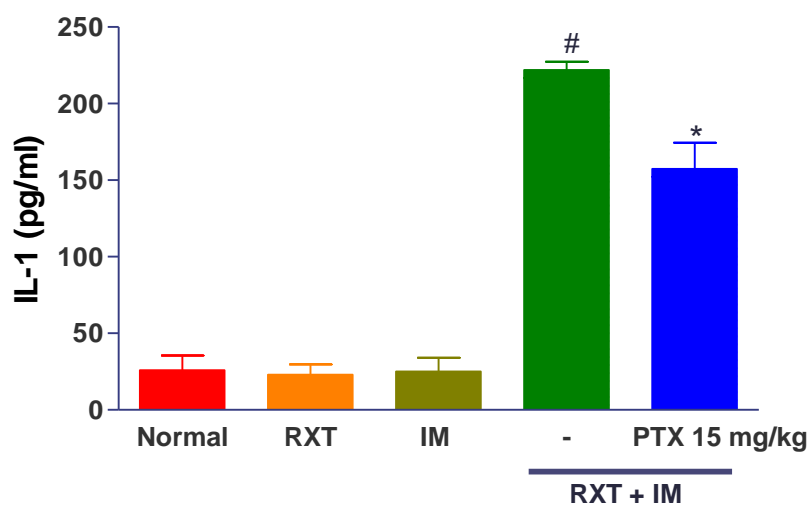
A produção de citocinas foi determinada através do conteúdo dessas citocinas no tecido da mucosa oral nos grupos controles e nos animais submetidos à RXT + IM.

Na figura 23 observa-se que os animais dos grupos controle (normal, irritação mecânica (IM) e radioterapia (RXT) isolados) apresentaram baixa dosagem tecidual de TNF- $\alpha$  e IL-1, enquanto os animais com mucosite oral experimental induzida por radioterapia e irritação mecânica, apresentaram alta dosagem tecidual de TNF- $\alpha$  e IL-1.

A pentoxifilina, na dose de 15 mg/kg foi capaz de atenuar, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), o aumento de IL-1 e TNF- $\alpha$  induzidos pela radioterapia e irritação mecânica.

Por outro lado, a PTX não alterou os níveis de IL-10 de forma significativa.





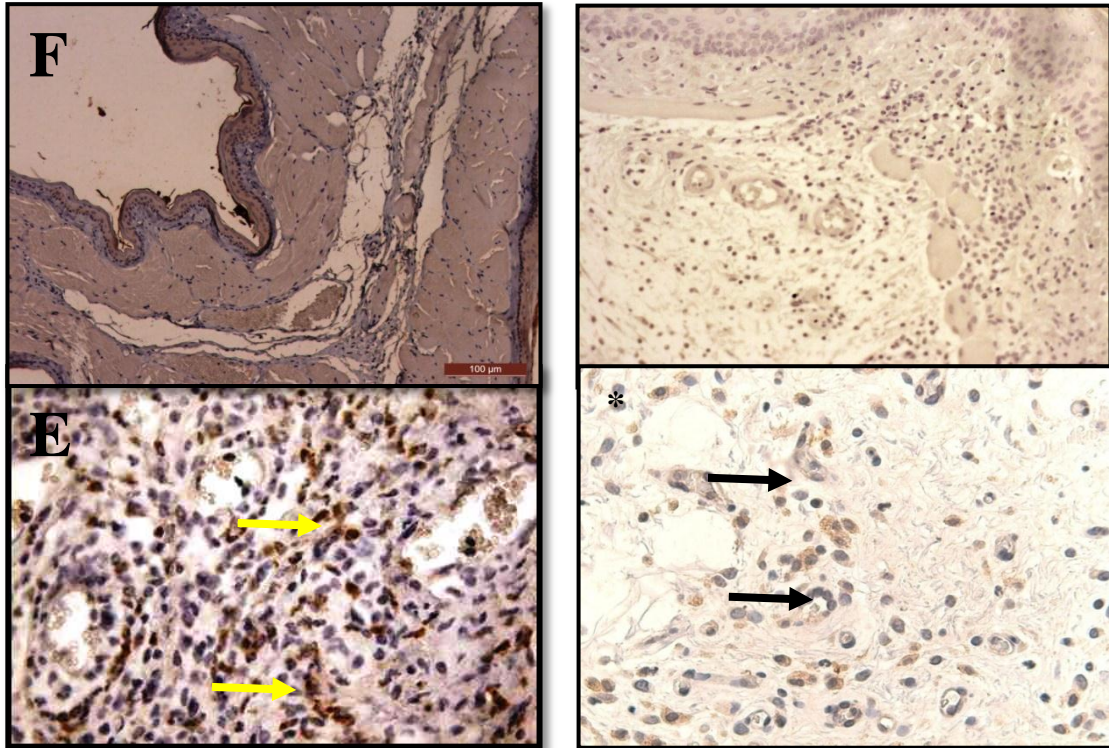
**FIGURA 23**–Efeito da pentoxifilina nos níveis teciduais de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM). As barras representam Média  $\pm$  EPM dos níveis de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Pentoxifilina 15 mg/kg (PTX). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 5. <sup>#</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup> $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Anova; Bonferroni).

#### **4.7.1.4. Efeito da pentoxifilina na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1) por imunohistoquímica na mucosa jugal de animais com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

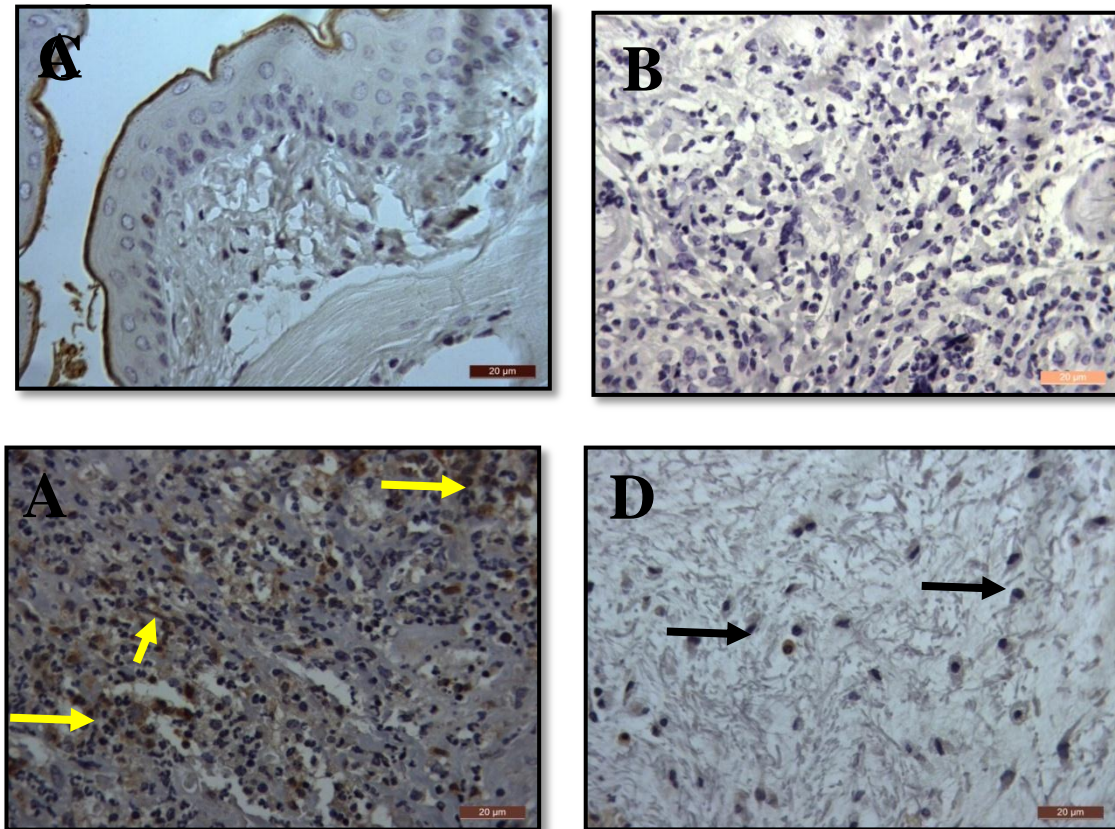
Nas figuras 24 e 25 observam-se os resultados do efeito da pentoxifilina na dose de 15 mg/kg nas marcações de TNF- $\alpha$  e IL-1 por imunohistoquímica da mucosa jugal de hamsters submetidos a radioterapia e irritação mecânica.

O tratamento com PTX reverteu o aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 na mucosa jugal nos animais submetidos a mucosite oral induzida por radioterapia.

As figuras 24C e 25C mostram a mucosa jugal de um animal submetido a mucosite oral, onde se vê fortes marcações de TNF- $\alpha$  e IL-1 ao nível das células mononucleares do tecido conjuntivo. Na fotomicrografia 24D e 25D pode-se observar uma redução acentuada tanto na marcação de TNF- $\alpha$  como IL-1 nas células do tecido conjuntivo dos animais tratados com PTX.



**FIGURA 24 - Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$ ) na mucosa jugal de hamsters: A - mucosa normal. B. mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ . C- mucosa com mucosite oral apresentando intensa marcação de TNF- $\alpha$  nas células do conjuntivo (setas). D- mucosa com mucosite oral tratada com PTX, mostrando redução acentuada da marcação de TNF- $\alpha$  na células mononucleares do tecido conjuntivo. Técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  (400X).**



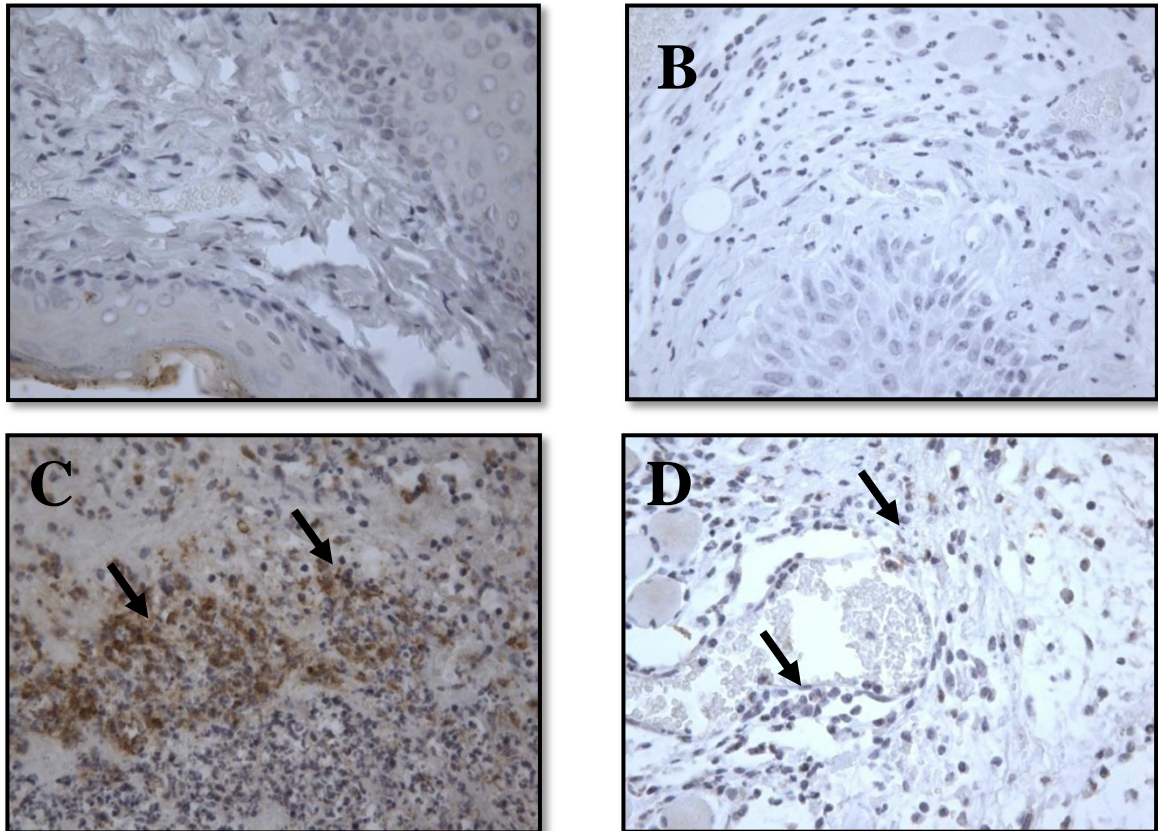
**FIGURA 25 - Fotomicrografias da marcação de citocinas (IL-1) na mucosa jugal de hamsters:**  
**A - mucosa normal. B. mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-IL-1. C- mucosa com mucosite oral apresentando intensa marcação de IL-1 nas células do conjuntivo (setas). D- mucosa com mucosite oral tratado com PTX, mostrando redução acentuada da marcação de IL-1 na células mononucleares do tecido conjuntivo. Técnica de imunohistoquímica para detecção de IL-1 (400X).**

#### **4.7.1.5. Efeito da pentoxifilina na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida na mucosa jugal de animais com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

Na figura 26 observa-se o resultado do efeito da pentoxifilina na dose de 15 mg/kg na marcação de NOSi pelo estudo imunohistoquímica da mucosa jugal de hamsters submetidos a radioterapia e irritação mecânica.

Observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para a enzima NOSi nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal e uma intensa marcação de NOSi ao nível do epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria do grupo submetido a radioterapia e irritação mecânica (fotomicrografia C), em relação à marcação observada na mucosa do animal do grupo controle normal, não submetido à mucosite oral.

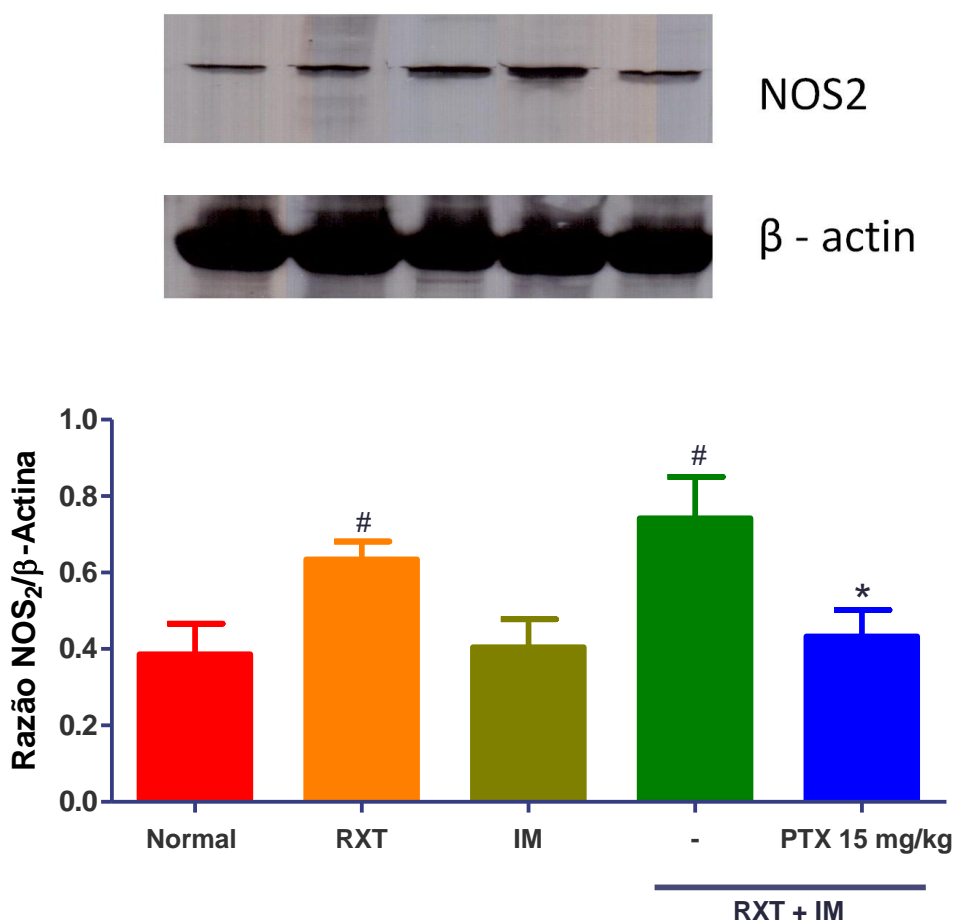
A pentoxifilina na dose de 15mg/kg foi capaz de reduzir, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para NOSi, quando comparado ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu solução salina 0.9% (salina). O controle negativo (A) representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi.



**Figura 26 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) na mucosa jugal de hamsters. A – mucosa normal. B - controle negativo que representa uma amostra de mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostra nenhuma marcação de NOSi. C - mucosa com mucosite ou submetido à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica sem tratamento. D – mucosa com mucosite oral tratada com PTX. Observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para a enzima NOSi nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal na fotomicrografia C. A pentoxifilina na dose de 15mg kg foi capaz de reduzir, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para NOSi (setas). Técnica de imunohistoquímica para detecção de IL-1 (400X).**

#### 4.7.1.6. Western blot para óxido nítrico sintase induzida na mucosa jugal de hamsters submetido à mucosite oral experimental induzida por radioterapia.

A expressão da enzima NOSi foi constatada na mucosa jugal do hamster submetido à mucosite oral experimental pelo método Western Blot. A figura 27 ilustra que a radioterapia associada à irritação mecânica aumenta significativamente a expressão de NOSi quando comparada com os grupos controle. A expressão da enzima na mucosa jugal dos animais tratados com pentoxifilina na dose de 15 mg/kg foi reduzida de forma significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparada com o grupo salina.



**FIGURA 27 - Efeito da pentoxifilina na expressão de óxido nítrico sintase induzida nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média ± EPM da razão NOS<sub>2</sub>/β-actina na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Pentoxifilina 15 mg/kg (PTX). O número de animais utilizados foi, no mínimo, 5. # $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao Normal; \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Anova; Bonferroni).

## **4.8. TRATAMENTO COM INIBIDOR DA ENZIMA NOSi (aminoguanidina)**

### **4.8.1. Análise Macroscópica**

A análise macroscópica das mucosas jugais do grupo de animais submetidos à mucosite oral por radioterapia que receberam apenas solução salina (grupo salina), no 13º dia, mostrou a presença de hiperemia e eritema acentuados, hemorragia, úlceras extensas e abscessos, recebendo escore e variação [3(1-3)] (Fig. 28; Tabela 3), significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle normal 0(0-0) (Fig. 28; Tabela 3).

O tratamento dos hamsters submetidos à mucosite oral com o inibidor da NOS, AG nas doses de 10,30 e 90 mg/Kg preveniu de forma significativa, os danos à mucosa oral causados pela radioterapia. A análise macroscópica das mucosas jugais desses animais mostrou redução de eritema e ausência de ulcerações e abscessos, observados no 13º do experimento (Fig. 28; Tabela 3).

### **4.8.2. Análise Microscópica**

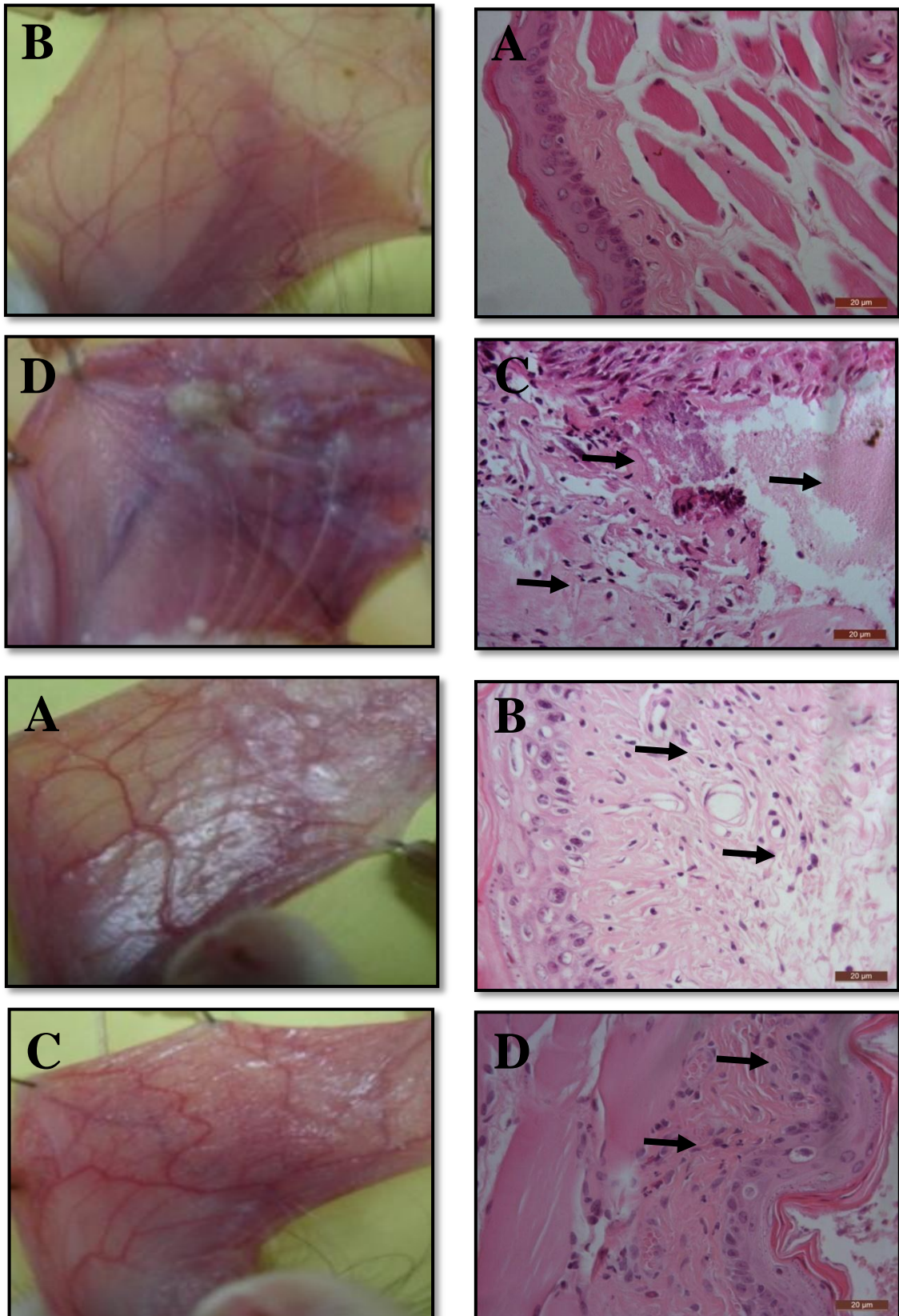
A avaliação histopatológica das mucosas jugais do grupo salina revelou a presença de acentuado infiltrado celular, com predominância de neutrófilos, vasodilatação acentuada, hemorragia, edema e úlceras extensas (Fig. 28), recebendo escore e variação de 3(1-3) (Tab. 3), significativamente diferente ao atribuído ao grupo controle normal 0(0-1); (Fig. 28; Tabela 3).

O tratamento com AG nas doses de 10, 30 e 90mg/Kg (Fig 28; Tab. 3) reduziu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a infiltração de células inflamatórias, presença de hemorragia e edema e preveniu a formação de úlceras e abscessos.

**TABELA 3** - Efeito da aminoguanidina (AG) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (avaliação por escores).

Grupos experimentais	Normal	RXT + IM	AG10	AG30	AG90
<b>Análise macroscópica</b>	<b>0(0 – 0)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>1(0 – 3)<sup>*</sup></b>	<b>1(0-2)<sup>*</sup></b>	<b>1(1 – 3)<sup>*</sup></b>
<b>Análise microscópica</b>	<b>0(0 – 1)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>2(1 – 3)<sup>*</sup></b>	<b>2(1 – 2)<sup>*</sup></b>	<b>2(1 – 3)<sup>*</sup></b>

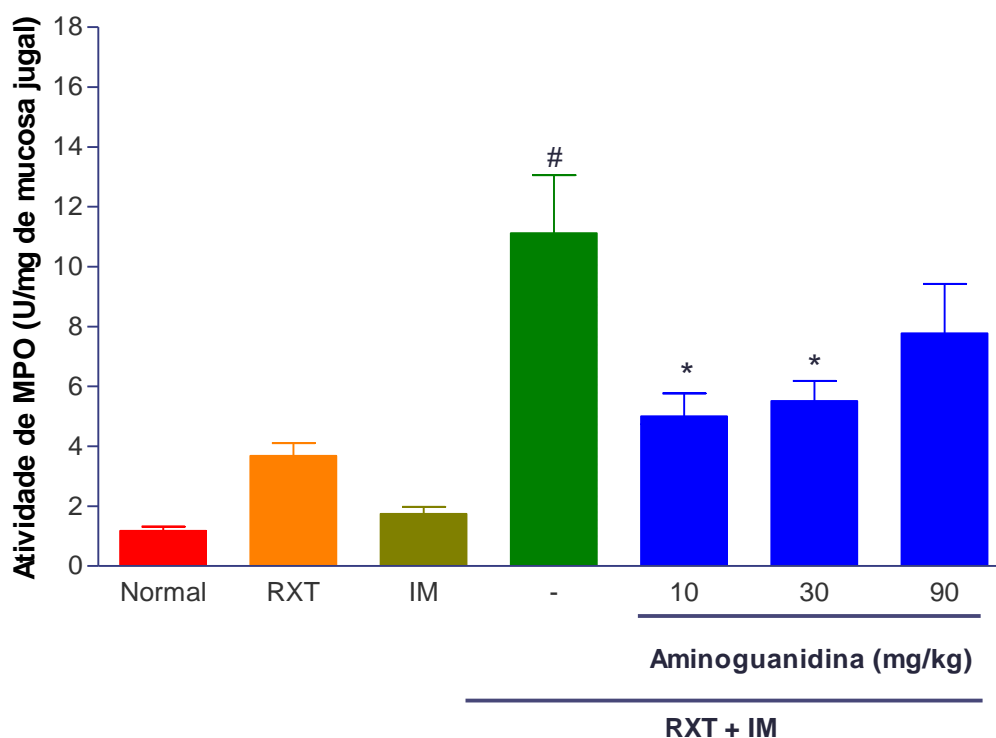
A mucosite oral foi induzida em hamsters através de radioterapia e irritação mecânica (RXT +IM). Os animais receberam aminoguanidina (AG) nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg ou 0,5 ml de solução salina a 0,9% (grupo salina) uma hora antes da irradiação ou irritação mecânica, diariamente, durante 13 dias. Os dados representam mediana e variação de, pelo menos, 10 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Kruskal-Wallis; Dunn).



**FIGURA 28** - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de hamsters normal (A e B); submetidos à radioterapia e irritação mecânica (C e D); tratados com aminoguanidina nas doses de 30 mg/kg (E e F), 90 mg/kg (G e H). As setas indicam o processo inflamatório. Coloração por HE - 100X.

#### 4.8.3. Efeito da aminoguanidina sobre a atividade de mieloperoxidase nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral experimental.

A atividade da enzima mieloperoxidase nas mucosas jugais do grupo de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia (salina), encontra-se significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ), no 13º dia do experimento, em comparação ao grupo controle normal ou ao grupo submetido apenas a radioterapia (RXT) ou irritação mecânica (IM). O tratamento com aminoguanidina nas doses de 10 mg/Kg e 30 mg/Kg reduziu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a atividade dessa enzima quando comparados ao grupo salina.

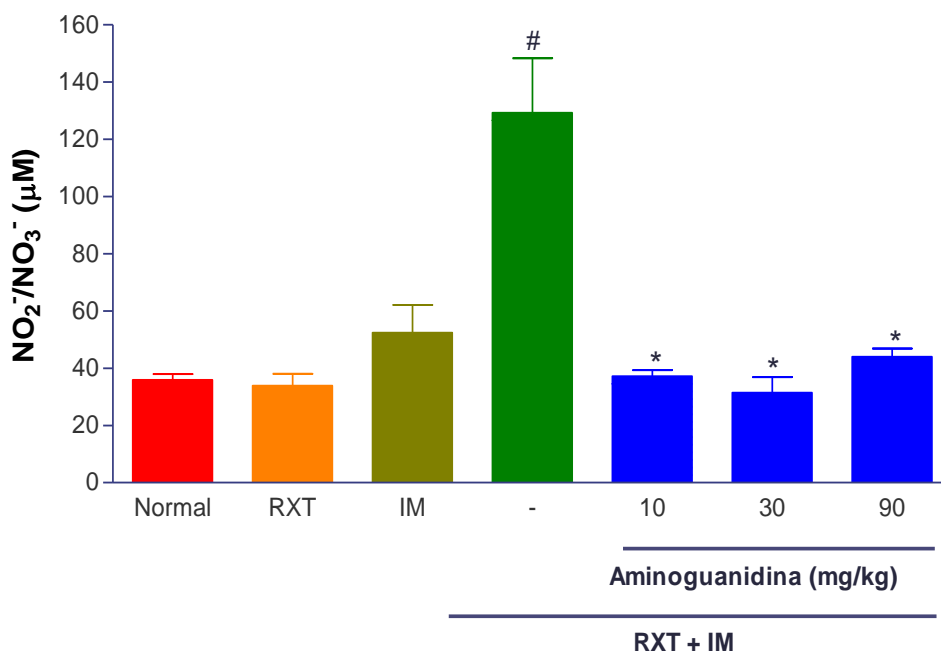


**FIGURA 29 - Efeito do inibidor da NOS, aminoguanidina, na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).**

As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO  $\times 10^6$ /mg de mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aminoguanidina nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg. # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos grupos controles (Normais, RXT e IM), \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais do RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, dez (Anova; Bonferroni).

#### 4.8.4. Efeito da aminoguanidina sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

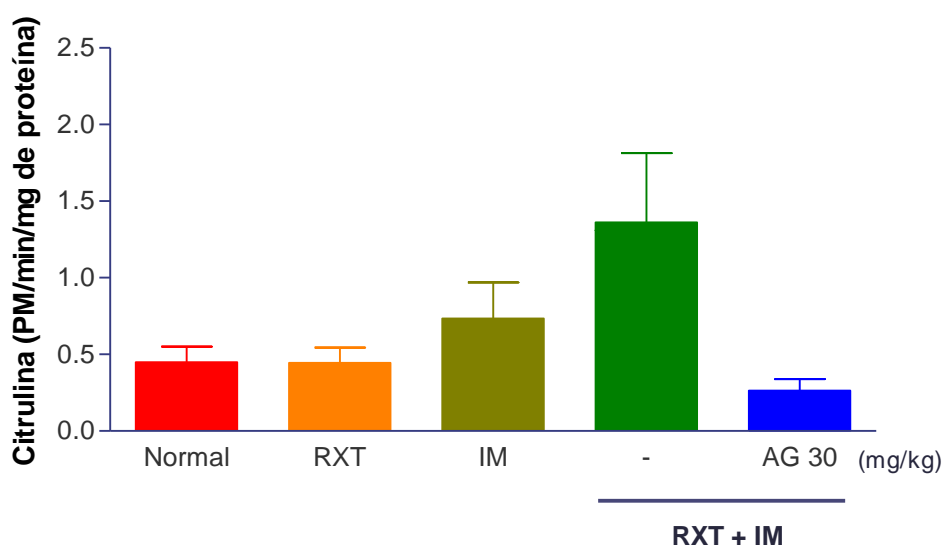
Os níveis de nitrito encontrados nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (salina), encontram-se significativamente aumentados ( $p < 0.05$ ), em comparação ao grupo controle normal (controle), grupo de radioterapia (RXT) e irritação mecânica (IM) isolada. O tratamento diário com aminoguanidina nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg reduziu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), os níveis de nitrito nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral experimental comparados ao grupo salina (Figura 28).



**FIGURA 30 - Efeito da aminoguanidina sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{M}$ ) da mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aminoguanidina nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg. #  $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos grupos controles (Normal, RXT e IM), \*  $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais do RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (Anova; Bonferroni).

#### 4.8.5. Efeito da aminoguanidina sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

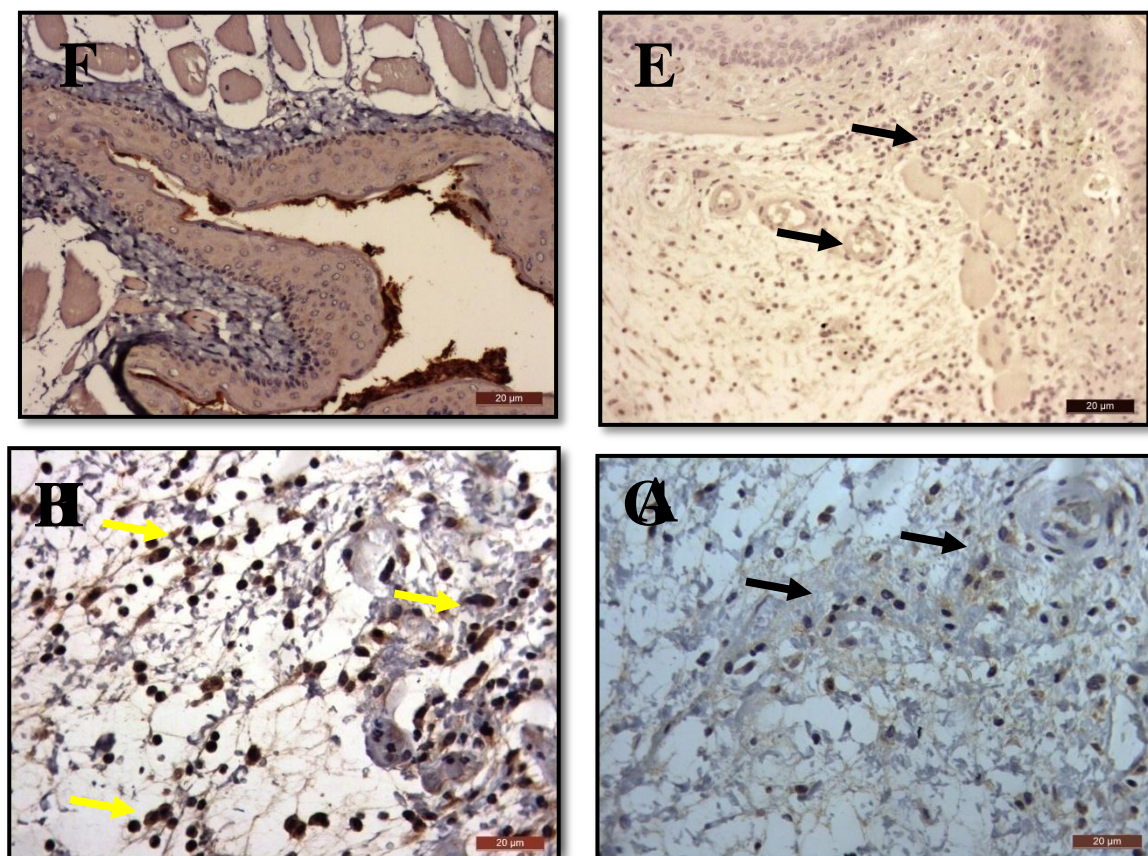
A radioterapia associada à irritação mecânica mostrou uma tendência no aumento da atividade da NOS, nas mucosas jugais dos animais que receberam solução salina (solução fisiológica a 0,9%), quando comparado aos grupos controle, radioterapia e irritação mecânica. O tratamento diário com aminoguanidina (AG) na dose de 30 mg/kg também não reduziu de forma significativa a atividade da NOS, em relação ao grupo de radioterapia associada a irritação mecânica (Figura 31).



**FIGURA 31 - Efeito da aminoguanidina na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da produção de citrulina (pmol/15 min/mg de proteína) na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aminoguanidina (AG) 30 mg/kg. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (ANOVA; Bonferroni).

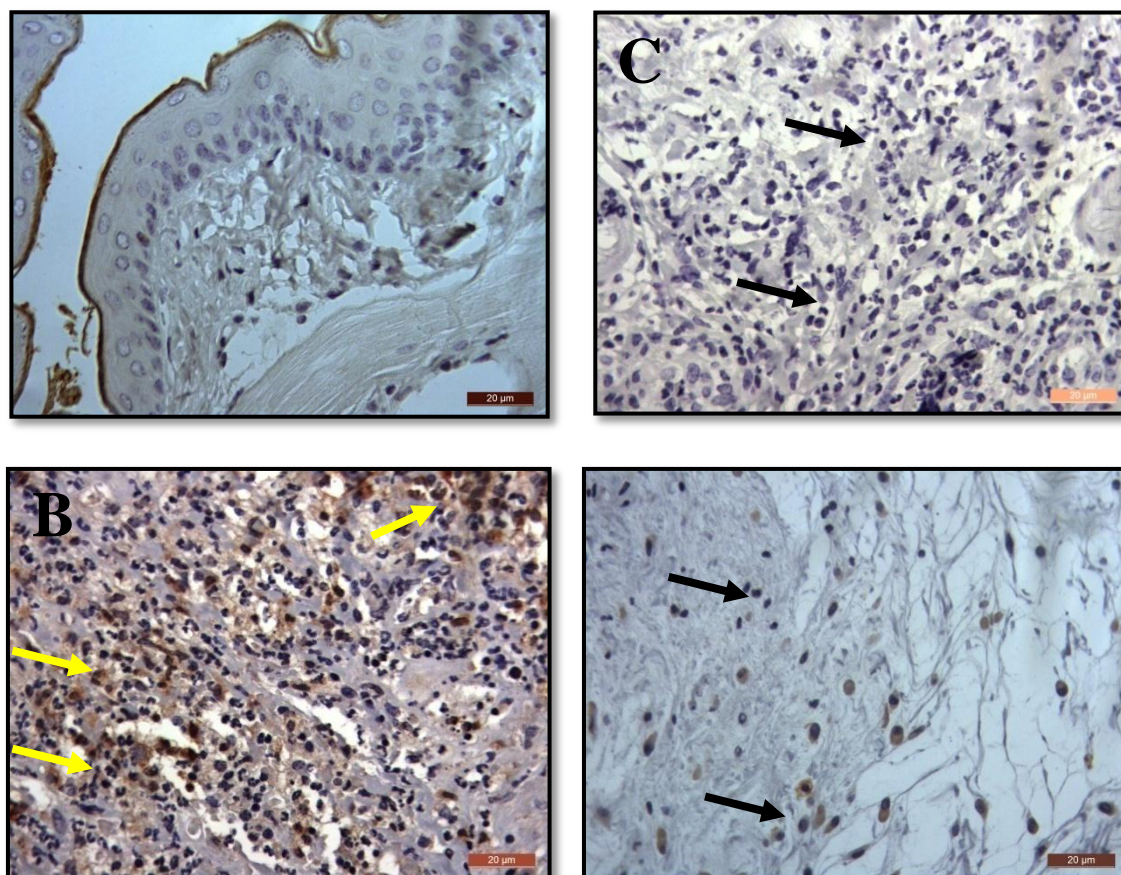
#### **4.8.6. Efeito da aminoguanidina na marcação por imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ e IL-1.**

Nas figuras 32 e 33 observa-se o efeito da aminoguanidina na marcação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pelo estudo imunohistoquímico, da mucosa oral do hamster submetido à mucosite oral por radioterapia. Na fotomicrografia 32C observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para TNF- $\alpha$  nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster (setas) submetido à mucosite oral por radioterapia, em relação à marcação observada na mucosa do grupo controle normal (32A), não submetido à mucosite oral. O tratamento com aminoguanidina (Figura 32D) mostra uma redução evidente da marcação de TNF- $\alpha$  (setas) tanto ao nível do epitélio, como também, da lâmina própria, quando comparada à fotomicrografia 32C, a qual evidencia a mucosa de um animal submetido à mucosite oral por radioterapia com intensa marcação de TNF- $\alpha$  (setas). O controle negativo observado na fotomicrografia 32B mostra uma mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não houve nenhuma marcação de TNF- $\alpha$  (setas).



**FIGURA 32 -** Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters. A - mucosa normal. B -mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ . C - mucosa com mucosite oral tratado com salina. D - mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina. Setas indicam imunomarcção celular. Técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  (400X).

Na fotomicrografia 33 observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para IL-1 nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster (setas) submetido à mucosite oral por radioterapia (salina), em relação à marcação observada na mucosa do grupo controle normal, não submetido à mucosite oral. O tratamento com aminoguanidina (figura 33D) reduziu a marcação imunohistoquímica de IL-1 $\beta$ (setas), quando comparado ao grupo submetido à mucosite oral (Figura 32C) experimental que recebeu tratamento com salina (setas). O controle negativo observado na fotomicrografia 33B mostra uma mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não houve nenhuma marcação de IL-1(setas).

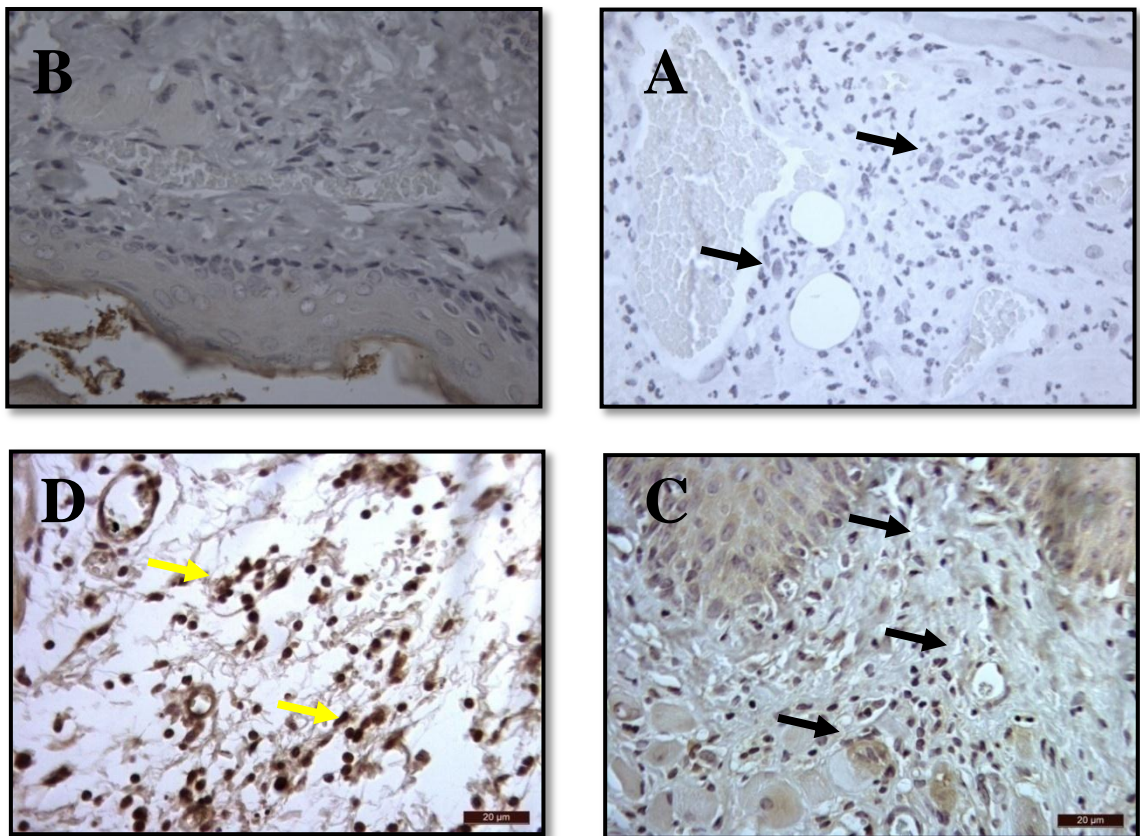


**FIGURA 33 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters. A - mucosa normal. B - mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-IL-1 $\beta$ . C - mucosa com mucosite oral tratado com salina. D - mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina. Setas indicam imunomarcção celular. Técnica de imunohistoquímica para detecção de IL-1 $\beta$ (400X).**

#### **4.8.7. Efeito da aminoguanidina na marcação imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (NOSi).**

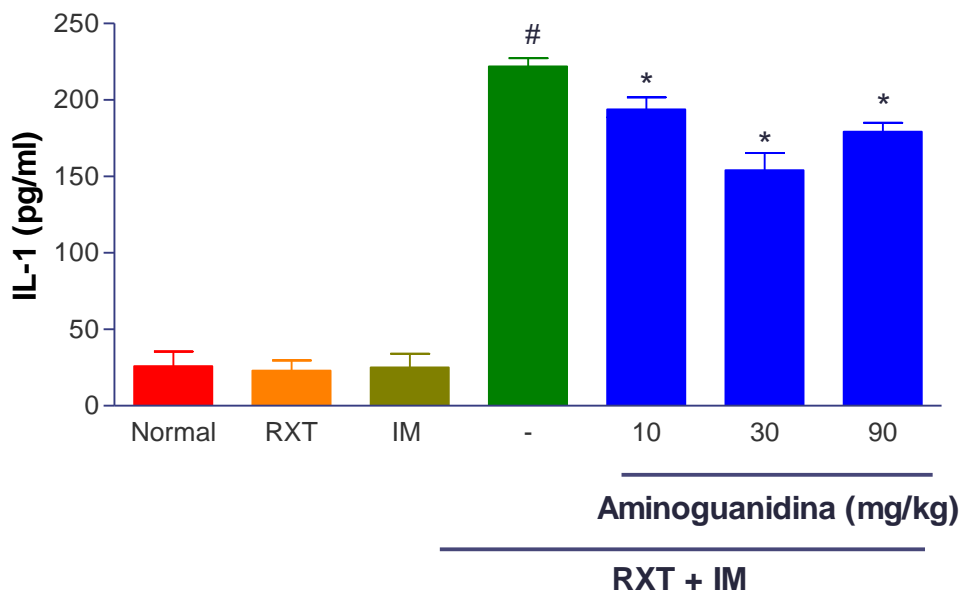
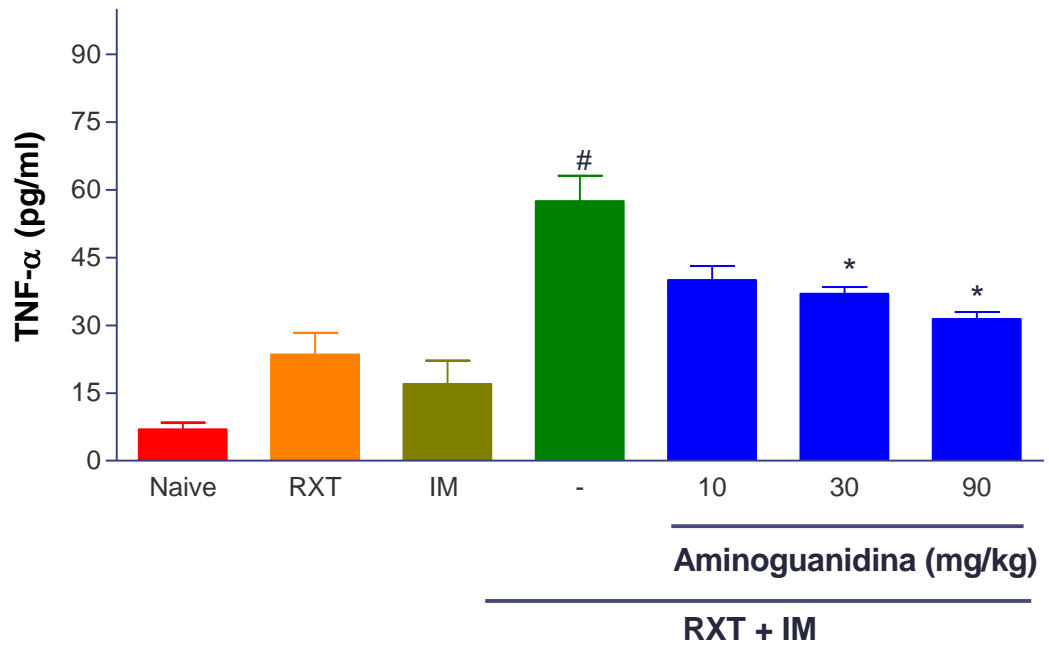
Na fotomicrografia 34C observou-se marcação imunohistoquímica acentuada para enzima NOSi (setas) nas células do tecido conjuntivo da mucosa jugal de hamster submetido à mucosite oral por radioterapia (salina), em relação à marcação observada na mucosa do grupo controle normal, não submetido à mucosite oral (figura 34A). O tratamento com aminoguanidina (figura 34D) reduziu a marcação imunohistoquímica para

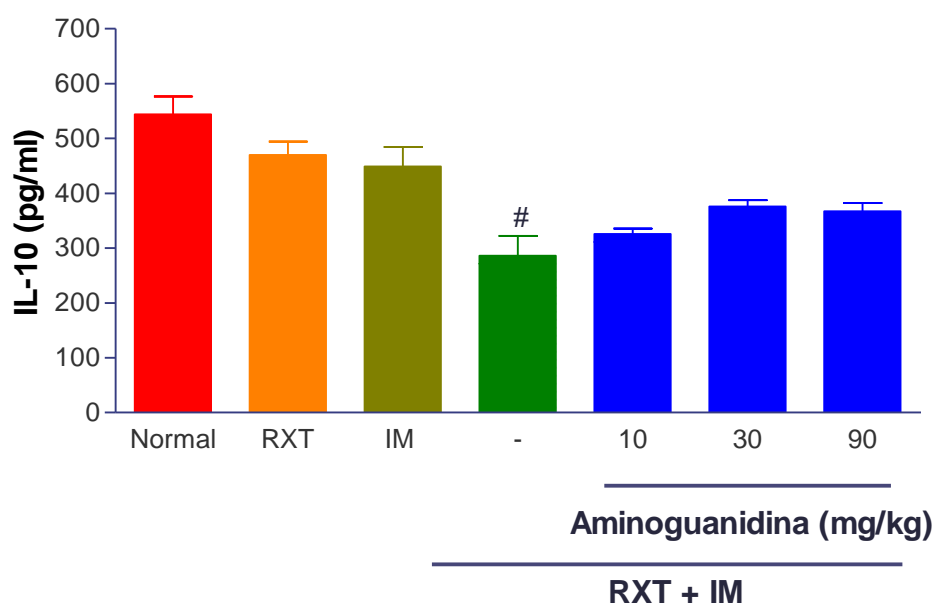
NOSi (setas), quando comparado ao grupo submetido à mucosite oral experimental que recebeu tratamento com salina (34C). O controle negativo observado na fotomicrografia 34B mostra uma mucosa jugal onde o anticorpo primário foi substituído pelo PBS-BSA 5% e não mostrou nenhuma marcação de NOSi (setas).



**FIGURA 34 - Fotomicrografias das mucosas jugais dos hamsters. A - mucosa normal. B - mucosa com mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica na ausência de anticorpo primário anti-NOSi. C - mucosa com mucosite oral tratado com salina. D - mucosa com mucosite oral tratado com aminoguanidina. Setas indicam imunomarcção celular. Técnica de imunohistoquímica para detecção de NOSi (400X).**

**4.8.8. Aminoguanidina reduz os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e IL-1 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**





**FIGURA 35 - Efeito do inibidor da NOS, aminoguanidina, nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aminoguanidina nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 5. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Anova; Bonferroni).

#### **4.9. EFEITO DOS FITOTERÁPICOS SOBRE A MUCOSITE ORAL INDUZIDA POR RADIOTERAPIA E IRRITAÇÃO MECÂNICA.**

##### **4.9.1. TRATAMENTO COM M. URUNDEUVA (EXTRATO DE AROEIRA)**

**4.9.1.1. Efeito do extrato de M. urundeava (aroeira) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

A tabela 5 demonstra o efeito do tratamento com o gel de M. urundeava nas concentrações de 5, 10 e 20% ou com gel inerte (controle) administrados topicamente nas mucosas jugais duas vezes ao dia e diariamente até o sacrifício. O tratamento com o gel de

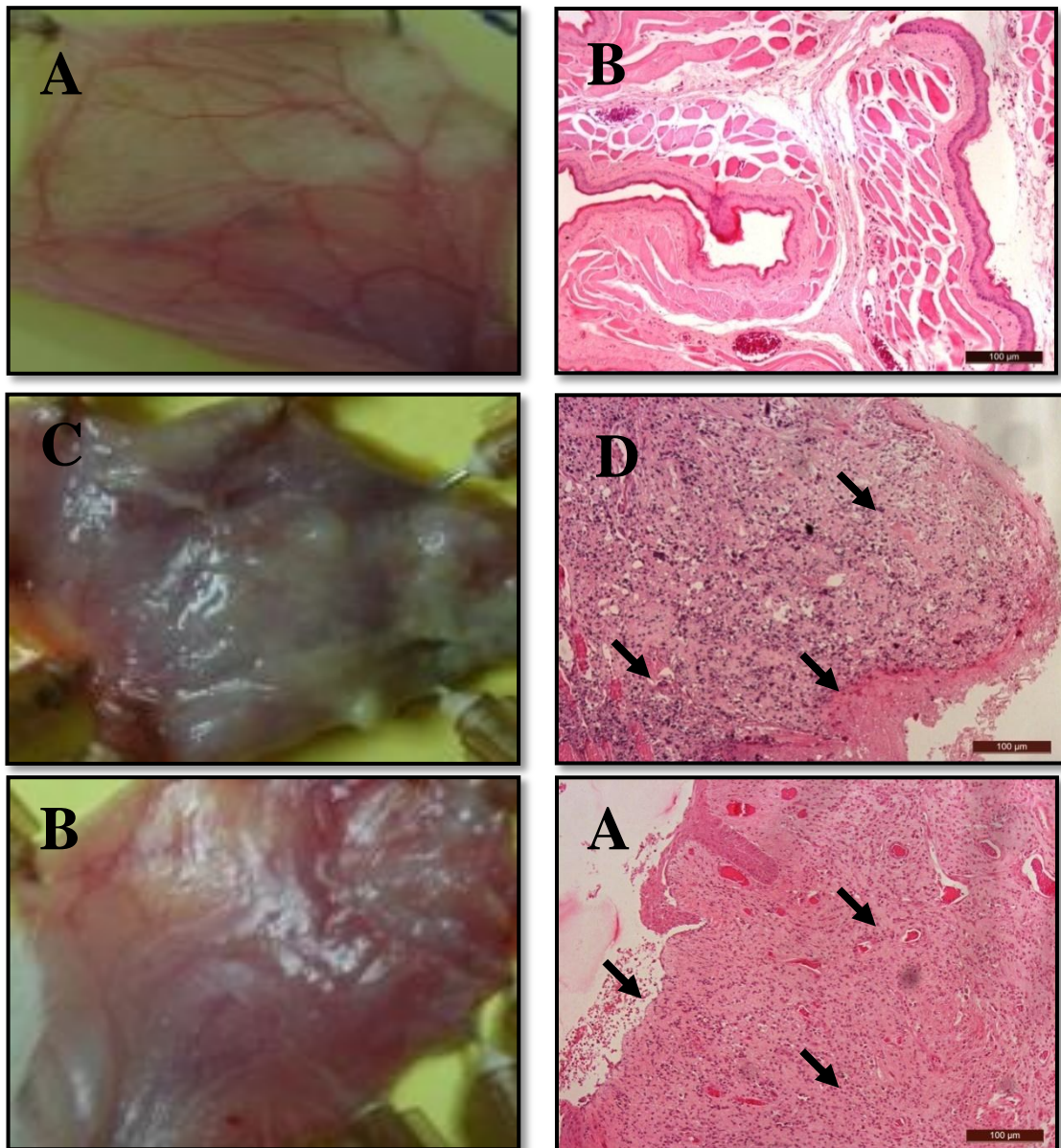
M. urundeuva não reduziu de forma significativa as alterações macroscópicas e histopatológicas relativas à mucosite oral experimental quando comparadas com os animais submetidos à mucosite e tratados com gel inerte (controle). Observa-se que a M. urundeuva não foi capaz de inibir a mucosite oral de forma significativa.

Na figura 36 observam-se os aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (A e B) e animais submetidos a tratamento com radioterapia e irritação mecânica seguido por: gel base (C e D); gel de M. urundeuva a 5% (E e F).

**TABELA 5 - Efeito da aroeira (AR) sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por radioterapia.**

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Normal</b>	<b>RT + IM</b>	<b>AR5%</b>	<b>AR10%</b>	<b>AR20%</b>
<b>Análise macroscópica</b>	<b>0(0 – 0)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>3(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>
<b>Análise microscópica</b>	<b>0(0 – 1)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>2,5(1 – 3)</b>	<b>2(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>

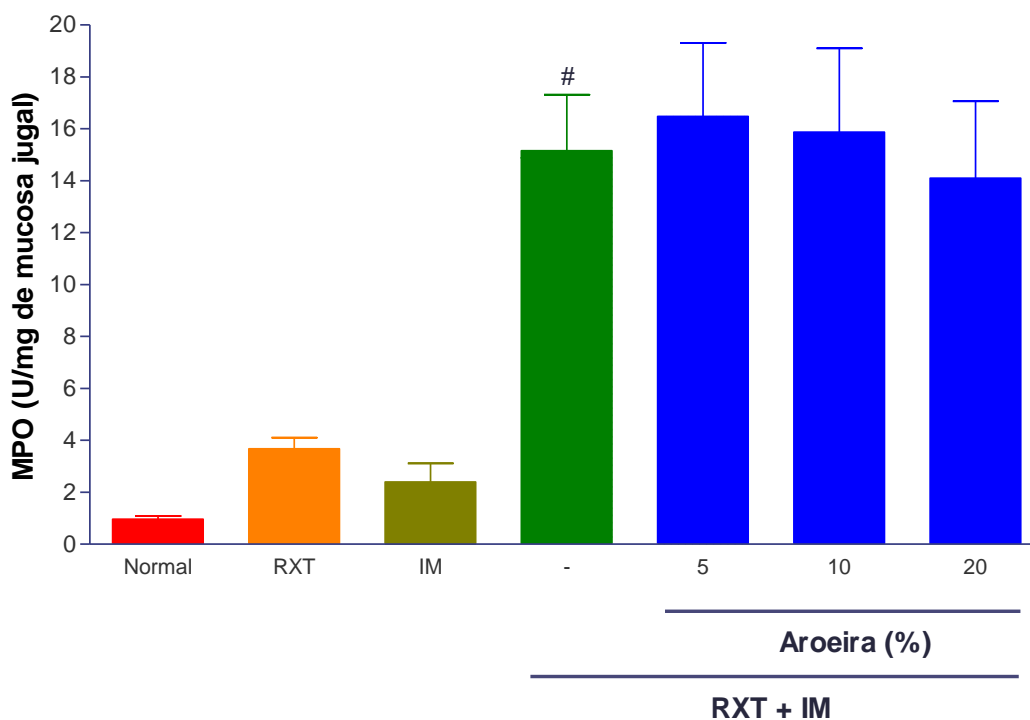
Os animais receberam gel de aroeira tópico nas concentrações de 5, 10 e 20% ou gel inerte (controle) duas vezes por dia até o 13º dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters.<sup>#</sup>p<0,05 em relação ao Normal (ANOVA; Bonferroni).



**FIGURA 36 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (A e B) e animais submetidos a tratamento com radioterapia e irritação mecânica seguido por: gel base (C e D); gel de aroeira a 5% (E e F). Na fotomicrografia D observa-se um quadro de processo inflamatório intenso, com acentuado infiltrado celular e extensa úlcera (setas). Na fotomicrografia F observa-se que ainda há um processo inflamatório importante, porém em fase de reparação (setas). Exame histopatológico corado pela HE - 100X.**

#### 4.9.1.2. Efeito da *M. urundeuva* (aroeira) sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral induzida por radioterapia.

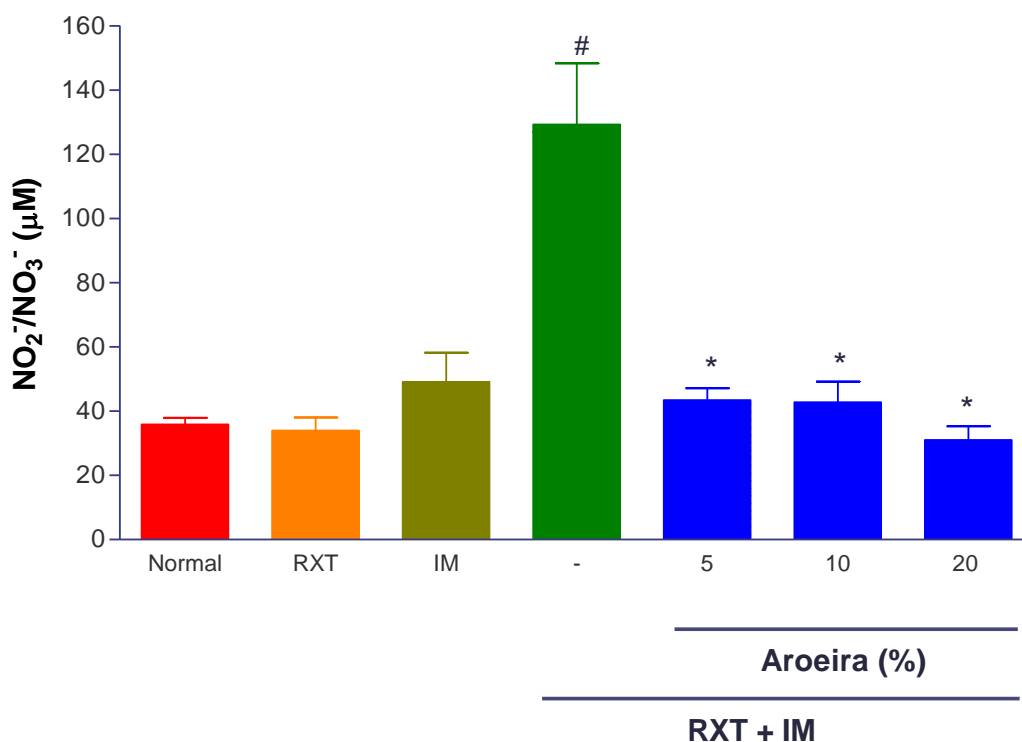
A figura 37 mostra que o tratamento com aroeira nas concentrações de 5, 10 e 20% não reduziu a intensidade da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral por radioterapia quando comparado aos animais do grupo salina.



**FIGURA 37 - Efeito da aroeira na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO  $\times 10^6$ /mg de mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aroeira 5, 10 e 20%. # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos grupos controles (Normais, RXT e IM). O número de animais utilizados foi, no mínimo, dez (Anova; Bonferroni).

#### 4.9.1.3. Efeito da *M. urundeuva* (aroeira) sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia.

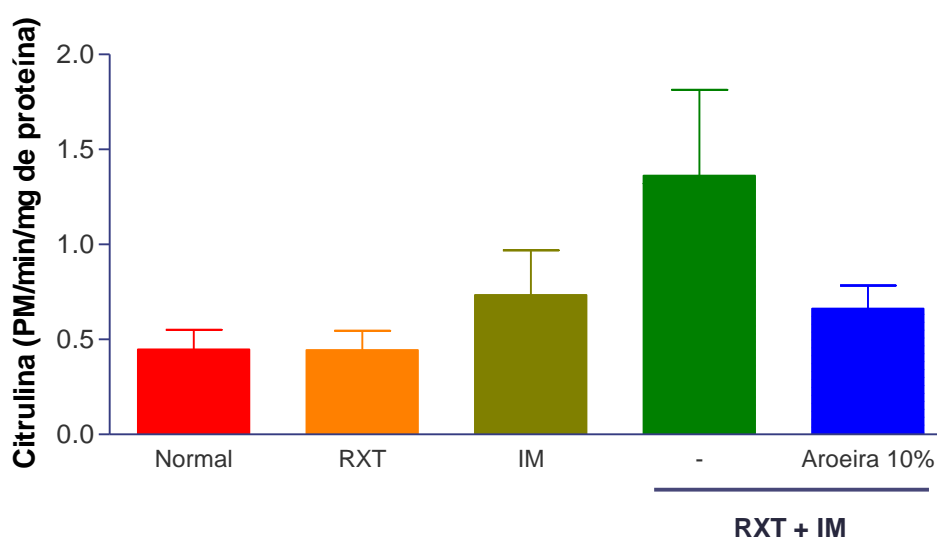
Pode-se observar na figura 38 que os níveis de nitrito encontrados nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia (salina) encontram-se significativamente aumentados em comparação ao grupo controle normal ou aos grupos submetidos somente a radioterapia ou irritação mecânica isolados. O tratamento com aroeira diariamente nas concentrações de 5, 10 e 20% reduziu, de forma significativa ( $p < 0,001$ ), os níveis de nitrito nas mucosas jugais de animais submetidos a mucosite oral experimental, possivelmente restabelecendo os parâmetros dos níveis de nitrito encontrados nos grupos de controles normal e radioterapia isolada.



**FIGURA 38 - Efeito da aroeira sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{M}$ ) da mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aroeira 5, 10 e 20%. # $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos grupos controles (Normal, RXT e IM), \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais do RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (Anova; Bonferroni).

#### 4.9.1.4. Efeito da *M. urundeuva* (aroeira) sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

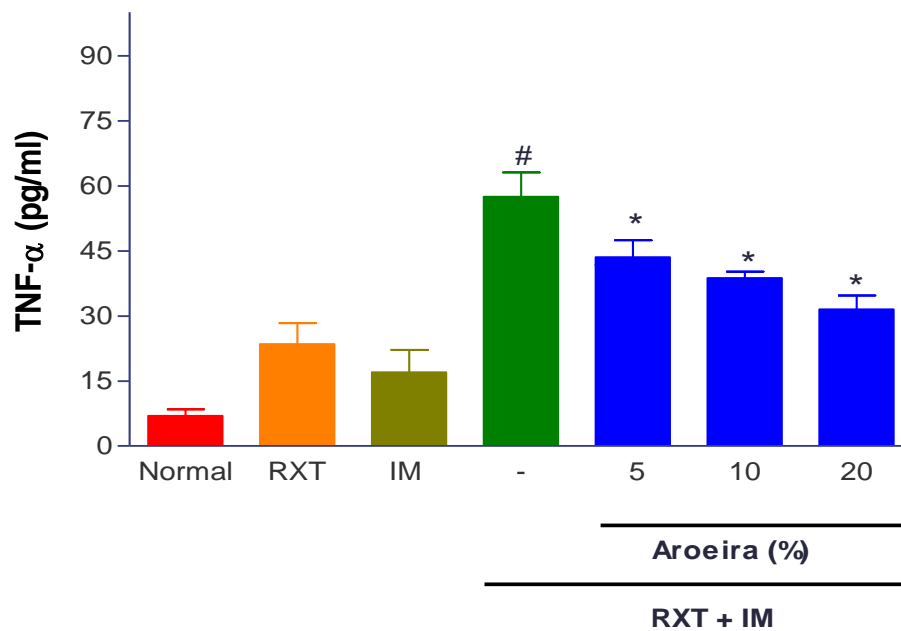
A figura 39 demonstra que o tratamento diário com aroeira na concentração de 10% não reduziu de forma significativa a atividade da NOS em relação ao grupo controle (salina).

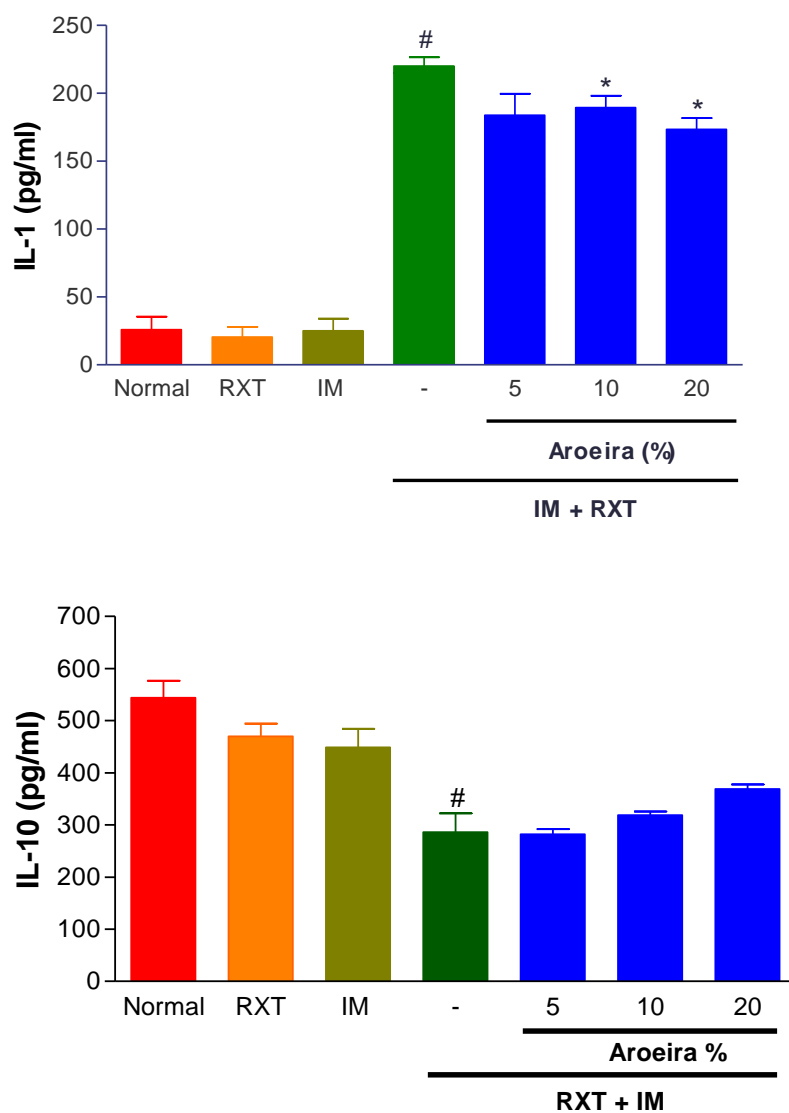


**FIGURA 39 - Efeito da aroeira na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da produção de citrulina (pmol/15 min/mg de proteína) na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aroeira 10%. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (ANOVA; Bonferroni).

**4.9.1.5. Efeito da *M. urundeuva* (aroeira) sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

O tratamento com aroeira nas concentrações de 5, 10 e 20% reverteu significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento de TNF- $\alpha$  na mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral por radioterapia. No entanto, o aumento de IL-1 só foi atenuado de forma significativa ( $p < 0,05$ ) com aroeira nas concentrações de 10 e 20%. IL-10 encontrava-se aumentado nos grupos tratados com aroeira.





**FIGURA 40 - Efeito da aroeira nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aroeira 5, 10 e 20%. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 3. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Anova; Bonferroni).

## 4.9.2. TRATAMENTO COM EXTRATO DE ALOE BARBADENSIS MILLER (ALOE VERA)

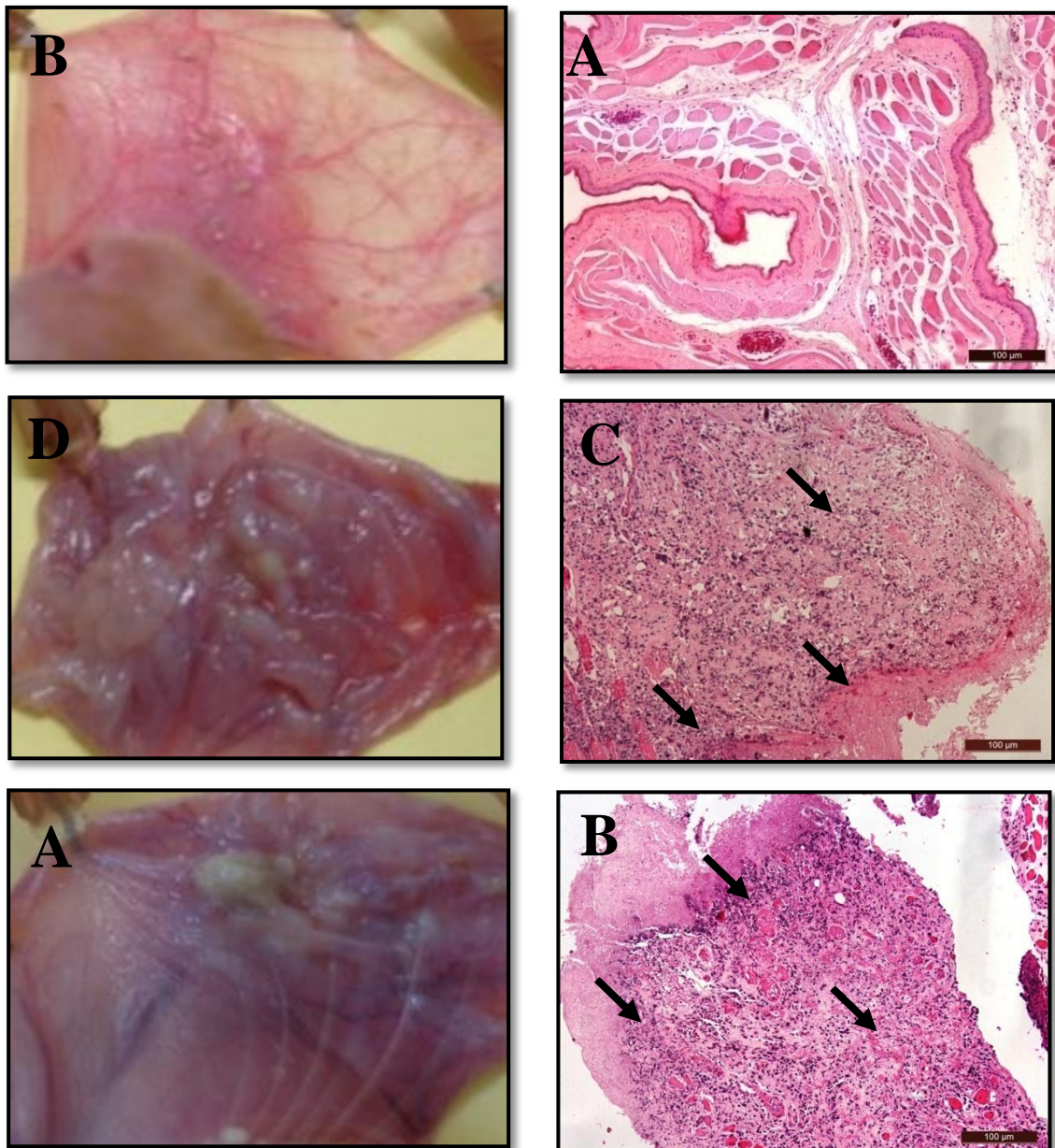
### 4.9.2.1. Efeito do Aloe barbadensis Miller (Aloe vera) sobre os aspectos macroscópicos e microscópicos observados na mucosite oral

A tabela 5 mostra o efeito do tratamento tópico com Aloe vera nas concentrações de 25, 50 e 100%, ou gel base inerte aplicado duas vezes ao dia na mucosa jugal até o 13º do protocolo. Observou-se que o Aloe vera não foi capaz de inibir a mucosite oral em relação aos animais tratados com gel inerte. No entanto, somente na concentração de 100% foi possível verificar algum grau de inibição na avaliação microscópica das mucosas jugais. Na figura 41 podem-se verificar os aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (figura 41A e B), animais submetidos à radioterapia tratados com gel inerte (figura 41C e D) e animais tratados com Aloe vera na concentração de 100% (figura 41E e F).

**TABELA 5 - Efeito do extrato de Aloe vera sobre as alterações macroscópicas e microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica.**

Grupos experimentais	Normal	RXT + IM	AV25%	AV50%	AV100%
<b>Análise macroscópica</b>	<b>0(0 – 0)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>3(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>
<b>Análise microscópica</b>	<b>0(0 – 1)</b>	<b>3(1 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>2(1 – 3)</b>	<b>3(1 – 3)</b>	<b>2(1 – 3)<sup>*</sup></b>

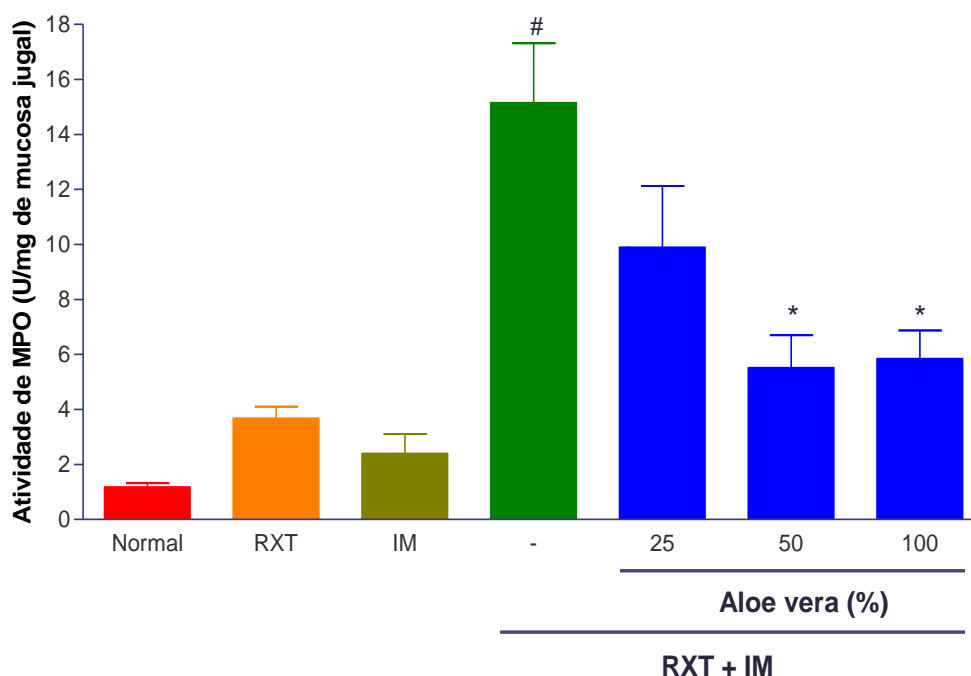
A mucosite oral foi induzida por radioterapia e irritação mecânica com auxílio de uma agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam gel de Aloe vera tópico nas concentrações de 25, 50 e 100% ou gel inerte (controle) duas vezes por dia até o 13º dia do experimento. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 10 hamsters. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo Radioterapia e Irritação mecânica (RXT + IM) (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).



**FIGURA 41 - Aspectos macroscópicos e microscópicos das mucosas jugais de animais normais (A e B) e animais submetidos a tratamento com radioterapia e irritação mecânica seguido por: gel base (C e D); gel de Aloe vera a 50% (E e F ).Na fotomicrografia D observa-se um quadro de processo inflamatório intenso, com acentuado infiltrado celular e extensa úlcera (setas). Na fotomicrografia F observa-se que ainda há um processo inflamatório importante, porém em fase de reparação (setas). Exame histopatológico corado pela HE – 100X.**

#### 4.9.2.2. Efeito do *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral induzida por radioterapia.

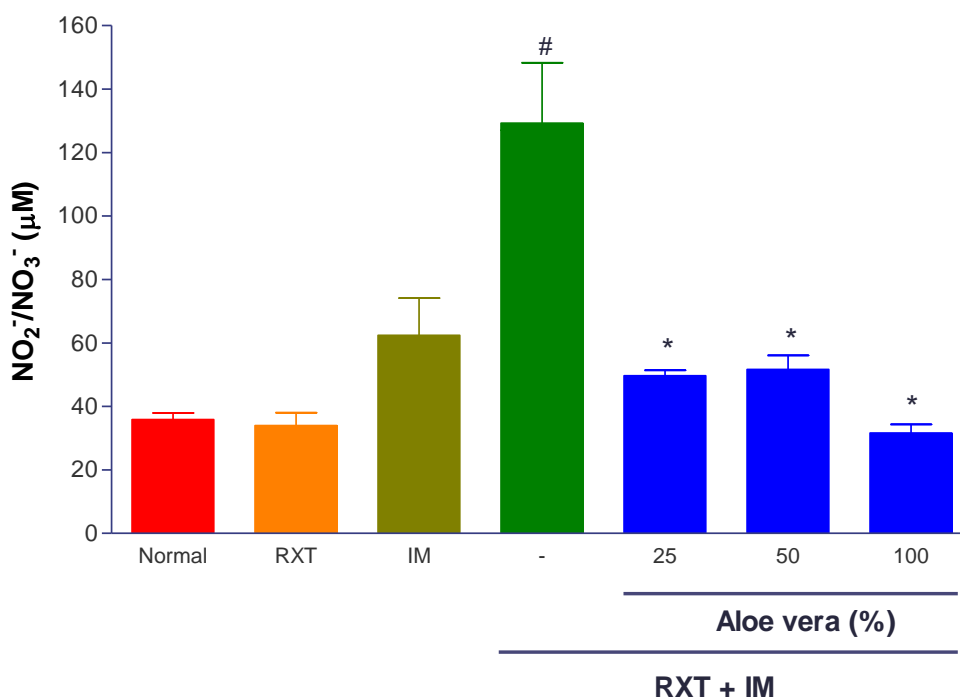
A figura 42 mostra que o tratamento com *Aloe vera* nas concentrações de 50 e 100% reduziu a intensidade da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas mucosas jugais dos animais submetidos à mucosite oral por radioterapia quando comparado aos animais do grupo salina.



**FIGURA 42 - Efeito da *Aloe vera* na atividade de mieloperoxidase (MPO) observadas na mucosite oral em hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da atividade de MPO  $\times 10^6$ /mg de mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e *Aloe vera* 25, 50 e 100%. # $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos grupos controles (Normais, RXT e IM); \* $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, dez (Anova; Bonferroni).

#### 4.9.2.3. Efeito do *Aloe barnadensis* Miller (*Aloe vera*) sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

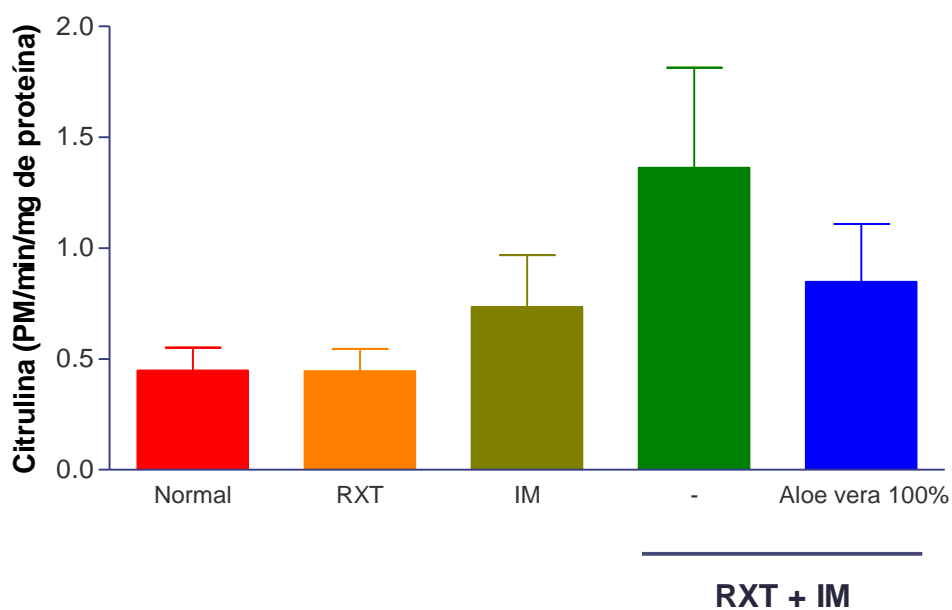
Pode-se observar na figura 43 que os níveis de nitrito encontrados nas mucosas jugais de animais submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia (salina) encontram-se significativamente aumentados em comparação ao grupo controle normal ou aos grupos submetidos somente a radioterapia ou irritação mecânica isolados. O tratamento com *Aloe vera* diariamente nas concentrações de 25, 50 e 100% preveniu, de forma significativa ( $p < 0,001$ ), o aumento dos níveis de nitrito nas mucosas jugais de animais submetidos a mucosite oral experimental, possivelmente restabelecendo os parâmetros dos níveis de nitrito encontrados nos grupos de controles normal e radioterapia isolada



**FIGURA 43 - Efeito do *Aloe vera* sobre a dosagem de nitrito nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da quantidade de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{M}$ ) da mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e *Aloe vera* 25, 50 e 100%. #  $p < 0,05$  representa diferenças estatísticas em relação aos grupos controles (Normal, RXT e IM), \*  $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação aos animais do RXT + IM. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (Anova; Bonferroni).

#### 4.9.2.4. Efeito do *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) sobre a atividade da NOS na mucosa jugal de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia

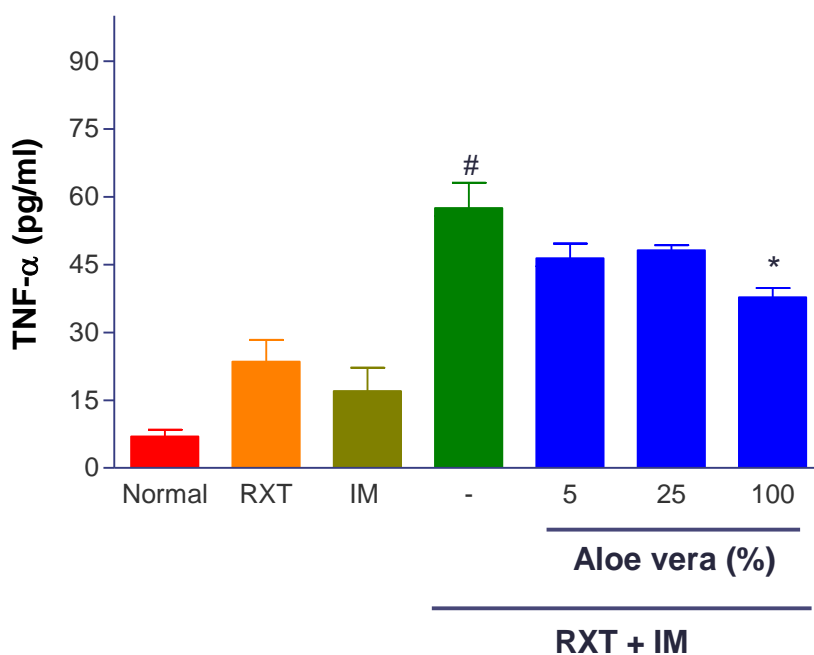
A figura 44 demonstra que o tratamento diário com *Aloe vera* na concentração de 100% não reduziu de forma significativa a atividade da NOS, em relação ao grupo controle salina.

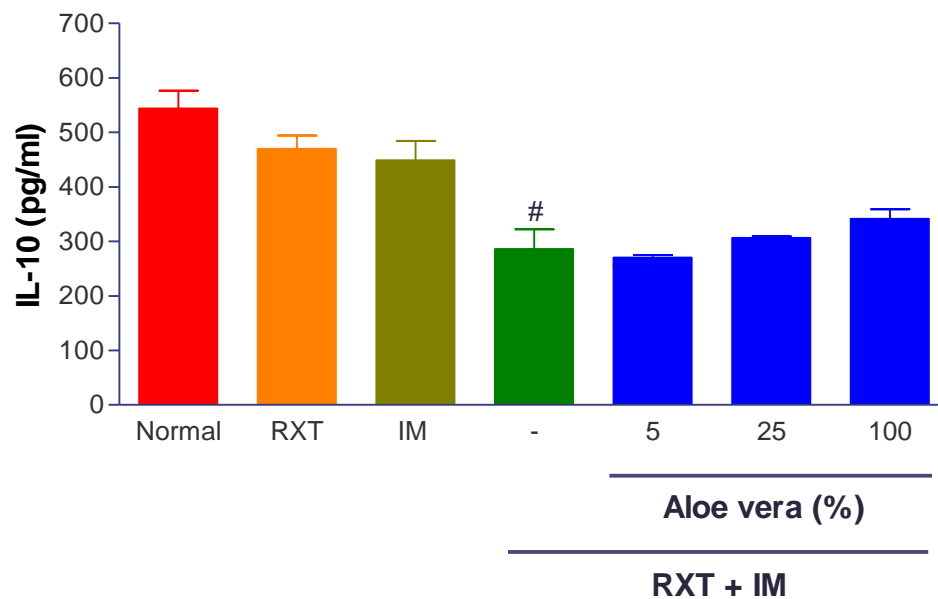
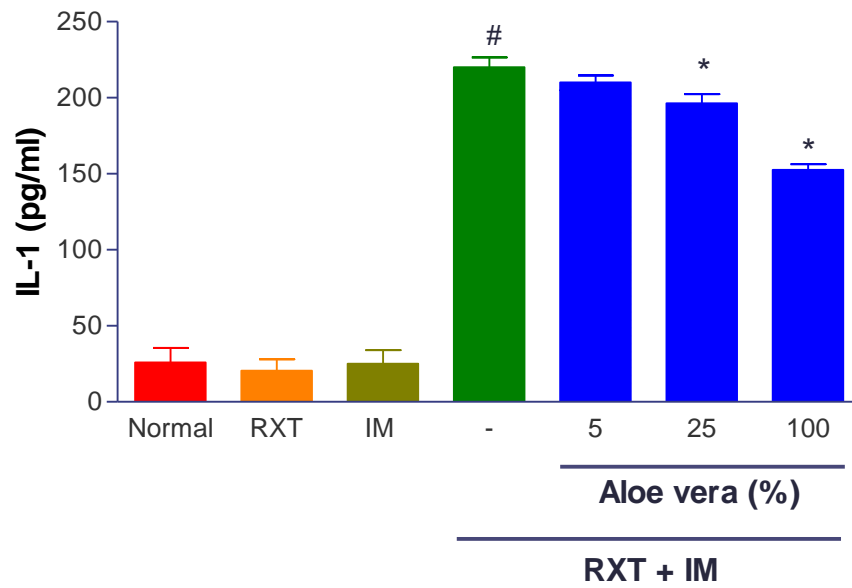


**Figura 44 - Efeito do *Aloe vera* na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) nas mucosas jugais dos hamsters induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM da produção de citrulina (pmol/15 min/mg de proteína) na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e *Aloe vera* 100%. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 6 (ANOVA; Bonferroni).

#### 4.9.2.5. Efeito do *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal dos hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica

O tratamento com *Aloe vera* na concentração de 100% reverteu significativamente ( $p < 0.05$ ) o aumento de TNF- $\alpha$  na mucosa jugal dos animais submetidos à mucosite oral por radioterapia. O aumento de IL-1 foi atenuado de forma significativa ( $p < 0,05$ ) com *Aloe vera* nas concentrações de 25 e 100%. O *Aloe vera* em todas as concentrações foi capaz de reduzir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o aumento de IL-10 com relação ao grupo controle normal.





**FIGURA 45 - Efeito do aloe vera nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 nas mucosas jugais de hamsters submetidos à mucosite oral induzida por radioterapia e irritação mecânica (RXT + IM).** As barras representam Média  $\pm$  EPM dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 na mucosa jugal de animais dos grupos Normal, Radioterapia (RXT), Irritação Mecânica (IM), Radioterapia e Irritação Mecânica (RXT + IM) e Aloe vera 5, 25 e 100%. O número de animais utilizados foi, no mínimo, 5. <sup>#</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao Normal; <sup>\*</sup>p<0,05 indica diferença estatística em relação ao RXT + IM (Anova; Bonferroni).

## 5. DISCUSSÃO

A mucosite oral radioinduzida é o principal efeito colateral agudo em pacientes submetidos à radioterapia para tratamento das neoplasias de cabeça e pescoço, e impacta negativamente sobre a qualidade de vida dos pacientes irradiados. É um fenômeno dependente da dose utilizada podendo tornar-se um fator limitante do tratamento e está associada com perda de peso, dor e incapacidade de alimentação.

Grandes avanços já foram observados nas abordagens terapêuticas do câncer. As modalidades de tratamentos têm tornado-se cada vez mais complexas, e a radioterapia ocupa lugar de destaque neste contexto. No entanto, a toxicidade em tecidos de alta proliferação, como a mucosa da cavidade oral, ainda se apresenta como um importante fator limitante.

Atualmente, não há tratamento efetivo na prevenção e terapêutica da mucosite oral, portanto as dificuldades na prevenção e tratamento da mesma ainda constituem um dos grandes desafios no manejo dos pacientes portadores de neoplasias e que são submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia.

A fisiopatologia da mucosite oral induzida por quimioterapia caracteriza-se como um processo de múltiplas etapas e dependente de uma cascata de mediadores inflamatórios, alguns já muito bem descritos, inclusive pelos pesquisadores do LAFICA (SONIS; TRACY e SHKLAR, 1990; SONIS et al., 2004; VILMA et al., 2005; SANT'ANA, 2006; LEITÃO et al., 2007) conforme bem discutido na introdução dessa tese.

No entanto, a patogênese da mucosite oral decorrente do tratamento radioterápico não tem sido tão extensamente estudada como a mucosite oral consequente à quimioterapia.

Alguns poucos modelos animais de mucosite quimio ou radioinduzida já foram propostos na tentativa de se reproduzir os achados observados nas correspondentes patologias humanas, e dessa forma melhor se conhece os mecanismos envolvidos na sua patogênese (PARKINS; FOWLER e YU, 1983; XU; VAN DER SCHUEREN e ANG, 1984; MOSES AND KUMMERMEHR, 1986; SONIS; TRACY e SHKLAR, 1990; SONIS et al., 2000; VILMA et al., 2005; MOURA, 2006).

No presente estudo foi possível reproduzir-se o modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem, o qual havia sido desenvolvido, de forma inédita em dissertação de mestrado defendida em 2006 (MOURA, 2006).

Dessa maneira foram observados achados tanto macroscópicos quanto microscópicos que caracterizam o processo inflamatório de uma mucosite oral, como hiperemia e eritema acentuado, hemorragias, úlceras, abscessos, ingurgitamento vascular e infiltrado inflamatório acentuado. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que utilizaram outro modelo animal desenvolvido em hamsters, no qual o tipo de radioterapia usada era de ortovoltagem (SONIS, 2000).

Mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico têm sido implicados na patogênese de diversos processos inflamatórios, incluindo-se aqueles consequentes à agressão tecidual provocada pela quimioterapia. Dessa forma, já está demonstrado que o óxido nítrico produzido por células inflamatórias através da indução da óxido nítrico sintase via ativação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1), parece ser um dos mediadores finais envolvidos nas lesões da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e ifosfamida (RIBEIRO et al., 2012) e das mucosites oral e intestinal induzida por 5-fluorouracil, metotrexate e irinotecan (LIMA et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; MELO et al., 2007 ; LIMA-JUNIOR et al., 2012).

Dentro deste contexto, nos propusemos a demonstrar no presente estudo que a radioterapia, a exemplo da quimioterapia, pode desencadear uma cascata de eventos envolvendo citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1, as quais levariam a liberação de outras citocinas, assim como a indução de enzimas tipo a óxido nítrico sintase induzida gerando mediadores finais como o óxido nítrico.

Dessa forma, foi possível mostrar na presente investigação, que tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 quando dosados por ELISA, apresentaram níveis significativamente aumentados nas mucosas jugais de animais com mucosite oral induzida por radioterapia, quando comparados com os devidos controles. Reforçando estes dados, foi também observado imunoexpressão aumentada dessas citocinas nas amostras de tecido das mucosas jugais daqueles animais com mucosite oral induzida por radioterapia.

Esses achados corroboram com aqueles observados no estudo de ONG et al. (2010), em que se avaliou o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na mucosite gastrointestinal induzida por radioterapia em ratos, sendo demonstrado que no dano sub-

agudo existia a participação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Alguns outros estudos têm mostrado que na mucosite oral induzida por radioterapia em hamsters há um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SONIS et al., 2000; SONIS et al., 2002; SONIS et al., 2004).

De forma complementar e absolutamente coerente foi também demonstrado, neste estudo, uma diminuição dos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 nas mucosas jugais dos animais com mucosite radio-induzida, sugerindo que a atenuação dos níveis endógenos dessa citocina esteja possivelmente contribuindo na patogênese dos eventos inflamatórios.

IL-10, assim como IL-4 e IL-13 são classificadas como citocinas antiinflamatórias, e entre, as suas principais atividades encontra-se a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (HART et al., 1989; De WAAL MALEFYT et al., 1991; FIORENTINO et al., 1991; CASSATELLA et al., 1993; ISOMAKI et al., 1996; MUCHAMUEL et al., 1997, VALE et al., 2003). Além disso, elas também inibem a expressão das enzimas COX-2 e NOS $\alpha$ , as quais estão envolvidas na produção de prostaglandinas e NO, respectivamente (CUNHA; MONCADA e LIEW, 1992b; NIRO et al., 1995; ONOE et al., 1996; NIRO et al., 1997). Em modelos de dor mecânica e articular em ratos, e de contorções abdominais em camundongos foi demonstrado que IL-4, IL-10 e IL-13 possuem efeito antihiperálgico, o qual decorre da inibição de citocinas pró-inflamatórias (POOLE et al., 1995; CUNHA et al., 1999; LORENZETTI et al., 2001; VALE et al., 2003).

Interessante, nesse contexto foi a demonstração, no trabalho de Vale et al. (2003), de um possível papel regulador endógeno negativo para IL-4, IL-10 e IL-13 na resposta nociceptiva, desde que o pré-tratamento de animais com anticorpo anti-IL-10 ou anti-IL-4 ou anti-IL-13 promove uma potenciação na resposta nociceptiva frente a estímulos sublimiáres. Em assim sendo é bem possível que no modelo experimental de mucosite radio-induzido aqui mostrado, a IL-10 possa estar desempenhando um papel semelhante, de forma que a sua diminuição, conforme demonstrado esteja contribuindo para um aumento nos níveis das citocinas TNF e IL-1, as quais estariam envolvidas com a deflagração da resposta inflamatória da mucosite provocada por radioterapia. Sabe-se que um dos sintomas importantes da MO é o quadro álgico, logo o fato dos níveis de IL-10 estarem diminuídos de forma significativa no grupo de MO (RXT + IM), e esta interleucina ter uma importante função antiinflamatória, pode correlaciona-se com a intensificação da dor referida pelos pacientes, e que normalmente está presente nesse processo

inflamatório. Deve-se reconhecer, entretanto que uma nova abordagem experimental envolvendo um tratamento com anticorpos anti-citocinas anti-inflamatórias seria necessário para confirmar essa nossa hipótese.

Na tentativa de se identificar outros possíveis candidatos a mediadores capazes de serem ativados e/ou liberados pelas citocinas já demonstradas como participantes da patogênese da mucosite radio-induzida, tornou-se extremamente razoável se pesquisar o envolvimento do óxido nítrico.

Nesse sentido foi inicialmente avaliada a expressão de NOSi por imunohistoquímica. Observou-se que houve uma intensa imunoposição de NOSi nas mucosas submetidas ao tratamento radioterápico nas condições previamente demonstradas, contrastando com uma fraca imunomarcagem naquelas mucosas não submetidas ao mesmo regime de radioterapia, o que estava sugerindo uma possível participação de NO neste processo inflamatório. De forma coerente, a seguir demonstrou-se que níveis significativamente aumentados de nitrito e nitrato estavam presentes naquelas mucosas submetidas ao regime proposto de radioterapia, capaz de provocar mucosite ulcerativa, fortalecendo, então a ideia do NO como um mediador inflamatório nesse processo.

De fato ao se realizar uma abordagem farmacológica através do pré-tratamento dos hamsters com um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzida (NOSi), aminoguanidina, verificou-se uma redução significativa e dose-dependente dos parâmetros macro e microscópicos observados no grupo de animais com suposta mucosite radio-induzida, assim como a redução de forma significativa da infiltração de neutrófilos e inibição significativa da dosagem de nitrito e nitrato.

Estes dados em muito reforça a hipótese do envolvimento do NO na patogênese da mucosite experimental induzida por radioterapia de megavoltagem e se torna a primeira demonstração do papel deste mediador nesse processo, a exemplo do que já se havia demonstrado, também de forma pioneira, para a mucosite oral induzida por quimioterapia (LEITÃO et al, 2006).

De forma coerente ao se lançar mão de uma abordagem molecular, através da técnica de Western Blot, foi possível se demonstrar um significativo aumento da expressão da NOSi nos animais submetidos à mucosite oral radio-induzida. Adicionalmente, também se mostrou que, além de superexpressa, a enzima está ativa desde que sua capacidade de converter L-arginina em L-citrulina encontra-se aumentada neste mesmo grupo, embora de

forma não significativa. Estes dois últimos dados, principalmente o primeiro, reforçam ainda mais o papel do NO, advindo da enzima óxido nítrico sintase induzida, na patogênese da mucosite oral provocada por radioterapia.

Sonis et al. (2002), por outro lado, utilizando o modelo de mucosite oral induzida por radioterapia de ortovoltagem em hamsters e numa abordagem molecular através de RT-PCR em que se pretendia demonstrar a sequência de genes envolvidos nesse processo inflamatório, detectaram baixos e variáveis níveis de TNF- $\alpha$  e de NOSi, o que inviabilizou a quantificação da expressão desses genes. Deve-se levar em conta, entretanto que o modelo utilizado pelo grupo de Sonis foi de radioterapia de ortovoltagem e o usado no presente estudo foi de radioterapia de megavoltagem. É possível, embora não tenhamos bases biológicas concretas para afirmar, que esses dois tipos de radiação possam desencadear sequências gênicas distintas o que explicaria as diferenças de resultados.

Considerando que citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 são reconhecidas como potentes estimuladores da síntese da NOSi e que pentoxifilina é um fármaco de larga utilização laboratorial, como inibidor da transcrição e tradução dos RNAm destas e de outras citocinas pró-inflamatórias (DOHERTY et al., 1991; NEUNER et al., 1994), tornou-se racional utilizá-la como ferramenta farmacológica na tentativa de se estabelecer a possível sequência dos mediadores envolvidos na cascata inflamatória da mucosite oral radio-induzida.

Dessa forma, foi demonstrado na presente investigação que o pré-tratamento de animais com PTX foi capaz de atenuar significativamente os parâmetros inflamatórios, macro e microscópicos observados nas mucosas jugais dos animais com mucosite oral induzida por radioterapia, incluindo-se aí o edema, a ulceração epitelial e a infiltração neutrofílica. Tais efeitos parecem ser consequentes à capacidade da PTX de inibir a síntese de citocinas proinflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, o que de fato foi possível de ser demonstrado no presente estudo. Esses dados são uma extensão daqueles preliminarmente mostrados em nossa dissertação de mestrado, em que se investigou o efeito protetor da pentoxifilina nas doses de 5 e 15mg/kg na mucosite induzida por radioterapia (MOURA, 2006).

Os dados em questão, também corroboram com aqueles frutos do trabalho de Lima et al. (2005), em que foi demonstrada a participação do TNF- $\alpha$  na patogênese da mucosite

oral experimental induzida por quimioterapia (5-FU) em hamsters, usando inibidores de citocinas como a pentoxifilina.

Usando outro modelo experimental, o de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos, Melo et al. (2007) também mostraram um importante efeito inibitório com o uso da pentoxifilina.

Uma provável explicação para todos esses achados, os aqui apresentados e os da literatura, tem por base o fato da PTX poder suprimir a transcrição dos genes de TNF- $\alpha$  e de IL-1. Além disso, tem sido descrito que a nível molecular, e em concentrações elevadas pode inibir a ativação de NF- $\kappa$ B, e como resultado interferir na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 (DOHERTY et al., 1991; NEUNER et al., 1994). Sabe-se que a inibição de NF- $\kappa$ B melhora a inflamação (KEIFER et al., 2001), assim como sua ativação resulta numa regulação aumentada de uma variedade de genes e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (SONIS et al., 2004a; SONIS, 2004, YEOH et al., 2005; LOGAN et al., 2007).

Tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 induzem vias de sinalização intracelulares que levam à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o que em última instância amplifica a resposta inflamatória coordenada por estas citocinas. Diante do exposto, pode-se inferir que a PTX possui a capacidade de modular a resposta inflamatória observada na mucosite oral radio-induzida, através da inibição de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 diretamente ou via inibição da indução de NF $\kappa$ B.

Esse efeito protetor da PTX encontrada no presente estudo como já mencionado pode ser explicado pela sua capacidade de inibir a produção das citocinas inflamatórias. Dados que corroboram com outros estudos que demonstraram que a PTX pode reduzir citocinas como TNF- $\alpha$  (SILVA et al., 2000; JI et al., 2004; VILMA et al., 2005; MOUA, 2006; MELO et al., 2007) e IL-1 (NEUNER et al., 1994; VAN FURTH et al., 1997; MELO et al., 2007).

Outro mediador importante avaliado nesse estudo foi o NO. Uma das ferramentas utilizadas inicialmente para a sua avaliação foi a imunoexpressão da NOSi. Nesse contexto, observou-se também que o tratamento com PTX reduziu a imunomarcagem de NOSi. De forma coerente, foi também possível se demonstrar que a PTX inibiu o aumento da expressão dessa enzima quando se utilizou outra ferramenta que foi a avaliação por Western Blot. Este fato demonstra de forma inequívoca que a NOSi está superexpressa na

mucosite induzida por radioterapia, e esta superexpressão encontra-se inibida pelo tratamento com um inibidor de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1), o que sugere que estas participam da indução da NOSi.

Outros estudos utilizando modelos experimentais distintos concordam com estes achados. Assim, Melo et al. (2007) e Lima-Junior et al. (2012), mostraram que PTX também era capaz de inibir diversos parâmetros da resposta inflamatória observada na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, sendo este efeito mediado via inibição da expressão da NOSi avaliada por imunomarcagem e por Western Blot.

Adicionalmente, Gómez-Cambronero et al. (2000) demonstraram que a PTX na dose de 12 mg/kg foi capaz de atenuar o edema e a inflamação na pancreatite experimental, possivelmente pela diminuição da produção de NO e Beshay et al. (2001) também observaram supressão dos níveis de expressão da NOSi *in vitro e in vivo* com o uso da PTX. A redução da produção de NO nos animais tratados com PTX pode ser em consequência da diminuição da infiltração de neutrófilos, devido à redução de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, conforme demonstrado pelo nosso grupo e por outros autores.

Com o objetivo de identificar potenciais fitoterápicos com ação protetora sobre a mucosite provocada pela radioterapia, dois produtos naturais de reconhecida ação antiinflamatórias, foram testados: a *M. urundeava* (aroeira do sertão) e o *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*). Nesse contexto, o estudo mostrou que a aroeira, a despeito de ter inibido a produção de nitrito e nitrato e de TNF- $\alpha$  tecidual, não foi capaz de atenuar os parâmetros macro e microscópicos comuns na mucosite radio-induzida. Esses dados contrastam com aqueles obtidos por Sant'Ana (2006), em sua dissertação de mestrado em que foi observado um efeito protetor importante desse fitoterápico quando utilizado no pré-tratamento de hamsters submetidos a mucosite oral induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil. Nesse estudo Sant'Ana sugere que o efeito protetor da aroeira parece ser consequente a sua ação inibitória da expressão de TNF- $\alpha$  e NOSi ou ainda também a um efeito direto sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).

Figueredo (2011) em sua dissertação de mestrado avaliando o efeito do infliximabe, um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  sobre a mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano demonstrou que houve inibição nos parâmetros inflamatórios (TNF- $\alpha$ , MPO, IL-1 $\beta$  e expressão de NOSi), mas sem efeito nas alterações funcionais, como diarreia, atividade

contrátil do duodeno (contratilidade da mucosite intestinal). Corroborando com esses achados, Melo et al. (2007) em um modelo experimental de mucosite intestinal induzida por irinotecano mostrou que a talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico que inibe a produção do TNF- $\alpha$ , reduziu a infiltração neutrófila e preveniu parte das alterações morfométricas, porém, não diminuiu a gravidade da diarreia. Baseado nestes resultados, considerando que nesse estudo a aroeira também não foi capaz de inibir o processo inflamatório da MO, porém inibiu a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , nos permite supor que a inibição do TNF- $\alpha$  não seja suficiente pra prevenir tanto a diarreia induzida por irinotecano quanto a mucosite oral induzida por radioterapia.

Existem evidências em modelos experimentais da atividade antiinflamatória e antioxidante da aroeira, no entanto, a fisiopatologia desses efeitos ainda tem sido pouca esclarecida. Sabe-se que os dois componentes da aroeira, tanto os taninos como as chalconas estariam mais relacionados com estas atividades. Esses componentes apresentam importante atividade antioxidante como antiinflamatória, pois estão envolvidos com a inibição da síntese de citocinas como o TNF- $\alpha$ , inibição de enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides, inibição da síntese de moléculas de adesão, inibição da oxidação do DNA, migração de neutrófilos e enzimas envolvidas nas vias intracelulares ativadas por citocinas (DESMARCHELIER et al., 1999; RODRIGUEZ, 2001; HERENCIA, 2001; MANTHEY et al., 2001).

Por outro lado, o Aloe vera na concentração de 100% foi eficaz em inibir os parâmetros inflamatórios avaliados à microscopia, além de atenuar a infiltração de neutrófilos, os níveis teciduais das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1, assim como de nitrito e nitrato. Coerentemente, o Aloe vera reverteu à inibição dos níveis teciduais de IL-10 observados na mucosite induzida pela radioterapia. Dessa forma, pode-se afirmar que o efeito inibitório do Aloe vera sobre a mucosite radio-induzida parece se dever a inibição das citocinas supracitadas, as quais estariam aumentadas neste contexto, e serveriam como estímulo para a indução da NOSi.

Dados anteriores do próprio Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) mostraram que o Aloe vera foi também capaz de inibir, de forma até mais intensa, os parâmetros inflamatórios observados na mucosite oral induzida por quimioterapia (SANT'ANA, 2006). Além disso, neste trabalho, foi evidenciado que o efeito inibidor do Aloe vera parece ser consequente a sua capacidade em inibir a expressão

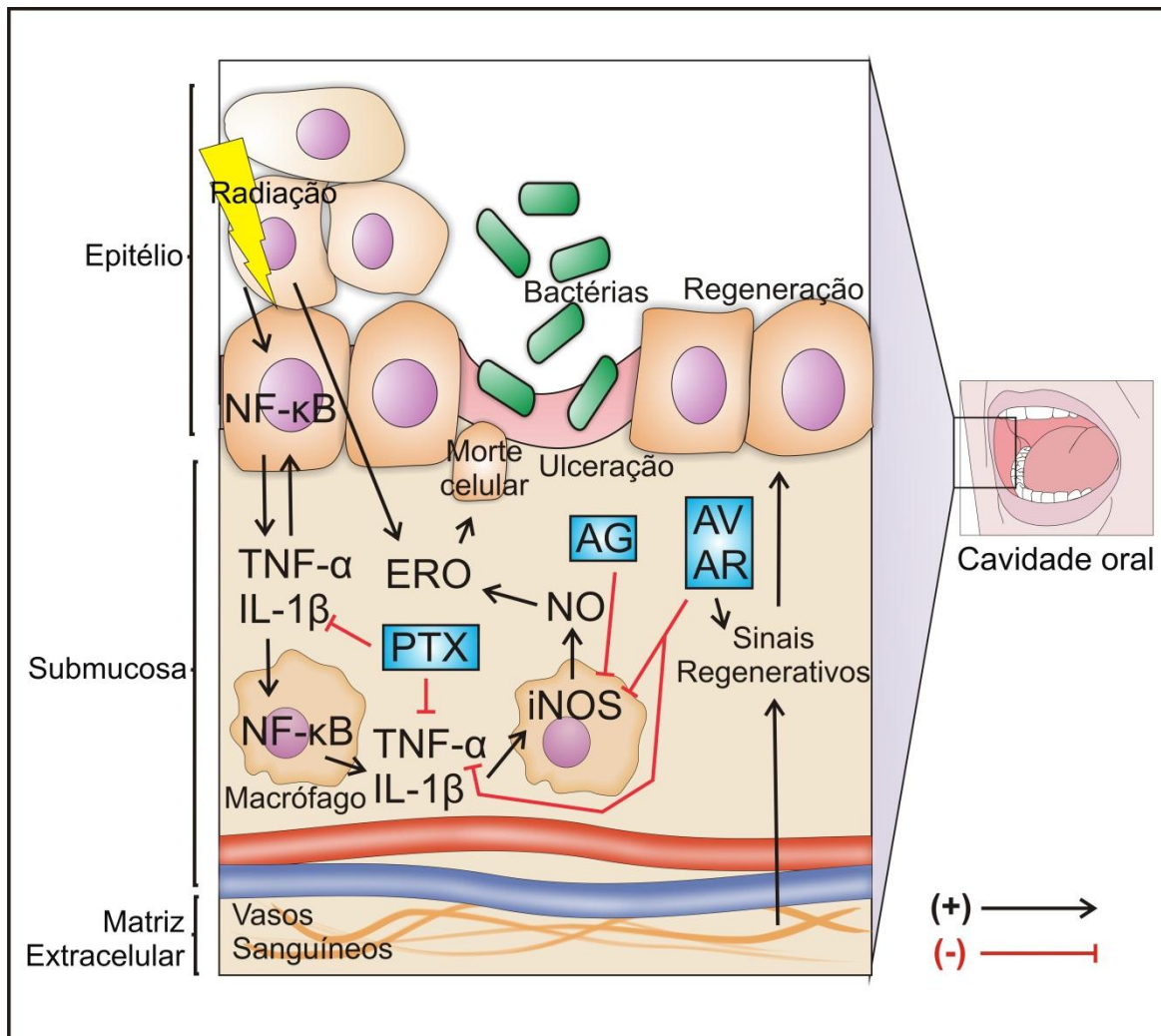
de TNF- $\alpha$  e NOSi avaliados por imunomarcção. Por outro lado, Su et al.(2004) em um estudo clínico randomizado de fase II em que se comparou Aloe vera com placebo na prevenção da mucosite oral em pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço em tratamento com radioterapia, demonstraram que o Aloe vera não foi capaz de atenuar a intensidade dos sinais e sintomas (intensidade da mucosite, perda de peso, escores de qualidade de vida, uso de medicação para dor, necessidade de hidratação, surgimento de infecção oral oportunista e interrupção do tratamento) relacionados a mucosite oral.

Outros estudos têm demonstrado que o extrato de Aloe vera apresenta uma potencial atividade antiinflamatória por inibir a produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) in vitro (VAZQUEZ, 1996), assim como a capacidade de inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida e do TNF- $\alpha$  (SRIVASTAVA et al., 2000; TALMADGE et al., 2004).Eanlamnam et al., 2006 mostraram que o Aloe vera apresentava um efeito anti-ulcerogênico possivelmente pela sua capacidade de reduzir a aderência leucocitária, inibir a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  e elevar os níveis de IL-10. Na colite ulcerativa, o Aloe vera tem sido descrito como um potente inibidor do processo inflamatório, quando usado por via oral por um período de quatro semanas, pois foi capaz de diminuir os parâmetros inflamatórios através da avaliação de escores clínicos, achados da retossigmoidoscopia e escores da histopatologia.

Recentemente, Pavesi et al. (2011), também demonstraram que a camomila usada de forma tópica em mucosa de hamsters submetidos à mucosite oral experimental induzida por 5-FU foi capaz de atenuar o processo inflamatório verificado pela diminuição de parâmetros macro e microscópicos.

No entanto, alguns estudos o Aloe vera tem demonstrado dados conflitantes com relação a sua capacidade antiinflamatória, os quais têm sido justificados por alguns fatores, como: tipos e variedades das amostras, métodos de preparação utilizados e isolamento de seus componentes, assim como o período de desenvolvimento da planta, o qual as amostras foram obtidas. Baseado neste contexto pode-se ter uma predominância de um componente sobre o outro, e atividades antagônicas (TURNER, 2004; NI, 2004). Logo, poderia justificar as possíveis diferenças existentes entre os estudos e os resultados contraditórios encontrados no presente trabalho.

**Diagrama esquemático representativo do possível efeito da pentoxifilina, aminoguanidina e fitoterápicos (Aloe vera, Aroeira) na mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem em hamsters**



**FIGURA 46: Modelo hipotético proposto da patogênese da mucosite oral experimental induzida pela radioterapia.** Baseado nos dados da literatura, e os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem-se que a pentoxifilina, aminoguanidina, assim como os fitoterápicos (Aloe vera e Aroeira) podem apresentar um papel modulatório negativo sobre a cascata dos mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NOSi), inibindo portanto, o processo inflamatória da mucosite oral experimental induzida por radioterapia. NFκB: fator de transcrição nuclear kappa B; ERO: espécies reativas de oxigênio; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral; IL: interleucinas; NOSi: óxido nítrico sintase induzida; NO: óxido nítrico; PTX: pentoxifilina; AG: aminoguanidina; AV: Aloe vera; AR: aroeira; (+): estimula; (-): inibição.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo nos permitiram concluir que:

1. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  via indução da NOSi e consequente produção de NO, parecem desempenhar um papel importante na patogênese da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem.
2. A diminuição nos níveis de IL-10 parece estar envolvida na patogênese da mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem.
3. Pentoxifilina exerce efeito protetor na mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem, sendo essa ação possivelmente decorrente da inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 e consequente bloqueio da síntese de NOSi.
4. Aminoguanidina exerce efeito protetor na mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem, sendo essa ação decorrente da inibição seletiva da NOSi.
5. A aroeira, a despeito de ter inibido a produção de nitrito e de TNF- $\alpha$  tecidual, não foi capaz de atenuar os parâmetros macro e microscópicos comuns na mucosite oral.
6. Aloe vera na concentração de 100% exerce efeito protetor na mucosite oral experimental induzida por radioterapia de megavoltagem, possivelmente via inibição de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO.

## REFERÊNCIAS

AISEN, S.; CARVALHO, H.; HADDAD, C.M.K. Braquiterapia – Parte B – Aplicações Clínicas. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. (Ed.). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 190-218.

ALBUQUERQUE, L.L.S.; CAMARG, T.C. Prevenção e tratamento da mucosite oral induzida por radioterapia: revisão de literatura. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v.53, n. 2, p. 195-209, 2007.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide syntases: structure, function and inhibition. **Biochem. j.**, London, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.

ALMEIDA, C.E.; HADDAD, C.K.; FERRIGNO, R.A. Evolução Técnica da Radioterapia Externa. In: **Radioterapia Baseada em Evidências – Recomendações da Sociedade Brasileira de Radioterapia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Radioterapia (SBRT), 2011. p. 21-26.

ALVERDY, J.C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. **JPEN J. parenter. enteral nutr.**, Baltimore, v. 14, n. 4, p. suppl 109S-113S, 1990.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ANTUNES, H.S. Cuidados bucais e tratamento. In: **Radioterapia Baseada em Evidências – Recomendações da Sociedade Brasileira de Radioterapia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Radioterapia (SBRT), 2011. p.459-465.

ARCHIBALD, D.; LOCKHART, P.B.; SONIS, S.T; et al. Oral complications of multimodality therapy for advanced squamous cell carcinoma of head and neck. **Oral surg. oral med. oral pathol.**, St. Louis, v. 61, n. 2, p. 139-141, 1986.

ARRUDA, F.F.; PURI, D.R.; ZHUNG, J.; et al. Intensity Modulated Radiation Therapy for treatment of oropharyngeal carcinoma: the MSKCC experience. **Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 64, n. 2, p. 363-373, 2006.

AYGENC, E.; CELIKKANAT, S.; KAYMAKCI, M.; et al. Prophylactic effect of pentoxifylline on radiotherapy complications: a clinical study. **Otolaryngol.head neck surg.**, Rochester, v.130, n.3, 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.**, Baltimore, v. 44, n.4, p.188-195, 1994.

BALLAS, L.K.; SHAH, A.A. Fundamentals of patient management. In: CHAO, K.S.C.; PEREZ, C.A.; BRADY, L.W. **Radiation Oncology Management Decisions**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2011.p. 1-11.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer.**Nat. genet.**,New York, v. 33, n.3s, p. 238-44, 2003.

BANDEIRA, M.A.M. **Contribuição do conhecimento químico de plantas do Nordeste, Myracrodruon urundeuva Fr. All. (syn. Astronium urundeuva Engl.), aroeira-do-sertão**. 1993. 205 p. dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BERGER, A.M.; KILROY, T.J. Oral complications.In: DE VITA, V.T.; HELMAN, S.; ROSENBERG, S.A. (Ed.). **Cancer: Principles & practice of oncology**, 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. 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.**, Orlando, v. 98, n. 2, p. 272-279, 2001.

BESSLER, H.; GILGA, R.; DJALDETTI, M.; et al. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells.**J. Leukoc Biol.**, Winston-Salem, v. 40, n. 6, p. 747-54, 1986.

BJORDAL, J.M.; BENSADOUN, R-J.; TUNER, J.; et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. **Support.care cancer**, Berlin, v. 19, n. 8, p.1069-1077, 2011.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; EVANS, S. M.; HAWKEY, C. J.; et al. Nitric oxide syntase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet**, London, v. 342, n. 8867, p. 338-340, 1993.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BREDET, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann. rev. biochem.**, Palo Alto, v.63, s.n., p. 175-195, 1994.

BRENNAN, M.T.; von BÜLTZINGSLÖWEN, I.; SCHUBERT, M.M.; et al. Alimentary mucositis: putting the guidelines into practice. **Support.care cancer**, Berlin, v. 14, n. 6, 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, p. 905-917.

BRIZEL, D.M. The Role of Combined Radiotherapy and Chemotherapy in the Management of Locally Advanced Squamous Carcinoma of the Head and Neck. In: **Principles and Practice of Radiation Oncology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 807-819.

BROWMAN, G.P. ; CRIPPS, C. ; HODSON, D.I. ; et al. Placebo controlled randomized trial of infusion fluorouracil during standard radiotherapy in locally advanced head and neck cancer. **J. clin. oncol.**, New York, v. 12, n. 12, p. 2648-2653, 1994.

CACCELLI, E.M.N.; RAPOPORT, A. Para-efeitos das irradiações nas neoplasias de boca e orofaringe. **Rev. bras. cir. cabeça pescoço**, v.37, n. 4, p. 198-201, 2008.

- CAPASSO,F.; GAGINELLA,T.S. **Laxatives**: a practice guide. Milan: Springer Italia, 1997, 85 p.
- CARDOSO, M.F.A.; NOVIKOFF, S.; TRESSO, A.; et al. Prevenção e controle das seqüelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. **Rev. bras. radiol.**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 107-115, 2005.
- CASSATELLA, M.A.; MEDA, L.; BONORA, S.; et al. Interleukin-10 (IL<sub>10</sub>) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J. exp. med.**, New York, v.178, n. 6, p. 2207-3311.
- CHEN, K.; INOUE, M.; OKADA, A. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in rat digestive tissues after endotoxin and its role in intestinal mucosal injury. **Biochem.biophys. res. commun.**, New York. v. 224, n.3, p. 703-708, 1996.
- CHEN, X.D.; HUANG, L.Y.; WU, B.Y.; et al. Effect of Aloe vera polysaccharide on the release of cytokines and nitric oxide in cultured human keratinocytes. **Zhongguo wei zong bing ji jiu yi xue**, s.l.v. 7, n. 5, p. 296-8, 2005.
- CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDET, D. S. Nitric oxide in excitable tissues: physiologic roles and disease. **J. clin.invest.**, New York, v.100, n. 10, p.2424-2429, 1997.
- CLANCY, R. M.; AMIN, A.R.; ABRAMSON, S.B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis rheum.**, Atlanta, v.41, n.7, p. 1141-1151, 1998.
- CLARKSON, J. E.; WORTHINGTON, H.V.; EDEN, O.B. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane database syst. rev.** (online)., n.1, 2006. Oxford: Update Software.
- CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; CHANG, K., et al. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, New York, v.41, n. 4, p. 552-556, 1992.

- COSSET, J.M. Efeitos Tardios da Irradiação. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. (Ed.). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 1117-1133.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B., et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. j. pharmacol.**, London, v.126, n. 1, p. 45-50, 1999.
- CUNHA, F.Q.; BOUKILI, M.A.; MOTTA, J.I.B.; et al. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. j. pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 47-52, 1993.
- CUNHA, F.Q.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. **Biochem.biophys. res. commun.**, v.182, n. 3, p.155-1159, 1992b.
- D'HELLENCOURT, C.L.; DIAW, L.; CORNILLET, P.; et al. Differential regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\beta$  and IL-10 by pentoxifylline. **Int. j. immunopharmacol.**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 739-748, 1996.
- DAVIS, R.H.; LEITNER, M.G.; RUSSO, J.M.; et al. Wound healing. Oral and topical activity of Aloe vera. **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.**, Washington. v. 79, n. 11, p.559-562, 1989.
- DE KONING, B.A.E.; VAN DIEREN, J.M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D.J.; et al. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int. immunol.**, v. 18, n. 6, p. 941-9, 2006.
- DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNET, B.; et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokines synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. exp. med.**, v.174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.
- DI GIROLAMO, N.; VISVANATHAN, K.; LODY, A.; et al. Expression of TNF- $\alpha$  by human plasma cells in chronic inflammation. **J. leukoc. biol.**, v.61, n. 6, p. 667-678, 1997.

DIB, L.L.; CURI, M.M. Complicações orais em oncologia. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. (eds). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 1145-1164.

DIB, L.L.; GONÇALVES, R.C.C.; KOWALSKI, L.P.; et al. Abordagem multidisciplinar das complicações orais da radioterapia. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 54, n. 5, p. 391-6, 2000.

DICKINSON, E.; TUNCER, R.; NADLER, E.; et al. NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. **Am. j. physiol.**, v.277, n. 6 Pt 1, p. G1281-1287, 1999.

DIJKSTRA, P.U.; KALK, W.W.; ROODENBURG, J.L. Trismus in head and neck oncology: a systematic review. **Oral oncol.**, v. 40, n. 9, p. 879-889, 2004.

DOHERTY, G.M.; JENSEN, J.C.; ALEXANDER, H.R.; et al. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery (St. Louis)**, St. Louis, v. 110, n. 2, p. 192-198, 1991.

DORNELES, D.; WOUK, A.F.; PONTAROLO, R.; et al. Efeito de Aloe Vera Linné sobre cicatrização de feridas de pele em coelhos. **Visão acadêmica**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 2003.

DORR, W.; KUMMERMEHR, J. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. **Radiother.oncol.**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 249-259, 1990.

DORR, W.; KUMMERMEHR, J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal condition and following single dose irradiation Virchows. **Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, Berlin, v. 60, n. 5, p. 287-294, 1991.

EAMLAMNAM, K.; PATUMRAJ, S.; VISEPODAS, N.; et al. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World j. gastroenterol.**, Beijing, v. 12, n. 13, p. 2034-2039, 2006.

- ELTING, L.S.; BODEY, G.P.; KEEFE, B.H. Septicemia e shock syndrome due to viridians streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin.infect. dis.**, Chicago, v. 14, n. 6, p.1201-1207, 1992.
- EMIDIO, T.C.S.; MAEDA, Y.C.; CALDO-TEIXEIRA, A.S. Oral manifestations of leucemia and antineoplastic treatment – a literatura review.**Brazilian Jornal of Health**, v. 1, n. 1, p. 136-149, 2010.
- EPISTEIN, J.B.; CHIN, E.A.; JACOBSON J.J.; et al. The relationships among fluoride, cariogenic oral flora, and salivary flow rate during radiation therapy. **Oral surg. oral med. oral pathol.oral radiol. endod.**,v. 86, n. 3, p.286-92, 1998.
- EPSTEIN, J.B.; PARKER, I. R.; EPSTEIN, M. S.; et al. Cancer related oral health care services and resources: a survey of oral and dental care in Canadian cancer centres. **J. Can. Dent. Assoc.**,Ottawa,v.70,n.5, p.302-304, 2004.
- EPSTEIN, J.B.; SILVERMAN, S. JR.; PAGGIARINO, D.A.; et al. Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, Double-blind, placebo-controlled clinical Trial. **Cancer**,Philadelphia,v.92 n. 4, p. 875-885, 2001.
- ESTRADA, C.; GOMEZ, C.; MARTIN, C.; et al. Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in endothelial cells. **Biochem.biophys. res. commun.**, v. 186, n. 1, p. 475-482, 1992.
- EVANS, D. E.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone.**J. bone miner. res.**, v.11, n. 3, p. 300-305, 1996.
- FANTONE, J.C.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A, 2002. p. 35-73.
- FERREIRA, C.G.; DIENSTMANN, R.; RODRIGUES, A.N. Drogas novas em oncologia. In: GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**, 2.ed. São Paulo: BBS Editora, 2006. p. 1329-1344.
- FIGUEREDO, A.A. **Efeito do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe, sobre a mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Departamento de Cirurgia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- FIORENTINO,D.F.; ZLOTNIK,A.; MOSMANN,T.R; et al. Il-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. immunol.**,Baltimore, v. 147, n. 11, p. 3815-3822, 1991.
- FOX, A.D.; KRIPKE, S.A.; De PAULA, J.; et al. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterolitis.**JPEN J. parenter. enteral nutr.**, Baltimore, v. 12, n. 4, p. 325-331, 1988.
- FRANÇA, C. M.; FRANÇA, C. M.; NUNEZ, S. C.; et al. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. **J. photochem.photobiol. B.**, Lausanne, v.94, n. 1, p. 25-31, 2009.
- FREIRE, R.C.C.G.; KOWALSKI, L.P.; DIB, L.L.; et al. Risk factors for severe oral mucositis induced by radiotherapy. In: VINCENT, J.J.A., editor. **1<sup>st</sup> World Congress on Head and Neck Oncology**. Bologna: Monduzzi, 1998. p 881-4.
- FU, K.K.; PAJAK, T.F.; TROTTI, A.; et al. 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.**, Elmsford, v.48, n. 1, p.7-16, 2000.
- FUJII, E.; IRIE, K.; OGAWA, K.; et al. Role of nitric oxide and prostaglandins in lipopolysaccharide-induced increase in vascular permeability in mouse skin.**Eur. j. pharmacol.**,Amsterdam, v.297, n. 3, p. 257-263, 1996.
- FUNARI, C.C; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. bras. farmacogn.**, Sao Paulo, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.**Nature**, London, v. 288, n. 5789, p. 373, 1980.
- GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T., et al. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. **Br. j. pharmacol.**,London, v.101, n. 1, p. 10-12, 1990.

GARVEY, E.P.; OPLINGER, J.A.; FURFINE, E.S.; et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and vivo. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 272, n. 8, p. 4959-4963, 1997.

GENOT-KLASTERSKY, M.T.; KLASTERSKY, J.; AWADA, F, et al. The use of low-energy laser (LEL) for the prevention of chemotherapy – and/or radiotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: results from two prospective studies. **Support.care cancer.**, Berlin, v. 16, n. 12, p. 1381-1387, 2008.

GOMES, D.A.; REIS, W.L.; VENTURA, R.R., et al. The role of carbon monoxide and nitric oxide in hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus in vitro. **Brain res.**, Amsterdam, v.1016, n. 1, p.33-39, 2004.

GONDIM, F.M.; GOMES, I.P.; FIRMINO, F. Prevenção e tratamento da mucosite oral. **Revista de Enfermagem UERJ**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 67-74, 2010.

GRIFFITHS, M.J.D.; MESSENT, M.; MACALLISTER, R.J.; et al. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol.**, London, v. 110, n. 3, p. 963-968, 1993.

GROSS, S.S.; STUEHR, D.J.; AISAKA, K., et al. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by  $N^G$  – a monoarginine,  $N^G$  – nitroarginine and  $N^G$  – methylarginine. **Biochem.Biophys.Res. Commun**, v. 170, n. 1, p. 96-103, 1990.

HADDAD, C.M.K.; AISEN, S.; CARVALHO, H.A. Braquiterapia – Parte A – Física. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L (Ed.). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 161-189.

HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; et al. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 concentrations on nonhematological toxicity and hematological recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp. hematol.**, Copenhagen, v.23, n. 12, p. 1256-1260, 1995.

HART, P.H.; VITTI, G.F.; BURGESS, D.R.; et al. Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1 and prostaglandin E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.86, n. 10, p. 3803-3807, 1989.

HAZUKA, M.B.; MARTEL, M.K.; MARSH, L.; et al. Preservation of parotid function after external beam irradiation in head and neck cancer patients: a feasibility study using 3-dimensional treatment planning. **Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.**, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 731-7, 1993.

HEGGERS, J.P.; LOY, G.L.; ROBSON, M.C.; et al. Histological demonstration of prostaglandin and thromboxanes in burned tissue. **J. surg. res.**, New York, v. 28, n. 2, p. 110-117, 1980.

HENKE, M.; ALFONSI, M.; FOA, P, et al. Palifermin decreases severe oral mucositis of patients undergoing postoperative radiochemotherapy for head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled Trial. **J.clin.oncol.**, New York, v.29, n. 20, p.2815-2820, 2011.

HENSON, B.S.; INGLEHART, M.R.; EISBRUCH, A.; et al. Preserved salivary output and xerostomia-related quality of life in head and neck cancer patients receiving parotid-sparing radiotherapy. **Oral oncol.**, Oxford, v. 37, n. 1, p.84-93, 2001.

HERENCIA, F.; FERRANDIZ, M.L.; UBEDA, A.; et al. 4-DIMETHYLAMINO-3', 4'-DIMETHOXYCHALCONE downregulates iNOS expression and exerts antiinflammatory effects. **Free radic.biol. med.**, v. 30, n. 1, p. 43-50, 2001.

HOLZHEIMER, R.G.; MOLLOY, R. G.; RIORDAIN, D. S.; et al. Long-term immunotherapeutic intervention with pentoxifylline in a mouse model of thermal injury and infection. **J. trauma**, Baltimore, v.38, n. 5, p.757-762, 1995.

HOMAR, J.C. Medicinas complementarias o alternativas? Um dilema para El sistem público. **Aten.primaria**, Barcelona, v. 35, n. 8, p. 389-391, 2005.

HORIOT, J.C.; LE FUR, R.; N'GUYEN, T.; et al. Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. **Radiother.oncol.**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 231-41, 1992.

HSIEH, H.K.; LEE, T.H.; WANG, J.P.; et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. **Pharm. Res.**, New York, v.15, n. 1, p.39-46, 1998.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. histochem.cytochem.**, Baltimore, v.29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

HUTCHESON, I. R.; WHITTLE, B. J.; BOUGHTON-SMITH, N. K. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. **Br. j. pharmacol.**, London, v. 101, n. 4, p. 815-820, 1990.

HUTTER, J.A.; SALMAN, M.; STA VINOHA, W.B.; et al. Antiinflammatory C-Clucosyl Chromone from Aloe barbadensis. **J. nat. prod.**, Cincinnati, v.59, n. 5, p.541-543,1996.

IM, S.A.; OH, S.T.; SONG, S, et al. Identificationn of optimal molecular size of modified Aloe polisaccharides with maximum immunomodulatory activity. **Int. immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 271-279, 2005.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. immunol.**, Baltimore, v.147, n. 11, p. 3815-3822, 1991.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

ISOMAKI, P.; LUUKKAINEN, R.; TOIVANEN, P.; et al. The presence of Interleukin-13 in rheumatoid synovium and its anti-inflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis rheum.**, Atlanta, v.39, n. 10, p.1693-1702,1996.

JEAN E, C.; HELEN V, W.; SUSAN, F.; et al. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane database syst. rev. (online)**, Oxford, 2011.

JERECZEK-FOSSA, B.A.; ORECCHIA, R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. **Cancer treat. rev.**, New York, v. 28, n. 1, p. 65-74, 2002.

JI, Q.; ZHANG, L.; JIA, H.; et al. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappaB activation and associated production of proinflammatory cytokines. **Ann. clin.lab. sci.**, Philadelphia, v.34, n. 4, p. 427-436, 2004.

KARMIOL, M.; WALSH, R.F. Dental caries after radiotherapy of the oral regions. **J. am. dent. assoc.**, Chicago, v. 91, n. 4, p.834-45, 1975.

KEEFE, D.M.; SCHUBERT, M.M.; ELTING, L.S. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, Philadelphia, v.109, n. 5, p. 820-831, 2007.

KEIFER, J.A.; GUTTRIDGES, D.C.; ASHBURNER, R.P.; et al. Inhibition of NFκB activity by thalidomide through suppression of IκB kinase activity. **J. biol. chem.**, Baltimore, v.276, n.25, p. 22382-22387, 2001.

KELNER, N.; CASTRO, J.F.L. Laser de baixa intensidade no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia: relato de casos clínicos. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2007.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral dis.**, Houndmills, v.7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem.j.**, London, v. 298, n. 2, p. 249-258, 1994.

KONTUREK, P.C.; DUDA, A.; BRZOZOWSKI, T.; et al. Activation of genes for superoxido dismutase, interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. **Scand. j. gastroenterol.**, Oslo, v. 35, n. 5, p. 452-463, 2000.

KOWANKO, I.; LONG, L.; HODGKINSON, B.; et al. The effectiveness of strategies for preventing and treating chemotherapy and radiation induced oral mucositis in patients with cancer. **Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE)**. 1998. p. 1-84.

KUMAR , M.P.D.; SEQUEIRA, P.S.; SHENOY, K. The effect of three mouthwashes on radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck malignancies: a randomized control trial. **J. cancer res. ther.**, Mumbai, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2008.

LALLA, R.V.; SONIS, S.T.; PETERSON, D.E. Management of oral mucositis in patients who have cancer. **Dent. clin. North Am.**, Philadelphia, v. 52, n. 1, p.61-77, 2008.

LAMAS, S.; MARSDEN, P.A.; LI, G. K.; et al. Endothelial nitric oxide syntase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.89, n. 14, p. 6348-6352, 1992.

LANGMEAD, L.; FEAKINS, R.M.; GOLDTHORPE, S.; et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral Aloe vera gel for active ulcerative colitis. **Aliment.pharmacol. ther.**, Oxford, v. 19, n. 7, p.739-747, 2004.

LAPPIN, D. F.; KJELDSSEN, M.; SANDER, L.; et al. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. periodontal.res.**, Copenhagen, v.35, n. 6, p. 369-373, 2000.

LAROUX, F.S.; PAVLICK, K.P.; HINES, I.N.; et al. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta physiol. scand.**, Stockholm, v. 173, n. 1, p. 113-118, 2001.

LE, QT.; KIM, H.E.; SCHNEIDER, C.J.; et al. Palifermin reduces severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study. **J. clin.oncol.**, New York, v.29, n.20, p. 2808-2814, 2011.

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, p. 631-655.

LEE, N.; XIA, P.; QUIVEY, J.M.; et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience. **Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 53, n. 1, p.12-22, 2002.

LEHNERT, S. Radiobiologia. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. (eds). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 91-118.

LEITÃO, R.F.C.; RIBEIRO, R.A.; BELLAGUARDA, E.A.L.; et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer chemother.pharmacol.**,Berlin, v. 59, n. 5, p. 603-612, 2006.

LEITÃO, R.F.C.; ROCHA, F.A.C.; CHAVES, H.V.; et al. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. periodontol.**,Indianapolis,v.75, n. 9, p. 1227-1232, 2004.

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**, San Diego, 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**, New York, v. 47, n. 4, p. 570-575, 1998.

LIMA, V.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; et al. Effects of the tumour necrosis factor- $\infty$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. j. oral sci.**,Copenhagen, v. 113, n. 3, p. 210-217, 2005.

LIMA-JUNIOR, R.C.P.; FIGUEIREDO, A.A.; FREITAS, H.C.; et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer chemother.pharmacol.**,Berlin, v. 69, n.4, p. 931-942, 2012.

LINO, M.D.M.C.; CARVALHO, F.B.; OLIVEIRA, L.R.; et al. Laser phototherapy as a treatment for radiotherapy-induced oral mucositis.**Braz. dent. j.**, Ribeirao Preto, v. 22, n. 2, p.162-165, 2011.

LIU, G.; ROBINS, H.I. A História Natural e a Biologia do Câncer. In: POLLOCK, R.E.; DOROSHOW, J.H.; KHAYAT, D.; et al. (Ed.). **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8ª Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. p.1-17.

LIU, X.; BUVINGTON, J. A.; TJALKENS, R. B. NF-kappaB dependent production of nitric oxide by astrocytes mediates apoptosis in differentiated PC12 neurons following exposure to manganese and cytokines. **Mol. brain res.**,Amsterdam, v.141, n. 1, p. 39-47, 2005.

- LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer treat. rev.**, New York, v. 33, n. 5, p. 448-60, 2007.
- LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; VEIGA, F.H.; et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13. **Eur. cytokine netw.**, Montrouge, v.12, n. 2, p. 260-267, 2001.
- MACIEJEWSKI, B; PREUSS-BAYER, G; MATH, D.; et al. The influence of the number of fractions and overall treatment time on control and late complication rate in squamous cell carcinoma of the larynx. **Int. j. radiat. oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 9, n. 3, p. 321-328, 1983.
- MADDENS, S.; CHARRUYER, A.; PLO, I.; et al. Kit signaling inhibits the sphingomyelin ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, New York, v. 100, n. 4, p. 1294-1301, 2002.
- MAENTHAISONG, R.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; NIRUNTRAPORN, S.; et al. The efficacy of Aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. **Burns.**, Guildford, v. 33, n. 3, p. 713-718, 2007.
- MAIA-FILHO, A.L.M.; SILVA, V.S.; BARROS, T.L.; et al. Efeito do gel da babosa (*Aloe barbadensis* Mill.) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n.2, p.146-150, 2011.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; INTRONA, M. Endothelial activation by cytokines. **Ann. N. Y. Acad. sci.**, New York, v. 832, p. 93-116, 1997.
- MANTRAVADI, R.V.; HAAS, R.E.; LIEBNER, E.J.; et al. Postoperative radiotherapy for persistent tumor at the surgical margin in head and neck cancer. **Laryngoscope**, Saint Louis, v. 93, n. 10, p. 1337-40, 1983.
- MARTELLA, E.; MOLE, R.D.; MOUTINHO, K.; et al. Fundamentos da Radioterapia. In: GUIMARÃES, J.R.Q. (Ed.). **Manual de Oncologia**. 2.ed. São Paulo: BBS Editora, 2006. p. 100-113.

MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais**. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil. Fortaleza, IOCE, 164p. 1989.

McGUIRE, D.B.; CORREA, M.E. P.; JOHSON, J.; et al. The role of basic oral care and good clinical practice principles in the management of oral mucositis. **Support.care cancer.**, Berlin, v. 14, n. 6, p.541-547, 2006.

MELLION, B.T.; IGNARRO, L.J.; OHLSTEIN, E.H., et al. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'-5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood**,New York, v.57, n. 5, p. 946-955, 1981.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.C.; SOARES, R.C.; et al. Role of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC) in the pathogenesis of CPT-11 induced intestinal mucositis in mice : effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer chemother. pharmacol.**,Berlin, v. 61, n. 5,p. 775-84, 2008.

MENDENHALL, W.M. Mandibular osteoradionecrosis.**J. clin.oncol.**,New York,v. 22, n. 24, p.4867-4868, 2004.

MENEZES, A.M.S. **Atividade anti-inflamatória e anti ulcerogênica da Astronium urundeuva Fr. All. Engl.** 1986. 140 p. dissertação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S.N. Effect of Astronium urundeuva (Aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Braz. j. med. biol. res.**, Ribeirao Preto, v. 21, n. 3, p. 531-3, 1988.

MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S.N.; FONTELES, M.C. Antiinflammatory activity of Astronium urundeuva: possible mechanisms invoved. **Braz. j. med. biol. res.**, Ribeirao Preto, v. 18, s.n., p. 861-4, 1985.

MERLANO, M.; CORVO, R.; MARGARINO, G.; et al. Combined chemotherapy and radiation therapy in advanced inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck: the final report of a randomized trial. **Cancer**, Philadelphia, v. 67, n. 4, p. 914-921, 1991.

MHATTANADUL,S. Antigastric ulcer properties of *Aloe vera*.**Songklanakarín J. Sci. Technol.** v. 18, s.n., p. 49-57, 1995.

MITCHELL, J.A.; AKARAREREENONT, P.; THIEMERMANN, C; et al. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, 1993.

MOLLER, D.R.; WYSOCKA, M.; GREENLEE, B.M.; et al. Inhibition human interleukin-12 production by pentoxifylline. **Immunology**, Oxford, v.91, n. 2, p. 197-203, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol.rev.**, Baltimore, v.49, n.2, p. 137-142, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIBBS, J. R.; et al. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol.rev.**, Baltimore, v.43, n. 2, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem.pharmacol.**, Oxford, v.38, n. 11, p.1709-1715, 1989.

MOON, E.J.; LEE, Y.M.; LEE, O.H.; et al. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. **Angiogenesis**, London, v. 3, n. 2, p. 117-123, 1999.

MOSES, R.; KUMMERMEHR, J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. **Br. j. cancer., Suppl.**, Basingstoke, v. 53, n. 7, p. 12-15, 1986.

MOURA, J.F.B. **Modelo experimental de mucosite oral induzida por radioterapia de megavoltagem – Efeito protetor da pentoxifilina.** 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Departamento de Cirurgia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MUCHAMUEL, T.; MENON, S.; PISACANE, P.; et al. Il-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 production. **J. immunol.**, Baltimore, v. 158, n. 6, p. 2898-2903, 1997.

MUSCARA, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric Oxide.V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. j. physiol.**, Bethesda, v. 276, n. (6 Part 1), p. 1313-1316, 1999.

NAGLER, R.M. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. **Oral dis.**, Houndmills, v. 8, n. 3, p. 141-6, 2002.

NASEEM, K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol. aspects med.**, Elmsford NY, v.26, n. 1-2, p. 33-65, 2005.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J. clin.invest.**, New York, v. 100, n. 10, p. 2417, 1997.

National Institute of Health (NIH). NIH consensus statement on oral complications of cancer therapies: diagnosis, prevention, and treatment. **NIH consens.statement.**, Bethesda, v. 7, p. 1-11, 1989.

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; SCHAUER, E.; et al. 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**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 262-267, 1994.

NI, Y.; TURNER, D.; Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L leaf pulp. **Int. immunopharmacol.**; Amsterdam, v. 4, n. 14, p. 1745-1755, 2004.

NIEDER, C.; ZIMMERMANN, F.B.; ADAM, M.; et al. The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. **Cancer treat. rev.**, New York, v. 31, n. 6, p.448-455, 2005.

NIRO, H.; OTSUKA, T.; IZUHARA, K., et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. **Blood**, New York, v.89, n. 5, p. 1621-1628, 1997.

NIRO, H.; OTSUKA, T.; TANABE, T., et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with IL-4. **Blood**, New York, v. 85, n. 12, p.3736-3745, 1995.

NOVAES, P.E.R.S. Radioterapia. In: BRENTANI, M.M., COELHO, F.R.G., IYAYASU, H.; et al. Eds. **Bases da Oncologia**. São Paulo: LEMAR-Livraria e Editora Marina, 1998. p. 441-455.

O'SULLIVAN, B.; LEVIN, W. Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management. **Semin.radiat. oncol.**,Philadelphia,v. 13, n. 3, p. 274-289, 2003.

OKUNIEFF, P.; AUGUSTINE, E.; HICKS, J.E.; et al. Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis.**J. clin.oncol.**,New York, v. 22, n. 11, p. 2207-2213, 2004.

OLIVEIRA, V.P.V.; CAVALCANTI, F.S.; BEZERRA, C.L.F.; et al. Plantas medicinais: considerações ecológicas e uso popular. **Salusvita**, Bauru, v. 8, n. 1, p. 49-58, 1989.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T., et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. **J. immunol.**,Baltimore, v.156, n. 2, p. 758-764, 1995.

OZTURK, B.; EGEHAN, I.; ATAVCI, S.; et al. 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.**,Elmsford,v. 58, n. 1, p. 213-219, 2004.

PALMEIRO, E. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia –Bases Patológicas das Doenças**, 7.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-89.

PALMER, R.M.J.; HICKER, M.S.; CHARLES, I.G., et al. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem.biophys. res. commun.**,New York, v.193, n. 1, p. 398-405, 1993.

PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem.biophys. res. commun.**,New York, v.153, n. 3, p. 1251-1256, 1988.

PARISH,L.C.; WITKOSKI,J.A.; MILIKAN,L.E. *Aloe vera*: its chemical and therapeutic properties. **Int. j. dermatol.**;Philadelphia, v. 30, n. 10, p. 679, 1991.

PARKIN, J.; COHEN, B.An overview of the immune system.**Immunology**,Oxford,v. 357, n. 9270, 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.**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 159-165, 1983.

PARMIGIANI, R.B.; CAMARGO, A.A. O genoma humano e o câncer. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 3-11.

PARSONS, J. The effect of radiation on normal tissues of the head and neck. In: MILLION, R.; CASSISI, N.; eds. **Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach**. Philadelphia: JB Lippincott, 1994. p. 245-289.

PEREZ, C. Perspectivas Futuras em Radioterapia (Para o Século XXI). In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. (eds). **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p.19-33.

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. p. 1-78.

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

PETERSON, D.E.; BENSADOUN, J.R.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Recommendations. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 20, n. 4, p. iv 174-iv 177, 2009.

PETROS, A.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet**, London, v. 338, n. 8782-8783, p. 1557-1558, 1991.

PETROS, A.; LAM, G.; LEONE, A.; et al. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc. res.**, London, v. 28, n. 1, p. 34-39, 1994.

PINTO, A.C.; LEITE, M.T.T. História da radioterapia. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L.; eds. **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 7-18.

PLEOVÁ, P. Prevention and treatment of chemotherapy and radiitherapy induced oral mucositis: a review. **Oral oncol.**,Oxford, v. 35, n. 5, p. 453-470, 1999.

POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; SELKIRK, S., et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. j. pharmacol.**,London, v.115, n. 4, p. 684-688, 1995.

RAJASEKARAN,S.; RAVI,K.; SIVAGNARAM,K.; et al. Beneficial effects of ALOE VERA leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. **Clin.exp. pharmacol. physiol.**, Oxford,v. 33, n. 3, p. 232-237, 2006.

RALSTON, S. H.; TODD, D.; HELFRICH, M. H.; et al. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinology**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 330-336, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. In: \_\_\_\_\_. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 42, p. 557-575.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; et al. Farmacologia. In: \_\_\_\_\_. **Hormônios locais, inflamação e alergia**, 5. ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 246-276.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; et al. Farmacologia. In: \_\_\_\_\_. **Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas**, 6. ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 202-225.

RAO, V.S.N.; MENEZES, A.N.S.; VASCONCELOS, F.A.; et al. Effects of Astronium urundeuva Engl. (Aroeira) in experimental colitis. **Braz. j. med. biol. res.**,Ribeirao Preto,v. 19, p. 568, 1986.

RAO, V.S.N.; VIANA, G.S.B.; MENEZES, A.M.S.;et al.Studies on the anti-ulcerogenic activity of Astronium urundeuva Engl. II. Aqueous extract. **Braz. j. med. biol. res.**, Ribeirao Preto, v. 20, n. 6, p. 803-5, 1987.

REES, D.D.; CELLEK, S.; PALMER, R.M.J.; et al. Dexamethsone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock.**Biochem.biophys. res. commun.**,New York, v.173, n. 2, p.541-547, 1990a.

REES, D.D.; LALMER, R.M.J.; SCHULZ., et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. j. pharmacol.**, London, v.101, n. 3, p. 746-752, 1990b.

REYNOLDS, T. **Aloes the genus aloe**. CRC press: Boca Raton, 2004.

REYNOLDS, T.; DWECK, AC. Aloe vera leaf gel: a review update. **J. ethnopharmacol.**, Limerick, v. 68, n. 1-3, p. 3-37, 1999.

RIDGER, V.C.; PETTIPHER, E.R.; BRYANT, C.E.; et al. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibition aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **J. immunol.**, Baltimore, v.159, n. 1, p.383-390, 1997.

ROBBERS, J.E.; SPEEDE, M.K.; TYLE, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 53-54, 1996.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E.; JANCAR, S.; et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. j. pharmacol.**, London, v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

ROCHA, J.C.C.; KAGOHARA, L.T. Oncogenética e Farmacogética. In: GUIMARÃES, J.R.Q Eds. **Manual de Oncologia**, 2. ed. São Paulo: BBS Editora, 2006. p. 57-66.

RODRIGUES, L.V.; FERREIRA, F.V.; REGADAS, F.S.P.; et al. Morphologic and Morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira do sertão). **Phytother.res.**, London, v. 16, n. 3, p. 267-272, 2000.

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.**, Basel, v. 46, Suppl 3, p. S218, 1997.

ROSENTHAL, D.I.; TROTTI, A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. **Semin.radiat. oncol.**, Philadelphia, v. 19, n.1, p. 29-34, 2009.

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: Lippincout-Raven, 1997. p. 705-722.

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, Philadelphia, v. 100, n. 9, p. 2026-46, 2004.

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

SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. **Radioterapia em Oncologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S., et al. NITRIC OXIDE: a key mediator in the early and late phase of carrageenin-induced rat paw inflammation. **Br. j. pharmacol.**, London, v.118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SCHANDENÉ, L.; VANDENBUSSCHE, P.; CRUSIAUX, A.; et al. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. **Immunology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 30-40, 1992.

SCHMID,R. An old medicinal plant: Aloe vera. **Parfürmerie and kosmetik**, v.72, n. 3, p. 146-150, 1991.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S.T. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and profylaxis of mucositis. **Head neck.**, New York, v. 25, n. 12, p. 1057-1070, 2003.

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.**, New York, v. 26, n. 1, p. 77-84, 2004.

SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P.D. Mucosal diseases series: oral mucositis. **Oral dis.**, Houndmills, v. 12, n. 3, p. 229-241, 2006.

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

SEGRETO, H.R.C.; SEGRETO, R.A. Bases de radiobiologia aplicadas à radioterapia. In: FERRIGNO, R. **Radioterapia Baseada em Evidências – Recomendações da Sociedade Brasileira de Radioterapia.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Radioterapia (SBRT), 2011. p. 31-37.

SESSA, W.C.; HARRISON, J.K.; BARBER, C. M.; et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 267, n. 22, p. 15274-15276, 1992.

SHER, D.J.; BALBONI, T.A.; HADDAD, R.I.; et al. Efficacy and toxicity of hemoradiotherapy using intensity-modulated radiotherapy for unknown primary of head and neck. **Int. j. radiat. oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 80, n. 5, p. 1405-1411, 2011.

SHIELDS, P.G.; HARRIS, C.C. Cancer risks and low-penetrance susceptibility genes in gene environment interactions. **J. clin. oncol.**, New York, v. 18, n. 11, p. 2309-15, 2000.

SILVA, J.C.R.; ROCHA, M.F.G.; LIMA, A.A.M., et al. Effects of pentoxifyline and nabumetone on the serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in rats with adjuvant arthritis. **Inflamm. res.**, Basel, v. 49, n. 1, p. 14-19, 2000.

SILVA, R.L. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular.** São Paulo: Atheneu, 2005, p. 29-42.

SIMON, S.D. Interações entre radioterapia e quimioterapia. In: SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. **Radioterapia em Oncologia.** Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1999. p. 231-236.

SLIWA, K.; WOODIWISS, A.; KONE, V.N.; et al. Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. **Circulation**, Dallas, v.109, n. 6, p.750-755, 2004.

SNELL, S.E.; MANCINO, A.L.; EDWARDS, J. Princípios da Oncologia Cirúrgica.In: POLLOCK, R.E.; DOROSHOW, J.H.; KHAYAT, D.; et al. (Eds). **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8.ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. p.209-224.

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

SONIS S.T.; KUNZ, A. Impact of improved dental services on the frequency of oral complications of cancer therapy for patients with non – head – and – neck malignancies.**Oral surg. oral med. oral pathol.**,St. Louis, v. 65, n. 1, p. 19-22, 1998b.

SONIS, S. T.; TRACY, C.; SHKLAR, G.An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy.**Oral surg. oral med. oral pathol.**,St. Louis, v. 69, n. 4, p. 437-443, 1990.

SONIS, S.; EDWARDS, L.; LUCEY, C. The biological basis for the attenuation of mucositis: the example of interleukin-11.**Leukemia**, New Jersey, v. 13, n. 6, p. 831-834, 1999.

SONIS, S.T. Oral complications. In : HOLLAND, J.F., et al, eds. **Cancer medicine**, 4. ed. Philadelphia: William and Wilkins, 1997. p. 3255-3264.

SONIS, S.T. Pathobiology of Mucositis. **Semin.oncol. nurs.**,Orlando, v. 20, n. 1, p. 11-15, 2004a.

SONIS, S.T. The biologic role for nuclear factor kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Crit. rev. oral biol. med.**, Boca Raton, v. 13, n. 5, p. 380-389, 2002a.

SONIS, S.T. The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis.**Oral oncol.**,Oxford, v. 45, p.1015-1020, 2009.

SONIS, S.T. The Pathobiology of Mucositis. **Nat. rev., Cancer.**, London, v. 4, n. 4, p. 277-284, 2004b.

SONIS, S.T. ; ELTING, L.S. ; KEEFE, D. ; et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury : pathogenesis, Measurement, Epidemiology, and Consequences for Patients. **Cancer**, Philadelphia, v. 100, n. 9, p. 1995-2025, 2004c.

SONIS, S.T.; FEY, E.G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**, Basel, v.16, n. 5, p. 680-686, 2002b.

SONIS, S.T.; MUSKA, A.; O'BRIEN, J.; et al. Alterations in frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. **Eur. j. cancer. Part B, Oral oncol.**, London, v. 31B, n. 4, p. 261-266, 1995.

SONIS, S.T.; O'DONNELL, K.E.; POPAT, R.; et al. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral oncol.**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 170-176, 2004d.

SONIS, S.T.; PETERSON, R.L.; EDWARDS, L.J.; et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 373-38, 2000.

SONIS, S.T.; SCHERER, J.; PHELAN, S., et al. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. **Cell prolifer.**, Oxford, v. 35, n. 1, p.93-102, 2002.

SONIS, T.S. Oral mucositis. **Anticancer drugs**, Oxford, v.22, n.7, p. 607-612, 2011.

SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; HAUTAMAKI, R.D.; et al. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. **J. surg. res.**, New York, v. 48, n. 1, p. 1-5, 1990.

SOUZA-FILHO, M.V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; et al. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am. j. pathol.**, New York, v.150, n. 1, p. 247-256, 1997.

SPIECKER, M.; PENG, H. B.; LIAO, J. K. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I $\kappa$ B $\alpha$ . **J. biol. chem.**, Baltimore, v.272, n. 49, p. 30969-30974, 1997.

STOKMAN, M.A.; SPIJKERVERT, F.K.L.; BURLAGE, F.R.; et al. Oral mucositis and selective elimination of oral flora in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: a double-blind randomized clinical trial. **Br. j. cancer**, London, v. 88, n. 7, p. 1012-16, 2003.

SU, C.K.; MEHTA, V.; RAVIKUMAR, L., et al. Phase II double-blind randomized study comparing oral Aloe vera versus placebo to prevent radiation-related mucositis in patients with head-and-neck neoplasms. **Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v.60, n.1, p. 171-177, 2004.

SUNDERLAND, S.E.; BROWMAN, G.P. Prophylaxis of oral mucositis in irradiated head-and-neck cancer patient: a proposed classification scheme of interventions and meta-analysis of randomized controlled trials. **Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 49, n. 4, p. 917-930, 2001.

SZABO, C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, Augusta, v. 6, n. 2, p. 79-88.

TEGUH, D.N.; LEVENDAG, P.C.; VOET, P.; et al. Trismus in patients with oropharyngeal cancer: relationship with dose in structures of mastication apparatus. **Head neck**, New York, v. 30, n. 5, p. 622-630, 2008.

THAMES, H.D.; HENDRY, J.H. **Fractionation in Radiotherapy**. Philadelphia: Taylor & Francis, 1987.

THANHAUSER, A.; REILING, N.; BOHLE, A.; et al. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity. **Immunology**, Oxford, v.80, n. 1, p. 151-156, 1993.

THIEMERMANN, C.; VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. **Eur. j. pharmacol.**, Amsterdam, v. 182, n. 3, p. 591-595, 1990.

TIZARD, I.R.; BUSBEE, D.; MAXWELL, B.E.; et al. The effect of acemannan on wound healing in young and old rats. **Wounds**, King of Prussia, v. 6, s.n., p. 201-209, 1994.

TROTTI, A.; BELLM, L.A.; EPSTEIN, J.B; et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother.Oncol.**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 253-62, 2003.

TSUJII, I.I. Quantitative dose-response analysis of salivary function following radiotherapy using sequential RT-sialography. **Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 11, s.n., p. 1603-12, 1985.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A., et al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J. pharmacol. exp. ther.**, Baltimore, v.304, s. n., p.102-108, 2003.

VAN FURTH, A.M.; VERHARD-SEIJMONBERGEN, E.M.; VAN FURT, R.; et al. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 by human leucocytes. **Immunology**, Oxford, v. 91, n.2, p. 103-196, 1997.

VÁZQUEZ, B.; AVILA, G.; SEGURA, D.; et al. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. **J. ethnopharmacol.**, Limerick, v. 55, n.1, p. 69-75, 1996.

VIANA, G.S.B., MATOS, F.J.A., BANDEIRA, M.A.M.; et al. Aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. 2. ed. Fortaleza: ed. UFC, 1995.

VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M.; MOURA, L.C.; et al. Alnagesic and antiinflamatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytother.res.**, London, v. 11, n. 2, p. 118-122, 1997.

VIANA, G.S.B.; BANDERA, M.A.M.; MATOS, F.J. Analgesic and antiinflamatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 2-3, p. 189-195, 2003.

VILCEK, J.; LE, J. Immunology of cytokines: an introduction. In: THOMSON, A.W. **The cytokine Handbook**, Academic press limited, 2.ed., p. 1-19, 1994.

VISSINK, A.; JANSMA, J.; SPIJKERVER, F.K.L.; et al. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit.rev.oral biol.Med.**, Boca Raton, v. 14, n. 3, p. 199-212, 2003.

VISUTHIPANICH,W. **Histochemical and pathological changes in rat gastric mucosa following Aloe vera gel and cortisol administration.** M Sc. Thesis in Anatomy, Bangkok, Faculty of science, Mahidol university, 1988.

VOGLER,BK.; ERNST,E. Aloe vera: a systematic review of its clinical effectiveness. **Br. j. gen. pract.**, London, v. 49, n. 447, p. 823-828, 1999.

WALDRON, J.N.; O'SULLIVAN, B. Princípios da Radioterapia Oncológica. In: POLLOCK, R.E.; DOROSHOW, J.H.; KHAYAT, D.; et al. (Eds). **Manual de Oncologia Clínica da UICC.** 8ª Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. p. 225-242.

WARD, A.; CLISSOLD, S.P. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. **Drugs**,New York, v. 34, n. 1, p. 50-97, 1987.

WARDLEY, A.M.; BOOTH, D.; ROBERTS, S.A.; et al.A quantitative histometric murine in vivo model of radiation-induced oral mucositis.**Arch. oral. biol.**,Oxford, v. 43, n. 7, p. 567-577, 1998.

WILLERS, H.; HELD, K.D. Introduction to Clinical Radiation Biology.**Hematol.oncol. clin. north am.**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2006.

WILLIAMS, D.A. Inflammatory cytokines and mucosal injury.**J. natl. cancer inst. monogr.**,Bethesda, v. 2001, n. 29, p.26-30, 2001.

WILLIAMS, M.S.; BURK, M.; LOPRINZI, C.L.; et al. Phase III double-blind evaluation of an Aloe vera gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity.**Int. j. radiat.oncol. biol. phys.**, Elmsford, v. 36, n.2, p. 345-349, 1996.

WORTHINGTON, H.V.; CLARKSON, J.E; EDEN, T.O.B. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment.**Cochrane database syst. rev. (online)**, Oxford, v. 19, n. 2, 2006.

XU, F. X.; VAN DER SCHUEREN, E.; ANG, K.K. Acute reactions of the lip mucosa of mice to fractionated irradiations. **Radiother.oncol.**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 369-374, 1984.

YAGI, A.; SHIBATA, S.; NISHIOKA, I.; et al. Cardiac stimulant action of constituents of Aloe vera saponaria. **J. pharm. sci.**, Washington, v. 71, s.n., p. 739-741, 1982.

YANG, K.D.; CHUEN, H. L.; SHAI, 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.**, New York, v. 211, s.n., p. 1006-1014, 1995.

YEOH, A.; GIBSON, R.; YEOH, E.R.C.; et al. Radiation therapy-induced mucositis: relationships between fractionated radiation, NF- $\kappa$ B, COX-1, and COX-2. **Cancer treat. rev.**, New York, v. 32, n. 8, p. 645-651, 2006.

ZABEL, P.; SCHADE, F. U.; SCHLAAK, M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 187, n. 3-5, p. 447-463, 1993.

ZHANG, X.F.; WANG, H.M.; SONG, Y.L.; et al. Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from Aloe vera. **Bioorg. med. chem. lett.**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 949-953, 2006.

ZUANZZI, J.A.S. Flavanóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GROSMAN, G.; et al. (Eds). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. s.l.UFRGS, p. 489-516, 1999.