ANDRESSA MATUCCI HOTSUMI

**Estudo temporal, do efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil
em glândulas salivares de hamsters**

São Paulo

2021

ANDRESSA MATUCCI HOTSUMI

**Estudo temporal, do efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil
em glândulas salivares de hamsters**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Biomateriais e Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves

São Paulo

2021

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

Hotsumi, Andressa Matucci.

Estudo temporal, do efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil em glândulas salivares de hamsters / Andressa Matucci Hotsumi; orientadora Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2021.

73 p.: fig., tab., graf.; 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 Corrigida.

1. Quimioterapia. 2. Fluorouracil. 3. Xerostomia. I. Gonçalves, Alyne Simões. II. Título.

Hotsumi AM. Estudo temporal, do efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil em glândulas salivares de hamsters. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 04 / 03 /2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Miguel Amenábar.

Instituição: Universidade Federal do Paraná.

Julgamento: Aprovada.

Profa. Dra. Sandra Bastos Rezende

Instituição: Instituto Brasileiro de Controle do Câncer.

Julgamento: Aprovada.

Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira.

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Aprovada.

Dedico este trabalho,

À Deus, por sempre me colocar em equilíbrio e me amparar em momentos difíceis.

À minha família, Tânia Regina e Ricardo Satoru, e meu irmão, Ricardo, pela paciência, suporte, educação e orientação. Obrigada por sempre me apoiarem e incentivarem nas escolhas que fiz na vida. A vocês só tenho gratidão e amor.

Aos meus avós paternos, Itoko e Shigeo, e meus avós maternos, Iracema e Eliseu (in memoriam), por serem a minha inspiração e exemplo de força e caráter. Obrigada por todos os valores ensinados. Tenho eterna admiração e tenho muito orgulho em dedicar essa conquista a vocês.

Ao meu padrinho, Carlos Kenji, por toda atenção e dedicação desde a minha formação. Obrigada, pelas experiências compartilhadas, paciência e compreensão. Um exemplo que levo de profissional ético e competente. Gratidão por compartilhar todo o amor pela Odontologia.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, por toda orientação e ensinamentos durante quase sete anos de convivência. Tenho muito orgulho em falar que sou sua orientanda, muito obrigada pela confiança e por sempre acreditar no meu potencial. Você é um exemplo de pessoa, profissional, humildade e dedicação. Tenho muita admiração em seu amor por ensinar e crescer junto com seus alunos. Obrigada por todas as oportunidades que me ofereceu até hoje. Você é a grande responsável por eu amar a odontologia, serei eternamente grata a você.

À Profa. Dra. Luana Campos, que se tornou uma grande amiga e a minha primeira orientadora na minha iniciação científica. Obrigada pela paciência em ensinar as minhas primeiras práticas em laboratório e estar me acompanhando até hoje. Só tenho que agradecer por toda confiança depositada em mim desde quando nos conhecemos. Você é um exemplo na minha vida acadêmica e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos e principalmente por me permitir continuar a sua ideia.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, pela oportunidade em frequentar o Laboratório de Biologia Oral (LBO), com muita receptividade e acolhimento. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos colaborando com meu desenvolvimento acadêmico.

Ao coordenador da Pós-Graduação, Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, por toda paciência, sabedoria, ensinamentos e sempre bom-humor. Muito obrigada!

Aos demais professores do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Rafael Yague Ballester, Roberto Ruggiero Braga, Carlos Eduardo Francci, Igor Studart Medeiros, Josete Barbosa Cruz Meira, Leonardo Eloy Rodrigues Filho, Paulo Francisco Cesar, Paulo Eduardo Capel Cardoso e Prof. Dr. José Nicolau, por me aceitarem no curso de pós-graduação e por todo conhecimento compartilhado contribuindo na minha formação acadêmica.

Aos técnicos do Laboratório, Douglas e Elis, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e por sempre estarem dispostos em ajudar. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Os considero grandes amigos, muita gratidão a vocês.

Às secretárias do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Rosinha e Eli, pela competência e disponibilidade em ajudar nas questões burocráticas da minha pós-graduação.

Às professoras e colegas Às professoras e colegas do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), Profa. Dra. Patrícia Freitas, Profa. Dra. Ana Cecília e Profa. Dra. Luciane Hiramatsuo Azevedo, obrigada pela convivência e pelos ensinamentos. Assim como as secretárias do LELO, Lili, Leni e Ana Maria, por todo carinho e ajuda durante todos esses anos.

Ao “grupo mucosite” em especial, o meu amigo Filipi, por ter sido meu tutor nos meus primeiros atendimentos no grupo. Obrigada por ensinar com tanto carinho, fato que foi fundamental para eu pertencer e continuar pertencendo ao grupo desde 2014.

A minha amiga e primeira tutora, Gabriela Campos, só tenho que agradecer por todos os ensinamentos e companheirismo desde a minha iniciação científica. Obrigada pela confiança, pela grande contribuição para a confecção inicial deste trabalho e no apoio durante sua execução, sempre com muita disposição. Muito obrigada!!!

À Cláudia, por toda amizade e por nunca hesitar um pedido de ajuda e sempre com muita gentileza e simpatia. Você é um exemplo de pessoa e pesquisadora.

À Sandra, por toda amizade, confiança e companheirismo em disciplinas da pós-graduação.

As minhas colegas do LBO, Lorraine, Juliana, Taís e Simone. Agradeço demais o carinho de vocês, obrigada pelos conhecimentos compartilhados e risadas e ao meu colega do laboratório de Bioquímica Oral, Marlus, pelos momentos de descontração e pelos cafés.

Aos meus amigos que a vida me presenteou, Danilo Muller, Andréia Andrade e Daniela Nakao, por todo incentivo, apoio moral e emocional. Vocês foram fundamentais em diversos momentos dessa trajetória. Muito obrigada!

À CNPq, pela bolsa de estudos.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por representar a minha base profissional desde 2013. Pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis, aprender e compartilhar experiências. Muito orgulho e gratidão.

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade”

Louis Pasteur

RESUMO

Hotsumi AM. Estudo temporal, do efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil em glândulas salivares de hamsters [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

Frente à controvérsia com relação à duração dos efeitos colaterais dos agentes quimioterápicos antineoplásicos nas glândulas salivares (GS), este trabalho teve como objetivo comparar, por meio de análises bioquímicas e histológicas, o efeito colateral, a longo prazo, do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) nas GS parótidas, submandibulares e sublinguais. Para este trabalho, 30 hamsters Sírios Dourados foram divididos, de maneira aleatória, em dois grupos, um grupo controle (C) (n=15), no qual foi apenas injetado o veículo do quimioterápico e o anestésico; e um grupo experimental (Q) (n=15), no qual foi injetado o 5-FU. O experimento teve uma duração total de 120 dias consecutivos e, nos dias, 30, 60 e 120 (D30, D60 e D120), cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e suas GS removidas para as análises bioquímicas, através da determinação da concentração total de proteína e análise da atividade de enzimas antioxidantes, a peroxidase e a catalase; e análises histológicas, através da análise por microscopia de luz. Com relação aos resultados bioquímicos, para as GS parótidas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, entre os grupos C e Q, em nenhuma das análises realizadas. No entanto, para a GS submandibulares houve uma diminuição significativa (43%) da atividade da enzima peroxidase para o grupo Q em comparação ao grupo C no dia 60, assim como um aumento de 30% na concentração de proteína ($p<0,05$). Para as glândulas sublinguais, também foi observada uma diminuição (54%) da atividade da peroxidase, só que no dia 30 do experimento. Em contrapartida, a atividade da enzima catalase não sofreu alteração para as glândulas submandibulares e parótidas, mas apresentou aumento (46%) para a glândula sublingual, no dia 60 do experimento, em comparação ao grupo C do mesmo tempo experimental ($p<0,05$). Histologicamente, o 5-FU parece promover alterações na morfologia e estrutura das GS maiores, até 120 dias, onde o grupo Q apresentou vacuolização, aumento do espaço intercelular e atrofia das unidades secretoras terminais, para as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. Frente aos resultados obtidos neste trabalho,

podemos concluir que o 5-FU pode induzir algumas alterações bioquímicas nas glândulas sublinguais e submandibulares, em até 60 dias de experimento; assim como alterações histológicas até 120 dias pós o término da quimioterapia, sendo que neste último caso, também para as glândulas parótidas.

Palavras-chave: Quimioterapia. 5-Fluorouracil. Hipofunção das glândulas salivares. Xerostomia.

ABSTRACT

Hotsumi AM. Temporal study on the effect of chemotherapy 5-Fluorouracil in hamsters saliva glands [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

Given the controversy regarding the duration of the side effects of antineoplastic chemotherapeutic agents on salivary glands (SG), this study aimed to compare, through biochemical and histological analyzes, the long-term deleterious effect of chemotherapy 5-Fluorouracil (5-FU) in parotid, submandibular and sublingual SG. For this work, 30 Golden Syrian hamsters were randomly divided into two groups, a control group (C) (n = 15), in which only the chemotherapy solvent and the anesthetic were injected; and an experimental group (Q) (n = 15), in which 5-FU was injected. The experiment lasted 120 consecutive days and, on days 30, 60, and 120 (D30, D60, and D120), five animals from each group were euthanized and their SG removed for biochemical analysis, by determining the total protein concentration and analysis of the activity of antioxidant enzymes, peroxidase, and catalase; and histological analysis, through analysis by optical microscopy. Regarding the biochemical results, for the parotid SG, no statistically significant differences were found, comparing the experimental times and groups (C and Q). However, for submandibular SG there was a significant decrease in peroxidase enzyme activity for group Q compared to group C on day 60 (43%), as well as a 30% increase in protein concentration ($p < 0.05$). For the sublingual glands, a decrease (54%) of peroxidase activity was also observed, only on the 30th day of the experiment. In contrast, the catalase enzyme activity did not change for the submandibular and parotid glands, but increased (46%) for the sublingual glands, on day 60th of the experiment, compared to group C of the same experimental time ($p < 0.05$). Histologically, the 5-FU seems to promote changes in the morphology and structure of the SG, up to 120 days, where the Q group presented vacuolization, increased intercellular space, and atrophy of the terminal secretory units, for the parotid, submandibular and sublingual glands. Because of the results obtained in this work, we can conclude that 5-FU can induce some biochemical changes in the sublingual and submandibular glands, in up to 60 days of the experiment; as well as

histological changes up to 120 days after the end of chemotherapy, in the latter case, also for the parotid glands.

Keywords: Chemotherapy. 5-Fluorouracil. Hypofunction of the salivary glands. Xerostomia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Delineamento experimental dos grupos Controle e Quimioterapia.....	36
Figura 4.2 - Delineamento experimental dos grupos Controle e Quimioterapia.....	37
Figura 4.3 - Sequência dos procedimentos realizados para obtenção das amostras de glândulas salivares. (A) <i>Hamster</i> posicionado após a eutanásia. (B) Região das glândulas salivares maiores: (c) glândulas parótidas e (d) glândulas submandibulares e sublinguais	38
Figura 4.4 - Sequência dos procedimentos histológicos realizados durante o experimento. A) Após remoção cirúrgica das glândulas salivares parótidas, submandibulares e sublinguais (respectivamente representadas nas imagens), as GS foram colocadas individualmente em solução fixadora. B) Depois de 24 horas, iniciou-se o processo para inclusão em parafina. C) Utilização do micrótomo para obtenção dos cortes. D) Lâminas prontas e secas, para o início do processo de coloração H&E. E) Lâminas após protocolo pré-estabelecido para coloração H&E. F) Lâminas analisadas e fotografadas em um microscópio de luz Olympus BX 60	41
Figura 4.5 - Sequência dos procedimentos realizados durante os experimentos. A) GS imediatamente colocadas sobre a placa de alumínio, para serem prensadas. B) Processo de homogeneização em tampão específico. C) Amostra homogeneizada pronta para centrifugação. D) Após centrifugação, amostra pronta para separação do sobrenadante.....	42
Figura 4.6 - Figura ilustrativa dos componentes para análise da atividade da enzima peroxidase no espectrofotômetro	43
Figura 4.7 - Figura ilustrativa dos componentes para análise da atividade da catalase no espectrofotômetro.....	44
Figura 4.8 - Figura dos componentes para análise da concentração de proteína no espectrofotômetro	45

Figura 5.1 - Fotomicrografia das glândulas salivares parótidas. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do espaço intercelular e vacuolização. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina 48

Figura 5.2 - Fotomicrografia das glândulas salivares submandibulares. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, vacuolização, aumento do espaço intercelular. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina 49

Figura 5.3 - Fotomicrografia das glândulas salivares sublinguais. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do espaço intercelular e ductos irregulares. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina 50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)51
- Gráfico 5.2 - Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)52
- Gráfico 5.3 - Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)53
- Gráfico 5.4 - Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar submandibular para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)54

Gráfico 5.5 - Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar submandibular para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)..... 55

Gráfico 5.6 - Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)..... 55

Gráfico 5.7 - Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar sublingual para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$) 56

Gráfico 5.8 - Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar sublingual para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$) Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$) 57

Gráfico 5.9 - Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
Ca ⁺	Cálcio
Cl ⁻	Cloro
Cm	Centímetro
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	Gramas
GS	Glândulas salivares
HGS	Hipofunção das glândulas salivares
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IgA	Imunoglobulina A
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kg	Quilograma
LBO	Laboratório de Biologia Oral
M	Molar
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	milimolar
Na ⁺	Sódio
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
U	Unidade
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	CÂNCER E TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS	25
2.2	GLÂNDULAS SALIVARES: CARACTERÍSTICAS GERAIS	27
2.3	SALIVA	29
2.4	SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ...	30
2.5	GLÂNDULAS SALIVARES E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS	31
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAL	35
4.2	MÉTODOS	35
4.2.1	Delineamento experimental	36
4.2.2	Eutanásia	37
4.2.3	Obtenção das amostras	38
4.3	ANÁLISES	38
4.3.1	Análises histológicas	39
4.3.2	Análises bioquímicas	41
4.3.2.1	<i>Atividade enzimática da peroxidase</i>	<i>42</i>
4.3.2.2	<i>Atividade enzimática da catalase</i>	<i>44</i>
4.3.2.3	<i>Concentração de proteína</i>	<i>45</i>
4.3.3	Análises estatísticas	46

5	RESULTADOS	47
5.1	EFEITO DO 5-FU NAS GS (ANÁLISES HISTOLÓGICAS).....	47
5.1.1	Glândula parótida	47
5.1.2	Glândula submandibular	48
5.1.3	Glândula sublingual.....	49
5.2	EFEITO DO 5-FU NAS GS (ANÁLISES BIOQUÍMICAS).....	51
5.2.1	Glândula parótida	51
5.2.2	Glândula submandibular	53
5.2.3	Glândula sublingual.....	56
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares (GS) constituem um grupo de glândulas exócrinas (secretam substâncias para o interior de uma cavidade, através de canais ou ductos), localizadas na região da boca, as quais representam uma importante função: manter a integridade dos tecidos orais e depositar seus produtos de secreção (Nicolau, 2008; Katchburian; Arana, 2017).

Os seres humanos apresentam três pares de glândulas salivares chamadas de maiores: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais. Além disso, possuem numerosas glândulas ditas menores, espalhadas em toda a cavidade oral, na mucosa, no palato mole, terço posterior do palato duro e na superfície interna dos lábios (Humphrey; Williamson, 2001; Nicolau, 2008; Katchburian; Arana, 2017).

O produto de secreção das glândulas salivares, a saliva, é composta por 99% de água e 1% de substâncias orgânicas e inorgânicas (Nicolau, 2008). Aproximadamente 90% da saliva total são secretados pelas glândulas salivares maiores e 10% pelas menores. A ausência de saliva na cavidade oral pode causar desconforto e alguns problemas de saúde, de tal forma a comprometer a qualidade de vida do indivíduo (Nicolau et al., 2005; Nicolau, 2008).

As glândulas salivares de humanos e de roedores, apesar de várias características semelhantes; tanto na secreção de seus produtos finais, como na morfologia de seus componentes, apresentam algumas diferenças. Os roedores não produzem saliva de forma espontânea (Nagler, 2002) e a glândula submandibular não apresenta células mucosas secretórias, apenas serosas (nos humanos, representa na média de 10% a 20%). Além disso, apresentam um ducto adicional, denominado ducto granular, localizado entre os ductos intercalados e estriados, sendo a sua secreção, essencialmente de enzimas e fatores de crescimento, atividade que é realizada pelos ductos estriados em humanos (Gresik, 1994).

As GS são órgãos frequentemente afetados por agentes antineoplásicos, seja por radioterapia (RT) na região de cabeça e pescoço ou altas doses de quimioterapia (QT). Os efeitos da RT nas GS são bem esclarecidos na literatura, porém, apesar da QT ser o tratamento de eleição em mais de 60% dos casos de câncer no Brasil e no

mundo, poucos estudos investigam os efeitos da QT no tecido glandular (Diaz-Arnold AM, Marek, 2002; Vissink et al., 2004; Campos et al., 2014).

Na literatura, permanece controverso o quanto a QT afeta as GS e se tais efeitos colaterais são reversíveis (Vissink et al., 2004, Jensen et al., 2010). Em uma revisão sistemática, os autores afirmam que os efeitos da QT nas GS são importantes e devem ser diagnosticados e tratados o quanto antes, a fim de prevenir outras alterações em cavidade oral e aumentar a qualidade de vida do paciente oncológico (Jensen et al., 2010).

Nosso grupo de estudos observou, em um modelo experimental em glândulas salivares de hamsters, importantes alterações nas GS submandibulares e sublinguais induzidas pelo quimioterápico 5-FU (Campos et al., 2014). Tal estudo observou o aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase e alteração na atividade das enzimas antioxidantes (peroxidase, catalase e superóxido dismutase). Além disso, os autores, observaram alterações histomorfológicas, incluindo atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do estroma glandular e fusão dos grânulos de secreção, além de alterações significativas na concentração de proteínas envolvidas no processo de secreção salivar (Campos et al., 2014). É importante ressaltar que, esses resultados foram obtidos, em um tempo experimental de cinco, sete e dez dias após a indução do quimioterápico 5-FU. Com isso, o presente trabalho teve o objetivo de analisar os efeitos do 5-FU, em glândulas salivares de hamsters, em tempos experimentais mais longos, sendo, 30, 60 e 120 dias após a indução do quimioterápico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A incidência de câncer continua aumentando no mundo todo (The Lancet, 2018). De acordo com as estimativas da GLOBOCAN-IARC (Global Cancer Statistic-International Research) o número estimado para a incidência de novos casos de câncer no mundo de 2020 a 2040 é de 16, 4 milhões para homens e de 9,22 milhões e com mortalidade de 13,9 milhões e 7,08 milhões, respectivamente (IARC, 2020).

2.1 CÂNCER E TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

Antigamente, durante o século XX, a mortalidade por doenças infecciosas, aqui no Brasil, tinha a maior incidência, porém, hoje ela representa apenas 9,7 % (Buchalla et al., 2003). A Organização Mundial da Saúde, em 2019, divulgou uma lista apontando as principais causas que poderiam gerar muitas vítimas, dentre as principais estão às doenças crônicas não contagiosas como diabetes, hipertensão e câncer, A incidência dessas doenças são altíssimas, onde juntas, são responsáveis por 70% de todas as mortes no mundo totalizando 41 milhões de vítimas (WHO, 2020).

Atualmente, no Brasil, o câncer continua sendo um problema de saúde pública devido a sua alta complexidade de tratamento, questões sociais e econômicas. De acordo com o Instituto de Métricas e Avaliação de Saúde, no ano de 2017, as mortes por neoplasias representaram a segunda maior causa de óbito na população brasileira (244.969 óbitos) atrás apenas de mortes por doenças cardiovasculares (INCA, 2018).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no ano de 2020, a previsão para 2025 é de 6 milhões de mortes por câncer prematuros por ano (INCA, 2020). Estima-se que 1,5 milhão de mortes anuais por câncer poderiam ser evitadas com medidas adequadas, se tornando imprescindível a conscientização não só no Brasil, mas no mundo todo, pois o índice de mortalidade tende a aumentar nos próximos anos. Atualmente, o plano terapêutico oncológico depende de uma avaliação multidisciplinar, incluindo como principais tratamentos, a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia (QT) é um tratamento antineoplásico sistêmico,

podendo ser aplicada de forma isolada, adjuvante a outro tipo de tratamento ou neoadjuvante, quando é realizada antes de outro tratamento. A QT é um tratamento oncológico bem comum, pois a maior parte dos tumores é caracterizado pelo desenvolvimento precoce de micro metástases (quando células malignas migram da sua localização primária para outras partes do corpo), indicando assim um protocolo de ação sistêmica. Em geral, o mecanismo de ação da quimioterapia baseia-se na inibição de processos celulares, interferindo na divisão celular e levando à apoptose celular (Almeida VL et al., 2005; Jensen et al., 2008).

Chabner e Calabresi, em 1995, descreveram uma classificação dos fármacos antineoplásicos, onde, o critério classificatório para os quimioterápicos, baseia-se nos diferentes mecanismos de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução, classificando como inibidores da topoisomerase, agentes alquilantes, produtos naturais, agentes antimetabólitos e purínicos (Chabner; Calabresi, 1995).

Dentre os principais quimioterápicos usados na prática clínica, estão os agentes antimetabólicos, os quais bloqueiam bioquimicamente a síntese do DNA das células tumorais, sendo restritos a fase S do ciclo celular. Como exemplo de antimetabólicos bastante utilizados no tratamento do câncer, temos os análogos do ácido fólico (Metotrexato, MTX), análogos das purinas (Mercaptopurina, 6-mercaptopurina; 6-MP) e os antagonistas das pirimidinas (5-Fluorouracil, 5-FU) (Chabner; Calabresi, 1995; Almeida et al., 2005).

O 5-FU, como falado anteriormente, é um antimetabólico análogo pirimídico utilizado nos tratamentos antineoplásicos, principalmente em lesões malignas de localização primária em cabeça e pescoço e do trato gastrointestinal. Seus metabólitos incorporam-se ao RNA da célula inibindo o seu processamento, afetando assim, no crescimento celular e também inibindo a timidilato sintase, resultando na depleção do trifosfato de timidina, que é um dos quatro nucleotídeos trifosfatos usados na síntese in vivo do DNA (Lokich, 1998; Mazzeo et al., 2009; Matuo, 2012). Os efeitos da privação de DNA e RNA são mais significativos em células que se replicam constantemente, como por exemplo, as células do trato gastrointestinal (Lokich, 1998; McCarthy et al., 1998). Em mucosa oral, estes efeitos nocivos podem predispor os pacientes à mucosite oral, dor, hemorragia, infecções locais e hipofunção das glândulas salivares. Em particular, os efeitos nocivos da QT, na secreção salivar, não

são muito bem compreendidos. No entanto, sabe-se que a hipofunção salivar induzida pelo 5-FU aumenta a suscetibilidade à mucosite oral (Chandra et al., 1977; McCarthy et al., 1998), dificulta a mastigação, deglutição, fala e podem causar inflamações orais, cárie dentária e disfagia (Lokich, 1998; McCarthy et al., 1998; Cassolato; Turnbull, 2003).

2.2 GLÂNDULAS SALIVARES: CARACTERÍSTICAS GERAIS

As glândulas salivares (GS) são órgãos essenciais para o nosso organismo, apresentam origem ectodérmica e são classificadas como glândulas exócrinas as quais apresentam uma importante função de produzir e secretar o fluido salivar.

Em seres humanos existem três pares de glândulas salivares denominadas maiores que são as parótidas, submandibulares e sublinguais, e glândulas salivares menores que são bastante numerosas (aproximadamente 600-1000 glândulas) e distribuídas em diversas regiões da boca como palato, lábio, língua, e mucosa jugal, com exceção do terço anterior do palato duro e da gengiva (Nicolau, 2008; Katchburian; Arana, 2012).

As glândulas salivares maiores produzem em média 90% da saliva total na proporção de 65-70% para as submandibulares, 20% para as parótidas e 7-8% para as sublinguais. As glândulas salivares menores, por sua vez, contribuem com menos de 10% da secreção total, porém essa secreção é extremamente importante para contribuir com a lubrificação da cavidade oral, devido aos seus componentes protetores e mucosos (Edgar, 1992).

As GS são compostas por unidades morfofuncionais denominadas adenômeros que são constituídos de uma unidade secretora terminal e um sistema de ductos (ductos intercalados, estriados e excretorios). Os ductos intercalados são as primeiras estruturas a receberem a secreção inicial, que é então conduzida aos ductos estriados, onde ocorrem várias alterações eletrolíticas (reabsorção de Na^+ (sódio) e Cl^- (cloro)), entre o fluido salivar e a matriz extracelular, via membrana plasmática. À medida que a saliva fica mais hipotônica, ductos excretorios extralobulares largos

coletam todo o líquido dos lóbulos glandulares e o secretam para a cavidade oral (Edgar, 1992; Nicolau, 2008).

A estimulação parassimpática é responsável pela dilatação dos vasos que resulta em secreção fluida e abundante, enquanto a estimulação simpática a saliva produzida é mais viscosa e pouco abundante em virtude da constrição dos vasos que irrigam a glândula. No Sistema Nervoso Parassimpático, os receptores muscarínicos M1 e M3 interagem com o neurotransmissor acetilcolina, para ativação da via sinalizadora Ca^{2+} /calmodulina, através da proteína Gq, a qual irá ativar a fosfolipase C, promovendo a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em trifosfato de inositol e diaclicerol, que serão responsáveis pela secreção de água, eletrólitos e pequenas quantidades de proteínas (Nicolau 2008; Nanci, 2013).

No Sistema Nervoso Simpático, a ativação ocorre pelo neurotransmissor norepinefrina, o qual ativa os adrenoreceptores β_1 , promovendo uma mudança conformacional da proteína Gs de membrana, a qual libera uma subunidade catalítica que interage com a proteína adenilato ciclase, aumentando a concentração, no citoplasma, do segundo mensageiro AMPc que, por sua vez, irá ativar a proteína quinase A e, como resultado, haverá uma secreção rica em proteínas (Asking; Gjørstrup, 1987; Nicolau, 2008; Nanci, 2013).

Em comparação às glândulas salivares humanas, Amano et al., em 2019, mostraram que os roedores também apresentam os três pares de glândulas maiores e diversas glândulas menores, espalhadas pela cavidade oral. Entretanto, com algumas diferenças morfológicas, como a presença de um ducto adicional, o ducto granular, nas glândulas submandibulares. Apesar de algumas diferenças morfológicas, as GS de roedores, também sintetizam e secretam um fluido na cavidade oral similar à saliva humana (Amano et al., 2019).

2.3 SALIVA

A saliva é um fluido multifuncional que protege a cavidade oral através da manutenção do pH salivar próximo a neutralidade, através do processo de remineralização dental, seu efeito antimicrobiano, além disso, umidifica e lubrifica a cavidade oral, auxiliando na formação e deglutição do bolo alimentar e na fonética (Humphrey; Williamson, 2001; Nicolau et al., 2005).

O produto de secreção é diferente para cada tipo de glândula salivar. A parótida secreta uma saliva aquosa, rica em enzimas, como a amilase, as proteínas ricas em prolina (PRPs) e outras glicoproteínas. Em contrapartida, a saliva secretada pela glândula submandibular, além dos componentes produzidos pela parótida, contém substâncias altamente glicosiladas, as mucinas. A glândula sublingual, por sua vez, também produz saliva viscosa, rica em mucinas. As glândulas salivares menores produzem cerca de 70% das mucinas salivares e quantidades significativas de imunoglobulinas (principalmente IgA), fosfatase ácida salivar e lisozimas. O fluído oral inclui a secreção das glândulas salivares maiores e menores, bem como células descamadas do epitélio oral, microrganismos e seus produtos, detritos alimentares, componentes do soro e células inflamatórias provenientes do sulco gengival (Gómez de Ferraris; Campos Muñoz, 2006; Nanci, 2013).

A saliva possui componentes inorgânicos e orgânicos importantes para suas funções. Entre os componentes inorgânicos, destacam-se o bicarbonato que mantém o sistema tampão salivar, e os íons cálcio e fosfato, que contribuem para a manutenção da integridade mineral dos dentes. Entre os componentes orgânicos (glicose, aminoácidos, moléculas lipídicas), a saliva contém grande variedade de proteínas que são possuidoras de funções particulares para a saúde bucal. Em termos de composição proteica, as PRPs e a amilase salivar compõem a maioria das proteínas da saliva, outras proteínas, como lisozima, lactoferrina, peroxidase, catalase, superóxido dismutase, lipase e imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG), aparecem em menor quantidade, porém, com importantes funções na integridade da cavidade oral (Kaufman, 2002; Helmerhorst; Oppenheim; 2007; Nanci, 2008; Katchburian; Arana, 2012).

2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O termo, espécies reativas de oxigênio (EROs) é utilizado para identificar os intermediários químicos reativos de origem do metabolismo do oxigênio, entre eles podemos citar, o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ferreira ALA; Matsubara LS, 1997; Nordberg J; Arnér ESJ, 2001; Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007). O O_2^- , é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. É gerado de forma espontânea, é um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas onde é produzido (Nordberg J; Arnér ESJ, 2001). Em contrapartida, o $OH^\cdot$, é considerado um radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos celulares. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, o qual reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007). O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o radical $OH^\cdot$. É gerado a partir da dismutação enzimática do O_2^- pela superóxido dismutase, e é capaz de atravessar membranas biológicas (Ferreira ALA ; Matsubara LS, 1997; Nordberg J, Arnér ESJ, 2001).

Quando temos EROs em altas concentrações pode ocasionar desde desnaturação de proteínas, como consequente inativação de enzimas, até peroxidação lipídica, provocando danos celulares. No entanto, a fim de prevenir estes possíveis danos, nosso organismo dispõe de um sistema antioxidante, que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (Ferreira ALA; Matsubara LS, 1997; Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007).

As enzimas peroxidase e catalase são importantes enzimas do nosso sistema antioxidantes e apresentam funções de proteger nosso organismo contra esses efeitos tóxicos de radicais livres formados no metabolismo celular (Finkel T; Holbrook NJ, 2000; Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007). É essencial o equilíbrio entre a quantidade de EROs gerada e a quantidade removida pelo nosso sistema antioxidante celular. Quando não temos esse equilíbrio, o estresse oxidativo ocorre, ou seja, o nosso sistema antioxidante de defesa celular não conseguiu eliminar o excesso de EROs produzidas, gerando alterações das atividades dessas enzimas antioxidantes

e levando a danos celulares severos (Finkel T et.al, 2000; Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007).

2.5 GLÂNDULAS SALIVARES E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

A secreção de saliva é fundamental para a manutenção da saúde bucal devido às mais variadas propriedades químicas e mecânicas do fluido salivar, sendo importante para manter a integridade da cavidade oral e qualidade de vida dos seres humanos.

As GS são órgãos frequentemente afetados por doenças sistêmicas (Diabetes, Síndrome de Sjogren), determinados medicamentos e tratamento antineoplásicos, que inclui radioterapia de cabeça e pescoço ou quimioterapia (Simões et al., 2009; Katchburian; Arana, 2012). Qualquer alteração na morfologia ou bioquímica das GS pode ocasionar redução parcial ou total da saliva podendo assim resultar em infecções, processos cariosos, perda de paladar, dor, desconforto e quadros de xerostomia (sintoma de boca seca) associada ou não à hipossalivação (diminuição real do fluxo salivar) (Nicolau, 2008; Simões et al., 2009; Katchburian; Arana, 2012; Delli et al., 2014).

Apesar de crescentes índices de cura da QT, as complicações secundárias permanecem um desafio para profissionais que estão envolvidos no manejo a pacientes submetidos a esses tipos de tratamentos. São comuns as queixas de mucosite oral, hipossalivação e xerostomia por esses pacientes, sendo a xerostomia um dos principais efeitos colaterais, pois implica diretamente no bem estar dos pacientes (Sonis et al., 2004).

Na literatura encontramos alguns trabalhos que associam os quimioterápicos antimetabólitos e alquilantes (Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-FU) em danos na morfologia das GS, como dilatação de ductos, degeneração acinar e inflamação do tecido glandular em mais de 50% dos pacientes submetidos a tratamentos oncológicos (Lockhart; Sonis, 1981). Além da alteração morfológica, o fluxo salivar e

a composição salivar também são alterados pela quimioterapia (Lockhart; Sonis, 1981; Vissink et al., 2004; Jensen et al., 2008; Campos et al., 2014).

Harrison et al., em 1998, realizaram um estudo para comparar o fluxo salivar de mulheres diagnosticadas com câncer de mama, antes da quimioterapia, com mulheres em tratamento de quimioterapia (Metotrexato, Ciclofosfamida e 5-FU) por pelo menos um mês. Como resultado, os autores mostraram que a terapia antineoplásica pode alterar a função glandular durante o tratamento (Harrison et al., 1998). Da mesma maneira, Mazzeo et al., em 2009, observaram alteração no fluxo e no pH salivar em pacientes no regime quimioterápico, o qual incluía 5-FU e leucovorin (Mazzeo et al., 2009). Entretanto, para ambos os estudos, não foi realizada uma avaliação da duração dessas alterações, após o término do tratamento oncológico.

Um estudo prospectivo, que avaliou amostras de saliva de pacientes com diagnóstico de Linfoma (Hodgkin ou não-Hodgkin), submetidos à combinação de quimioterápicos Doxorrubicina, Bleomicina e Ciclofosfamida, revelou que os parâmetros do metabolismo proteico salivar analisados (lisozima, amilase e imunoglobulinas) começaram a retornar aos níveis normais a partir de 1 ano após finalizado o tratamento quimioterápico e sugerem, ainda, que o organismo tende a eliminar o fármaco e alcançar a homeostase (Meurman JH et.al, 1997).

Dentre as principais alterações decorrentes da QT, tem-se a xerostomia e a hipofunção glandular, com consequente quadro de hipossalivação, porém, ainda permanece controverso, na literatura, o quanto a QT afeta as GS e se tais efeitos colaterais são reversíveis (Vissink et al., 2004). Entretanto, embora alguns autores relatam que os danos são possivelmente temporários, a maioria concorda que esses devem ser prevenidos ou tratados o quanto antes, para evitar alterações na cavidade oral e na qualidade de vida dos pacientes oncológicos (Sonis et al., 2004; Jensen et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo analisar, histologicamente e bioquimicamente, o efeito do quimioterápico 5-FU nas GS parótidas, submandibulares e sublinguais de hamsters, após 30, 60 e 120 dias da injeção do quimioterápico.

Os objetivos específicos foram analisar os efeitos do 5-FU nas GS maiores, em diferentes tempos experimentais, através das análises:

1. Histológicas: através da análise por microscopia de luz.
2. Bioquímicas: através da análise da concentração total de proteínas e da atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a peroxidase e a catalase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas descritas abaixo, relacionadas com o manuseio dos animais e os experimentos laboratoriais, foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (ANEXOS A e B) e todas as análises posteriores foram realizadas no Laboratório de Biologia Oral (LBO) e no Laboratório de Bioquímica Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, ambos da FOUSP.

4.1 MATERIAL

Para o trabalho foram selecionados trinta hamsters Sírios Dourados, machos, com oito semanas de vida, com aproximadamente 150g mantidos no LBO. Os animais foram separados individualizados, com água e comida ad libitum (em cubos, dieta controle (4,47 kcal / g, contendo 25% de gordura, 50% de carboidratos e 25% de proteína) e em condições controladas de iluminação (12h luz/ 12h escuro, sendo luzes acesas às 7:00 da manhã), temperatura ambiente controlada 23 ± 3 e umidade $55 \pm 10\%$.

Antes do início dos experimentos, os animais foram submetidos a uma semana de período de aclimação com o objetivo de reduzir o estresse pela mudança de ambiente.

4.2 MÉTODOS

Este subitem inclui, além do método e modelo experimental, todos os métodos de análise.

4.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental deste estudo foi estabelecido pelo protocolo de hipofunção das glândulas salivares.

A hipofunção das GS (HGS) foi induzida nos animais, seguindo a metodologia proposta por Sonis e Costello (1995) e modificada por Franca et al. (2009) através da injeção do agente quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) nos dias 1 e 3 do experimento. Para isso, todos os animais foram pesados e anestesiados com uma associação de Copazine (Xilazina) 0,53ml/Kg e Vetanarcol (Quetamina) 0,086ml/Kg. O experimento teve duração de 120 dias consecutivos, onde os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (Figura 4.1):

- Grupo C, controle, administração apenas das doses anestésicas e veículo de diluição do 5-FU (hidróxido de amônia, 1M), (n=15);
- Grupo Q, quimioterapia, administração do 5-FU para indução da HGS (n=15).

Figura 4.1 - Delineamento experimental dos grupos Controle e Quimioterapia

Created with BioRender.com

Fonte: A autora.

O agente quimioterápico foi injetado via intraperitoneal, sendo, nos dias 1 e 3 administrado 100mg/Kg e 65mg/Kg de 5-FU, respectivamente. Nos dias, 30, 60, e 120, 5 animais (Q) e 5 animais (C) de cada grupo foram eutanasiados (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Delineamento experimental dos grupos Controle e Quimioterapia

Fonte: A autora.

4.2.2 Eutanásia

Como descrito anteriormente, foram eutanasiados e analisados 5 animais do grupo C e 5 animais do grupo Q, em três tempos experimentais (D30, D60 e D120).

Nos três tempos experimentais, pré-determinados, os animais foram devidamente anestesiados com uma associação de Copazine (Xilazina) 0,53ml/Kg e Vetanarcol (Quetamina) 0,086ml/Kg, antes da eutanásia dos animais realizada por destroncamento cervical.

4.2.3 Obtenção das amostras

Imediatamente após a eutanásia dos animais, as glândulas salivares parótida, submandibulares e sublinguais foram removidas para as análises histológicas e bioquímicas (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Sequência dos procedimentos realizados para obtenção das amostras de glândulas salivares. (A) *Hamster* posicionado após a eutanásia. (B) Região das glândulas salivares maiores: (c) glândulas parótidas e (d) glândulas submandibulares e sublinguais

Fonte: A autora.

4.3 ANÁLISES

Este subitem inclui, todas análises histológicas, bioquímicas e estatísticas realizadas.

4.3.1 Análises histológicas

Para a realização das análises histológicas, após a eutanásia dos animais, as GS maiores, foram removidas, com o auxílio de uma tesoura e imediatamente fixadas (0,1% glutaraldeído + 4% formaldeído em tampão cacodilato 0,1M – pH 7,4) e após 12 horas no fixador, os espécimes foram devidamente processados para análise em microscopia de luz.

Análise por Microscopia de Luz- Hematoxilina e Eosina (HE)

Os espécimes foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 e submetidos à desidratação em concentrações crescentes de etanol, seguido de xilol, sendo infiltrados e incluídos em parafina para obtenção dos blocos (Tabela 4.1). Após a inclusão, os blocos foram cortados. Foram obtidos cortes com uma navalha (Crystal Plus™) de três micrômetros em um micrótomo MICROM HM360 (Alemanha) que foram corados com hematoxilina e eosina e depois de montadas, foi colocado uma gota de resina sintética (Etelan®) sobre o corte e posto uma lamínula, comprimindo-a sobre o corte, de modo que ficou uma fina camada entre a lâmina e a lamínula (Figura 4.4).

As lâminas foram analisadas em um microscópio de luz Olympus BX 60 e fotografadas com uma câmera digital (Olympus DP72, Japão) acoplada ao microscópio e conectada a um microcomputador com o software para análise de imagens (CellF, Olympus, Japão) (Figura 4.4). Todas as análises foram analisadas por avaliadores experientes.

Tabela 4.1 - Protocolo para a coloração pela técnica de Hematoxilina & Eosina (Cardiff et al., 2014)

REAGENTE	REPETIÇÕES	TEMPO
Desparafinização		
<i>Xilol I</i>	1	5'
<i>Xilol II</i>	1	5'
Hidratação		
<i>Etanol 100%</i>	1	5'
<i>Etanol 95%</i>	1	5'
<i>Etanol 70%</i>	1	5'
Coloração		
<i>Água corrente</i>	1	5'
<i>Água destilada</i>	1	5'
<i>Hematoxilina</i>	1	3'
<i>Água corrente</i>	1	7-10'
<i>Água destilada</i>	1	Mergulho
<i>Eosina</i>	1	1-2'
<i>Água destilada</i>	3	Mergulho
Desidratação		
<i>Etanol 95%</i>	1	20'
<i>Etanol 100%</i>	2	3'
<i>Etanol/Xilol</i>	1	5'
<i>Xilol Diafanização</i>	1	5'
<i>Xilol Montagem</i>	1	5'

Fonte: A autora.

Figura 4.4 - Sequência dos procedimentos histológicos realizados durante o experimento. A) Após remoção cirúrgica das glândulas salivares parótidas, submandibulares e sublinguais (respectivamente representadas nas imagens), as GS foram colocadas individualmente em solução fixadora. B) Depois de 12 horas, iniciou-se o processo para inclusão em parafina. C) Utilização do micrótomo para obtenção dos cortes. D) Lâminas prontas e secas, para o início do processo de coloração H&E. E) Lâminas após protocolo pré-estabelecido para coloração H&E. F) Lâminas analisadas e fotografadas em um microscópio de luz Olympus BX 60

Fonte: A autora.

4.3.2 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, logo após a eutanásia dos animais, os fragmentos de GS foram imediatamente prensados em placas de alumínio previamente mantidas em gelo seco e armazenadas em freezer à -80°C . No momento de uso, as GS foram pesadas e homogeneizadas em tampão específico e o sobrenadante utilizado para cada experimento (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Sequência dos procedimentos realizados durante os experimentos. A) GS imediatamente colocadas sobre a placa de alumínio, para serem prensadas. B) Processo de homogeneização em tampão específico. C) Amostra homogeneizada pronta para centrifugação. D) Após centrifugação, amostra pronta para separação do sobrenadante

Fonte: A autora.

4.3.2.1 Atividade enzimática da peroxidase

A determinação da peroxidase foi pelo método de Chandra et al. (1977), modificado por Anderson (1986) (Figura 4.6). Este método consiste na medida da variação da absorbância 460nm, durante 5 minutos, pelo espectrofotômetro (Beckman DU-800), de uma mistura de amostras do homogenado das glândulas, de tampão fosfato 10mM, orto-dianisidina 10mM e H_2O_2 2,1 mM. Foi usado como padrão a solução de lactoperoxidase 1mg/mL com diluição 1:100.

Figura 4.6 – Figura ilustrativa dos componentes para análise da atividade da enzima peroxidase no espectrofotômetro

Fonte: A autora.

4.3.2.2 Atividade enzimática da catalase

A determinação da catalase foi realizada nos fragmentos de GS, os quais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 50mM pH 7,4, centrifugadas e o sobrenadante foi usado no ensaio de acordo com o método de Aebi (1984), o qual baseia-se no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 , determinada espectrofotometricamente a 240nm (UV) durante 5 minutos (Figura 4.7).

Figura 4.7 – Figura ilustrativa dos componentes para análise da atividade da catalase no espectrofotômetro

Fonte: A autora.

4.3.2.3 Concentração de proteína

A concentração total de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), através do padrão de albumina de soro bovino. Neste método, as proteínas em meio alcalino reagem com o cobre, formando um complexo que reduz o reativo de folin-ciocalteu, resultando numa coloração azulada, a qual foi lida em espectrofotômetro a 660nm (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Figura dos componentes para análise da concentração de proteína no espectrofotômetro

Fonte: A autora.

4.3.3 Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos bioquímicos foram analisados pelo teste de variância (ANOVA), seguida pelo teste estatístico t de Student, utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Para todos os testes aplicados, aceitou-se uma significância de 5%. Todos os dados coletados, assim como elaboração de gráficos e tabelas foram registrados e realizados em um programa Microsoft Excel versão 2010.

5 RESULTADOS

Foi constituído banco de dados e imagens informatizado para a comparação dos diferentes fatores envolvidos na análise e os dados obtidos foram descritos de forma tabular e gráfica.

5.1 EFEITO DO 5-FU NAS GS (ANÁLISES HISTOLÓGICAS)

Microscopia de Luz – Hematoxilina e Eosina (HE).

5.1.1 Glândula parótida

Em todos os animais do grupo controle foram notadas células íntegras com características serosas contendo núcleo esférico e citoplasma basófilo e os ductos (intercalar, granuloso e estriado) também se apresentaram íntegros.

A partir do dia 30 de experimento, e para os outros dias (60 e 120), o grupo Q apresentou características de glândula serosa, como também atrofia das unidades secretoras terminais, vacuolização e aumento do espaço intercelular (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Fotomicrografia das glândulas salivares parótidas. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do espaço intercelular e vacuolização. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina

Fonte: A autora.

5.1.2 Glândula submandibular

Para a glândula submandibular em todos os animais do grupo controle notaram-se glândula salivar do tipo mista com predomínio de células serosas as quais se apresentam íntegras.

A partir do dia 30 de experimento, e para os dias 60 e 120, o grupo Q revelou evidente atrofia das unidades secretoras terminais, aumento dos espaços intercelulares e ductos menos volumosos e irregulares (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Fotomicrografia das glândulas salivares submandibulares. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, vacuolização, aumento do espaço intercelular. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina

Fonte: A autora.

5.1.3 Glândula sublingual

Nas análises histológicas para a glândula sublingual, observou-se em todos os grupos controle, característica de uma glândula salivar do tipo mista com predomínio de células mucosas, as quais se apresentam íntegras, assim como seus ductos.

A partir do dia 30 de experimento, e para os outros dias (60 e 120), o grupo Q apresentou características de glândula serosa como também evidente atrofia das unidades secretoras terminais, ductos irregulares e aumento do espaço intercelular (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Fotomicrografia das glândulas salivares sublinguais. Em (A) grupo C, mostrando integridade das unidades secretoras terminais e dos ductos. Em (B, C e D), grupo Q nos dias 30, 60 e 120, respectivamente, mostra atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do espaço intercelular e ductos irregulares. Aumento original 40x- Coloração Hematoxilina & Eosina

Fonte: A autora.

Os resultados histológicos finais revelam que o quimioterápico 5-FU tende a modificar a morfologia e estrutura das glândulas salivares maiores. Para todas as GS analisadas, parótidas, submandibulares e sublinguais, no dia 30, 60 e 120 do

experimento foram observadas atrofia das unidades secretoras terminais, vacuolização, ductos irregulares e aumento do espaço intercelular no grupo Q.

5.2 EFEITO DO 5-FU NAS GS (ANÁLISES BIOQUÍMICAS)

Atividade enzimática da peroxidase, catalase e concentração total de proteína.

5.2.1 Glândula parótida

Com relação à concentração de proteína total analisada, na glândula parótida, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (C e Q) nos mesmos tempos experimentais (30, 60 e 120 dias), entretanto, foi observado um aumento de mais de 200%, para ambos os grupos (C e Q), 120 dias após a injeção do quimioterápico, em relação aos demais tempos experimentais (30 e 60 dias) (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

Com relação à média da atividade da enzima antioxidante peroxidase, não foi encontrado diferenças estaticamente significantes em nenhum dos diferentes tempos experimentais (30, 60 e 120 dias) e também entre grupos C e Q do mesmo tempo experimental (Gráfico 5.2). Para a atividade da enzima catalase não foi observada diferença entre os grupos C e Q, quando comparados no mesmo tempo experimental (30, 60 e 120 dias); houve apenas uma diminuição progressiva para ambos os grupos C e Q, ao comparar o tempo experimental 30 com 60 e 120 dias (Gráfico 5.3) ($p < 0.05$).

Gráfico 5.2 – Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estaticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

Gráfico 5.3 – Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Fonte: A autora.

5.2.2 Glândula submandibular

Nas análises bioquímicas realizadas nas glândulas submandibulares, a concentração de proteína total no dia 60 do experimento apresentou um aumento de 30% para o grupo Q em relação ao grupo C do mesmo tempo experimental, porém o seu valor se manteve semelhante para ambos os grupos (C e Q) nos dias 30 e 120 do experimento (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 - Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar submandibular para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Com relação à média da atividade da enzima peroxidase no dia 60, o grupo Q apresentou uma diminuição estatisticamente significativa de 43% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo C, do mesmo tempo experimental, porém o seu valor se manteve semelhante para ambos os grupos (C e Q) no 30 e 120 dias (Gráfico 5.5).

Quanto à atividade da enzima catalase houve uma diminuição da sua atividade para ambos os grupos C e Q quando comparado os valores do tempo experimental 30 com o 60 e 120 dias ($p < 0,05$) (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.5 – Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar submandibular para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

Gráfico 5.6 – Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

5.2.3 Glândula sublingual

Com relação à concentração de proteína total analisada, na glândula sublingual, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (C e Q) nos mesmos tempos experimentais (30, 60 e 120 dias), entretanto, foi observado um aumento significativo, para ambos os grupos (C e Q), 120 dias após a injeção do 5-FU, em relação aos demais tempos experimentais (30 e 60 dias) (Gráfico 5.7).

Gráfico 5.7 – Média da concentração de proteína total (mg de prot/ml) da glândula salivar sublingual para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

Com relação à atividade da enzima antioxidante peroxidase, no dia 30 do experimento, o grupo Q apresentou diminuição de 54% em relação ao grupo controle do mesmo tempo experimental ($p<0,05$). Nos dias 60 e 120 do experimento, a atividade da peroxidase permaneceu semelhante para todos os grupos (C e Q) (Gráfico 5.8). A atividade da catalase aumentou para o grupo Q, no dia 60, em aproximadamente 46%, quando comparada ao grupo C do mesmo tempo experimental (Gráfico 5.9) ($p<0,05$).

Gráfico 5.8 – Média da atividade da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula salivar sublingual para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p<0,05$) Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p<0,05$)

Fonte: A autora.

Gráfico 5.9 – Média da atividade da enzima catalase (U/mg prot) da glândula salivar parótida para os grupos C e Q nos tempos experimentais D30, D60 e D120. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais para o mesmo grupo (ANOVA, dois fatores (tempo e grupo) e com pós-Teste t de Student, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos para o mesmo período experimental (Teste t de Student, $p < 0,05$)

Fonte: A autora.

Os resultados bioquímicos finais revelam que o quimioterápico 5-FU, provocou alterações no metabolismo glandular até 60 dias de maneira diferente para as glândulas.

Observou-se, na glândula submandibular do grupo Q, um aumento de 30% na concentração de proteína total, no dia 60 do experimento, em relação ao grupo C, do mesmo tempo experimental. Na atividade da enzima peroxidase, para a glândula submandibular, foi encontrada diminuição (43%) no grupo Q, em relação ao grupo C, também no dia 60 do experimento e, para a glândula sublingual, também foi observada uma diminuição (54%) da sua atividade, no dia 30 do experimento. Em contrapartida, a catalase se mostrou sem alteração para as glândulas parótidas e submandibulares, mas apresentou atividade aumentada para a glândula sublingual, também no dia 60 (46%), em comparação ao grupo C do mesmo tempo experimental.

6 DISCUSSÃO

As glândulas salivares são órgãos frequentemente afetados por tratamentos oncológicos, seja por radioterapia de cabeça e pescoço ou altas doses de quimioterapia. Os efeitos colaterais da RT nas GS estão bem estabelecidos na literatura, porém apesar da QT ser o tratamento de eleição em mais de 60% dos casos de câncer no Brasil e no mundo, pouco se sabe sobre os seus efeitos nas GS, assim como não se sabe se esses são reversíveis ou não. Sendo assim, este trabalho teve como finalidade avaliar alguns efeitos colaterais nas GS maiores, a longo prazo, em hamsters submetidos ao quimioterápico 5-FU.

Há alguns relatos na literatura que demonstram o efeito colateral de alguns quimioterápicos nas glândulas salivares. Em um estudo prospectivo, McBride e Siegel, em 1988, compararam a atividade do fluxo salivar das glândulas submandibulares e parótidas de ratos tratados com o agente antimetabólico MTX. Os autores observaram um aumento na concentração de β -adrenoreceptor, receptor importante para a secreção de proteínas na saliva. No entanto, essa alteração foi somente observada para as glândulas submandibulares dos animais tratados com MTX (McBride; Siegel, 1988). No presente estudo, foi observado um aumento de 30% na concentração de proteína total, nas glândulas salivares submandibulares, 60 dias após a injeção do 5-FU.

Com relação aos efeitos dos quimioterápicos Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-FU nas glândulas salivares, alguns autores observaram uma redução temporária da secreção salivar, porém, após o tratamento quimioterápico, a secreção salivar retornou aos níveis iniciais. Além disso, os autores relataram que a redução observada, no fluxo salivar, poderia ser atribuída a outras causas, que não o agente quimioterápico (Wahlin YB et al., 1991; Meurman JH et al., 1997; Harrison et al., 1998; Vissink et al., 2004).

Ohrn et al, em 2001 e Blomgren et al, em 2002, avaliaram o fluxo salivar de pacientes antes do início da quimioterapia e logo após o término do tratamento oncológico. Os autores observaram que não houve alteração do fluxo salivar, porém a maioria dos pacientes queixaram-se de boca seca (Ohrn KE et al., 2001 e Blomgren J et al., 2002).

Os resultados do presente trabalho mostram que a maioria dos efeitos colaterais do 5-FU, na função enzimática das glândulas salivares, parece ser reversível, principalmente para as glândulas parótidas. No entanto, algumas alterações bioquímicas foram observadas até 60 dias pós injeção do 5-FU, como o aumento da concentração de proteína total e a diminuição da atividade enzimática da peroxidase, para as GS submandibulares e um aumento da atividade enzimática da catalase, nas glândulas sublinguais, em relação ao grupo controle do mesmo tempo experimental.

A enzima catalase e peroxidase, apesar de apresentarem a mesma função, proteção do organismo contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio, são dois tipos diferentes de enzimas. A catalase é encontrada principalmente nos peroxissomas de vários tecidos e contém, em seu sítio ativo, um grupo heme e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P) (Betteridge DJ, 2000; Kirkman HN; Gaetani GF, 2007). Em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, a catalase, age catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Kirkman HN; Gaetani GF, 2007; Betteridge DJ, 2000; Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007). Em contrapartida, a peroxidase, é encontrada principalmente no citoplasma e nas mitocôndrias (Abdalla DSP; Faine LA, 2008), e na presença H_2O_2 , catalisa a transformação do tiocianato em hipotiocianato, resultando em função antimicrobiana e antioxidante (Ihalin et al., 2006). Quando o H_2O_2 está presente em concentrações baixas, no nosso organismo, é a enzima peroxidase quem faz sua remoção, transformando em água e oxigênio (Halliwell B; Gutteridge JMC, 2007).

Com algumas diferenças em relação ao observado no presente estudo, Campos et al., em 2014, mostraram o aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase e das enzimas antioxidantes peroxidase, catalase e a diminuição da atividade da superóxido dismutase para as glândulas sublinguais e submandibulares. No entanto, o maior tempo experimental que os autores analisaram foi o de 10 dias após a injeção do 5-FU (Campos et al., 2014).

A glândula salivar submandibular foi a que mais apresentou alterações com 60 dias após a injeção do 5-FU. Vale destacar que essa glândula é a principal responsável pela secreção da saliva, em repouso e, alterações bioquímicas e

histológicas, podem influenciar na função glandular e, conseqüentemente, na quantidade e qualidade da saliva produzida e secretada.

Para os três pares de GS analisados neste estudo, parótidas, submandibulares e sublinguais, foi observada uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade da enzima catalase para ambos os grupos (C e Q) no último tempo experimental (120 dias após a injeção de 5-FU), o que pode estar relacionado com o envelhecimento natural dos animais (Haider et al., 2014).

Haider et al. (2014), em um modelo animal, observaram a relação do estresse oxidativo decorrente da geração de radicais livres de oxigênio com o envelhecimento dos animais. Para isso, compararam ratos de quatro e vinte e quatro meses e concluíram um aumento de radicais livres, diminuição das atividades da enzima antioxidante catalase e da atividade da SOD no cérebro e no plasma de ratos idoso.

Este trabalho também teve como finalidade analisar histologicamente o efeito do quimioterápico 5-Fluorouracil sobre as glândulas salivares, em diferentes tempos experimentais, e dessa maneira avaliar o dano causado às estruturas das glândulas salivares maiores e a duração desses efeitos, que conseqüentemente podem alterar também a sua função. Apesar de ainda incerto os efeitos imediatos e tardios do agente quimioterápico 5-FU nas GS, os poucos achados científicos se restringem a relatar importantes alterações morfológicas, das quais incluem degeneração e atrofia acinar, formação cística e infiltrado inflamatório (Lockhart; Sonis, 1981), conseqüências que também encontramos nesse estudo.

Os resultados histológicos deste trabalho mostraram que o agente 5-FU promove alterações morfológicas importantes, nas glândulas salivares maiores, como aumento dos espaços intercelulares e atrofia das unidades secretoras terminais. Esse quadro é tido como conseqüência dos efeitos do quimioterápico, uma vez que, além de inibir a divisão celular pelo bloqueio do ciclo celular, promove a liberação de radicais livres e, conseqüentemente aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em um efeito citotóxico que causa danos severos ou até morte celular (Lockhart; Sonis, 1981; Almeida VL et al., 2005; Matuo, 2012; Campos et al., 2014). Campos et al., observaram alterações histomorfológicas, incluindo atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do estroma glandular e fusão dos grânulos de secreção, além de alterações significativas na concentração de proteínas

envolvidas no processo de secreção salivar, com a utilização da mesma metodologia do presente estudo.

As glândulas salivares maiores produzem cerca de 90% da saliva secretada na cavidade oral e, conseqüentemente, qualquer alteração na estrutura destas glândulas, pode ocasionar uma alteração na quantidade e qualidade do produto secretado. Com isso, estudos analisando as alterações bioquímicas e histológicas dos diferentes quimioterápicos disponíveis são importantes para melhor entendermos os efeitos sobre as glândulas salivares e como evitá-los.

É importante ressaltar que a saliva é responsável pela lubrificação da cavidade oral, efeito tampão, função imunológica, *clearance* salivar, sensibilidade gustativa, início da digestão e formação do bolo alimentar, entre outras funções essenciais e, alterações na sua quantidade ou composição, podem afetar a qualidade de vida dos pacientes oncológicos, tanto com relação a aspectos fisiológicos, como sociais. Com isso, o conhecimento dos efeitos nocivos do quimioterápico, com relação a sua duração e ação nas diferentes glândulas salivares, é importante, pois pode ter um impacto clínico relevante, nortando futuras condutas clínicas com os pacientes oncológicos.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o 5-FU pode induzir alterações na atividade enzimática das glândulas submandibulares e sublinguais até 60 dias após o término da QT e também promover alterações morfológicas até 120 dias após a quimioterapia.

REFERÊNCIAS¹

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

Almeida VL, Leitão A, Reina L del CB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím Nova.* 2005;28(1):118-29. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>.

Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. *Acta Histochem Cytochem.* 2012 Oct;45(5):241-50. doi: 10.1267/ahc.12013.

Anderson LC. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells in vitro. *Arch Oral Biol.* 1986;31(7):501-3. doi: 10.1016/0003-9969(86)90027-0.

Asking B, Gjørstrup P. Synthesis and secretion of amylase in the rat parotid gland following autonomic nerve stimulation in vivo. *Acta Physiol Scand.* 1987 Jul;130(3):439-45. doi: 10.1111/j.1748-1716.1987.tb08160.x.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3. PMID: 10693912.

Blomgren J, Jansson S, Rödger S, Birkhed D. Secretion rate from minor salivary glands in patients with malignant haematological diseases receiving chemotherapy--a pilot study. *Swed Dent J.* 2002;26(2):75-80.

Buchalla CM, Waldman EA, Laurenti R. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no Município de São Paulo. *Rev Bras Epidemiol.* 2003 dez;6(4):335-44. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2003000400008>.

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. doi: 10.1111/php.12195.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin, staining of mouse tissue sections. Cold Spring Harb Protoc. 2014 Jun;2014(6):655-8. doi: 10.1101/pdb.prot073411.

Cassolato SF, Turnbull RS. Xerostomia: clinical aspects and treatment. Gerodontology. 2003 Dec;20(2):171-5. doi: 10.1111/j.1741-2358.2003.00064.x.

Chabner BA, Calabresi P. Quimioterapia das doenças neoplásicas In: Goodman LS, Gilman A. Bases farmacológicas da terapêutica. 8a ed. São Paulo: McGraw-Hill; 1995. p. 903-49.

Chandra T, Das R, Datta AG. Role of thyroid gland on the peroxidase and iodinating enzymes of submaxillary gland. Eur J Biochem. 1977 Jan;72(2):259-63. doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11248.x.

Delli K, Spijkervet FK, Kroese FG, Bootsma H, Vissink A. Xerostomia. Monogr Oral Sci. 2014;24:109-25. doi: 10.1159/000358792.

Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: a literature review. J Prosthet Dent. 2002 Sep;88(3):337-43. doi: 10.1067/mpr.2002.128176.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992 Apr 25;172(8):305-12. doi: 10.1038/sj.bdj.4807861.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Méd Bras, v.43, p.1-16, 1997.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.

Franca CM, Franca CM, Nunez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, et al. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. J Photochem Photobiol B. 2009 Jan;94(1):25-31. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.09.006.

Gómez de Ferraris ME; Campos Muñoz A. Histologia e embriologia bucodental. 2a ed. Guanabara Koogan; 2006.

Gresik EW. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microsc Res Tech*. 1994 Jan;27(1):1-24. doi: 10.1002/jemt.1070270102.

Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age (Dordr)*. 2014 Jun;36(3):9653. doi: 10.1007/s11357-014-9653-0.

Halliwell B, Gutteridge, JMC, editor. *Free radicals in biology and medicine*. 4th edition ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.

Harrison T, Bigler L, Tucci M, Pratt L, Malamud F, Thigpen JT, et al. 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. doi: 10.1111/j.1754-4505.1998.tb00914.x.

Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):680-93. doi: 10.1177/154405910708600802.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Males, age [0-85+]. France: IARC; 2020 [citado 10 jan. 2021]. Disponível:
https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?sexes=1&single_unit=500000&types=1.

Ihalin R, Loimaranta V, Tenonuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2006;445(2):261-8.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Atlas de mortalidade. Rio de Janeiro: INCA; 2018 [citado 12 jan. 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Duas décadas de Dia Mundial do Câncer e “Estimativa 2020” marcam o 4 de fevereiro no INCA. Rio de Janeiro: INCA; 2020 [citado 14 jan. 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/duas-decadas-de-dia-mundial-do-cancer-e-estimativa-2020-marcam-o-4-de-fevereiro-no-inca>.

Jensen AW, Laack NN, Buckner JC, Schomberg PJ, Wetmore CJ, Brown PD. Long-term follow-up of dose-adapted and reduced-field radiotherapy with or without chemotherapy for central nervous system germinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Aug;77(5):1449-56. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.077.

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. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.01.015.

Katchburian E; Arana V. *Histologia e embriologia oral*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p. 84-104.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212. doi: 10.1177/154411130201300209.

Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(1):44-50.

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. doi: 10.1111/j.1524-4725.1981.tb00208.x.

Lokich J. Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. *Oncology (Williston Park)*. 1998 Oct;12(10 Suppl 7):19-22.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Matuo R. Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta aos danos no DNA induzidos pelo agente antitumoral 5-fluorouracil [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul; 2012 [citado 13 jan. 2020]. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49288/000827929.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, Busamia BE, Dubersarsky C, Lavarda M, Jarchum G, Finkelberg AB. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Mar 1;14(3):E108-13.

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. doi: 10.1016/0003-9969(88)90185-9.

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. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00068-2.

Meurman JH, Laine P, Keinänen S, Pyrhönen S, Teerenhovi L, Lindqvist C. Five-year follow-up of saliva in patients treated for lymphomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997 Apr;83(4):447-52. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90143-8.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):141-6. doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.02838.x.

Nanci A. *Oral histology*. 8th ed. Montreal: Elsevier; 2013.

Nanci A. *Ten Cate's oral histology. Development, structure and function*. 7a ed. St. Louis: Mosby-Elsevier; 2008.

Nicolau J, editor. *Fundamentos de Odontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. (Crivelo Júnior O, coordenador. *Fundamentos de bioquímica oral*; 3, p. 12-4; 6, p. 40).

Nicolau J, de Matos JA, de Souza DN, Neves LB, Lopes AC. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Oral Sci*. 2005 Jun;47(2):111-6. doi: 10.2334/josnurd.47.111.

Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.

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. doi: 10.1007/s005200000214. PMID: 11430420.

Simões A, Platero MD, Campos L, Aranha AC, Eduardo Cde P, Nicolau J. Laser as a therapy for dry mouth symptoms in a patient with Sjögren's syndrome: a case report. *Spec Care Dentist*. 2009 May-June;29(3):134-7. doi: 10.1111/j.1754-4505.2009.00078.x.

Sonis ST, Costello KA. A database for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995 Jul;31B(4):258-60. doi: 10.1016/0964-1955(95)00019-e.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004 May;100(9 Suppl):1995-2025. doi: 10.1002/cncr.20162.

The Lancet. GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer. *Lancet*. 2018 Sep 22;392(10152):985. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32252-9. Epub 2018 Sep 20. Erratum in: *Lancet*. 2018 Oct 6;392(10154):1196.

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(2):111-8. doi: 10.3816/SCT.2004.n.004.

Wahlin YB. Salivary secretion rate, yeast cells, and oral candidiasis in patients with acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Jun;71(6):689-95. doi: 10.1016/0030-4220(91)90275-h.

WHO - World Health Organization. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Genebre: WHO; 2020 [citado 15 jan. 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Odontologia da Universidade De São Paulo

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP Nº 006/2019 referente ao projeto intitulado: "Estudo Temporal do Efeito do Quimioterápico 5-Fluorouracil em Glândulas Salivares de Hamsters" sob a responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves e das alunas Andressa Matucci Hotsumi, Luana de Campos e Gabriela Campos Magliano, foi analisado em reunião realizada em 22 de abril de 2019 e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal: remoção de glândulas salivares em 80 ratos da espécie Hamster.

São Paulo, 22 de abril de 2019.

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço
Coordenadora da CEUA/FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – São Paulo, SP – Cep 05508-000
www.fo.usp.br

ANEXO B - Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7840-202

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **020/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Alyne Simões Gonçalves** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo prospectivo do efeito da quimioterapia na morfologia e metabolismo das glândulas salivares de hamsters**" do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Victor Elías Arana-Chavez, Luana de Campos e Gabriela Magliano** 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 **04/11/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 05 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Victor Elías Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP