BERNAR MONTEIRO BENITES

Determinação da presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

São Paulo

2015

BERNAR MONTEIRO BENITES

Determinação da presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves.

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Benites, Bernar Monteiro.

Determinação da presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Bernar Monteiro Benites ; orientador Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2015.

65p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Quimioterapia. 2. Saliva. 3. Hamsters. 4. Cromatografia. I. Gonçalves, Alyne Simões. II. Título.

Benites B. Determinação da presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: /   /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Este trabalho é dedicado a Deus, aos meus pais, Wanderley e Vânia, e aos meus irmãos, Lincon e Gabriel.

Tua Família – Anjos de Resgate

*"Percebe e entende que os melhores amigos
São aqueles que estão em casa esperando por ti*

Acredita nos momentos mais difíceis da vida

Eles sempre estarão por perto

Pois só sabem te amar

E se por acaso a dor chegar

Ao teu lado vão estar

Pra te acolher e te amparar

Pois não há nada como um lar

Tua família volta pra ela

Tua família te ama e te espera

Para ao teu lado sempre estar

Tua família!

Às vezes muitas pedras surgem pelo caminho

Mas em casa alguém feliz

Te espera pra te amar

Não não deixe que a fraqueza tire a tua visão

Que um desejo engane o teu coração

Só Deus não é ilusão

E se por acaso a dor chegar

Ao teu lado vão estar

Pra te acolher e te amparar

Pois não há nada como um lar

Tua família volta pra ela

Tua família te ama e te espera

Para ao teu lado sempre estar

Tua família!"

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge**.

Ao Departamento de Biomateriais e Biologia Oral na pessoa do seu chefe de departamento **Prof. Dr. Leonardo Eloy Rodrigues Filho**.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Biomateriais e Biologia Oral da FOU SP, na pessoa do seu coordenador do programa **Prof. Dr. Rafael Yague Ballester**.

Aos Profs. de Pós-graduação em Biomateriais e Biologia Oral da FOU SP, por todo conhecimento transmitido.

À **Prof. Dra. Alyne Simões Gonçalves** pela chance de ingresso na FOU SP e por ter me aceitado como orientado. Foram dois anos de muito aprendizado pessoal e profissional. Espero que seja apenas o começo.

Ao **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira** por toda atenção dada durante o desenvolvimento do presente projeto.

A todos que trabalham no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas – LTPNA, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Ernani Pinto**, pela paciência e ajuda que me deram na execução da parte laboratorial.

Aos animais que cederam suas vidas para que esse trabalho pudesse ser executado.

A **Brunna Haddad Anhesini**, minha namorada, amiga, parceira, ou simplesmente como eu te falo: cúmplice. Você me ajudou em todas as etapas com muita paciência, dedicação e me compreendeu na fase mais difícil dessa jornada. É você

quem me acalma, me escuta, me entende, briga, cobra, torce, enfim, sem você eu não seria capaz. Agradeço por participar 100% dessa conquista e por ser minha metade. Te amo.

Aos amigos de Pós-graduação pelas conversas, risadas e troca de experiência.

Ao grande amigo **Pedro Paulo Albuquerque Cavalcanti de Albuquerque**, ou simplesmente PEDRÃO, agradeço por ter tornado essa jornada mais fácil em todos os sentidos. Alguns poucos se tornam irmãos, e você é um deles. Admiro você simplesmente traçar uma meta e ir até o fim (não mude isso), exemplo disso é não poder mais te chamar de Gordão. Você é diferenciado e sabe disso. Agradeço o apoio que você deu nesses dois anos, inclusive, por você sempre me jogar para cima dizendo, por exemplo, que ainda vou abrir meu próprio hospital. Me orgulho de estar presenciando o seu crescimento profissional e fazer parte dessa história.

Aconteça o que for, conte comigo!

Ao grande amigo **Ezequias Costa Rodrigues Júnior**, ou só ZECA, muito obrigado por tudo. Pelas conversas, risadas, os post-it, a pasta para organizar melhor os artigos, a confecção da aula, enfim, você abrilhantou a minha jornada e, mais do que ninguém me incentiva a continuar buscando as realizações profissionais. Que a distância não seja empecilho para essa amizade!

Ao meu amigo **Tiago Machado**, que é uma pessoa muito querida. Agradeço toda atenção que teve comigo no meu exame de qualificação. Divido com você também essa conquista.

Ao amigo **Bruno Lopes**, ou apenas amiche, agradeço pela parceria e por todas as risadas que tivemos durante esse tempo na pós-graduação. É um cara do bem, de bom coração e sempre que precisei você estava pronto para me ajudar.

À amiga **Karen Fukushima**, ou Japa, você me conquistou aos poucos e hoje sei que essa parceria é verdadeira! Agradeço cada abraço, cada minuto que você se importou quando eu estava desanimado. Adoro você japinha!!!!

Aos meus amigos da minha cidade natal, dentre eles, **Lucas Coutou, Marco Aurélio, Tiago Melo, Thomas William, Tércio Jr**, que em alguma oportunidade vieram me visitar amenizando a saudade, além de sempre me apoiarem a buscar novos desafios. Obrigado pela parceria rapaziada.

À **Edilene**, secretária do Departamento de Biologia Oral, agradeço por todas as conversas, abraços, conselhos, por ouvir sempre minhas lamentações, por me indicar até médicos e assim eu resolver problemas de saúde, enfim, você terá sempre meu carinho, respeito e admiração.

Ao **Douglas Nesadal**, técnico do Laboratório de Bioquímica Oral da FOUSP, agradeço toda atenção e ensinamentos durante esta etapa da minha vida.

À **Elisângela Chinen**, técnica do Laboratório de Biologia Oral, agradeço por toda ajuda prestada. Quem te conhece sabe o quanto você faz por nós alunos.

À **Rosa e Eli**, secretárias do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOUSP, agradeço por toda a ajuda. Sempre prontas pro que der e vier.

Aos demais funcionários da FOUSP, em especial **Dona Fran**, que tenho um apreço enorme. As nossas manhãs são mais leves com as suas brincadeiras e puxões de orelha e claro, sem seu café ninguém produz.

À **Glauci**, bibliotecária da FOUSP, pela celeridade nas correções. Sem você não teria concluído esse trabalho.

À **CNPQ** pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

Benites, B. Determinação da presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

Vários métodos de análise para o ensaio do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) em fluidos biológicos de humanos e animais, foram previamente relatados. Considerando que a administração do 5-FU altera de alguma maneira a morfologia e função das glândulas salivares, e que a presença do quimioterápico na mucosa oral pode levar a algumas complicações orais, este trabalho teve como objetivo de determinar a presença de 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma vez que este modelo animal é usado nos estudos com mucosite oral e hipofunção glandular, induzidas por 5-FU. Doze animais foram divididos em 4 grupos: CP e CPI, onde os animais receberam intraperitonealmente pilocarpina (CP) ou pilocarpina + isoproterenol (CPI) e o veículo do quimioterápico, e os grupos QP e QPI, onde os animais receberam, respectivamente, os mesmos secretagogos listados acima e o quimioterápico 5-FU. Após a administração do secretagogo, foi coletada a saliva de todos os animais, por um período de 60 min. Em seguida, a saliva foi congelada a -80 °C para posterior determinação do quimioterápico por CLAE. Após análise dos cromatogramas, e com base nos resultados obtidos, foi possível identificar a presença do 5-FU nas amostras de saliva de *hamsters* que receberam o quimioterápico via intraperitoneal pela técnica da CLAE.

Palavras-Chave: Quimioterapia. 5-Fluorouracil. Excreção salivar. Saliva de Hamsters. Cromatografia de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Benites, B. Determining the presence of 5-FU in the saliva of the hamsters that received chemotherapy by liquid chromatography of high efficiency [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

Various analytical methods for testing the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU) in biological fluids of humans and animals have been reported previously. Whereas the administration of 5-FU alter in any way the morphology and function of the salivary glands, and that the presence of chemotherapy in the oral mucosa can lead to some oral complications, this study aimed to determine the presence of 5-FU in chemotherapy treated hamsters saliva by Liquid Chromatography High Performance (HPLC), since this animal model is used in studies of oral mucositis and gland hypofunction induced by 5-FU. Twelve animals were divided into 4 groups: intraperitoneally pilocarpine (CP), pilocarpine + isoproterenol (CPI) and the chemotherapy of the vehicle, and the QP and QPI groups where the animals were, respectively, the same secretagogues listed above and 5-FU chemotherapy. After administration secretagogue, the saliva from all animals was collected for a period of 60 min. Then the saliva was frozen at -80 °C for subsequent determination of chemotherapy by HPLC. After analysis of chromatograms, and based on the results obtained, it was possible to identify the presence of 5-FU in Hamsters saliva samples that received intraperitoneal chemotherapy via the technique of HPLC.

Keywords: Chemotherapy. 5-Fluorouracil. Salivary excretion. Saliva hamsters. Chromatography High Performance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fórmula molecular do 5-Fluorouracil (5-FU)	19
Figura 2.2 - Processo de secreção salivar	25
Figura 5.1 - Cromatograma representativo em CLAE de padrão interno de 5-BU em 5 µg/ml, em detector UV - 254 nm.	38
Figura 5.2 - Cromatograma representativo em CLAE de padrão de 5-FU em 10.000 ng/ml, em detector UV - 254 nm.	39
Figura 5.3 - Cromatograma representativo em CLAE de padrão de 5-FU em 100 ng/ml, em detector UV - 254 nm.	40
Figura 5.4 - Cromatograma representativo em CLAE do branco, em detector UV – 254 nm.	41
Figura 5.5 - Cromatograma representativo em CLAE de amostra do grupo 1 - CP, em detector UV - 254 nm.	42
Figura 5.6 - Cromatograma representativo em CLAE de amostra do grupo 2 - CPI, em detector UV - 254 nm.	43
Figura 5.7 - Cromatograma representativo em CLAE de amostra do grupo 3 - QP, em detector UV - 254 nm.	44
Figura 5.8 - Cromatograma representativo em CLAE de amostra do grupo 4 - QPI, em detector UV - 254 nm.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-BU	5-Bromouracil
5-FU	5-Fluouracil
5'-dFCR	5' - deoxi – fluorocitidina
5'-dFUR	5'-deoxi-5-fluorouridina
a.C	Antes de Cristo
ATP	Adenosina Trifosfato
B-UP	β - ureidopropionase
BV	Balão Volumétrico
Ca ⁺²	Cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CDA	Citidina Desaminase
CES	Carboxilesterase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Controle/pilocarpina
CPI	Controle/pilocarpina/isoproterenol
DAD	Detector de Arranjos Diodos
DAG	Diacylglicerol
DHP	Di-hidropirimidinase
DP	Diameter Particles
DPD	Dihidropirimidina-Desidrogenase
FBAL	α -fluoro- β -alanina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia de São Paulo
FUH ₂	di-hidrofluorouracil
FUPA	α -fluoro- β -ácido ureidopropionico
GTP	Guanosina Trifosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IgA _s	Imunoglobulina A secretora
IP ₃	Inositol 1,4,5 Trifosfato
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
L	Lenght
LV	Leucovorin
M ²	Metro quadrado
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
MTX	Metotrexato
Ng	Nanogramas
Nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIP ₂	Fosfatidil-Inositol 4,5 Bifosfato
PKA	Proteína Quinase A
QP	Quimioterapia/pilocarpina
QPI	Quimioterapia/pilocarpina/isoproterenol
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
TP	Timidina Fosforilase
TR	Tempo de Retenção
TS	Timidilato Sintase
U	Uracila
UH ₂	Di-hidrouracila
UV	Ultra-violeta
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Câncer e quimioterapia.....	17
2.2 Glândulas salivares e saliva.....	20
2.3 Processo secretório e secretagogos.....	23
2.4 Detecção do 5-FU em tecidos e fluídos corporais	26
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Comissão de ética no uso de animais.....	34
4.2 Animais	34
4.3 Coleta das amostras de saliva.	35
4.4 Preparo das amostras de saliva.....	35
4.5 Método analítico	36
4.5.1 Curva Padrão	37
4.5.2 Sequência de corrida analítica	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Identificação do 5-BU.....	38
5.2 Identificação do 5-FU	39
5.3 Branco	41
5.4 Grupos Controle.....	42
5.5 Grupos experimentais.....	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos do câncer foram descritos no antigo Egito e datam de aproximadamente 3000 a. C e Hipócrates, segundo a literatura, foi a primeira pessoa a usar uma palavra similar a câncer e a começar a definir de fato a doença tal qual a conhecemos hoje. Durante anos a doença foi considerada majoritariamente de países desenvolvidos. No entanto, hoje a maior parte dos gastos globais relacionados à doença é destinada aos países em desenvolvimento.

No Brasil, a estimativa até o final do ano de 2015 é de aproximadamente 576.580 mil novos casos de câncer em homens e mulheres (INCA, 2014). Segundo dados fornecidos pela GLOBOCAN 2012, o número estimado de novos casos de câncer anualmente em todo o mundo chegará em 20 milhões até o ano de 2025 (IARC, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo e, para 2030, estima-se que haverá 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença. Isso se deve ao envelhecimento populacional, redução da mortalidade infantil e o controle de mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (INCA, 2014; IARC, 2015; Ferlay et al., 2015).

Atualmente, o tratamento do câncer é alicerçado em uma avaliação multidisciplinar em que se determina um plano terapêutico, seja por ressecção cirúrgica, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) ou a combinação destes tratamentos visando melhores chances de cura e a preservação do paciente.

O termo quimioterapia refere-se ao tratamento de doenças por substâncias químicas que afetam o funcionamento celular. Os quimioterápicos empregados no tratamento das neoplasias, de maneira geral, podem ser classificados como: agentes alquilantes, antimetabólitos, antagonistas purínicos, inibidores de topoisomerasas e produtos naturais. (Chabner; Calabresi, 1995; Almeida et al., 2005).

Os agentes antimetabólitos, um dos grupos de quimioterápicos mais usados na prática clínica, exercem seus efeitos farmacológicos interferindo na síntese do DNA e RNA e são restritos à fase S do ciclo celular. Metotrexato (MTX) e 5- Fluorouracil (5-FU) se estabeleceram ao longo do último quarto de século entre os agentes

quimioterápicos de câncer mais utilizados (Coates et al., 1984). A administração sequencial de doses moderadas de MTX seguido por 5-FU tem demonstrado ser eficaz no tumor de cabeça e pescoço avançado, câncer colorretal e no câncer de mama (Dimery; Legha, 1986; Cameron et al., 1994).

O 5-FU é um fármaco antagonista das pirimidinas. É indicado não só em associação com outros agentes quimioterápicos como também como monoterapia para o tratamento oncológico de tumores malignos (Ewens et al., 2005). Muitas combinações de medicamentos utilizados para tratar cânceres invasivos (por exemplo, adenocarcinoma metastático de mama) incluem o 5-FU. O carcinoma colorretal é geralmente tratado com um regime que inclui 5-FU em combinação com Leucovorin (Madajewicz et al., 1984; O'Connell, 1989). Outra combinação eficaz é entre a Cisplatina e o 5-FU, no entanto a resposta e toxicidade variam consideravelmente de acordo com o esquema terapêutico (Scanlon et al., 1986; Lacave et al., 1991; Ahlgren et al., 1991; Chung et al., 1997).

Embora o principal modo de administração do 5-FU seja por via intravenosa, vários estudos com pacientes com câncer de cólon e ovário têm examinado o uso da administração intraperitoneal para alcançar altos níveis da droga no fígado e no peritônio, sem a toxicidade sistêmica grave que provoca (Ewens et al., 2005).

Devido à falta de seletividade dos agentes quimioterápicos para as células tumorais, há alguns efeitos colaterais descritos na literatura, como indisposição, redução de peso, diarreia, vômitos, dentre outros (Kalman; Vilani, 1997; Capra et al., 2001; Viele, 2003; Ewens et al., 2005). Além disso, há também ação dos quimioterápicos nas células dos tecidos da cavidade oral, o que pode levar à mucosite oral, candidose, ageusia e alterações do fluxo salivar e da composição da saliva, o que acarreta perda da qualidade de vida dos pacientes oncológicos (Simões et al., 2009; Naidu et al., 2004)

A hipossalivação/xerostomia é um dos sinais/sintomas mais comuns dos pacientes que são submetidos à RT de cabeça e pescoço e à QT (Vissink et al., 2003), juntamente com a mucosite oral. As glândulas salivares são de natureza exócrina, localizadas próximas à cavidade oral e classificadas, quanto ao tamanho, em glândulas salivares maiores e menores; sendo as glândulas submandibulares, parótidas e sublinguais as representantes do primeiro grupo e, as palatinas e labiais, exemplos de glândulas salivares menores (Holsinger; Bui, 2007).

O produto de secreção das glândulas salivares, a saliva, desempenha um papel importante na promoção da saúde da cavidade oral e, variações na sua quantidade e qualidade, podem ter consequências deletérias para a mucosa bucal e para todos os tecidos da cavidade oral (Epstein et al., 2002).

Com relação ao efeito da quimioterapia sobre as glândulas salivares, a literatura ainda é controversa (Laine et al., 1992; Harrison et al., 1998; Ohn et al., 2001), no entanto, quanto à radioterapia de cabeça e pescoço, a literatura é rica em trabalhos relacionados ao seu efeito nocivo e irreversível sobre as glândulas salivares, alterando a quantidade e qualidade da saliva (Jonhson et al., 1993; Parliament et al., 2004; Kam et al., 2007).

Campos (2013) e Campos et al. (2014), mostraram que o agente 5-FU promove alterações morfológicas e bioquímicas importantes nas glândulas submandibulares e sublinguais de *hamsters* que receberam o quimioterápico por via intraperitoneal. Além disso, outros trabalhos demonstraram alteração no fluxo e na composição salivar de pacientes oncológicos que receberam o tratamento quimioterápico (Lockhart; Sonis, 1981; McBride; Siegel, 1988; Vissink et al., 2004; Jensen et al., 2010).

Uma vez que pouco se sabe sobre o efeito do 5-FU sobre as glândulas salivares, somado ao fato de alguns autores sugerirem que o contato direto do 5-FU na mucosa oral pode estar relacionado com o aparecimento da mucosite oral (Barret, 1987; Milano et al., 1989; Slavik et al., 1993; Epstein et al., 2002), este trabalho tem o objetivo de determinar a presença de 5-FU na saliva de hamsters que receberam o quimioterápico pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma vez que este modelo animal é usado nos estudos com mucosite oral e hipofunção glandular, induzidas por 5-FU e, com isto, futuros trabalhos poderão ser realizados com esta técnica de determinação de 5-FU, para melhor compreensão de como estas complicações orais ocorrem após a administração deste quimioterápico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer e quimioterapia

Câncer, segundo pesquisas é o diagnóstico que a maioria dos brasileiros mais teme ouvir, pois está relacionado para muitos, com sofrimento e morte (INCA, 2015). Apesar dos avanços nas pesquisas, segundo dados do Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade, a doença assusta mais que a Aids e o diabetes, segundo e terceiro lugares, respectivamente (ICTQ, 2015).

Para uma célula cancerosa ou tumoral é necessário que haja uma transformação dos protooncogenes em oncogenes e, a partir disso, se multiplicam de forma descontrolada. Através da angiogênese, ocorre a manutenção e o acúmulo da massa dessas células, formando os tumores malignos. Inicialmente, as células tumorais invadem os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local no qual o tumor se iniciou, formando as metástases (Almeida et al., 2005).

Muito embora a cirurgia e a radioterapia sejam procedimentos mais eficazes e valiosos para tumores localizados, somente um terço dos pacientes oncológicos podem receber estes tratamentos, uma vez que essas medidas são utilizadas quando ainda não houve metástase tumoral. Os 70% restantes dos tumores sofrem micro metástases e, por isso, o mais indicado é a utilização ou associação da terapia sistêmica, a quimioterapia (QT) (Almeida et al., 2005).

O tratamento de tumores metastáticos é realizado através do uso de quimioterapia, hormônios e terapias biológicas, uma vez que a ação destes medicamentos é sistêmica. Em geral, quimioterápicos baseiam-se em compostos tóxicos que impossibilitam a proliferação rápida das células tumorais, porém, inibem também o rápido crescimento necessário para a manutenção de folículos de cabelo, de medula óssea e células do trato gastrointestinal que conduz a efeitos secundários indesejáveis observados em tratamento de cancer (Chabner; Roberts, 2005).

Mais recentemente, uma revolução industrial biotecnológica proporcionou o surgimento de uma nova era nas modalidades de tratamento, chamada de “Terapia

alvo”. Esta terapia tem como expectativa uma redução aos efeitos colaterais das terapias clássicas (Chabner; Roberts, 2005). A idéia é bloquear os sinais que ajudam as células malignas a crescerem e se dividerem incontrolavelmente, produzindo assim a morte de células cancerosas por meio de indução da apoptose, com estímulos ao sistema imune ou alvejando a entrega de agentes quimioterápicos específicos, minimizando a morte de células normais e evitando os efeitos secundários indesejáveis (Chabner; Roberts, 2005; Croce, 2008). A primeira droga da terapia alvo aprovado pela FDA (em inglês *Food and Drug Administration*) em 1997 foi o Retuximab, e foi também o primeiro anticorpo monoclonal disponível para o tratamento do cancer (Scott, 1998).

Por não fazer qualquer distinção entre as células normais e neoplásicas, a quimioterapia pode causar ulcerações na mucosa, tornando esta suscetível à infecção por bactérias da microbiota bucal, bem como por organismos exógenos com risco de disseminação sistêmica (Pizzo, 1993; Rolston et al., 2003). Concomitantemente, a função salivar comprometida pode elevar ainda mais o risco para essa disseminação de origem oral.

Inúmeros agentes citotóxicos têm sido relacionados ao desenvolvimento de danos à mucosa oral e gastrointestinal entre os quais podemos citar os agentes antimetabólitos como a mercaptopurina, a citarabina, o 5-Fluorouracil (5-FU) em altas doses, os substratos derivados de plantas como o etoposide, os agentes antitumorais como a doxorrubicina e os agentes alquilantes como o melfalano e bussulfano. Algumas drogas destacam-se pelo seu efeito estomatotóxico, como o metrotexato, 5-FU, doxorrubicina, dactinomicina, bleomicina e o uso de associações com floxuridina, mitomicina, vincristina e vinorelbina (Cunha, 2010). O 5-FU, molécula polar com fórmula molecular $C_4H_3FN_2O_2$ (Figura 2.1), foi introduzido na clínica terapêutica para tratamento de tumores em 1957 e continua sendo parte essencial do tratamento dos tumores gástricos, colorretais, de cabeça e pescoço, mama, ovário, próstata, fígado e do trato geniturinário. O 5-FU foi usado inicialmente de forma isolada e, com o passar dos anos, passou a ser utilizado em diferentes regimes, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes. Esses esquemas variam em suas doses, tempo e tipo de infusão (Martins et al., 2013).

Figura 2.1 – Fórmula molecular do 5-Fluorouracil (5-FU).
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure>

O 5-FU é um antimetabólito análogo à Uracila (U) que entra na célula utilizando o mesmo transporte facilitado da U com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar de hidrogênio. Há três formas citotóxicas diferentes atribuídas ao 5-FU: incorporação de fluoronucleotídeos no DNA ou RNA, que desencadeia o processo de apoptose, e a inibição da enzima timidilato sintase (TS). A TS é a enzima alvo do 5-FU e o aumento de sua expressão constitui um potencial mecanismo de resistência a esta droga. (Longley et al., 2003).

Deenen et al, demonstraram em 2013 a biotransformação da Capecitabina (pró-fármaco do 5-FU) e do 5-FU. A primeira é metabolizada pela carboxilesterase (CES) para 5'- deoxi – fluorocitidina (5'-dFCR), a qual é subsequentemente metabolizada pela citidina desaminase (CDA) para 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'-dFUR), seguido para conversão em 5-FU pela timidina fosforilase (TP). O 5-FU é inativado pela dihidropirimidina-desidrogenase (DPD) para di-hidrofluorouracil (FUH2), que é depois convertido por di-hidropirimidinase (DHP) para α -fluoro- β -ácido ureidopropionico (FUPA). O α -fluoro- β -alanina (FBAL) é o catabólito final da cascata de biotransformação e é formado pela β -ureidopropionase (β -UP).

A biodisponibilidade do 5-FU é reduzida no fígado (Schlemmer et al., 1994) através da DPD, enzima chave no catabolismo do 5-FU. É através desta enzima que o organismo exerce o *clearance* ou a desintoxicação pelos rins. Portanto, é reconhecido que a deficiência de DPD é responsável por mais toxicidades potencialmente letais e deve ser utilizado com parcimônia em pacientes com a deficiência, já que estes estão em maior risco (Ciccolini et al., 2010). Foi

demonstrado que a enzima DPD cataboliza imediatamente 80% a 85% do fármaco infundido, o que lhe transfere uma meia-vida plasmática que pode variar de 4.5 até aproximadamente 15 minutos (Heggie et al., 1987; Bressolle et al., 1999).

Devido à elevada toxicidade causada pelo uso do 5-FU e a relação com a atividade da enzima DPD de cada indivíduo, parece ser relevante introduzir testes de triagem antes da administração da droga (Dolegowska et al., 2012). Desta maneira, a detecção da função da DPD, poderia permitir a previsão de intolerância ao 5-FU pelo paciente e, com base neste dado, a aplicação de agentes quimioterápicos alternativos poderia ser instituída. Além disso, a análise da DPD poderia também ser utilizada como ferramenta para o cálculo das doses iniciais de 5-FU (Van Kuilenburg et al., 2012). Com isto, Dolegowska et al (2012), propuseram um método espectrofotométrico para medição da atividade do DPD, para fins de rastrear grupos de pacientes qualificados ou não para a quimioterapia com o agente 5-FU.

2.2 Glândulas salivares e saliva

As glândulas são originadas a partir da proliferação de células do epitélio de revestimento que invadem o tecido conjuntivo subjacente. Após a invasão, estas células sofrem um processo de diferenciação que as tornam especializadas na síntese, no armazenamento e na secreção de substâncias de acordo com a função no organismo, constituindo a porção secretora. Os epitélios glandulares que mantêm continuidade com o epitélio de revestimento, tanto diretamente com as células secretoras, quanto através de ductos, são denominadas células exócrinas. As glândulas exócrinas possuem uma porção secretora constituída por células especializadas no processo secretório e por ductos que transportam o produto secretado. Uma das formas de classificação dessas glândulas é o mecanismo pelo qual ocorre a liberação do produto de secreção. As glândulas salivares, por exemplo, por liberarem a secreção por meio da exocitose, sem que haja perda de material celular, são classificadas em células glandulares merócrinas (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012; Ten Cate, 2013).

O ser humano possui três pares de glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas ditas menores. As glândulas salivares são compostas por duas regiões anatômicas e funcionalmente distintas: as regiões das unidades secretoras terminais (antigamente chamadas de acinares) e ductal. A primeira consiste em um ou dois tipos de células, local no qual é produzido todo fluido e secretado grande parte de proteínas. A segunda é formada por tipos distintos de células e é o local onde ocorrem trocas iônicas e secreção de poucas proteínas (Nicolau, 2008).

As unidades secretoras terminais podem ser constituídas de células mucosas, serosas ou mucosas com semilua serosa, além de apresentarem células mioepiteliais que ajudam na secreção da saliva (Katchburian; Arana-Chavez, 2012). As glândulas menores são mucosas, as parótidas são principalmente serosas, as sublinguais são principalmente mucosas e as glândulas submandibulares, mistas com predomínio seroso. As células serosas são especializadas na síntese, armazenamento e secreção de proteínas, enquanto que a secreção das células mucosas possui um conteúdo menos enzimático e com maior teor de glicoproteínas (Carpenter, 2013). Possuem formato de trapézio e apresentam características ultraestruturais típicas de células com intensa atividade de síntese e secreção protéica. A região basal de seu citoplasma é repleta em retículo endoplasmático rugoso, e a região apical apresenta o aparelho de Golgi bem desenvolvido, além de muitas vesículas ou grânulos de secreção (Arana-Chavez; Bradaschia, 2012; Ten Cate, 2013).

As glândulas salivares maiores são responsáveis por aproximadamente 95% da secreção salivar e, as glândulas menores, pelos 5% restantes. As glândulas salivares menores, com ductos curtos, formam uma pequena massa glandular distribuída por quase toda extensão da cavidade bucal, abaixo da membrana mucosa. Embora produzam apenas 5% da saliva, elas secretam mucoproteínas importantes na formação da película adquirida (Katchburian; Arana-Chavez, 2012). Segundo Nicolau, o número total de glândulas salivares, menores ou acessórias, na cavidade oral foi estimado em cerca de seiscentos (Nicolau, 2008).

A glândula parótida é morfologicamente similar entre ratos e humanos, contendo células secretórias serosas e um sistema de ductos constituído de ductos intercalar, estriado e excretório. A glândula submandibular de roedores se diferencia dos humanos devido à falta de células mucosas secretórias (em humanos são

aproximadamente 10-20% de células secretórias) e devido à presença de um segmento ductal adicional, nomeado ducto granular, o qual secreta diversas enzimas e fatores de crescimento. Com isto, as glândulas salivares e a secreção salivar de ratos são o melhor modelo experimental, uma vez que estudos em humanos são limitados (Nagler, 2002; Tandler, 1993a,1993b).

Água e eletrólitos são transportados ativamente pelas unidades secretoras terminais e, em seguida, há uma mudança na composição desta saliva primária, principalmente no teor de eletrólito, durante a passagem pelo sistema de ducto (Turner; Sugiya, 2002; Melvin et al., 2005). A saliva passa, portanto, de uma solução isotônica para uma solução hipotônica à medida que atravessa o sistema de ductos. Este processo requer um alto gasto de energia, de modo que as regiões mais ativas têm um número elevado de mitocôndrias, localizadas na região basolateral das células, como nos ductos estriados. Além de absorver íons, há também a secreção de bicarbonato de potássio, um componente importante do sistema de tamponamento da saliva que ajuda evitando a desmineralização e ajudando a remineralização dos dentes. As demais células ductais secretam apenas pequenas quantidades de proteínas. No entanto, células dos ductos granulares, que são peculiares as glândulas submandibulares de alguns roedores, incluindo ratos e *hamsters*, possuem grande quantidade, por exemplo, de calicreína (Proctor; Carpenter, 2007).

A saliva é composta de 99% de água e 1% de substâncias, orgânica e inorgânica. Dentre as substâncias orgânicas encontradas na saliva, destacam-se as com funções já bem estabelecidas, como a amilase, lisozima e lactoperoxidase, fazendo parte das enzimas digestivas, lise das bactérias e catalisadora de oxido-redução, respectivamente. Dentre as funções de proteção exercida pelos componentes inorgânicos, destacam-se a manutenção do pH, realizada principalmente pelo bicarbonato, neutralização de ácidos e bases pelo fosfato e o processo de remineralização das superfícies dentárias exercida principalmente pelo cálcio e flúor (Nicolau, 2008).

A literatura aceita o uso de expressões como saliva mista, saliva total ou fluido oral. Saliva é o produto de secreção das glândulas salivares, livre de outros materiais, enquanto que fluido oral é a mistura de saliva com o fluido do sulco gengival (fluido crevicular), além de células de descamação e resíduos alimentares (Nicolau, 2008).

Segundo Lawrence, os componentes da saliva agem como um "espelho da saúde do corpo", visto que a saliva pode ser uma ferramenta no monitoramento da saúde e por vezes no diagnóstico precoce de certas doenças, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o câncer de mama (Lawrence, 2002).

As glândulas salivares são afetadas diretamente por algumas condições sistêmicas, incluindo desordens autoimunes (síndrome de *Sjögren*, HIV, lúpus eritematoso e artrite reumatoide), desordem hormonais (diabetes, disfunção da glândula tireoide), desordens neuronais (Parkinson, paralisia de Bell, paralisia cerebral), depressão, tratamento oncológico, como, radioterapia na região de cabeça e pescoço ou quimioterapia e mais de 500 fármacos podem alterar o funcionamento das glândulas, principalmente em relação a xerostomia e a hipofunção glandular, com consequente quadro de hipossalivação (Nicolau, 2008; Simões et al., 2009a,b; Simões et al., 2010; Katchburian; Arana-Chavez, 2012; Campos et al., 2013).

O controle e atividade, das células secretoras das glândulas salivares, são de responsabilidade do sistema nervoso simpático e parassimpático que trabalham harmoniosamente em conjunto para produzir a saliva (Proctor; Carpenter, 2007).

2.3 Processo secretório e secretagogos

As glândulas salivares recebem suprimento nervoso autônomo simpático e parassimpático. A estimulação α -adrenérgica e colinérgica muscarínica é responsável pela secreção de água e eletrólitos, com menor concentração de substâncias orgânicas enquanto que a β -adrenérgica é responsável pela secreção protéica (Baum, 1993).

As glândulas salivares maiores são innervadas por ambos os nervos simpático e parassimpático (Baum, 1993). A secreção salivar ocorre em resposta à estimulação autônoma de neurotransmissores simpáticos e parassimpáticos e interagem com receptores específicos da membrana plasmática das células glandulares desencadeando uma série de reações envolvidas no processo secretório. O estímulo simpático é mediado principalmente pelo neurotransmissor acetilcolina, enquanto que o estímulo parassimpático é mediado principalmente pelo neurotransmissor noradrenalina (Proctor; Carpenter, 2007). O mecanismo pelo qual

os neurotransmissores induzem as glândulas salivares a secretarem produtos baseia-se em sua ligação a receptores superficiais específicos, na membrana basolateral, e por meio da geração do segundo mensageiro (transdução de sinal) ativam os processos envolvidos na secreção do fluido e regulação da exocitose. Os principais componentes do sistema de transdução de sinal são: receptores, as proteínas-G, os efetores enzimáticos, os segundos mensageiros, os canais iônicos e as proteínas quinases. Esses receptores são chamados de moduladores ativos, os quais podem ser divididos em duas classes: agonistas (estimulação) e antagonistas (bloqueador). As glândulas salivares expressam uma variedade de receptores de superfície celular, os quais em destaques são: receptores adrenérgicos, muscarínicos, substância P e VIP (peptídeo vaso-intestinal) (Nicolau, 2008).

O tecido alvo responde de forma correta a determinado estímulo, que lhe é específico. O receptor reconhece as características estruturais do sinalizador e a interação dos dois geralmente ativa ou complexa proteínas de transdução de sinal da membrana, como proteínas-G, ou outro transdutor. A maioria dos transdutores de receptores na membrana plasmática são proteínas ligadoras de guanosina trifosfato (GTP), conhecidas como proteínas-G. As proteínas-G são constituídas por três subunidades: α , β e γ . Se o estímulo for iniciado através da ligação de um neurotransmissor com um receptor β -adrenérgico, a subunidade α interage diretamente com a enzima adenilato ciclase. Esta interação causa a ativação do centro catalítico da enzima, de modo que o ATP é convertido a cAMP. Havendo o aumento intracelular de cAMP, haverá a ativação da proteína quinase A dependente de cAMP, ocorrendo a exocitose de proteínas. Por outro lado, se a estimulação for via receptor muscarínico- colinérgico é a enzima fosfolipase C que será ativada. Esta enzima catalisa a hidrólise do fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para formar dois segundos mensageiros, o inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃, no citoplasma, se ligará ao receptor do retículo endoplasmático provocando a liberação de cálcio e contribuindo para o aumento do nível de cálcio citosólico. O DAG ativa a proteína quinase C, a qual é dependente de cálcio. Esse aumento de cálcio citosólico, altera a proteína quinase C permitindo que a mesma seja ativada, o que leva à exocitose de proteínas. A figura 2.2 demonstra, resumidamente, o processo de secreção salivar após os estímulos simpático e parassimpático (Nicolau, 2008).

Figura 2.2 – Processo de secreção salivar (Nicolau, 2008)

A estimulação salivar pode ser feita através da estimulação dos receptores orais (via aferente) ou por ação direta no sistema nervoso autônomo (via eferente). A via aferente engloba estímulos fisiológicos gustatórios e mastigatórios enquanto que na via eferente o estímulo salivar é através de sialogogos (Holmes, 1999; Davies, 1997; Pedrazas et al., 2007).

A pilocarpina e o isoproterenol, aplicados por via intraperitoneal, são os dois principais agentes utilizados para estimular a salivação em ratos. A pilocarpina, a uma dosagem de 0,1-10 mg/kg de peso e o isoproterenol, em doses de 10-250 mg/kg de peso corporal (Krinke, 2000).

A pilocarpina é um agonista parassimpático e sua utilização como secretagogo é comum, causando uma produção contínua e abundante da saliva, usualmente resultando em uma secreção aquosa (Ferguson, 1993). O Isoproterenol é um potente agonista β -adrenérgico, não seletivo, com baixa afinidade pelos receptores α -adrenérgicos (Hoffman; Lefkowitz, 1996) que aumenta os níveis de cAMP nas unidades secretoras terminais, ativando a proteína quinase A e desta forma estimula a secreção protéica (Baum, 1993). No trabalho realizado por Selye e colaboradores foi observado que ratos tratados cronicamente com isoproterenol

secretaram grande quantidade de saliva viscosa, além de terem mostrado que a pele destes animais se apresentava constantemente úmida (Selye et al., 1961).

2.4 Detecção do 5-FU em tecidos e fluidos corporais

Vários métodos de análise para o ensaio do quimioterápico 5-Fluorouracila (5-FU) em fluidos biológicos foram previamente relatados, incluindo a separação dos compostos estruturalmente relacionados, seus metabólitos, como as pirimidinas, e especialmente a uracila, que tem um tempo de retenção próximo ao 5-FU (Alsarra; Alarafi, 2004). Para isso, os autores utilizaram a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, que vem do acrônimo CLAE (em inglês, *High- performance liquid chromatography – HPLC*).

A cromatografia é uma técnica de química analítica utilizada para separar, identificar e para quantificar os componentes de uma mistura. Os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária. Esta última, geralmente de grande área, e a outra um fluido insolúvel, que percorre a fase estacionária (Ciola, 1998). São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases, influenciando a retenção destes sobre a coluna cromatográfica. Cada componente na amostra interage de forma diferente com o material adsorvente, sendo a saída de cada um, dependente desta interação. Com isto, os picos cromatográficos serão gerados de acordo com o tempo de retenção e interação do soluto com as fases móvel e estacionária (Collins et al, 2006).

Alsarra e Alarifi, em um trabalho usando CLAE desenvolveram e validaram um método rápido e simples de quantificação do 5-FU em amostras de plasma humano obtidas a partir de voluntários saudáveis e que receberam a adição de 5-FU e de soluções de timina. O método foi extremamente sensível ao ponto de indentificar 1ng/ml da droga, o que o torna uma ferramenta potencialmente valiosa em muitas aplicações (Alsarra; Alarif, 2004).

Bressolle et al, propôs em seu trabalho avaliar a farmacocinética do 5-FU e do Leucovorin (LV) em 85 pacientes com cancer colorretal metastático. Amostras de sangue foram coletadas antes, durante e após as infusões em *bólus* de 5-FU. As

concentrações plasmáticas de 5-FU foram realizadas por CLAE com detecção para ultravioleta (UV). Os limites de quantificação e de detecção foram de 20 ng/ml e 10 ng/ml, respectivamente (Bressolle et al., 1999).

As quantificações, no plasma, da uracila (U) e do seu metabólito di-hidrouracila (UH₂), podem ser utilizadas como marcadores substitutos do 5-FU (César et al., 2012). Além disso, Deenen e colaboradores, utilizando o mesmo tipo de aparelho usado por César et al, desenvolveram um método robusto de quantificação da Capecitabina e seus seis metabólitos em plasma humano, fazendo com que, dessa forma, novos estudos farmacocinéticos possam ser realizados e testados, já que alguns autores citam o poder citotóxico dos metabólitos do 5-FU (Deenen et al., 2013). Baseado em estudos com radiomarcadores, Derissen et al, quantificaram simultaneamente três dos metabólitos intracelulares formados, considerados responsáveis pelo efeito antineoplásico do 5-FU em células mononucleares de sangue periférico, sendo eles, 5-Fluorouridina (FUTP), 5-fluorodesoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-fosfato (FdUMP), através da cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas (Derissen et al., 2015).

Heggie e colaboradores estudaram a farmacocinética do 5-FU e seus metabólitos no plasma, urina e bile de 10 pacientes tratados com a droga em bólus via intravenosa, a uma concentração de 500 mg/m². Os autores utilizaram um método de CLAE rápido, específico e reprodutível, que permitiu a identificação simultânea do 5-FU e dos seus metabólitos. Especificamente no caso das amostras do plasma, constatou-se que a concentração de 5-FU variou entre 5 e 419.8 µM e, que após duas horas da infusão, já não era mais possível encontrar concentrações detectáveis do 5-FU no plasma, sendo que o limite de detecção do método foi de 2 µM (Heggie et al., 1987).

Zheng e Wang (2005) quantificaram, também por CLAE, os níveis de 5-FU no sangue, fígado e no tumor de 39 pacientes com Carcinoma hepatocelular tratados por mais de quatro dias antes de serem operados. Os resultados encontrados pelos autores em relação a concentração da droga foi de 1.1 µg/ml ±0.3 no plasma; 5.6 µg/ml ±0.8 no fígado; 5.9 µg/ml ±0.9 no centro do tumor e na periferia do tumor encontraram 10.5 µg/ml ±1.6.

Diversos agentes quimioterápicos já foram identificados na saliva de pacientes tratados sistemicamente, entre eles: 5-FU, etoposide, melfalan, carboplatina e taxol (Slavik et al., 1993). Milano e colaboradores, em 1989, avaliaram a concentração de

5-FU no plasma e na saliva de 10 pacientes que receberam o quimioterápico durante 5 dias de infusão contínua para diversos tipos de tumores. Oito de dez pacientes apresentaram aumento na concentração de 5-FU durante o curso de infusão, sugerindo que, o contato direto e crescente do 5-FU com o epitélio oral, pode estar relacionado com o aparecimento de danos à mucosa oral. Tal fato reforça a necessidade de uma maior compreensão da farmacologia do 5-FU na saliva (Milano et al., 1989), como também observado por Epstein et al. (2002).

Mazzeo et al (2013), analisaram a saliva de 15 pacientes que iriam receber tratamento com 5-FU e Leucovorin em três momentos distintos: antes, durante o primeiro ciclo e após 21 dias do primeiro ciclo. Concentrações mais elevadas de flúor e de cálcio foram observadas nas amostras extraídas durante o primeiro ciclo, indicando a presença de produtos do metabolismo dos fármacos na saliva.

Bressolle e colaboradores (1992), usando CLAE, quantificaram Doxorrubicina no plasma e saliva estimulada de glândula parótida de 6 pacientes que receberam entre 28 a 72 mg/m² da droga. Com exceção da primeira hora que somente foi coletado amostra de sangue, ambos, sangue e saliva foram coletados em tempos variados de 2, 4, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a infusão intravenosa do quimioterápico. A análise revelou que as concentrações da droga na saliva parótida e no plasma não se correlacionaram, e as concentrações máximas identificadas em saliva variaram entre 11.7 a 82.6 ng/ml. Os autores vão de acordo com Milano, e sugerem que, como as drogas são excretadas em quantidades significativas na saliva parótida, podem expor a mucosa do trato gastrointestinal a estes agentes, mesmo após administração intravenosa, sendo uma das possíveis causas da mucosite em doentes que recebem este tipo de medicamento.

Celio e colaboradores (1983), usando CLAE, identificaram 5-FU no plasma e na saliva de glândulas parótidas de 11 pacientes com doenças neoplásicas avançada em tempos variados de 15, 45 e 75 minutos após administração intravenosa do quimioterápico. No plasma, identificou entre 0,3 à 35 µg/ml e em saliva, foi possível identificar de 0,02 à 12 µg/ml de 5-FU, sendo as maiores concentrações encontradas em 15 minutos de coleta. Além disso, os autores mostraram que o 5-FU é rapidamente distribuído nos tecidos e seu nível plasmático diminui drasticamente após a administração intravenosa. Os autores concluíram que a concentração dos agentes quimioterápicos na saliva pode fornecer informações sobre a concentração plasmática da droga e, a via de eliminação do fármaco, pode ajudar no

desenvolvimento de esquemas terapêuticos para agentes antineoplásicos tóxicos, assim como ajudar na detecção de pacientes que possuem patologias que alteram a excreção da droga e conseqüentemente estão em maior risco de desenvolver toxicidade.

Joulia e colaboradores (1999), investigaram o perfil farmacocinético do 5-FU e Leucovorin em plasma e saliva de 21 pacientes com tumores colorretais metastáticos que receberam dois ciclos consecutivos de infusão contínua, por meio de análises em CLAE. As amostras foram coletadas em tempos variados de 0.3, 1, 2, 3, 4, 18, 22.3 horas após a infusão, sendo a saliva coletada por dois minutos, por coleta. Apesar de haver uma correlação significativa entre as concentrações individuais de 5-FU na saliva e plasma, os valores ficaram dispersos, de modo que a concentração da droga na saliva de glândula parótida não pôde ser usada como estimativa indireta dos níveis de 5-FU livre no plasma.

De particular interesse fisiológico e clínico, os trabalhos em geral, tem identificado uma rápida difusão de 5-FU na saliva nos primeiros 15 a 20 minutos após a infusão, obtendo a maior concentração nesse período. Este fenômeno pode ser devido a alterações na função das glândulas salivares causadas pelo 5-FU, resultando na redução da taxa de fluxo salivar (Celio et al., 1983; Hayashi et al., 1988a; Slavik et al., 1993; Meurman et al., 1994; Joulia et al., 1999).

Jensen e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática de hipofunção da glândula salivar e xerostomia induzida por terapias contra o câncer. Após análise dos dados, os autores concluíram que os resultados mostraram divergência com relação ao diagnóstico de câncer subjacente, aos regimes de quimioterapia, a diferentes períodos de estudo em relação à administração de quimioterápicos e ao número de ciclos de quimioterapia anteriores. Além disso, a maioria dos estudos avaliou a função da glândula salivar apenas durante a quimioterapia sem acompanhamento em longo prazo. Portanto, não é possível tirar qualquer conclusão consistente sobre os efeitos da quimioterapia e a prevalência de hipofunção da glândula salivar e xerostomia. Por outro lado, ressalta que os pacientes com baixa secreção salivar antes do tratamento do câncer parecem estar em maior risco de desenvolver hipossalivação em resposta à quimioterapia e a ter uma recuperação mais demorada (Jensen et al., 2008).

Por ser o modelo animal mais utilizado em outros trabalhos, Celio et al, usando ratos machos da raça *Wistar*, coletaram amostras do plasma, saliva da glândula

parótida e da bile para avaliar a farmacocinética do 5-FU em 3 concentrações diferentes, qual seja, 12,5, 25 e 50mg/kg após administração intravenosa. A meia-vida no plasma para cada concentração foi 22 ± 2 ; 25 ± 5 e 27 ± 3 minutos, respectivamente. A saliva foi coletada em tempos variados de 15, 30 e 60 minutos identificando concentrações que variaram entre 0,7 e 7,6 $\mu\text{g/ml}$ de 5-FU, sendo que as menores e maiores concentrações identificadas da droga foram proporcionais às concentrações injetadas (Celio et al., 1983).

Wang e colaboradores (2008), quantificaram o 5-FU em amostras de sangue de quatro ratos machos que receberam uma dose de 25 mg/kg diluídas em 0,9% de solução salina. Todos os animais receberam 1 mL/kg do peso corpóreo da solução da droga via intravenosa através da canulação realizada na veia jugular. Antes da administração do 5-FU era coletada uma amostra do sangue por um catéter, o que equivale ao branco (amostra sem 5-FU), e após a injeção as coletas foram realizadas nos tempos 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 180 minutos. A concentração máxima detectada foi de $21 \mu\text{g/ml} \pm 3.26$ e o limite de detecção foi de 20 ng/ml.

Hayashi e colaboradores (1988b), usando ratos como modelo animal, estudaram a excreção salivar do 5-FU pelas glândulas submandibulares e parótidas, após administração intravenosa em *bolus* do quimioterápico. A saliva específica de cada glândula foi coletada através de canulação dos ductos excretores. Os resultados apresentaram diferenças na excreção de cada glândula salivar, de modo que houve maior excreção do quimioterápico pela glândula submandibular.

Como observado, a excreção salivar de várias drogas tem sido objeto de um alto número de estudos nas três últimas décadas, visto que o método de coleta da saliva tem a vantagem de ser uma técnica não invasiva, sem exposição dos pacientes ao desconforto, irritação da pele e risco de infecção. Pouco valor foi dado à excreção dos quimioterápicos e seus efeitos colaterais aos tecidos da cavidade oral, visto que ainda é desconhecido se o contato direto dos quimioterápicos na mucosa oral pode estar relacionado com o aparecimento das mucosites e quais os efeitos nas glândulas salivares e sua relação com o fluxo salivar.

Antuniassi (2005) e McCarthy et al (1998), observaram que pacientes portadores do fluxo salivar reduzido, submetidos a protocolo quimioterápico com 5-FU, desenvolveram mais mucosite e em grau mais severo. Esse fato correlaciona-se com os trabalhos que avaliaram a concentração da sIgA, o fluxo salivar e a presença

dos diversos quimioterápicos na saliva, em pacientes com manifestação de mucosite oral (Barret, 1987; Milano et al., 1989; Slavik et al., 1993).

As principais complicações sistêmicas ou orais relacionadas com altas doses do 5-FU incluem diarreia, mielossupressão e mucosite (Cunningham et al., 1984; Madajewicz et al., 1984; O'Connell, 1989). Outras toxicidades, com uma baixa incidência são: síndrome mão-pé, alopecia, náuseas, vômitos, dermatite, toxicidades cardíacas e diminuição da secreção da glândula salivar (Celio et al., 1983; Slavik et al., 1993; Joulia et al., 1999). De acordo com os trabalhos citados, César et al., encontraram semelhanças entre as toxicidades mais comuns, das quais, a diarreia em 9/12 (75%), estomatite em 10/12 (83%) e neutropenia febril em 10/12 (83%) pacientes (César et al., 2012).

Ewens e colaboradores, avaliaram o edema facial, aumento da glândula salivar submandibular e sua associação com a perda de peso, após a administração (intraperitoneal e intravenosa) de 5-FU + LV em diferentes grupos de ratos. De acordo com os dados da pesquisa, pode-se observar que tanto a dose quanto a via de administração afetaram o nível de toxicidade. Assim, os ratos tratados com uma dose baixa tiveram uma maior perda de peso, quando o tratamento foi dado iv do que quando foi dado ip. Já com doses altas, por ambas as vias, todos os ratos tiveram perda de peso contínua e foram sacrificados quando a sua perda de peso foi de $\geq 20\%$ o seu peso pré-tratamento. Em relação ao edema facial, a incidência foi de 100% para ratos que receberam doses elevadas de 5-FU + LV por ambas as vias, 83% nos que receberam baixa dose pela via iv e 0% para aqueles via ip. Não houve relação direta do aumento de volume da glândula com a perda de peso do animal, de modo que, apenas em 50% e 17% daqueles que receberam a droga via ip e iv altas doses, respectivamente, resultaram na perda de peso máxima tolerada (Ewens et al., 2005).

Ainda sobre o aumento de volume das glândulas submandibulares, Ewens e colaboradores concluíram que se tratava de uma infecção oportunista, e excluíram todas as formas de infecção prévia ao tratamento antineoplásico. Entretanto, não conseguiram explicar o porque do aumento de volume especificamente nessa glândula. Segundo Sonis et al, os danos diretos à mucosa enfraquecem a integridade do tecido e quando associadas à diminuição da produção de saliva ou bloqueio das glândulas e imunossupressão, as bactérias podem entrar no interstício, sendo essa a justificativa sugerida também por Ewens (Sonis et al., 1990; Ewens et

al., 2005). Mazzeo et al (2012), avaliaram a atividade funcional das glândulas submandibulares em ratos Wistar submetidos à quimioterapia e em comparação aos resultados de Ewens, embora não excluam a possibilidade de infecção bacteriana de doenças imunológicas temporárias, sugerem que a secreção salivar pode ser afetada por um mecanismo dual. O primeiro mecanismo seria a toxicidade induzida por 5-FU, interferindo assim no uso da glicose pelas células acinares. O segundo, afetaria o arco reflexo autônomo simpático mediado por receptores beta. Assim, a ação sinérgica de ambas as drogas 5-FU + LV agiria negativamente sobre a atividade neural, reduzindo a secreção salivar. E ainda completa dizendo que isto explicaria a hipossalivação, citado por vários autores em pacientes submetidos a regime de 5-FU + LV no tratamento de carcinoma colorrectal.

Campos (2013), mostrou que o 5-FU atua nas glândulas salivares atrofiando as unidades secretoras terminais e alterando a composição deste tecido, no entanto, esclarece que o mecanismo de ação desta droga sobre as glândulas salivares ainda é desconhecido (Campos, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

Uma vez que a administração do quimioterápico 5-FU altera a morfologia e função das glândulas salivares e que, de maneira direta, a presença do quimioterápico na mucosa oral pode levar a algumas complicações orais, como a mucosite e, como este modelo animal é usado nos estudos destas alterações induzidas por este quimioterápico; somado ao fato de que não há na literatura, dentro do nosso conhecimento, padronização da técnica de detecção do 5-FU em saliva de *hamsters*, a determinação da droga na saliva destes animais, pode ajudar em futuros trabalhos na compreensão de como estas complicações orais ocorrem, após a administração deste quimioterápico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor entendimento, a descrição de materiais e métodos foi subdividida.

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP) e está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) (Anexo A).

4.2 Animais

Foram utilizados *hamsters sírio dourado* machos, com massa corpórea entre 120 a 200 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Odontologia de Bauru e foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP.

Primeiramente, os animais eram pesados e divididos em 1 por gaiola, com livre acesso a água e comida. Em seguida, os animais eram divididos em diferentes grupos, conforme o uso do secretagogo e do 5-FU (n=3):

Grupo CP: animais receberam pilocarpina e o veículo do quimioterápico;

Grupo CPI: animais receberam pilocarpina + isoproterenol e veículo do quimioterápico;

Grupo QP: animais receberam pilocarpina e injeção de 5-FU;

Grupo QPI: animais receberam pilocarpina + isoproterenol e injeção do 5-FU.

Após os animais serem anestesiados com uma associação de Anasedan (Cloridrato de Xilazina) 13,8 mg/kg e Dopalen (Cloridrato de Ketamina) 11,6 mg/kg, era injetado, via intraperitoneal, soluções de Pilocarpina (7,5mg/kg p.c) e Isoproterenol (5,0 mg/kg p.c.), dissolvidos em água destilada, para o estímulo da salivação. Imediatamente após era injetado 65 mg/kg do 5-FU (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), diluído em hidróxido de amônia 1M (veículo), via intraperitoneal, de acordo com o protocolo utilizado por Campos e colaboradores. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo na mesma proporção (Campos et al., 2013).

4.3 Coleta das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas por um período de 60 minutos. Para a coleta da saliva foi utilizado um funil que direcionava o fluxo salivar ao tubo *falcon* de coleta, o qual era mantido em gelo. Percorrido o tempo de coleta das amostras, as mesmas foram armazenados em um freezer à -80 °C até o momento das análises. Após o tempo de coleta, os animais foram sacrificados por destroncamento medular.

4.4 Preparo das amostras de saliva

Previamente à análise cromatográfica, as amostras de saliva dos grupos CP, CPI, QP e QPI eram descongeladas e preparadas de acordo com o método citado por Joulia et al, onde para cada alíquota de 100 µl de saliva, 20 µl da solução do padrão interno (Blorouracil, 5 µg/ml) era adicionado e misturado suavemente, adicionado a 100µl de acetonitrila, um solvente polar, e então a amostra era centrifugada (10 min a 1350 g e 4 °C). O sobrenadante era transferido para um tubo de ensaio e, para cada 100µl, era misturado com 300 µl de acetato de etila. A mistura então foi centrifugada (10 min a 1540 g e 4 °C). A fase orgânica superior foi pipetada e transferida para um tubo de ensaio de vidro e levada para o Laboratório

de Toxinas e Produtos Naturais de Algas – LTPNA, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para evaporação em Nitrogênio até à secura, em uma temperatura fixada em 40 °C. O resíduo seco foi resuspendido em 200 µl de água deionizada e, em seguida, as amostras eram filtradas em filtros Millex®, 0.45µm (Millipore) antes da injeção na coluna (Joulia et al., 1999).

4.5 Método analítico

As análises foram realizadas em um sistema de CLAE Shimadzu Prominence (Shimadzu, Japão) de acordo com a monografia oficial USP 38 NF 33, 2015. O método referido foi modificado com relação à proporção de fase móvel e dimensão de coluna cromatográfica para otimização do tempo de retenção e disponibilidade de materiais, respectivamente. Assim, foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm; Ace, Escócia) e fase móvel constituída por 100% de solução de tampão fosfato 0,05 M, com eluição isocrática, diluído em água deionizada. O pH da solução foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, com solução de hidróxido de potássio (KOH) 5M. O fluxo da fase móvel foi ajustado em 1,0 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 µl e foi realizada de forma manual. A detecção foi efetivada através de detector de arranjos diodos, do inglês *diode array detector* (DAD), no comprimento de onda de 254 nm.

Foram preparados branco e curva padrão do 5-FU. O branco utilizado foi água deionizada (**Milli-Q®**, Gehaka). Para a curva padrão foram utilizadas soluções do analito conforme descrição abaixo.

Além disso, foi preparada amostra do padrão interno 5-BU (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Para isso, foi pesado 10 mg do composto, o qual foi diluído em água milliq até o volume de 100 mL, e dessa solução foi pipetado 12,5 mL para um volume de 50 mL de água deionizada, obtendo como concentração final 5 µg/mL do padrão interno.

4.5.1 Curva Padrão

Foi pesado 10 mg da substância de referência de 5-FU (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e transferido para balão volumétrico âmbar (BV) de 1L, obtendo assim uma concentração de 10 µg/mL do analito.

Em BV de 100mL foram pipetadas 18,75mL, 12,5mL e 6,25mL da solução padrão estoque para obtenção de 7,5µg/mL, 5 µg/mL e 2,5µg/mL de concentração do analito. Para se obter a concentração de 1µg/mL foi pipetado 2,5mL da solução estoque em BV de 25mL e dessa solução, pipetado 2,5mL e adicionado em BV de 25 mL para se obter a concentração de 100ng/mL. Para cada concentração foram realizadas injeções em triplicata e assim calculada a curva padrão.

Foi pesado 10mg da substância do 5-BU (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e diluído em água milliQ em BV de 100 mL, e dessa solução foi pipetado 12,5 mL para um BV de 50 mL, obtendo como concentração final 5 µg/mL do padrão interno.

4.5.2 Sequência de corrida analítica

A sequência de corrida analítica foi subdivida em tópicos para melhor entendimento. As soluções e amostras eram injetadas sequencialmente conforme descrição abaixo:

- 1 – Solução do branco.
- 2 – Solução do padrão interno (5µg/ml, 5-BU).
- 3 – Uma concentração conhecida da solução de 5-FU.
- 4 – Solução do branco.
- 5 – Amostras dos grupos CP e CPI, animais que não receberam o quimioterápico.
- 6 – Uma concentração conhecida da solução de 5-FU.
- 7 – Amostras dos grupos QP e QPI, animais que receberam o 5-FU.

5 RESULTADOS

Os resultados cromatográficos foram subdivididos em identificação do branco, padrão interno (5-BU), padrão (5-FU), branco e, na sequência, os diferentes grupos (CP, CPI, QP e QPI).

5.1 Identificação do 5-BU

A figura 5.1 representa o cromatograma da solução do padrão interno, 5-Bromouracil (5-BU) e, este apresentou tempo de retenção (t_r) em 13 ± 0.5 minutos para todas as leituras.

Figura 5.1 – Cromatograma representativo, em CLAE, de padrão interno de 5-BU com 5 $\mu\text{g/ml}$, em detector UV - 254 nm

5.2 Identificação do 5-FU

Após a injeção da solução de 5-FU utilizando as condições cromatográficas citadas e avaliação dos parâmetros como tempo de retenção (t_r), fator de cauda e eficiência da coluna, as figuras 5.2 e 5.3 representam o cromatograma da solução e, demonstram que o t_r do 5-FU, mesmo variando as concentrações de 10.000ng/ml para 100ng/ml, se mantiveram em 4.6 ± 0.4 minutos para todas as leituras.

Figura 5.2 – Cromatograma representativo em CLAE, de solução de 5-FU, com concentração de 10.000 ng/ml, em detector UV - 254 nm

Figura 5.3 – Cromatograma representativo, em CLAE, do 5-FU, com concentração de 100 ng/ml, em detector UV - 254 nm

5.3 Branco

A figura 5.4 representa o cromatograma da amostra do branco, água deionizada, onde não se observa pico na região do 5-FU e do 5-BU.

Figura 5.4 – Cromatograma representativo em CLAE do branco, em detector UV - 254 nm

5.4 Grupos Controle

As figuras 5.5 e 5.6 representam cromatogramas das amostras de saliva dos grupos CP e CPI, animais que não receberam quimioterápico, mas que receberam padrão interno durante o tratamento das amostras. Após a leitura, observou-se pico no tr do 5-BU e ausência no tr do 5-FU.

Figura 5.5 – Cromatograma representativo, em CLAE, de amostra do grupo CP, em detector UV - 254 nm

Figura 5.6 – Cromatograma representativo, em CLAE, de amostra do grupo CPI, em detector UV - 254 nm

5.5 Grupos Experimentais

As figuras 5.7 e 5.8 representam cromatogramas das amostras de saliva dos grupos QP e QPI, animais que receberam o quimioterápico. Após a leitura, observou-se pico no tr do 5-FU e do 5-BU.

Figura 5.7 – Cromatograma representativo, em CLAE, de amostra do grupo QP, em detector UV - 254 nm.

Figura 5.8 – Cromatograma representativo, em CLAE, de amostra do grupo QPI, em detector UV - 254 nm.

6 DISCUSSÃO

A detecção salivar de várias drogas, como os quimioterápicos, tem sido objeto de estudo de vários autores na tentativa de correlacionar os resultados das análises salivares com os observados nas análises realizadas em plasma (Celio et al., 1983; Hayashi et al., 1988a, b; Hayashi et al., 1989; Bressolle et al., 1992; Joulia et al., 1999). Além disso, alguns autores correlacionaram a presença de alguns quimioterápicos na saliva com as complicações orais decorrentes da ação direta destes sobre a mucosa oral (Celio et al., 1983; Milano et al., 1989; Epstein et al., 2002).

Alguns trabalhos encontrados na literatura identificaram ou quantificaram o quimioterápico 5-Fluorouracil (FU), um importante agente quimioterápico, em amostras de fluídos ou tecidos de humanos, ratos e cães (Celio et al., 1983; Watanabe et al., 1985; Heggie et al., 1987; Hayashi et al., 1988a, 1988b; Hayashi et al., 1989; Milano et al., 1989; Bressolle et al., 1992, 1999; Joulia et al., 1999; Alsarra e Alarifi, 2004; Zheng e Wang, 2005; Wang et al., 2008; Mazzeo et al., 2012; César et al., 2012; Dolegowska et al., 2012; Mazzeo et al., 2013; Deenen et al., 2013), no entanto, até o momento dessa pesquisa, não encontramos trabalhos que determinaram a presença deste quimioterápico em saliva de *hamsters*, o qual é bastante utilizado como modelo de estudo da mucosite oral e hipofunção das glândulas salivares decorrentes da injeção intraperitoneal do 5-FU, através de um modelo proposto por Sonis et al e posteriormente modificado por outros autores (Sonis et al., 1990; França et al., 2009; Campos et al., 2014).

Os autores que quantificaram 5-FU em saliva de humanos e ratos, o fizeram através de métodos analíticos em CLAE. Há muito tempo que a CLAE é o modelo de escolha entre os pesquisadores e indústrias para separação e quantificação de substâncias. A CLAE é muito utilizada, pois se trata de um tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Sendo assim, tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins et al., 2006). Apresenta uma série de vantagens como a possibilidade de utilizar a mesma fase estacionária várias vezes, permite realizar análises qualitativas

e oferece bons resultados quantitativos (desvios inferiores a 5%), além de possibilitar a detecção na região do espectro do visível e do ultra-violeta (Ciola, 1998). Por outro lado, alguns autores citam como limitação do método, o extenso preparo das amostras, tempos de corrida relativamente longa, necessidade de troca de coluna, limite inferior de quantificação insuficiente, ou a falta de detalhes sobre o método de replicação (Deenen et al., 2013).

Com relação ao método de extração da amostra, levando-se em consideração que na literatura já está descrita a determinação e quantificação de 5-FU em saliva de ratos, no presente trabalho foi seguido o protocolo proposto por Joulia et al, para saliva de ratos, onde os autores quantificaram amostras contendo apenas 10 ng/ml do 5-FU (Joulia et al., 1999).

Antes de iniciar uma análise, é necessário obter estabilidade da linha de base. Uma vez estável, antes de qualquer corrida analítica, deve ser determinada a leitura com solução que contenha todos os componentes exceto o agente a ser analisado, para comprovação de ausência de sinal analítico. No presente trabalho, este controle foi conseguido através das amostras dos grupos CP e CPI.

As análises, do presente trabalho, foram realizadas de acordo com a monografia oficial USP 38 NF 33, 2015. Indo de acordo com o capítulo geral <621> da farmacopeia americana, e considerando a disponibilidade de colunas e testes realizados com o 5-FU (padrão), a coluna que apresentou resultados satisfatórios foi a de 150 x 4,6 mm, mantendo a razão comprimento/tamanho de partículas recomendada. Sendo assim, a partir de testes prévios, foi observado que, no tempo de retenção do ativo, havia presença de sinal analítico no branco, o que poderia comprometer a identificação do fármaco, devido coeluição. A fim de separar esses sinais analíticos, foi realizada alteração na proporção da fase móvel, a qual ficou definida como 100% do tampão fosfato 0,05 M, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Outro ponto modificado do protocolo citado foi a concentração do padrão de 5-FU, uma vez que o método referido utiliza o preparo do padrão na concentração de 10 µg/ml e, de acordo com a literatura, alguns métodos utilizam a detecção do ativo na saliva em concentrações de ng/ml (Celio et al., 1983; Watanabe et al., 1985; Milano et al., 1989; Joulia et al., 1999; César et al., 2012).

Muitos trabalhos que quantificaram quimioterápicos em saliva, realizaram o estudo em modelos animais. No entanto, os roedores não apresentam salivação espontânea, sendo o processo de secreção salivar dependente de estimulação do

sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Com isto, estes trabalhos utilizaram a pilocarpina e o isoproterenol como secretagogos para estimulação salivar nesses animais.

A pilocarpina é um medicamento muito utilizado e eficaz para tratar a secura da boca em pacientes com xerostomia ou hipossalivação, por atuar sobre os receptores muscarínicos M3 tipo colinérgicos de células acinares. A utilização de um secretagogo parassimpatomimético estimula a secreção de água e eletrólitos, através do aumento intracelular de Ca^{2+} , produzindo uma saliva mais fluída (Susa et al., 2013). Embora o isoproterenol não seja usado como estimulante salivar em humanos, é um medicamento simpaticomimético que atua ao nível dos receptores β -adrenérgicos. Por ser um potente agonista β -adrenérgico, pode ser usado como secretagogo em glândulas salivares de roedores. Sua ação se dá em resposta à estimulação de receptores β_1 - e β_2 -adrenérgico (Zaagsma; Nahorski, 1990), aumento de cAMP e ativação da proteína quinase A (PKA), o que resulta na exocitose de proteínas (D'Amico et al., 2010; Susa et al., 2013).

Piraino et al (1980), utilizaram como agente colinérgico, a pilocarpina (0,25 mg / ml) e infundiram (0,2 ml / min) ao longo de um período de 60 min para estimular a secreção salivar de glândula parótida de ratos. Celio et al (1983), utilizaram-se do mesmo protocolo em 1983 também com ratos *Wistar*. Hayashi et al (1988), induziram a salivação de ratos *Wistar* usando somente pilocarpina em um fluxo constante durante 2 horas até atingir um estado de equilíbrio plasmático. Fujinami et al (2009), estimularam a secreção salivar com isoproterenol (2,0 mg/kg) e pilocarpina (0,5 mg/kg). Susa et al (2013), utilizaram separadamente pilocarpina 0,1 mg/100 g e isoproterenol 0,8 mg/100 g por peso corporal. Mazzeo et al (2012), utilizaram Metacolina para estimular a produção de saliva fluída, e isoproterenol para induzir a descarga de proteínas armazenadas, ambas dissolvidas em solução salina a uma concentração de 5 mg/kg peso.

Celio et al (1983), usando rato *Wistar* como modelo animal, demonstrou que o 5-FU era excretado em quantidades detectáveis na saliva de parótida após a administração intravenosa, utilizando a análise por CLAE. Porém, os valores quantificados na saliva de glândulas parótidas foi tão baixa que os autores acreditavam que esta concentração contribuía de maneira insignificante para os equivalentes totais de drogas eliminados do corpo. Hayashi et al (1988b), usando o mesmo modelo animal e também analisando a concentração do 5-FU por CLAE,

mostraram que mesmo em concentrações mais altas da droga, viram que a excreção salivar correspondia apenas com 0,07 % do total do clearance corporal, indo de acordo com a hipótese sugerida por Celio.

A partir das primeiras observações dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico, Celio et al, levantaram a hipótese, até hoje não confirmada, de que a excreção na saliva expõe a mucosa do trato gastro-intestinal superior e, com isso, poderia ser um dos fatores irritantes e sinérgicos do mecanismo interno das drogas na formação das mucosites (Celio et al., 1983; Milano et al., 1989). Outros efeitos secundários dos quimioterápicos no sistema estomatognático, incluem disgeusia e xerostomia (Mazzeo et al., 2013).

Freqüentemente, a mucosite oral afeta a mucosa não queratinizada das bochechas, lábios, palato mole, a superfície ventral da língua, e o assoalho da boca aproximadamente 5 a 7 dias após a administração da droga (Sonis et al., 1990). Com o interesse em minimizar os efeitos clínicos da mucosite e infecção subsequente, Sonis et al, propuseram utilizar *Hamsters* como um modelo animal por imitarem a condição visto em seres humanos (Sonis et al., 1990).

Campos e colaboradores (2014), por meio de análise clínica, biológica e histológica, avaliaram a MO e a hipofunção das glândulas salivares submandibulares e sublinguais, ambas induzidas pelo 5-FU. Os autores encontraram alteração na atividade das enzimas antioxidantes e lactato desidrogenase, assim como clara atrofia das unidades secretoras terminais, apoptose, aumento dos espaços intercelulares e fusão dos grânulos de secreção das glândulas submandibulares, assim como atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do estroma, fusão dos grânulos de secreção e perda do limite intercelular das glândulas sublinguais. Concluem que esses efeitos citotóxicos resultam em dano severo ou morte celular.

Frente aos resultados do trabalho de Campos et al (2014), torna-se evidente a necessidade de analisar a saliva de *Hamsters* que receberam o 5-FU e verificar se esse modelo animal pode ser utilizado para quantificação do quimioterápico. Além disso, alguns autores acreditavam que as alterações citológicas nas glândulas salivares dos ratos após doses subletais de 5-FU poderia prejudicar a descarga de materiais de secreção (Celio et al., 1983). Sendo assim, a confirmação da presença do 5-FU na saliva de *Hamsters* passa a ter grande valor para as próximas pesquisas, visto que esse é um dos modelos animais usado para avaliar as alterações na mucosa oral e nas glândulas salivares.

O 5-FU pode ser usado de forma isolada ou em combinação com outras drogas e geralmente é utilizada via intravenosa, no intuito de regredir o tumor e aumentar a sobrevida dos pacientes (Glimelius et al., 1998). Porém, há muito tempo foi comprovado que casos com fornecimento vascular deficiente dificultam a absorção eficiente de agentes quimioterápicos em células tumorais (Jain, 1988). A fim de se obter a concentração máxima do quimioterápico no órgão alvo, foi sugerida como uma via alternativa de administração, a via intraperitoneal (Cunliffe; Sugarbaker, 1989; Horsell et al., 1999; Mahteme et al., 2004).

O uso da cavidade peritoneal para administração de quimioterapia é baseado no mecanismo fisiológico de transporte entre o sangue e a cavidade peritoneal. A absorção de fluido capilar e a absorção de fluido linfático são os determinantes para a perda de fluido a partir da cavidade peritoneal. A parede capilar é a principal barreira entre o sangue e troca da cavidade peritoneal (Rippe et al., 2001).

Jones et al, já em 1978, relatou que com a administração das drogas por via intravenosa era possível obter melhores níveis das mesmas no plasma, e que, por outro lado, a administração intraperitoneal, como no caso do 5-FU + LV, demonstrava resultar em uma maior exposição do fígado, órgão principal de metástases de carcinoma colorretal (Jones et al., 1978).

Yazbeck et al. (2015), através de injeções intraperitoneal em ratos, avaliou os efeitos tóxicos potenciais do extrato de caracol em ratos, o qual foi testado pelo mesmo grupo como potencial quimiopreventivo, quando administrado sozinho, ou em combinação com 5-FU. Al-Hamdany; Al-Hubaity (2014), avaliaram as alterações histológicas e mudanças histoquímicas induzidas por 5-FU via intraperitoneal dentro dos hepatócitos de ratos *Wistar*. Abd et al (2014), investigou o efeito anti-proliferativo de metformina em comparação com 5-FU induzida por formação de criptas aberrantes colorretal em ratos, quando administrado via oral e intra-peritoneal.

Esses trabalhos demonstram que, apesar da via intravenosa ser o principal modo de administração do 5-FU, ainda hoje é muito utilizada a via intraperitoneal. Por ser um método já utilizado também pelo grupo de pesquisa do nosso laboratório e, por não encontrar trabalhos que demonstrassem a maneira de realizar a canulação em hamsters, assim como há trabalhos em ratos *wistars* (Celio et al., 1983; Hayashi et al., 1989; Ewens et al., 2005; Wang et al., 2008), optou-se por utilizar a via intraperitoneal para injeção das drogas utilizadas no trabalho.

Com a metodologia utilizada em nosso trabalho, foi possível identificar a presença do quimioterápico 5-FU na saliva de *hamsters* que receberam, via intraperitoneal, secretagogos que estimulam apenas a via parassimpática (Pilocarpina) ou animais que além de receberem este estímulo, receberam também estimulante simpatomimético (Isoproterenol). Como o objetivo era identificar e não quantificar, ainda não é possível dizer que o uso concomitante de duas vias de estimulação salivar pode causar um aumento da excreção do fármaco em *hamsters*, como sugerido por Mazzeo (Mazzeo et al., 2012).

Dessa forma, mesmo alterando o método referido, foi possível identificar a presença do 5-FU em amostras de saliva de *Hamsters* que receberam o quimioterápico via intraperitoneal, e assim, uma vez identificado o 5-FU, os próximos trabalhos poderão correlacionar a presença do quimioterápico com os efeitos colaterais nos tecidos da mucosa gastro-intestinal.

7 CONCLUSÃO

Com base nas condições deste estudo e nos resultados obtidos podemos concluir que é possível identificar o quimioterápico 5-FU em saliva de *hamsters*, que receberam o fármaco intraperitonealmente, por CLAE, e conclui-se que o método utilizado é sensível para o que se propôs.

Considerando o fato de que não há na literatura, dentro do nosso conhecimento, padronização da técnica de detecção do 5-FU em saliva de *hamsters*, a identificação da droga na saliva destes animais, pode auxiliar em futuros trabalhos que poderão ser realizados com esta técnica de determinação de 5-FU, para melhor compreensão de como estas complicações orais ocorrem após a administração deste quimioterápico.

REFERÊNCIAS¹

- Abd AH, Hussein AG and Mahmood AS. Efficacy of intra-peritoneal administration of metformin and 5-Fluorouracil in prevention of induced-colorectal aberrant crypt foci in mice. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2014;6(2): 305-8.
- Ahlgren JD, Trocki O, Gullo JJ, Goldberg R, Muir WA, Sisk R, Schacter L. Protracted infusion of 5-FU with weekly low-dose cisplatin as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer who have failed 5-FU monotherapy. *Cancer Invest*. 1991;9(1):27-33.
- Al-Hamdany MZ and Al-Hubaity AY. The histological and histochemical changes of the rat's liver induced by 5-Fluorouracil. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 28, No. 2, 2014 (95-103).
- Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA e Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular e específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova*. 2005;28(1) : 118-29.
- Alsarra IA, Alarifi MN. Validated liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 May 25;804(2):435-9.
- Antuniassi AR. Ocorrência e Grau de severidade da mucosite bucal em relação ao fluxo salivar de pacientes sob quimioterapia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2005.
- Arana-Chavez VE e Bradaschia, V. *Biologia celular e tecidual para odontologia – moléculas, células e tecidos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. v. 1.
- Barrett AP. Clinical characteristics and mechanisms involved in chemotherapy-induced oral ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987 Apr;63(4):424-8.
- Baum BJ. Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 20;694:17-23. Review.

---

¹De acordo com o estilo Vancouver.

Bressolle F, Jacquet JM, Galtier M, Jourdan J, Donadio D, Rossi JF. Doxorubicin and doxorubicinol plasma concentrations and excretion in parotid saliva. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;30(3):215-8.

Bressolle F, Joulia JM, Pinguet F, Ychou M, Astre C, Duffour J, Gomeni R. Circadian rhythm of 5-fluorouracil population pharmacokinetics in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;44(4):295-302.

Cameron DA, Gabra H, Leonard RC. Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br J Cancer*. 1994 Jul;70(1):120-4.

Campos L, Nicolau J, Arana-Chavez VE, Simões A. Effect of laser phototherapy on enzymatic activity of salivary glands of hamsters treated with 5-Fluorouracil. *Photochem Photobiol*. 2014 May- Jun;90(3):667-72.

Campos L. Estudo clínico, bioquímico e histológico comparativo do efeito das fototerapias LED, laser de baixa e alta potência na mucosite oral e do efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares em hamsters tratados com 5- Fluorouracil. [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2013.

Capra S, Ferguson M, Ried K. Cancer: impact of nutrition intervention outcome-- nutrition issues for patients. *Nutrition*. 2001 Sep;17(9):769-72.

Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:267-76.

Celio LA, DiGregorio GJ, Ruch E, Pace JN, Piraino AJ. 5-Fluorouracil concentrations in rat plasma, parotid saliva, and bile and protein binding in rat plasma. *J Pharm Sci*. 1983 Jun;72(6):597-9.

Celio LA, DiGregorio GJ, Ruch E, Pace J, Piraino AJ. Doxorubicin and 5-fluorouracil plasma concentrations and detectability in parotid saliva. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983;24(2):261-6.

César IC, Cunha-Júnior GF, Duarte Byrro RM, Vaz Coelho LG, Pianetti GA. A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of dihydrouracil/uracil ratio in plasma: evaluation of toxicity to 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer. *Ther Drug Monit*. 2012 Feb;34(1):59-66.

Ciccolini J, Gross E, Dahan L, Lacarelle B, Mercier C. Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer*. 2010 Oct;9(4):224-8.

Ciola R. Fundamentos de cromatografia. A líquido de alto desempenho – HPLC. São Paulo: Edgard Blucher LTDA; 1998.

Chabner BA, Calabresi P. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 1995.

Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):65-72.

Chung YS, Yamashita Y, Inoue T, Matsuoka T, Nakata B, Onoda N, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Shirasaka T, Sowa M. Continuous infusion of 5-fluorouracil and low dose cisplatin infusion for the treatment of advanced and recurrent gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 1997 Jul 1;80(1):1-7.

Coates AS, Tattersall MH, Swanson C, Hedley D, Fox RM, Raghavan D. Combination therapy with methotrexate and 5-fluorouracil: a prospective randomized clinical trial of order of administration. *J Clin Oncol*. 1984 Jul;2(7):756-61.

Collins CH, Braga GL e Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP; 2006.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):502-11.

Cunha CB. Avaliação da eficácia do tratamento para mucosite oral Induzida por cinco-fluoracil, com uso de laser de baixa potência em diferentes comprimentos de onda [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2010.

Cunliffe WJ, Sugarbaker PH. Gastrointestinal malignancy: rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg*. 1989 Oct;76(10):1082-90.

Cunningham J, Bukowski RM, Budd GT, Weick JK, Purvis J. 5-Fluorouracil and folinic acid: a Phase I-II trial in gastrointestinal malignancy. *Invest New Drugs*. 1984;2(4):391-5.

Davies AN. The management of xerostomia: a review. *Eur J Cancer Care*. 1997 Sep;6(3):209-14.

D'Amico F, Skarmoutsou E, Mangano K, Malaponte G, Stivala F, Mazzarino MC. Expression and localization of prominin-1 in isoproterenol-treated rat parotid gland. *Int J Mol Med*. 2010 Oct;26(4):505-10.

Deenen MJ, Rosing H, Hillebrand MJ, Schellens JH, Beijnen JH. Quantitative determination of capecitabine and its six metabolites in human plasma using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Jan 15;913-914:30-40.

Derissen EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Development of an LC-MS/MS assay for the quantitative determination of the intracellular 5-fluorouracil nucleotides responsible for the anticancer effect of 5-fluorouracil. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Jun 10;110:58-66.

Dimery IW, Legha SS. Sequential methotrexate, 5-fluorouracil, and cisplatin in the treatment of recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck: failure of hypertonic saline to reduce the nephrotoxicity of cisplatin. *J Clin Oncol*. 1986 Nov;4(11):1670-6.

Dolegowska B, Ostapowicz A, Stanczyk-Dunaj M, Blogowski W. Spectrophotometric methods as a novel screening approach for analysis of dihydropyrimidine dehydrogenase activity before treatment with 5-fluorouracil chemotherapy. *J Physiol Pharmacol*. 2012 Aug;63(4):411-21.

Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Jul;94(1):39-44.

Ewens AD, Mihich E, Ehrke MJ. Fluorouracil plus leucovorin induces submandibular salivary gland enlargement in rats. *Toxicol Pathol*. 2005;33(4):507-15.

Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993 Feb;75(2):186-91.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

França CM, França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Jan 9;94(1):25-31.

Fujinami Y, Fukui T, Nakano K, Ara T, Fujigaki Y, Imamura Y, Hattori T, Yanagisawa S, Kawakami T, Wang PL. The effects of cigarette exposure on rat salivary proteins and salivary glands. *Oral Dis.* 2009 Oct;15(7):466-71.

Glimelius B, Jakobsen A, Graf W, Berglund A, Gadeberg C, Hansen P, Kjaer M, Brunsgaard N, Sandberg E, Lindberg B, Sellström H, Lorentz T, Pahlman L, Gustavsson B. Bolus injection (2-4 min) versus short-term (10-20 min) infusion of 5-fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: a prospective randomised trial. Nordic Gastrointestinal Tumour Adjuvant Therapy Group. *Eur J Cancer.* 1998 Apr;34(5):674-8.

Harrison T, Bigler L, Tucci M, Pratt L, Malamud F, Thigpen JT, Streckfus C, Younger H. Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist.* 1998 May-Jun;18(3):109-12.

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res.* 1987 Apr 15;47(8):2203-6.

Hayashi Y, Watanabe J, Iwamoto K, Ozeki S. Salivary excretion of 5-fluorouracil. II. Fluctuation of saliva/plasma concentration ratio and salivary clearance during a constant rate intravenous infusion in beagle dogs. *J Pharmacobiodyn.* 1988a Jun;11(6):438-43.

Hayashi Y, Watanabe J, Ozeki S, Iwamoto K. Salivary excretion of 5-fluorouracil (5-FU). III. Non-linear kinetics of salivary excretion of 5-FU following bolus intravenous administration in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1988b Nov;36(11):4547-53.

Hayashi Y, Watanabe J, Ozeki S. Salivary excretion of 5-fluorouracil (5-FU). IV. Dependency of saliva/plasma concentration ratio and salivary clearance on plasma concentration of 5-FU during constant-rate intravenous infusion in rats. *J Pharmacobiodyn.* 1989 Mar;12(3):137-44.

Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Catecolaminas, Drogas Simpaticomiméticas e Antagonistas dos Receptores Adrenérgicos. In: Gilman, AG, As bases farmacológicas da terapêutica. 9ªed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana; 1996. p. 103-17.

Holmes S. The Management of Xerostomia in Older Adults. *Reviews in clinical gerontology,* 1999;(9):317-26.

Holsinger FC, Bui DT. Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. Salivary Gland Disorders. Berlin: Springer; 2007.

Horsell KW, Merten S, Clingan P, King DW, Morris DL. Peritonectomy and intraperitoneal chemotherapy in appendiceal and colorectal cancer. Aust N Z J Surg. 1999 Oct;69(10):729-32.

IARC. International agency for research on cancer. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, GLOBOCAN, 2012 [citado 15 jun. 2015] Disponível em: www.globocan.iarc.fr

ICTQ. Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade. O câncer no alvo do medo [citado em 15 jun. 2015]. Disponível em: www.ictq.com.br/portal/colunas-materias/o-cancer-no-alvo-do-medo

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do câncer. Estimativas 2014 [citado 15 jun. 2015]. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2014.

Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review. Cancer Res. 1988 May 15;48(10):2641-58.

Jensen SB, Mouridsen HT, Reibel J, Brünner N, Nauntofte B. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. Oral Oncol. 2008 Feb;44(2):162-73.

Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, Dutilh J, Fulton JS, Jankovic L, Lopes NN, Mello AL, Muniz LV, Murdoch-Kinch CA, Nair RG, Napeñas JJ, Nogueira-Rodrigues A, Saunders D, Stirling B, von Bültzingslöwen I, Weikel DS, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT; Salivary Gland Hypofunction/Xerostomia Section; Oral Care Study Group; Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. Support Care Cancer. 2010 Aug;18(8):1061-79.

Johnson JT, Ferretti GA, Nethery WJ, Valdez IH, Fox PC, Ng D, Muscoplat CC, Gallagher SC. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. N Engl J Med. 1993 Aug 5;329(6):390-5.

Joulia JM, Pinguet F, Ychou M, Duffour J, Astre C, Bressolle F. Plasma and salivary pharmacokinetics of 5-fluorouracil (5-FU) in patients with metastatic colorectal cancer

receiving 5-FU bolus plus continuous infusion with high-dose folinic acid. *Eur J Cancer*. 1999 Feb;35(2):296-301.

Kalman D, Villani LJ. Nutritional aspects of cancer-related fatigue. *J Am Diet Assoc*. 1997 Jun;97(6):650-4.

Kam MK, Leung SF, Zee B, Chau RM, Suen JJ, Mo F, Lai M, Ho R, Cheung KY, Yu BK, Chiu SK, Choi PH, Teo PM, Kwan WH, Chan AT. Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 1;25(31):4873-9.

Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e embriologia oral*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Krinke GJ. *The Laboratory Rat*. London: Academic Press; 2000.

Lacave AJ, Barón FJ, Antón LM, Estrada E, De Sande LM, Palacio I, Esteban E, Gracia JM, Buesa JM, Fernández OA, et al. Combination chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil 5-day infusion in the therapy of advanced gastric cancer: a phase II trial. *Ann Oncol*. 1991 Nov-Dec;2(10):751-4.

Laine P, Meurman JH, Tenovuo J, Murtomaa H, Lindqvist C, Pyrhönen S, Teerenhovi L. Salivary flow and composition in lymphoma patients before, during and after treatment with cytostatic drugs. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1992 Oct;28B(2):125-8.

Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc*. 2002 Mar;68(3):170-4.

Lockhart PB, Sonis ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histologic study. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981 Dec;7(12):1019-25.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):330-8.

Madajewicz S, Petrelli N, Rustum YM, Campbell J, Herrera L, Mittelman A, Perry A, Creaven PJ. Phase I-II trial of high-dose calcium leucovorin and 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Cancer Res*. 1984 Oct;44(10):4667-9.

Mahteme H, Larsson B, Sundin A, Khamis H, Graf W. Uptake of 5-fluorouracil (5-FU) in peritoneal metastases in relation to the route of drug administration and tumour debulking surgery an autoradiographic study in the rat. *Eur J Cancer*. 2004 Jan;40(1):142-7.

Martins CG, Wagner SC, Linden R. Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. *Rev Bras Cancerologia*. 2013;59(2):271-80.

Mazzeo MA, Linares JA, López MM, Gallará RV, Bachmeier E, Wietz FM, Finkelberg AB. Functional impairment in submandibular gland of rats induced by 5-fluorouracil and calcium leucovorin. *Acta Odontol Latinoam*. 2012;25(3):262-8.

Mazzeo MA, Linares JA, López MM, Bachmeier E, Wietz FM, Galván V, Valentinuzzi MC, Riveros JA, Finkelberg A. Analysis of saliva samples from oncological patients treated with 5-fluorouracil and leucovorin calcium by scanning electron microscopy with energy dispersive system. *J Oral Pathol Med*. 2013 Nov;42(10):788-92.

McBride RK, Siegel IA. Effect of methotrexate on protein and amylase secretion by rat parotid and submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol*. 1988;33(4):245-9.

McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol*. 1998 Nov;34(6):484-90.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:445-69.

Meurman JH, Laine P, Lindqvist C, Pyrhonen S, Teerenhovi L. Effect of anticancer drugs on patients with and without initially reduced saliva flow. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994 May;30B(3):204-8.

Milano G, Thyss A, Santini J, Frenay M, Francois E, Schneider M, Demard F. Salivary passage of 5-fluorouracil during continuous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):197-9.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):141-6.

Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. *Neoplasia*. 2004 Sep-Oct;6(5):423-31.

Nicolau J. Fundamentos de Bioquímica oral. Rio de Janeiro: Guanabara; 2008.

O'Connell MJ. A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer. A Mayo Clinic/North Central Cancer Treatment Group study. *Cancer*. 1989 Mar 15;63(6 Suppl):1026-30.

Ohrn KE, Wahlin YB, Sjöden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. *Support Care Cancer*. 2001 Jun;9(4):247-57.

Parliament MB, Scrimger RA, Anderson SG, Kurien EC, Thompson HK, Field GC, Hanson J. Preservation of oral health-related quality of life and salivary flow rates after inverse-planned intensity- modulated radiotherapy (IMRT) for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Mar 1;58(3):663-73.

Pedrazas CHS, Azevedo NML, Torres SR. Manejo do paciente com hipossalivação. *Rev PerioNews*. 2007;1(4):369-73.

Piraino AJ, DiGregorio GJ, Ruch EK. A small animal model utilizing salivary drug excretion for pharmacokinetic determinations. *J Pharmacol Methods*. 1980 Jan;3(1):1-7.

Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *N Engl J Med*. 1993 May 6;328(18):1323-32.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci*. 2007 Apr 30;133(1):3-18. Epub 2006 Dec 6.

Rippe B, Rosengren BI, Venturoli D. The peritoneal microcirculation in peritoneal dialysis. *Microcirculation*. 2001 Oct;8(5):303-20.

Rolston KV, Frisbee-Hume S, LeBlanc B, Streeter H, Ho DH. In vitro antimicrobial activity of moxifloxacin compared to other quinolones against recent clinical bacterial isolates from hospitalized and community-based cancer patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Oct;47(2):441-9.

Scanlon KJ, Newman EM, Lu Y, Priest DG. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):8923-5.

Schlemmer HP, Bachert P, Semmler W, Hohenberger P, Schlag P, Lorenz WJ, van Kaick G. Drug monitoring of 5-fluorouracil: in vivo ^{19}F NMR study during 5-FU chemotherapy in patients with metastases of colorectal adenocarcinoma. *Magn Reson Imaging*. 1994;12(3):497-511.

Scott SD. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Pract*. 1998 May-Jun;6(3):195-7.

Selye H, Veilleux R, Cantin M. Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science*. 1961 Jan 6;133(3445):44-5.

Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PH, Cristófaró M, Marques MM, Eduardo CP. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009a Apr;41(4):264-70.

Simões A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2009b;24(4):591-6.

Simões A, de Campos L, de Souza DN, de Matos JA, Freitas PM, Nicolau J. Laser phototherapy as topical prophylaxis against radiation-induced xerostomia. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):357-63.

Slavik M, Wu J, Riley C. Salivary excretion of anticancer drugs. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 20;694:319-21.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990 Apr;69(4):437-43.

Susa T, Sawai N, Aoki T, Iizuka-Kogo A, Kogo H, Negishi A, Yokoo S, Takata K, Matsuzaki T. Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. *Acta Histochem Cytochem*. 2013 Dec 28;46(6):187-97.

Tandler B. Introduction to mammalian salivary glands. *Microsc Res Tech.* 1993a Sep 1;26(1):1-4.

Tandler B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microsc Res Tech.* 1993b Sep 1;26(1):57-74.

Ten Cate. Antonio Nanci. *Histologia oral.* 8ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2013.

Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis.* 2002 Jan;8(1):3-11.

United States Pharmacopeia. General chapter <621> Chromatography. USP 38 NF 33; 2015.

United States Pharmacopeia. Monography Fluouracil. USP 38 NF 33; 2015.

Viele CS. Overview of chemotherapy-induced diarrhea. *Semin Oncol Nurs.* 2003 Nov;19(4 Suppl 3):2-5.

Van Kuilenburg AB, Häusler P, Schalhorn A, Tanck MW, Proost JH, Terborg C, Behnke D, Schwabe W, Jabschinsky K, Maring JG. Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetics in cancer patients with a c.1905+1G>A mutation in DPYD by means of a Bayesian limited sampling strategy. *Clin Pharmacokinet.* 2012 Mar 1;51(3):163-74.

Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Prevention and treatment of salivary gland hypofunction related to head and neck radiation therapy and chemotherapy. *Support Cancer Ther.* 2004 Jan 1;1(2):111-8.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):199-212.

Wang Q, Song X, Zhang F, Liu Y. Determination of 5-fluorouracil in sérum microsamples by a high-performance liquid chromatographic method and its application to pharmacokinetic studies in rats. *J Chromatogr Sci.* 2008 May-Jun;46(5):450-3.

Watanabe J, Hayashi Y, Iwamoto K, Ozeki S. Salivary excretion of 5-fluorouracil. I. Fluctuation of the saliva/plasma concentration ratio and salivary clearance in beagle

dogs following bolus intravenous administration. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1985 Mar;33(3):1187-94.

Yazbeck R, Lindsay R, Abbott CA, Benkendorff K and Howarth GS. Combined Effects of Muricid Extract and 5-Fluorouracil on Intestinal Toxicity in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2015, Article ID 170858, 9 pages, 2015.

Zaagsma J, Nahorski SR. Is the adipocyte beta-adrenoceptor a prototype for the recently cloned atypical 'beta 3-adrenoceptor'? Trends Pharmacol Sci. 1990 Jan;11(1):3-7.

Zheng JF, Wang HD. 5-Fluorouracil concentration in blood, liver and tumor tissues and apoptosis of tumor cells after preoperative oral 5'-deoxy-5-fluorouridine in patients with hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2005 Jul 7;11(25):3944-7.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **004/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Alyne Simões Gonçalves** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa **"Correlação da concentração do 5-FU em diferentes órgãos e fluídos de hamsters tratados com o quimioterápico"** do qual participam o(s) pesquisador(es) **Fernando Neves Nogueira e Bernar Monteiro Benites**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **28/04/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 28 de abril de 2014.

Prof. Dr. João Guálberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP