

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ESTOMATOLOGIA**

**COLÁGENO E EXPRESSÃO DE TGF- β NO REPARO TECIDUAL DE MUCOSA
BUCAL SUBMETIDA À RADIOTERAPIA**

Lara Correia Pereira

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Botelho Martins

SALVADOR

2010

LARA CORREIA PEREIRA

**COLÁGENO E EXPRESSÃO DE TGF- β NO REPARO TECIDUAL DE MUCOSA
BUCAL SUBMETIDA À RADIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito para obtenção do título de Mestre em Estomatologia.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Botelho Martins

Salvador

2010

P 434 Pereira, Lara Correia

Colágeno e expressão de TGF- β no reparo tecidual de mucosa bucal submetida à radioterapia./ Lara Correia Pereira. . – Salvador.- 2010.
69 f.

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública -EBMSP. Programa de Pós-graduação em Odontologia, mestrado em Estomatologia, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Botelho Martins

Inclui bibliografia

1.Radioterapia. 2. TGF- β , colágeno. 3.Reparo tecidual. I . Título.

CDU: 615.849

LARA CORREIA PEREIRA

**COLÁGENO E EXPRESSÃO DE TGF- β NO REPARO TECIDUAL DE MUCOSA
BUCAL SUBMETIDA À RADIOTERAPIA**

Comissão examinadora:

Dra. Ana Carla Robatto Nunes

Doutora em Microbiologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Prof. Adjunto do curso de Odontologia da UESB.

Dr. Miguel Gustavo Setubal Andrade

Doutor em Imunologia pela ICS/UFBA e Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela PUCRS. Prof. Adjunto do curso de Odontologia da EBMSP.

Dr. Antônio Márcio Teixeira Marchionni

Doutor em Laser pela UFBA e Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela PUCRS. Prof. Assistente do curso de Odontologia da EBMSP.

Membro suplente:

Dr. Arlei Cerqueira

Mestre e Doutor em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela PUCRS. Prof. Adjunto do curso de Odontologia da EBMSP

Salvador

2010



- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Dedico aos meus pais Neto e Sheyla, que são a
minha fonte de inspiração e o alicerce da
minha vida, e às minhas irmãs, Ana Carolina
e Emília, que são minhas companheiras de
vida.**

Primeiramente agradeço a Deus, que é força suprema que guia a minha vida.

Aos meus pais Neto e Sheyla, que são a razão da minha existência, sem eles minha vida não seria a mesma.

Agradeço as minhas irmãs, Ana Carolina e Emília, que são as minhas amigas eternas e companheiras para todas as lutas advindas de nossa existência.

Agradeço meu namorado Richardson que é um grande amigo, companheiro paciente e carinhoso.

Agradeço a Dú, a pessoa mais amiga e simples que poderia ter aparecido na minha vida, que me escuta sempre que eu preciso.

Agradeço aos meus avôs José, Naide, Santa, Walter por suas preces tanto neste mundo material como no mundo espiritual.

Aos meus tios e tias pela constante torcida e carinho. Aos meus primos e primas pelo carinho e amizade.

Agradeço a meu cunhado Saulo, pelo carinho, e ao seu filho, Simon por sua alegria.

Agradeço a Dan, por me fazer feliz a cada pequeno gesto feito.

Agradeço a minha orientadora, Gabriela, que me incentivou na decisão de fazer mestrado, me ajudou nos obstáculos encontrados neste caminho, mas agradeço principalmente pela amizade.

Agradeço as minhas amigas Flávia e Manuela, que embora longe torceram por mim e ficaram felizes por cada etapa ultrapassada.

Agradeço a Camila pela ajuda e carinho.

Agradeço a Louise e Rosane pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Urbino pela confiança.

Agradeço a Profa. Dra. Silvia e aos demais professores da casa pelo conhecimento transmitido.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio pelo grande incentivo dado a minha jornada.

Agradeço aos colegas do mestrado Rebeca, Maybel, Carine, Faber, Thaís, Flávia e Deyla, pela companhia nesta árdua jornada.

Agradeço a Mes. Thaís Mariano, pela ajuda.

Aos funcionários da Bahiana que me ajudaram, em especial aos funcionários da pós-graduação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu êxito profissional.

“Não sabendo que era impossível foi lá e fez”

Autor desconhecido

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - percentual

® - símbolo para marca registrada

µm – micrômetro

µm² – micrômetro quadrado

BSA - albumina do soro bovino

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

cGy – centigray, equivalente à centésima parte do Gray, unidade de medida de radiação ionizante

cm – centímetro

DAB – diaminobenzidina, líquido DAB, sistema substrato-cromógeno

DNA – ácido desoxirribonucléico

EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FGF – fator de crescimento fibroblástico

g – grama

Gy – gray, unidade de medida de radiação ionizante e que significa energia depositada por unidade de massa de uma substância ou tecido. Equivale à unidade J/Kg

HE – coloração histológica pela Hematoxilina e Eosina, considerada uma técnica de rotina em laboratório de histopatologia

LAP - peptídeo associado à latência

MEC - matriz extracelular

mg - miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

NF-κB - Fator nuclear – Kappa B

NaCl – Cloreto de sódio

PBS – *phosphate buffered saline*, tampão salino fosfato

PDGF- Fator de crescimento de derivado plaquetário

pH – potencial hidrogeniônico, essa grandeza indica a acidez (pH < 7), neutralidade (pH = 7) ou alcalinidade (pH > 7) de uma solução líquida

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

SERP – Serviço de Radioterapia do Hospital São Lucas da PUCRS

TBS – tampão tris-salino

TNF - fator de necrose tumoral

TGF- β - fator de crescimento tumoral beta

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média, desvio-padrão e mediana da expressão de colágeno pela coloração de picosírius de cada grupo após análise histomorfométrica (Fonte: EBMSp, 2010).....26
- Tabela 2 – Média, desvio-padrão e mediana da expressão do anticorpo anti-TGF- β de cada grupo após análise histomorfométrica (Fonte: EBMSp, 2010).....27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Radioterapia: a) contenção plástica desenvolvida por Martins (2004); b) animal acondicionado na contenção individualmente; c) animais posicionados para radioterapia; d) animais posicionados para receber radiação ionizante (Fonte: Martins, 2004).....	19
Figura 2 – Procedimento cirúrgico: a) sedação e analgesia; b) execução da padronização da úlcera no dorso da língua; c) remoção do tecido do dorso lingual; d) aferição inicial da úlcera (Fonte: Martins, 2004; Mariano, 2008).....	20
Figura 3 - Fotomicrografias do reparo tecidual nos grupos: a) Grupo 1; b) Grupo 2; c) Grupo 3; d) Grupo 4 (coloração pelo picrosirius, aumento 400x) (Fonte: EBMSP, 2010).....	24
Figura 4 - Fotomicrografias do reparo tecidual por grupos: a) Grupo 1; b) Grupo 2; c) Grupo 3; d) Grupo 4 (coloração por imunistoquímica anti-TGF- β , aumento 400x) (Fonte: EBMSP, 2010).....	25
Figura 5 - Comparação da expressão de colágeno entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (Dunn) - significância 5% (Fonte: EBMSP, 2010).....	26
Figura 6 - Comparação da expressão de colágeno entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (Student) - significância 1% (Fonte: EBMSP, 2010).....	26
Figura 7 - Comparação da expressão do anticorpo anti-TGF- β entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (significância 5%) (Fonte: EBMSP, 2010).....	27
Figura 8 - Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 01 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).....	28
Figura 9 - Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 02 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).....	28

Figura 10 - Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 03 - teste de Spearman
(Fonte: EBMSP, 2010).....29

Figura 11 - Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 04 - teste de Spearman
(Fonte: EBMSP, 2010).....29

SUMÁRIO

1	Introdução	01
2	Manuscrito I	04
2.1	Resumo	05
2.2	Introdução	05
2.3	Revisão de Literatura	07
2.4	Considerações Finais	10
2.5	Abstract	11
2.6	Referências	11
3	Manuscrito II	14
3.1	Resumo	15
3.2	Introdução	16
3.3	Metodologia	17
3.4	Resultados	22
3.5	Discussão	29
3.6	Conclusão	37
3.7	Abstract	37
3.8	Referência	38
	ANEXOS	41
	APÊNDICES	47

1 INTRODUÇÃO¹

O número de casos diagnosticados como câncer de cabeça e pescoço tem causado uma preocupação na comunidade científica, em parte devido ao uso necessário de terapias como radio e/ou quimioterapia que causam alterações nos tecidos adjacentes ao tumor. A radioterapia atua nas células tumorais assim como nas células teciduais normais, causando, por isso, complicações agudas e crônicas inerentes ao tratamento no paciente (R1,2, P25). Embora já se conheça o mecanismo de ação desses tratamentos, o entendimento da fisiopatologia de todas as alterações teciduais provocados por eles ainda é uma dificuldade encontrada pelos usuários e pesquisadores da área.

O objetivo do tratamento das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, além da cura da lesão presente, é evitar os malefícios inerentes a esse tratamento nos pacientes, culminando em um aumento da qualidade de vida e conseqüentemente da sobrevivência de indivíduos diagnosticados com câncer (P6).

Paciente com mucosite radioinduzida tem estimulação da produção do Fator de Crescimento Transformador – Beta (TGF- β) para que haja o reparo tecidual (P1,2,4,5,7). Soma-se a isso o fato de que a radiação ionizante também leva à estimulação na produção e a ativação precoce dessa citocina (R12, P11). Pode-se supor que a sobreposição das duas formas de estimulação do TGF- β em paciente submetido à radioterapia deve culminar em um incremento da fibrose tecidual, no entanto essa sobreposição não é confirmada pelos autores avaliados.

Além disso, na literatura não há referência em relação à expressão do TGF- β radioinduzido na mucosa oral, em especial no tecido ulcerado, justificando assim a realização da presente pesquisa.

O presente trabalho é apresentado em dois manuscritos, sendo o primeiro um artigo de revisão de literatura sobre a expressão do TGF- β em mucosa oral submetida à radioterapia; e o segundo manuscrito um artigo baseado no trabalho experimental em tecido submetido à radioterapia e visando verificar a correlação entre o TGF- β e colágeno. O objetivo maior é

¹ R – referência bibliográfica oriunda do manuscrito 1, correspondente ao número citado; P- referência bibliográfica oriunda do manuscrito 2, correspondente ao número citado

compreender, ainda que parcialmente, as alterações que ocorrerem no reparo em tecidos submetidos à radiação ionizante, no que concerne ao colágeno e sua relação com a citocina citada.

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR - BETA EM MUCOSA ORAL SUBMETIDA À RADIOTERAPIA. UMA REVISÃO CRÍTICA DA LITERATURA

Lara Correia Pereira*, Gabriela Botelho Martins**

* Aluna do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Estomatologia)

** Doutora em Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Professora adjunto do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Resumo

A radiação ionizante é uma das formas de terapia utilizadas para o tratamento de neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Todavia, pode causar complicações agudas, como a mucosite, e complicações crônicas, como a fibrose tecidual. A radioterapia promove um aumento na deposição de fibras colágenas e incrementa a expressão e ativação precoce do Fator de Crescimento Transformador – Beta, que pode culminar nessa fibrose local. O Fator de Crescimento Transformador - Beta é uma citocina multifuncional, excretada sob a forma latente, com importante função na modulação do sistema fibroblasto-fibrócito, estimulando aumento da síntese e depósito de colágeno, atuando no reparo tecidual. O Fator de Crescimento Transformador – Beta ativado aumenta a síntese de matriz desta proteína e diminui sua degradação, especialmente em tecido irradiado sob reparo tecidual. A presente revisão de literatura tem como objetivo esclarecer a relação da expressão do Fator de Crescimento Transformador - beta em tecidos submetidos à radiação ionizante utilizada para tratamento antineoplásico, em especial na mucosa oral e no reparo tecidual em lesões do tipo mucosite, realizando uma análise crítica dos trabalhos avaliados.

Palavras-chaves: Radioterapia, Colágeno, Fator Transformador de Crescimento Beta.

INTRODUÇÃO

A radiação ionizante é uma das opções de tratamento para neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Todavia, sua ação não ocorre somente no tecido tumoral, mas também nos tecidos

normais. O mecanismo de ação pode ser direto e indireto no DNA celular, sendo os tecidos compostos por células lábeis os mais afetados ¹⁻⁴.

A mucosite é uma intercorrência frequente e muitas vezes debilitante nos pacientes sob tratamento antineoplásico, o que pode culminar no desenvolvimento de outras complicações, interferindo no curso do tratamento, no controle local tumoral e, conseqüentemente, na sobrevivência do paciente ^{2,4,5}. Outra complicação comum é a fibrose, encontrada nos tecidos após tratamento radioterápico, uma vez que a radiação ionizante pode causar um aumento na deposição de colágeno e mudanças no seu metabolismo, verificando-se maturação relativa das fibras colágenas ^{3,6,7}.

O Fator de Crescimento Transformador – Beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional responsável por inúmeras funções em diferentes tipos celulares ⁸. Cromack *et al.* ⁷ relataram que o TGF- β é bifuncional, atuando como regulador do crescimento e diferenciação celular. Atua ainda no processo de reparo tecidual, sendo que, na mucosa oral, este processo de cicatrização é acelerado comparado com tecido cutâneo ^{7,9}. O TGF- β pode estimular a proliferação de fibroblastos normais, de células não epiteliais, entre outras ¹⁰, e é um forte estimulador da síntese e depósito de proteínas da matriz extracelular (MEC) por parte dos fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais, podendo culminar na formação de fibrose local ^{8,9}.

A radiação ionizante pode estimular a cascata de ativação de genes, transcrição e síntese de proteínas que têm a função de permitir a sobrevivência da célula após a injúria por radiação. Inclui-se nesse processo a ativação de fatores como TGF- β , fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) ¹¹. Já foi observado que a radiação ionizante pode ativar a proteína TGF- β 1 em células da glândula mamária ¹², em células cardíacas ¹³ e células do parênquima pulmonar ⁶.

A literatura sugere hipóteses que relacionam a radiação ionizante com a expressão do TGF- β em diversos tecidos e aumento na produção de colágeno gerando fibrose local. No entanto, não se contemplou esta atuação no que diz respeito à mucosa oral. Desta forma, o objetivo desse estudo foi explorar a literatura atual para melhor entender a relação da expressão do TGF- β em mucosa oral submetida à radiação ionizante normalmente utilizada no tratamento

das neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, mais especificamente relacionado ao reparo tecidual das lesões de mucosite, realizando uma análise crítica dos trabalhos avaliados.

REVISÃO DE LITERATURA

A radioterapia é uma opção de tratamento para os tumores malignos de cabeça e pescoço, cujo agente terapêutico é a radiação ionizante, tornando o meio eletricamente instável^{2,14}. Seu efeito biológico ocorre através da transferência linear de energia, que representa a energia liberada pela radiação por unidade de espaço (meio) percorrido, sendo que esta energia é importante na capacidade de penetração no meio absorvedor; e através da taxa de dose, que é a quantidade de energia liberada num determinado tempo¹⁴.

A ação da radiação ionizante nos tecidos pode ocorrer através do efeito direto, pela interação direta nos componentes celulares (DNA, proteínas e lipídeos) representando 30% de sua atividade; ou do efeito indireto, responsável por 70% da sua ação, através da ligação com o meio constituinte celular produzindo radicais livres, o que culmina na morte celular^{2,14}.

Os efeitos agudos da radioterapia levam a mucosites, alterações das glândulas salivares, xerostomia, e o risco de infecções bucais. As agressões da radiação ionizante aos tecidos moles são provocadas pela obliteração dos microvasos, excessiva fibrose e alterações cromossômicas em células normais^{1,15}. Este efeito dependem do volume e do local irradiado, da dose total, do fracionamento, da idade e condição clínica do paciente^{2,14}.

Segundo Hom *et al.*¹, a fibrose tecidual é uma complicação crônica induzida pela radioterapia, sendo progressiva, dose dependente e permanente. O tecido irradiado se torna mais susceptível ao trauma, infecção e irritação, devido ao decréscimo da vasculatura e aumento da deposição de fibras colágenas. Parte dessa resposta fibrótica é induzida pelo TGF- β e parece estar relacionada à modulação do sistema fibroblasto-fibrócito, levando ao acúmulo de colágeno tipo I e III¹⁶. Ou seja, a radiação ionizante isolada é capaz de induzir a diferenciação prematura de fibroblastos em fibrócitos levando a um aumento da síntese de colágeno intersticial¹⁷. Além disso, dentre as ações do TGF- β , pode-se citar a diminuição da degradação do colágeno, que intensifica a formação dessa fibrose local^{13,17-19}.

Dessa forma, a agressão tecidual causada pela radioterapia leva a um processo de reparo semelhante à inflamação local, formando colágeno, porém a formação dessas fibras sofre modificações metabólicas, não formando completamente os feixes de fibras colágenas ²⁰.

O colágeno é uma molécula polipeptídica responsável por aproximadamente um terço da proteína total do organismo de mamíferos. Sua síntese se dá através dos fibroblastos sendo secretado para o meio extracelular na forma de molécula de procolágeno. Na matriz conjuntiva, as fibrilas de colágeno não maduro iniciam o processo de estabilização e organização de suas fibras através de ligações covalentes ²¹.

O TGF é uma citocina que faz parte da super família de polipeptídeos e tem a função multifuncional da proliferação e diferenciação de amplas variedades celulares ¹⁴. Existem várias isoformas do TGF- β que podem ser designadas como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 e TGF- β 5. As isoformas 1, 2 e 3 são codificadas pelos cromossomos humanos 19q13, 1q41 e 14q24, e as isoformas 4 e 5 são identificados em aves e anfíbios, respectivamente. Entre os mamíferos, a sequência de aminoácidos do TGF- β 1 é altamente conservada já que é idêntica entre os humanos e bovinos, e difere em somente um aminoácido nos ratos ⁸.

A excreção inicial do TGF- β se dá sob a forma inativa, sendo um complexo formado de união de peptídeos maduros e precursores do TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 conhecido como peptídeo associado à latência – LAP ^{8,16}, que precisa ser clivado para que o fator exerça sua função.

O TGF- β latente, também chamado de pré-pró-TGF- β , é composto por uma grande molécula com 390 aminoácidos. A primeira clivagem molecular ocorre no aminoácido-29, através de uma glicolização no peptídeo Glicina – Leucina transformando-se em pró-TGF- β . A clivagem proteolítica da segunda fase de ativação ocorre no aminoácido-278, separando-o do glicopeptídeo aminoterminal, formando o TGF- β maduro. O TGF- β biologicamente ativo é uma polipeptídeo dimérico composto por 112 aminoácidos ²².

Lyons *et al.* ²² sugeriram que a secreção do TGF- β ativo não possibilitaria uma resposta apropriada nos órgãos, tecidos e células, devido a sua atuação endócrina ou parácrina, justificando a sua latência inicial.

No reparo tecidual, o TGF- β é ativado e produzido em resposta a estímulos, incluindo a plasmina, trombose e oxigênio reativo⁹. Segreto *et al.*¹⁴ sugerem que a ativação precoce do TGF- β nos tecidos submetidos à radioterapia seria consequente ao estresse oxidativo induzido pelos radicais livres produzidos pela radiação ionizante e a elevação continuada e tardia da proteína devido aos mecanismos celulares via plasmina. A plasmina é uma protease que ativa o TGF- β latente *in vivo*.

A ativação do TGF- β tem sido detectada após 30 e 90 dias da aplicação da radiação ionizante, e é possível que nos períodos iniciais, entre hum e 14 dias depois da irradiação, já tenha ocorrido ativação da proteína TGF- β 1, porém de forma discreta, sendo que a baixa concentração da proteína não parece permitir sua detecção por imunistoquímica¹³.

Segundo Chen *et al.*²³, os níveis de TGF- β no plasma decresceram após quimio e radioterapia nos pacientes que também desenvolveram dermatites e mucosites, podendo ser essa uma explicação do desenvolvimento dessas alterações. Em seu estudo com 18 pacientes diagnosticados com carcinoma epitelial de nasofaringe sob tratamento de radioterapia e /ou quimioterapia, os autores avaliaram os níveis de TGF- β no plasma desses pacientes pré e pós tratamento radioterápico, observando que nos indivíduos possuidores de altos níveis de TGF- β pré-tratamento, justificado pelo autora a produção da citocina pela carcinoma, houve um decréscimo pós-terapia, sendo estes os pacientes que mais sofreram com as complicações inerentes ao tratamento. O oposto ocorreu nos pacientes que possuíam baixos níveis de TGF- β pré-tratamento radioterápico e altos níveis pós-tratamento.

A mucosite é uma das mais significantes toxicidades não-hematológica associada à radioterapia, que ocorre devido à indução da morte celular por apoptose pela terapia anti-câncer²⁴. Sonis²⁴ sugere que o Fator Nuclear – Kappa B (NF- κ B) que tem ação pró-apoptose ou anti-apoptose, quando ativado, pode ser o fator determinante para o fato do tecido da mucosa normal ser exposto à citotoxicidade da terapia anti-câncer. Sculy *et al.*²⁵ relataram ainda a formação de oxigênio reativo como superóxido.

A mucosite radioinduzida clinicamente é caracterizada como um eritema que ocorre em doses acumulativas de radiação de cabeça e pescoço a partir de 10 Gy, seguida da formação de

úlceras que geram desconforto ao paciente em doses de radiação acumulativa de 30 Gy, além da possibilidade ocorrência de infecções oportunistas nos pacientes ²⁵.

Para que ocorra o reparo tecidual da mucosite tem-se a necessidade de produção e ativação de TGF- β . Todavia, em um tecido onde o sistema fibroblasto-fibrócito está modificado devido à radiação ionizante, onde há o aumento da expressão e ativação precoce do TGF- β , o tecido em reparo pode expressar diferentes concentrações de TGF- β , culminado no aumento da fibrose tecidual local.

Na mucosa oral, o reparo tecidual é acelerado e com mínima cicatriz quando comparado com tecido cutâneo, principalmente nas primeiras 24 horas, devido à influência local do TGF- β , pelo aumento da expressão gênica do seu mRNA, como descritos por Schrementi *et al.*⁹. O mecanismo de reparo tecidual acelerado por TGF- β no tecido radioinduzido foi avaliado por Cromack *et al.*⁷ através da injeção de TGF- β 1 após irradiação corporal total, observando a melhora até 133% no reparo, na qualidade do tecido ou no reparo como um todo, quando comparado com o não uso da injeção de TGF- β 1, confirmando assim a interferência do TGF- β no reparo tecidual após irradiação.

Uma informação importante é de que os queratinócitos que atuam no reparo tecidual, controlando a inflamação e remodelação tecidual, parecem ter a capacidade de produzir fatores de crescimento como o TGF- β , posto que Riedel *et al.*¹⁹ avaliaram 10 espécimes de tecidos excisados cirurgicamente, *in vitro* e por imunistoquímica, culturas celulares de queratinócitos da epiderme humana, verificando sua expressão nessas células, aumentando também a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), controlando a inflamação local, culminando em reparo tecidual.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a literatura estudada, a radiação ionizante, embora seja uma terapia eficiente contra neoplasias de cabeça e pescoço, pode causar efeitos colaterais agudos, como a mucosite, e efeitos crônicos, como a fibrose tecidual. A radioterapia também pode causar o aumento na expressão de TGF- β e sua ativação precoce, culminando em mudança no metabolismo das fibras colágenas no reparo tecidual, incrementando a fibrose local. Outro ponto observado é

que a mucosite ocasionada pelo tratamento antineoplásico, no momento de reparo tecidual, estimula a produção de TGF- β que, somado com a injúria por radiação evidencia um aumento da ativação e estimulação dessa citocina, resultando com aumento da fibrose local.

ABSTRACT

Ionizing radiation is a form of therapy used for the treatment of malignancies of head and neck. However, it can cause acute complications such as mucositis, and chronic complications, such as tissue fibrosis. Radiation causes an increase in collagen deposition and increases the expression and activation of the Transforming Growth Factor - beta, which may result in this local fibrosis. The transforming growth factor - beta is a multifunctional cytokine, excreted latent, with an important role in the modulation of the fibroblasts-fibrocytes, stimulating increased synthesis and deposition of collagen, acting on tissue repair. The transforming growth factor - beta activated increases matrix synthesis of this protein and decreases its degradation, especially in irradiated tissue or tissue repair, and in the oral mucosa this process is accelerated compared with skin tissue. This literature review aims to clarify the relationship between the expression of transforming growth factor - beta in tissues subjected to ionizing radiation used for anticancer treatment, particularly in the oral mucosa and wound repair in lesions with mucositis.

Keywords: Radiotherapy, collagen, transforming growth factor beta.

REFERÊNCIAS

- 1 Hom DB, Adam GL, Monyai D. Irradiated soft tissue and its management. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1995, 28(5): 1003-1019.
- 2 Jham BC, Freire AD daS. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006, 72(5).
- 3 Rieki R, Jukkola A, Sassi M-L, Höyhtyä M, Kallioinen M, Risteli J, Oikarinen A. Modulation of skin collagen metabolism by irradiation: collagen synthesis is increased in irradiated human skin. *Br J Dermatol.* 2000; 142: 874-880.
- 4 Volpato LER, Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM. Mucosite bucal radio e quimioinduzida. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007, 73(4).

- 5 Bonan PRF, Lopes MA, Alves F de A, Almeida OP de. Aspectos clínicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2005, 51(3): 235-242.
- 6 Mattos MD, Kimura ED, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA, Segreto HRC. Ativação da proteína TGF- β 1 latente em pulmão irradiado *in vivo*. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2002, 48(4): 329-334.
- 7 Cromack TD, Porras-Reyes B, Purdy AJ, Pierce GF, Mustoe TA. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor β 1: Identification of *in vivo* mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits. *Surgery.* 1993, 113(1): 36- 42.
- 8 Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor- beta. *Biochem. Biophys. Acta.* 1990, 1032: 79-87.
- 9 Schrementi ME, Ferreira AM, Zender C, DiPietro LA. Site-specific prodction of TGF- β in oral mucosal and cutaneous wounds. *Wound repair regen.* 2008, 16: 80-86.
- 10 Zaragoza OP, Martinez LA, Marina MV. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación em câncer. *Salud pública Méx.* 2001, 43(4).
- 11 Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor- beta: recent progress and new challengens. *J. Cell. Biol.* 1992, 119: 1017-1021.
- 12 Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang MLS, Weatherbee JA. Transforming growth factor - β activation in irradiated murine mammary gland. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 892-899.
- 13 Affonso-Júnior RJ, Oshima CTF, Kimura ET, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA, Segreto HRC. Expressão da proteína TGF- β 1 em coração irradiado *in vivo*. *Radiol. Bras.* 2004, 37(2): 107-113.
- 14 Segreto HRC, Segreto RA. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. *Folha méd.* 2000, 119(4): 9-27.
- 15 August M, Wang J, Plante D, Wang CC. Complications associated with therapeutic neck radiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996, 54: 1409-1415.
- 16 Ruifrok ACC, Mcbride W.H. Growth factors: biological and clinical aspects. *Int. Radiot. Oncol. Biol. Phys.* 1999, 43: 877-81.
- 17 Rodemann HP, Bomberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol.* 1995, 35(2): 83-90.
- 18 Philipp K, Riedel F, Sauerbier M, Hörmann K, Germann G. Targening TGF- β in human keratinocytes and its potential role in wound healing. *Int J Mol Med.* 2004,14: 589-593.
- 19 Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G, Sauerbier M. TGF- β antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes *in vitro*. *Arc Med Res.* 2007, 38: 45-51.

- 20 Mariano, TA. Avaliação das alterações do reparo tecidual em mucosa bucal submetida à radioterapia [dissertação]. Salvador: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; 2008.
- 21 Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.285 1999.
- 22 Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 1990, 187: 467-473.
- 23 Chen HW, Chang YC, Lai YL, Chen YJ, Chen YJ, Huang MJ, Leu YS, Fu YK, Wang LW, Hwang JJ. Change of plasma transforming growth factor- β 1 levels in nasopharyngeal carcinoma patients treated with concurrent chemo-radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2005, 35(8): 427-432.
- 24 Sonis ST. The biological role for nuclear factor-kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002, 13(5): 380-389.
- 25 Scully C, Sonis S, Diz PD. Mucosal diseases series. *Oral Dis.* 2006, 12: 229-241.

COLÁGENO E EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR - BETA NO REPARO TECIDUAL DA MUCOSA BUCAL SUBMETIDA À RADIOTERAPIA

Lara Correia Pereira*, Camila Queiroz**, Thaís Almeida Mariano***, Manoela Carrera M.C. Pereira****, Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo*****, Gabriela Botelho Martins*****

* Aluna do curso de Pós-Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Estomatologia).

** Acadêmica do curso de Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

***Mestre em Estomatologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

**** Doutoranda em Estomato-Patologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas. Mestre em Estomatologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

*****Doutora em Estomatologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Professora adjunto do curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

***** Doutora em Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Professora adjunto do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar, quantitativamente, a expressão do TGF- β em mucosa bucal submetida à radioterapia correlacionando com produção de colágeno. Foram utilizados 20 blocos parafinados contendo tecido de língua de ratos Wistar, divididos em quatro grupos, três experimentais e um controle, com cinco animais cada. Os animais dos grupos 3 e 4 receberam 6000 cGy de radiação terapêutica e os grupos 2 e 4 tiveram o dorso da língua ulcerado no 19º dia do experimento. Ao final do experimento, a língua dos animais foi removida cirurgicamente, fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina para confecção das lâminas. A expressão do TGF- β foi observada através da marcação imunistoquímica para detecção do TGF- β , e as fibras colágenas analisadas pela coloração com picrossírius, com quantificação morfométrica. O grupo submetido à radioterapia e ulceração possuiu maior

produção de colágeno e TGF- β (21% e 9,44%, respectivamente) em comparação com os outros grupos. Todavia, foram observadas diferenças significativas apenas entre os grupos 3 e 4, quando aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$), Dunn ($p < 0,0406$) e Student-Newman-Keuls ($p < 0,0064$), com nível de significância de 5% e 1%, respectivamente. Não se observaram diferenças estatísticas na expressão do TGF- β entre os grupos. Não houve correlação positiva entre o TGF- β e colágeno ($p > 0,05$) em nenhuma das análises realizadas. Concluiu-se que a presença de colágeno e a expressão do TGF- β é aumentada no reparo tecidual de úlceras submetidas à radioterapia, comparada à úlcera ou à radioterapia isoladas, e que não houve correlação entre o TGF- β e o colágeno.

Palavras-chaves: Radioterapia, TGF- β , colágeno, reparo tecidual.

INTRODUÇÃO

O reparo tecidual é um processo complexo que envolve vários estágios e necessitam de colaboração de componentes da MEC, diferentes tipos de células e mediadores, onde o TGF- β atua em todos os estágios de reparação¹⁻⁷.

O Fator de Crescimento Transformador – beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional que é responsável por inúmeras funções em diferentes tipos celulares, sendo inicialmente secretadas na forma latente e ativada através de seus efeitos biológicos e união dos seus receptores. Possui diferentes isoformas, como TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3^{1-3,8,9}.

O TGF- β pode estimular a proliferação e diferenciação de fibroblastos normais, de células não epiteliais e epiteliais e certos tipos de células mesenquimais, além de estimular a produção de outros fatores de crescimento, sendo um forte estimulador da síntese e depósito de proteínas da matriz extracelular (MEC) por parte dos fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais, o que também pode culminar na formação de fibrose tecidual reacional^{1,2,10}. Já foi observado que a radiação ionizante pode ativar a proteína TGF- β 1 em células da glândula mamária¹¹, em células cardíacas¹² e células do parênquima pulmonar¹³.

O colágeno é uma molécula polipeptídica responsável por aproximadamente 30% das proteínas totais do organismo de mamíferos. Os fibroblastos são as células responsáveis pela sua síntese, sendo secretado para MEC na forma de molécula de procolágeno, onde qualquer

alteração no sistema fibroblasto/fibrócito pode culminar em alteração da maturação da matriz conjuntiva ¹⁴.

A radiação ionizante utilizada para o tratamento de neoplasias malignas, isoladamente, pode induzir mudanças da composição do tipo celular do sistema fibroblasto/fibrócito, gerando mudanças na homeostasia, o que causa um aumento na deposição de colágeno e conseqüentemente uma fibrose tecidual local, podendo também causar uma maturação relativa das fibras colágenas ^{4,10,12,13,15}.

A mucosite oral é uma alteração tecidual esperada nos pacientes submetidos à radioterapia de etiologia incerta, sendo relatado quase a totalidade de manifestação nos pacientes, e dependendo do grau que se manifesta pode interferir diretamente no tratamento proposto ^{6,16}.

A literatura sugere hipóteses que relacionam a radiação ionizante com a expressão do TGF- β em diversos tecidos, no entanto não foi encontrado estudos que façam essa relação com a mucosa oral. Dessa forma, tendo como objetivo avaliar quantitativamente a expressão do TGF- β em mucosa bucal submetida à radioterapia, pretende-se observar quantitativamente a expressão de colágeno; verificar a expressão imunohistoquímica do TGF- β ; correlacionar a expressão do TGF- β com a produção do colágeno.

METODOLOGIA

A pesquisa quantitativa de investigação experimental em laboratório foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP-Bahiana/EBMSP) sob o número de protocolo 004/2009 (ANEXO 01). Foi avaliada e aprovada anteriormente para os trabalhos de Martins ¹⁷ (CEP-PUCRS; protocolo: 0053/03) (ANEXO 02) e Mariano ¹⁸ (CEP-Bahiana/FBDC; protocolo: 012/2007) (ANEXO 03).

Amostra e amostragem

A amostra do tipo aleatória estratificada constou de 20 blocos de tecido de língua de ratos machos adultos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, incluídos em parafina obtidos

a partir do trabalho de Martins¹⁷ e Mariano¹⁸. Os blocos foram agrupados em quatro grupos, seguindo a divisão do trabalho de Mariano¹⁸: Grupo 1: Controle 01, blocos obtidos de 5 animais não submetidos à radioterapia, sem lesão ulcerada em língua; Grupo 2: Controle 02, blocos obtidos de 5 animais não submetidos à radioterapia, com lesão ulcerada em língua; Grupo 3: Controle 03, blocos obtidos de 5 animais submetidos à radioterapia, sem lesão ulcerada em língua; Grupo 4: Experimental, blocos obtidos de 5 animais submetidos à radioterapia, com lesão ulcerada em língua.

Protocolo radioterapêutico

Os animais foram submetidos a procedimentos de radioterapia e cirúrgico definidos por Martins¹⁷, sendo postos individualmente em uma contenção plástica delineada para o estudo citado (Figura 1a,b). Os animais dos grupos 3 e 4 foram submetidos ao protocolo instituído pelo Serviço de Radioterapia da PUCRS (SERP) para câncer de cabeça e pescoço, constando de uma sessão diária de radioterapia (200 cGy/dia), de segunda a sexta-feira, durante seis semanas, no total de 30 sessões, totalizando 6000 cGy de radiação ao final do tratamento. O aparelho empregado no tratamento radioterápico foi o Philips - modelo XK5101 - unidade de teleterapia rotacional por Cobalto 60 (Figura 1c,d).

Procedimento Cirúrgico

Os animais dos grupos 2 e 4 foram submetidos ao procedimento cirúrgico no 19º dia do início de tratamento, no momento em que completaram uma dose total de 3000 cGy de radiação ionizante, sendo quantidade de energia suficiente para produzir mucosite oral nos pacientes em tratamento. Estes animais foram sedados e anestesiados pela associação de Cloridrato de Xilazina - Anasedan injetável² - com Cloridrato de Ketamina - Vetanarcol® –anestésico injetável³-, na proporção de 1:1, sendo administrado 0,2 ml/100g de peso, por via intramuscular (Figura 2a). Após a obtenção do efeito anestésico, os animais tiveram suas bocas abertas com o auxílio de atilhos, a úlcera foi produzida no dorso da língua por um punch descartável – Biopsy punch – 5 mm², a uma pequena distância do ápice (Figura 2b,c). A úlcera distendida foi aferida a cada quarenta e oito horas, totalizando 10 aferições, utilizando-

² Agribrands do Brasil Ltda.

³ König do Brasil Ltda.

se uma régua endodôntica milimetrada, visando maior padronização do procedimento (Figura 2d). As medidas foram obtidas, sempre pelo mesmo examinador previamente calibrado.

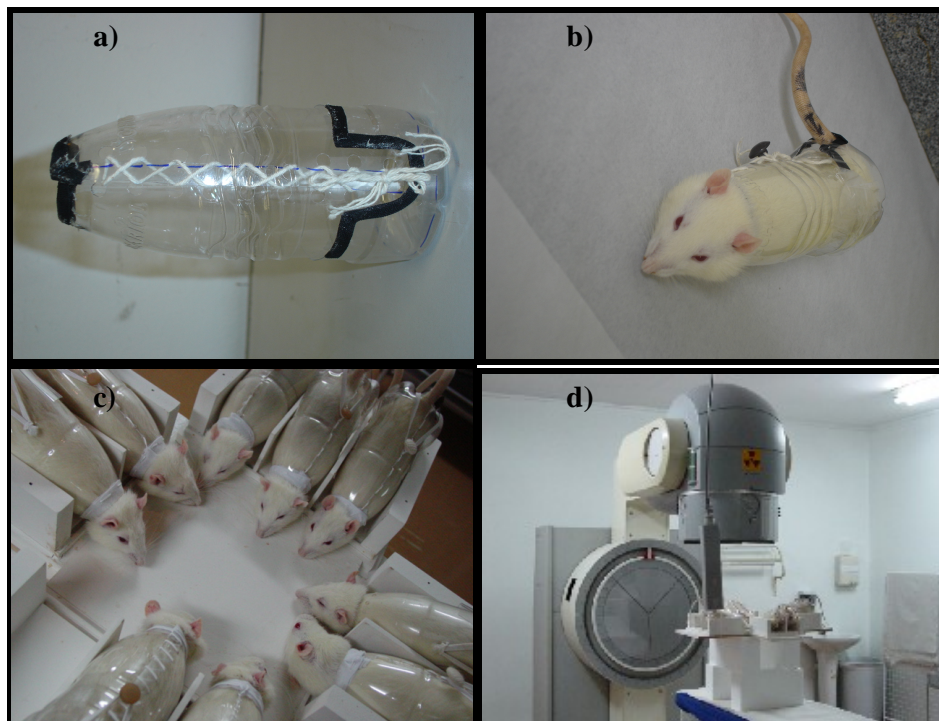


Figura 1: a) contenção plástica desenvolvida por Martins¹⁷; b) animal acondicionado na contenção individualmente; c) animais posicionados para radioterapia; d) animais posicionados para receber radiação ionizante (Fonte: Martins¹⁷).

Tempo de morte e obtenção das peças

Quarenta e oito horas após o término das sessões de radioterapia todos os animais foram mortos. A língua dos animais foi removida cirurgicamente e essas foram fixadas em solução de formol a 10%. A região correspondente à área da úlcera foi seccionada em sua porção central, longitudinalmente, e as peças incluídas em parafina do centro para a margem, sendo estes os blocos parafinados utilizados na presente pesquisa. Cortes histológicos de quatro micrômetros (μm) de espessura foram obtidos a fim de serem analisadas pela coloração de rotina hematoxilina – eosina (HE), picrossírius e imunistoquímica por anticorpo anti-TG

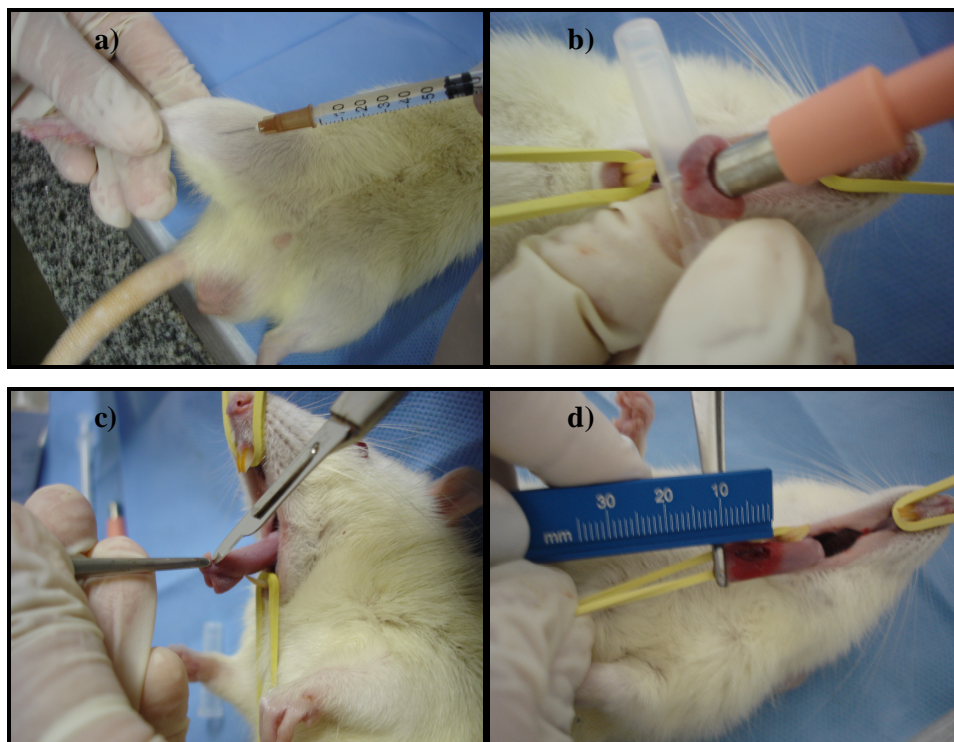


Figura 2: a) sedação e analgesia; b) execução da padronização da úlcera no dorso da língua; c) remoção do tecido do dorso lingual; d) aferição inicial da úlcera (Fonte: Martins¹⁷; Mariano¹⁸).

Imunoistoquímica para anti-TGF- β

Em lâminas tratadas previamente com solução de organo-silano⁴, foram obtidas secções teciduais a partir de blocos de parafina contendo tecido de língua dos ratos estudados no presente trabalho.

Procedeu-se à desparafinização dos cortes histológicos, submetendo-se as lâminas a banhos sucessivos em xilol. Em seguida, as mesmas foram hidratadas em soluções de álcool absoluto e lavadas em água corrente e destilada. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol por 30 minutos. As lâminas foram então rinsadas com água corrente seguida de água destilada. Foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas através do reagente Peroxidase Blocking Reagent Ready-to-Use⁵, por 10 minutos

⁴ A3648- Sigma

⁵ Dako, Dinamarca – S2001

em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas com água destilada e submetidas a três banhos com PBS de 3 minutos cada. A recuperação antigênica para as lâminas submetidas ao anticorpo anti- TGF- β foi realizada através da incubação em pepsina 1%, pH 1.8, a aproximadamente 37 °C por 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas resfriaram em temperatura ambiente e foram banhadas em água destilada, seguido de três banhos com PBS de 3 minutos cada.

A inibição das ligações inespecíficas foi feita com solução de leite em pó a 10% e PBS, por 20 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti- TGF- β (1:4) e preparados na diluição preconizada através de um diluente com agente redutor de background⁶. Tais anticorpos foram aplicados com auxílio de pipetas de precisão em cada corte histológico, com um volume de 100 μ l e incubados por uma noite em câmara úmida a 4°C.

Após equilibrar as lâminas à temperatura ambiente por trinta minutos, realizaram-se seis rinsagens com PBS, seguidas por quatro lavagens com TBS de três minutos cada e secagem com papel absorvente. Em seguida, aplicou-se o polímero com HRP do Kit EnVision⁷ por trinta minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada e realizaram-se seis rinsagens com PBS, seguidas por quatro lavagens com PBS de três minutos cada.

A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina⁸. Posteriormente, as mesmas foram lavadas com água com o objetivo de bloquear a reação. As lâminas foram, então, contra-coradas com hematoxilina de Meyer por quinze segundos, lavadas com água corrente, e depois com água destilada. Por fim, os cortes foram desidratados duas vezes em soluções de álcool absoluto, diafanizados em dois banhos de xilol e montados em Bálsamo do Canadá.

⁶ Dako, Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dinamarca, S3022

⁷ Dako, Dinamarca, K4061

⁸ Liquid DAB Sbstate Chromogen System, Dako, Dinamarca, K3466

Como controle positivo foi utilizado tecido de granulação com conhecida positividade para TGF- β em todas as reações imunoistoquímicas realizadas. O controle negativo foi obtido através da substituição do anticorpo primário por PBS e BSA.

Histomorfometria

Através do programa Motic Images Advanced 3.0®⁹ as fotomicrografias das lâminas foram obtidas utilizando os recursos disponíveis para execução das análises. Para cada lâmina foram selecionados três campos que representavam o meio da úlcera e as duas extremidades da mesma, com a objetiva de 40x. Para avaliar a área de fibras colágenas, utilizou-se a coloração do picrossírius e, para verificação da área expressa do TGF- β , foram utilizadas os cortes marcados imunoistoquimicamente. Com o auxílio do Excell®¹⁰, os resultados totais para área das fibras colágenas e da citocina TGF- β foram anotadas e obtidas as médias e a média percentual dos três campos de cada animal, e, então, para cada grupo. Todas as análises foram cegas para evitar o viés de tendenciosidade e por um mesmo avaliador. As análises quantitativas foram realizadas, no laboratório de microscopia da EBMSP.

Análise dos dados

O colágeno e a expressão da marcação de TGF- β tecidual foram analisados de forma quantitativa pela média das áreas expressas. Foi aplicado o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, confirmado pelo teste de Dunn e Student-Newman-Keuls e o teste de correlação de Spearman, com nível de significância de 5% pelo programa Bioestat 5.0¹¹.

RESULTADOS

1 Análise morfológica

1.1 Colágeno

⁹ Motic ChinaGroup CO. LTD.

¹⁰ Microsoft China Group 1985-2001.

¹¹ Produtos do Bioestat, Belém, Pará, Brasil, 2007.

Na avaliação descritiva das fibras colágenas em lâminas coradas pelo picrosírius, aumento de 400x, observou-se que o grupo 01 (tecido normal sem injúria) apresentou fibras em feixes organizados, dispostos mais próximos ao epitélio, compatível com aspecto de normalidade da área (Figura 03a).

Para o grupo 02 (úlceras) observou-se fibras colágenas mais espessas, porém com feixes organizados mais superficialmente, próximos ao epitélio, condizente com o reparo tecidual após uma injúria pontual. As fibras colágenas apresentaram-se dispostas de maneira uniforme, tanto no centro quanto nas margens da úlcera cicatrizada. Em apenas um animal as fibras colágenas apresentaram-se mais espessas, porém mais desorganizadas em comparação com os demais casos. Em todos os animais pôde-se observar a completa epitelização da área da úlcera com epitélio mais delgado em dois animais (Figura 03b).

Em relação ao grupo 03 (tecido submetido à radioterapia) observou-se que as fibras colágenas se encontravam dispostas de forma mais espessas que os grupos 01 e 02. Dois animais apresentaram visualmente, maior quantidade de fibras colágenas que os demais, sugerindo uma deposição maior do colágeno na área. Note-se que neste grupo, a injúria pela radiação, mesmo de baixa intensidade, foi mantida até o final do experimento (Figura 03c).

Já no grupo experimental - grupo 04 -, pôde-se notar que as fibras colágenas se encontravam em feixes irregulares, dispostos tanto imediatamente subjacente ao epitélio de revestimento, como infiltrando tecido conjuntivo mais profundamente. Fibras colágenas espessas entremeavam as fibras delicadas em toda a extensão da lâmina. Todos os animais apresentaram completa epitelização na região da úlcera (Figura 03d).

1.2 Expressão do TGF- β

As lâminas marcadas pelo anticorpo anti-TGF- β por imunistoquímica foram avaliadas de forma descritiva, observando-se a diferença entre os grupos estudados. O grupo 01 exibiu expressão uniforme na região de tecido conjuntivo mais próximo de epitélio, com evidencição leve nas camadas basais epiteliais. Já o grupo 02 exibiu a presença da citocina de maneira exuberante no tecido conjuntivo, com expressão quase nula em região do epitélio (Figura 04 a,b).

O grupo 03 assemelhou-se ao grupo 01 ao expressar o TGF- β em células basais do epitélio, podendo ser justificado pela não ruptura de membrana basal. Todavia, a área de tecido conjuntivo que exibia a presença da molécula foi menos uniforme neste grupo, quando comparada ao grupo 02 (Figura 04 c).

Ficou nítida a intensa marcação do anticorpo no grupo onde as injúrias da radiação e reparo de úlcera se somaram - grupo 04 -, caracterizando o grupo de maior evidência desta citocina. Nos casos analisados, o tecido epitelial exibiu intensa marcação pelo anticorpo associada à também exuberante expressão da citocina no tecido conjuntivo subjacente (Figura 04 d).

Ressalta-se que o objetivo foi analisar a expressão da citocina no tecido conjuntivo subjacente à área da injúria não sendo estudada a marcação epitelial.

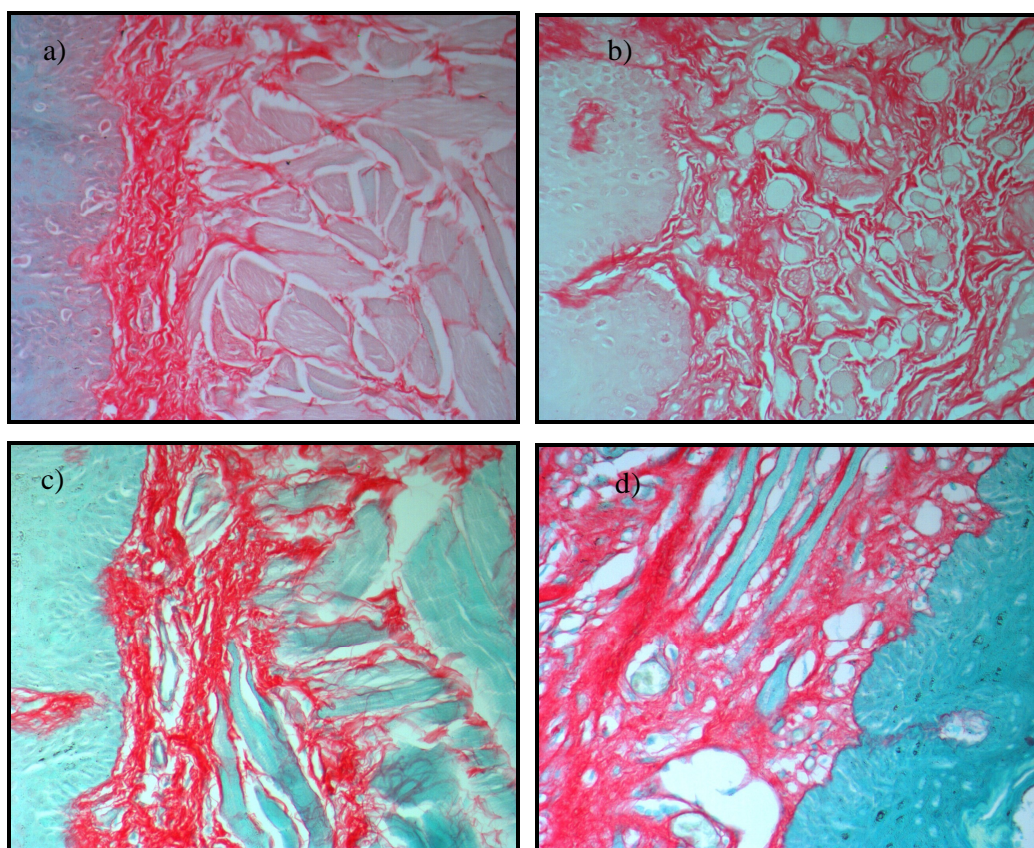


Figura 3 - Fotomicrografias do reparo tecidual nos grupos: a) Grupo 1; b) Grupo 2; c) Grupo 3; d) Grupo 4 (coloração pelo picrosirius, aumento 400x) (Fonte: EBMSp, 2010).

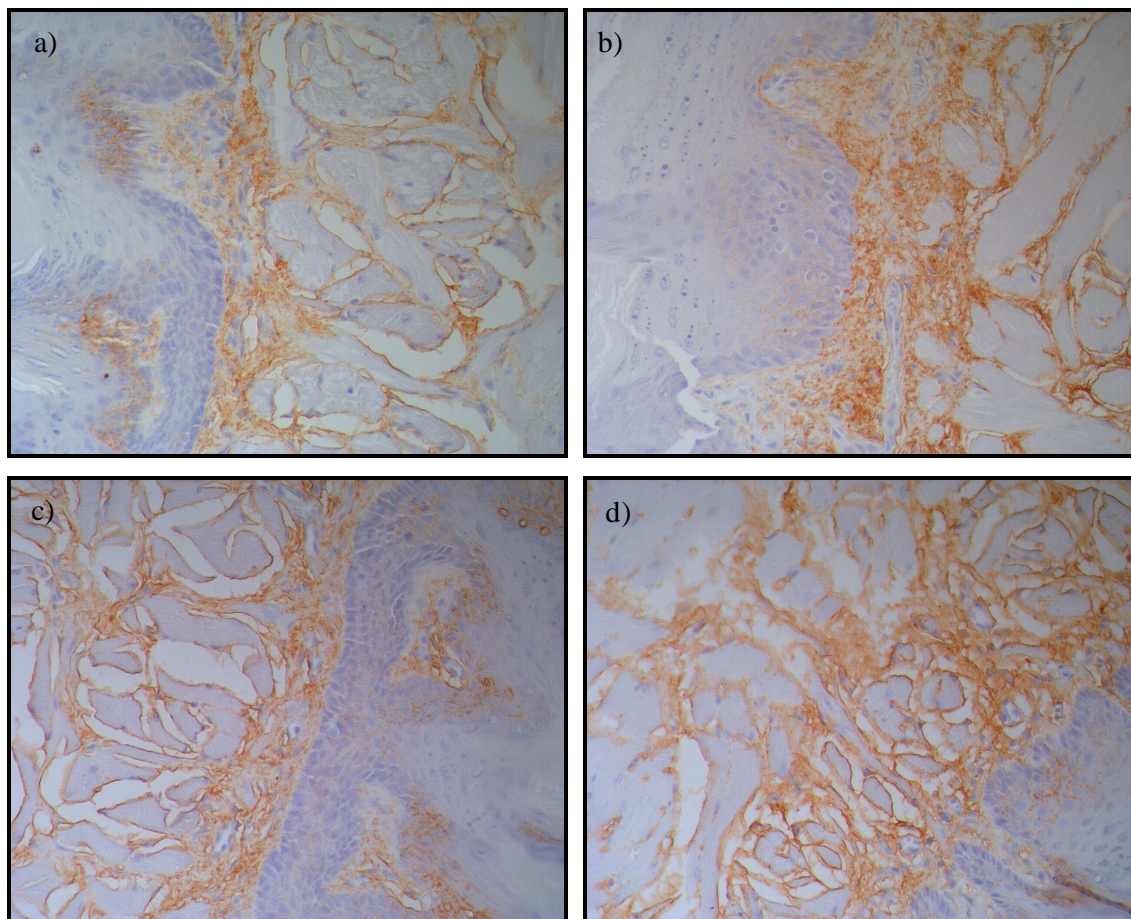


Figura 4 - Fotomicrografias do reparo tecidual por grupos: a) Grupo 1; b) Grupo 2; c) Grupo 3; d) Grupo 4 (coloração por imunohistoquímica anti-TGF- β , aumento 400x) (Fonte: EBMSp, 2010).

2 Análise morfométrica

2.1 Colágeno

A tabela 01 apresenta as médias do colágeno por grupos obtidas pela análise morfométrica. No apêndice A pode-se verificar os valores para cada um dos animais, por área.

Ao se comparar os grupos da pesquisa em relação à expressão do colágeno pela coloração de picosírius através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos 3 e 4, o que foi confirmado pelo teste Dunn (significância de 5%) e pelo teste Student-Newman-Keuls (significância de 1%) com os valores de p de $p=0,0406$ e $p=0,0064$, respectivamente (gráficos 01 e 02).

Tabela 01- Média, desvio-padrão e mediana da expressão de colágeno pela coloração de picosírius de cada grupo após análise histomorfométrica (Fonte: EBMSP, 2010).

	Média	Mediana	Percentual
Grupo 01	1493,41 ± 3320,42	8,87	11,39 ± 3,17
Grupo 02	2252,28 ± 5020,67	6,68	11,15 ± 1,79
Grupo 03	6,57 ± 0,75	6,94	9,93 ± 4,59
Grupo 04	14,55 ± 3,64	14,09	21,0 ± 4,71

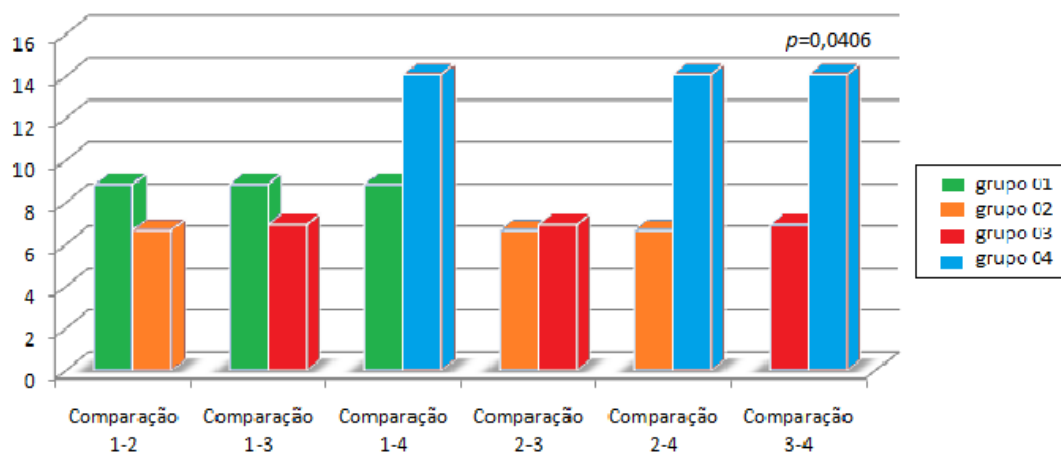


Figura 05- Comparação da expressão de colágeno entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (Dunn) - significância 5% (Fonte: EBMSP, 2010).

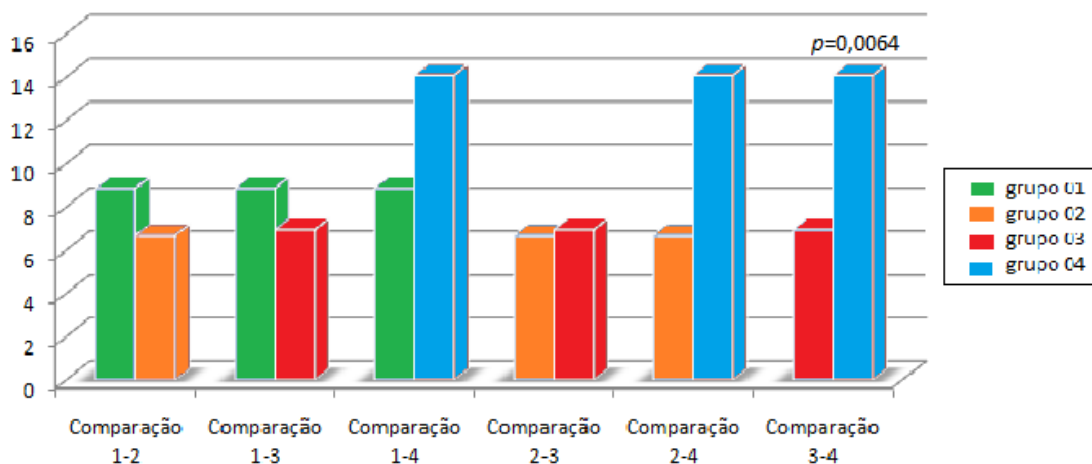


Figura 06- Comparação da expressão de colágeno entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (Student) - significância 1% (Fonte: EBMSP, 2010).

2.2 Expressão de TGF- β

A tabela 02 apresenta as médias da expressão de TGF- β por grupos obtidas pela análise morfométrica. As médias e os valores para cada um dos animais, por área estão contidas no Apêndice B.

Ao se aplicar o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para a expressão do TGF- β , não foram observadas diferenças significantes entes os grupos ($p= 0,8806$) (gráfico 03).

Tabela 02- Média, desvio-padrão e mediana da expressão do anticorpo anti-TGF- β de cada grupo após análise histomorfométrica (Fonte: EBMSp, 2010).

	Média	Mediana	Percentual
Grupo 01	580,61 \pm 883,75	3,32	5,28 \pm 2,66
Grupo 02	582,16 \pm 793,84	3,38	5,93 \pm 2,88
Grupo 03	417,56 \pm 927,71	2,1	8,04 \pm 4,21
Grupo 04	279130,53 \pm 623561,1	2,79	9,44 \pm 5,84

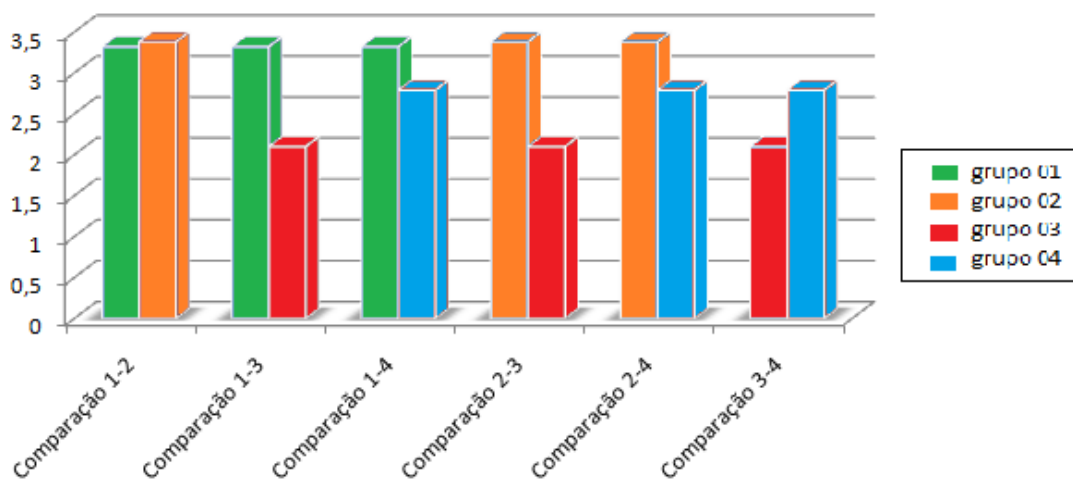


Figura 07- Comparação da expressão do anticorpo anti-TGF- β entre os grupos - teste de Kruskal-Wallis (significância 5%) (Fonte: EBMSp, 2010).

3 Correlação entre colágeno e a expressão de TGF- β

A correlação entre a produção de colágeno e a expressão da citocina TGF- β foi avaliada entre os grupos semelhantes. Para tal, utilizou-se o teste de correlação de Spearman. Para todas as análises, os resultados não foram diferentes estatisticamente (figuras 08, 09, 10 e 11). Os valores de p foram maiores que 0,05.

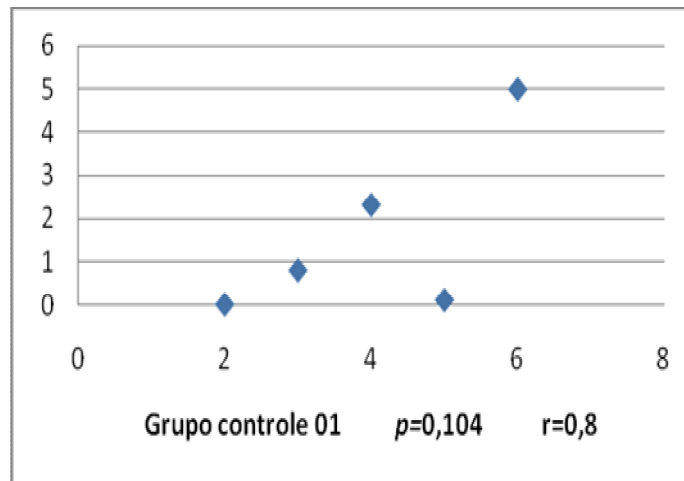


Figura 08- Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 01 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).

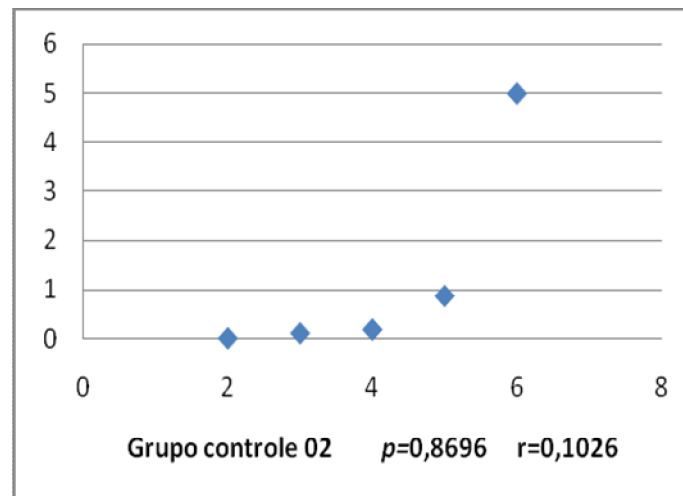


Figura 09- Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 02 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).

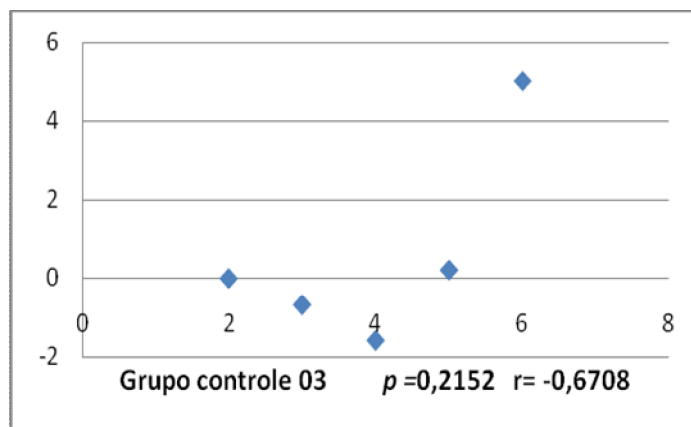


Figura 10- Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 03 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).

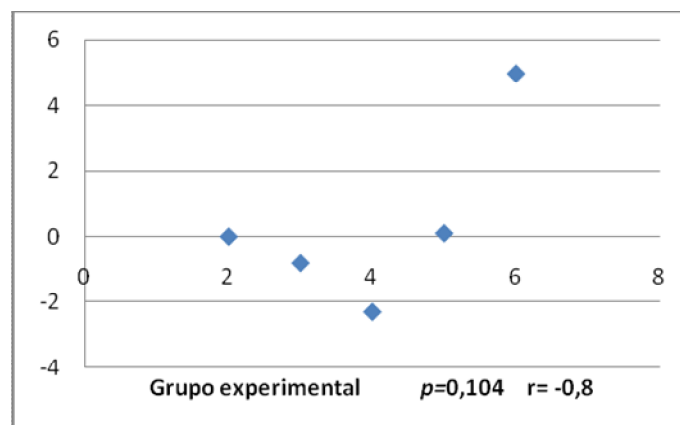


Figura 11- Correlação entre colágeno e expressão de TGF- β no grupo 04 - teste de Spearman (Fonte: EBMSP, 2010).

DISCUSSÃO

A linha de pesquisa em que esse trabalho se insere visa elucidar o reparo tecidual em mucosa oral submetida à radioterapia, a fim de obter informações dos efeitos dessa terapia em curto prazo em mucosa oral, com o intuito de posteriormente aplicar tais conhecimentos na melhora da sobrevida dos pacientes submetidos à radiação ionizante. Vale ressaltar que sua metodologia já é consolidada cientificamente, tendo sido utilizada para a tese de doutorado de Martins¹⁷ e dissertação de mestrado de Mariano¹⁸.

A utilização do dorso da língua de rato no presente trabalho é justificada por Dörr e Weber-Frishi¹⁹ que descreveram a mucosa da língua como um tecido apropriado para o estudo das alterações teciduais vinculadas à radioterapia. O dorso foi escolhido por ser uma região de

mais fácil acesso, consequentemente manipulação e visualização das injúrias causadas, além do fato de ser um local sujeito a traumatismos locais, principalmente durante a alimentação, semelhante aos pacientes em tratamento radioterápico ¹⁷.

A divisão dos grupos trabalhados seguiu o padrão estabelecido por Martins ¹⁷ e Mariano ¹⁸, onde o grupo 01 foi considerado o controle negativo, por não ter submetido os animais a nenhuma injúria, os grupos 02 e 03 foram considerados os controles positivos da pesquisa, com o objetivo de avaliar as alterações teciduais no reparo causadas pelas injúrias (úlceras e radioterapia) isoladamente, e o grupo 04 foi considerado grupo experimental, pela imposição dos animais às injúrias de úlcera e radioterapia somadas, com o intuito de observar a associação das lesões no reparo tecidual

A realização da úlcera ocorreu no 19º dia de experimento, quando a dosagem de 3000 cGy foi atingida, tendo como objetivo simular as lesões de mucosite oral, que é complicação comum em pacientes submetidos à radioterapia. O uso dessa dosagem de radiação se justifica pelos estudos de August *et al.* ²⁰ que observaram a mucosite oral em doses acima de 2000cGy em câncer de cabeça e pescoço.

A mucosite oral é uma das mais significantes alterações tóxicas associadas à terapia anti-câncer ^{6,21}. Os primeiros sinais clínicos de mucosite oral podem ocorrer a partir de 1000 cGy de dose cumulativa e a úlcera tem seu aparecimento a partir de 3000 cGy, resultando em grande desconforto ao paciente. Estima-se que quase todos os pacientes tratados por radiação ionizante para tumores malignos de cabeça e pescoço desenvolvem esta lesão ^{6,16}. Acredita-se que a patogenia da mucosite é devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias no início da radioterapia ²². No entanto, Sonis ⁶ relatou ser incorreto caracterizar a mucosite como uma desordem inflamatória, pois estudos histológicos comprovam que o infiltrado leucocitário está associado a estágios tardios, como a ulceração. A mucosite ocorre devido à ação da terapia anti-neoplásica que se liga inespecificamente a células da camada basal epitelial, causando a perda da habilidade de renovação. Os fibroblastos sofrem ação direta da radiação ionizante, precedidas da ação epitelial, o que estimula a produção de proteases, culminando em uma ruptura da membrana basal e promovendo a disseminação de outros sinais destrutivos. Contudo, durante o processo de reparo tecidual, os componentes da MEC geram sinais que

causam a migração, diferenciação e proliferação celular para que se tenha um tecido reparado⁶.

O colágeno produzido no tecido normal tende a ser mais uniforme na sua distribuição ao longo da lâmina própria da mucosa com as fibras dispostas paralelamente e percorrendo um caminho sinuoso¹⁴. Morfologicamente, no grupo 01 (controle), as fibras colágenas apresentaram-se compatíveis com a normalidade, enquanto que no grupo 02 (úlceras), as fibras estavam organizadas como na fase de remodelação do reparo tecidual²³. O grupo 3 (radioterapia) apresentou fibras dispostas de maneira semelhante ao grupo 02, sendo que aparentava, de maneira geral, uma cicatrização atrasada. Já no grupo 04 (experimental) pôde-se observar características distintas de todos os grupos no aspecto qualitativo, com fibras colágenas dispostas desorganizadamente e espessura delgada, evidenciando que a associação de injúrias parece culminar em um tecido reparado, porém alterado em relação ao padrão de normalidade, assemelhando-se a um tecido conjuntivo denso não modelado, com feixes de fibras sem orientação definida¹⁴.

Analisando os resultados quantitativos do presente estudo pôde-se observar que as injúrias de ulceração e radiação ionizante, quando isoladas, atuam da mesma forma no reparo tecidual, pois não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 02 e 03. Contudo, a associação das injúrias parece apresentar uma resposta distinta, em especial quando comparado com a injúria radioterapia exclusiva. No entanto, a diferença observada não pode ser atribuída à ulceração, pois a comparação entre os grupos 01 e 02 não apresentou diferença estatisticamente significativa. Não há trabalhos na literatura estudada que tenha analisado esta associação entre ulceração e radioterapia para ser utilizada como referência comparativa. Contudo, Deham e Hauer-Jensen²⁴ relataram que a exposição à radiação ionizante em um tecido já injuriado e inflamado contribui para a ocorrência de uma maior inflamação e fibrose local.

Em uma avaliação individual das comparações estatísticas realizadas com o tecido normal (sem injúria) e os diferentes grupos, não houve diferença na produção de colágeno no reparo tecidual, podendo-se atribuir este fato ao tempo estipulado para este experimento. Isso porque o tempo ideal de avaliação das fibras no processo de reparo é de 06 meses à um ano¹⁴ em humanos, tempo necessário para que ocorra um remodelamento e organização das fibras no

tecido neoformado. Martins ¹⁷ observou em seu estudo que o colágeno depositado possuiu maior volume entre os grupos estudados pela autora. Todavia, como também não esperou tempo de remodelação ideal, sugere que o padrão de deposição pode variar e a quantidade chegar próxima ao padrão de normalidade. Ressalta-se que a autora utilizou o laser como fator estimulador do reparo, o que não foi o objetivo de estudo do trabalho aqui apresentado.

Para Martin *et al.* ⁹ a fibrose tecidual é definida como um tecido onde o sinal de reparo não é cessado. A fibrose tecidual radioinduzida é considerada apenas um efeito tardio, que ocorre depois de 06 meses do final da radiação ^{9,12,14,15,25}. No presente estudo, a avaliação ocorreu depois de 30 dias de radioterapia, o que talvez justifique a não diferença estatística entre os grupos 03 (somente radioterapia) e o grupo 01 (controle), devido à falta de tempo suficiente para a formação de uma fibrose tecidual radioinduzida. Esse tempo também está de acordo com o período de remodelamento ¹⁴. No presente estudo não houve diferença estatística com o nível de significância de 5%, entre os grupos 01 e 03 na expressão do colágeno após 30 dias de irradiação, corroborando com os achados de Mattos *et al.* ¹³ e Affonso-Junior *et al.* ¹². Os autores ^{12,13} avaliaram a produção de colágeno no tecido pulmonar e cardíaco respectivamente, após tempos diferentes de irradiação, observando que no período de 30 dias, semelhante ao presente estudo, não houve diferenças estatisticamente significativas do tecido irradiado com o tecido normal.

Segundo Riecki *et al.* ²⁶, a radiação resulta numa significativa mudança no metabolismo do colágeno com o aumento da deposição de fibras e menor degradação, o que foi observado morfológicamente no presente estudo para os grupos 03 e 04. Estes apresentaram feixes de colágeno desorganizados com relativa maturação, havendo aumento da síntese e acúmulo das fibras colágenas no tecido irradiado. Embora Riecki *et al.* ²⁶ tenham observado diferença estatística para os grupos estudados, no presente estudo não houve diferença significativa ao comparar-se os grupos 01 (controle) e 03 (somente radioterapia). Contudo, Riecki *et al.* ²⁶ estudaram o tecido cutâneo no câncer de mama com tempo de exposição à radiação maior (média 26 meses), o que poderia justificar a maior formação do colágeno nos tecidos analisados. Novamente, o tempo de 48 horas após o fim a radioterapia ainda não parece ser suficiente para apresentar fibrose significativa. Isto torna ainda mais relevante os resultados aqui apresentados, uma vez que este período de latência entre o término da radioterapia e a visualização da fibrose é um período pouco estudado entre os autores. Observa-se produção de

colágeno aumentada, porém com aspecto ainda imaturo e desorganizado em relação ao tecido normal.

A expressão do TGF- β não foi diferente, estisticamente, para todos os grupos avaliados. Isso parece significar que o TGF- β não é a citocina responsável isoladamente pelo aumento da quantidade das fibras colágenas. Isso é evidenciado, em especial, pelo fato de não ter havido diferenças na comparação dos grupos 03 e 04. Todavia, pode ocorrer essa maior produção devido a estímulos de outros fatores de crescimento como o FGF ou PDGF^{2,5,7,9}.

O TGF- β é uma citocina fortemente expressa na forma latente no coração, no parênquima pulmonar e na glândula mamária em condições de normalidade. Quando o tecido é exposto a uma injúria têm-se uma mudança na forma de expressão do TGF- β , que passa a ser observado na forma ativa¹¹. Ou seja, espera-se que haja expressão positiva do TGF- β nos tecidos na forma latente e/ou na forma ativa, o que ocorreu em todos os grupos desta pesquisa. A expressão do fator ocorre na extensão da membrana basal do epitélio e em todo tecido conjuntivo¹¹⁻¹³, sendo verificada marcação do anticorpo na periferia celular, delimitando sua forma.

A presente pesquisa não objetivou avaliar a expressão ativa ou latente da citocina, não conseguiu estabelecer se a expressão do TGF- β em todos os grupos está na sua forma biologicamente ativa. Porém, segundo Barcellos-Hoff *et al.*¹¹, a irradiação ionizante causa uma mudança no perfil de ativação da citocina nas glândulas mamárias, sugerindo assim que o fator expresso pelos grupos 03 e 04 (irradiados) pode estar ativo. Contudo, para afirmar tal hipótese, novas pesquisas seriam necessárias.

Embora tenha sido relatado na introdução desse artigo a presença de três isoformas do TGF- β , pode-se justificar a não avaliação específica de cada uma delas no processo de reparo pelo estudo realizado por Crowe *et al.*⁵, que observaram que todas as isoformas atuam no reparo tecidual de forma compensatória na ausência de alguma delas. Os autores relataram que, mesmo que a falta do TGF- β 1 cause o atraso da resposta inflamatória, o TGF- β 2 atua compensando-a nos primeiros dias, sendo seguido posteriormente pela compensação do TGF- β 3 para que ocorra o completo reparo tissular. Contudo, espera-se que o TGF- β 1 seja a forma mais identificada no tecido em reparo tecidual. Shah *et al.*⁸ citam que a ausência do TGF- β 1

e TGF- β 2 causa a redução da cicatrização, por diminuir a quantidade de monócitos, macrófagos, neovascularização, fibronectina, colágeno tipo I e III nos estágios iniciais do reparo tecidual, sugerindo que ambas isoformas do fator contribuem para o reparo.

Contradizendo Barnard *et al.*¹ e Martin *et al.*⁹ ao citarem que o TGF- β é uma citocina multifuncional, Cromack *et al.*²⁷ relataram que o TGF- β é um regulador bifuncional, atuando no crescimento e na diferenciação celulares, sendo que o principal tipo celular afetado na irradiação de superfície o fibroblasto. Isso culmina no comprometimento da síntese do colágeno na fase de reparo tecidual com maturação pobre das fibras colágenas. Isto confirma os dados encontrados neste estudo, onde os animais irradiados (grupo 03 e 04) exibiram a formação das fibras colágenas alteradas, apresentando-se de forma mais delgadas e com uma deposição irregular subjacente ao tecido epitelial.

No reparo tecidual, espera-se que haja imunomarcagem positiva do TGF- β no citoplasma dos fibroblastos e próximo à membrana basal epitelial desde os primeiros dias de reparo, decrescendo essa área de expressão com o passar dos dias²⁸, achado semelhante ao do presente estudo, onde se observou a imunomarcagem do TGF- β nos locais supracitados.

Para Schrementi *et al.*²⁹ o TGF- β influencia a resposta inflamatória, deposição de MEC e a reepitelização, justificando a presença dessa citocina nos grupos 02, 03 e 04 no estudo apresentado, pois o reparo tecidual ocorre de forma complexa em três fases: a inflamação, proliferação e remodelação. Como os tecidos foram submetidos à injúrias tem-se a necessidade do reparo tecidual, conseqüentemente da resposta inflamatória.

O TGF- β pode atuar no reparo tecidual regulando a expressão de fatores angiogênicos como o VEGF e as colagenases com as metaloproteinases (MMPs) através dos queratinócito, fato observado neste estudo onde as células epiteliais expressaram essa citocina^{2,30,31}. Todavia, essa expressão não foi avaliada quantitativamente, por ser objetivo do estudo apenas a avaliação do colágeno e tecido conjuntivo. Sugere-se novos estudos com esta finalidade.

No estudo realizado por Riedel *et al.*⁷, o tratamento com TGF- β em queratinócitos humanos *in vitro* causou significativo aumento da expressão do VEGF, melhorando a atividade angiogênica, culminando em reparo tecidual melhorado. Segundo o trabalho realizado por

Mariano ¹⁸ observou-se que a injúria traumática realizada na mucosa oral causou maior expressão do VEGF quando comparado com os demais grupos do seu estudo, grupo este que ao final de experimento exibiu o completo reparo tecidual. A atividade angiogênica das células endoteliais podem promover e regular outros eventos biológicos como a inflamação, proliferação dos fibroblastos, síntese de MEC e epitelização ⁷. Segundo Wang *et al.* ³⁰, a expressão de níveis altos do TGF- β especialmente na membrana basal pode ser essencial para a secreção da citocina na derme.

Segundo Mariano ¹⁸, que relatou que a radioterapia gera alterações vasculares no tecido, as injúrias nas células endoteliais provocadas pela radiação ionizante podem estimular a síntese de colágeno pela ativação de fatores de crescimento como o FGF, TNF- α , PDGF e TGF- β , além de estimular a inflamação local e alteração do fibroblasto normal com o intuito de promover o reparo tecidual ao dano, culminando em uma maior produção da MEC ²⁴.

Rodeman e Bamberg ¹⁰, em sua revisão bibliográfica observaram que o TGF- β é a citocina mais responsável pela fibrose reacional em tecidos normais. No entanto, a fibrose estudada pelo autor foi no parênquima pulmonar. Segundo Sassi *et al.* ¹⁵ a fibrose tecidual causa um aumento na quantidade de colágeno tipo I e acredita-se que este aumento culmine em alterações na estrutura e função da pele. Além do fato de que nos tecidos irradiados há uma contínua produção de TGF- β , causando um processo fibrótico radio-induzido. Este estudo é um dos primeiros a relacionar o TGF- β na injúria por irradiação em mucosa oral, que por si só, parece ser relevante por sua presença nos resultados.

Schrementi *et al.* ²⁹ observaram que o TGF- β é um dos fatores que inicialmente atuam no reparo tecidual, que ocorre de forma mais acelerada na mucosa oral em comparação com o tecido cutâneo, com aproximadamente 100% de reepitelização nas primeiras 24 horas pós-trauma. Este fato foi discutido nesta pesquisa, onde houve a completa cicatrização de todas as úlceras correspondente aos animais dos grupos 02 e 04 ao final do experimento.

Segundo Mattos *et al.* ¹³, quando estudaram a expressão de TGF- β no tecido pulmonar, após 30 dias de irradiação houve uma ausência e/ou fraca imunopositividade desta citocina tanto na forma latente como na forma ativa, tendo seu pico de expressão do período de 14 dias de

irradiação, sendo considerado um tempo de meia vida curto, o que parece justificar a ausência de diferença estatística entre os grupos 01 e 03 na expressão do TGF- β deste estudo.

A avaliação de TGF- β 1 ativa no tecido cardíaco foi semelhante quando comparados os períodos de 1, 14 e 30 dias, só havendo aumento na expressão da citocina após 90 dias de radiação ¹². Resultado semelhante foi encontrado nesta pesquisa, ao se comparar após 30 dias de radioterapia, os grupos 01 e 03.

Schultze-Mosgau *et al.* ²⁸ realizaram um estudo onde comparavam um grupo controle e um grupo que recebia neutralizador de TGF- β . No grupo controle, ou seja, o que expressa livremente o TGF- β , foi observado a presença da citocina após o quinto dia do experimento no citoplasma dos fibroblastos e na camada basal do epitélio. Este fato corrobora com o achado apresentado, onde o TGF- β expressou-se na camada basal epitelial em todos os grupos. Os autores citados, também observaram que, morfológicamente, o colágeno expresso pelo grupo sem o neutralizador, possuía uma estrutura mais complexa e em maior quantidade comparados com o grupo teste. Apesar de não ter sido avaliado a qualidade do colágeno apresentado, percebem-se a presença de fibras delgadas e desorganizadas no grupo 04, onde se aplicam as injúrias.

O presente estudo possibilitou a realização da correlação entre o colágeno e o TGF- β em mucosa oral submetida à radioterapia em conjunto com a uma injúria local (úlceras), verificando-se a não correlação entre as variáveis de estudo. Contudo, os resultados mostraram que mesmo que o tempo de 48 horas após a irradiação não seja o tempo estipulado para que ocorra uma fibrose tecidual, a associação de injúrias causa um aumento na produção do colágeno, sugerindo um processo fibrinogênico.

Devido à diferença estatística encontrada entre os grupos 03 e 04 na produção do colágeno e a não correlação com o TGF- β nos grupos, sugere-se a realização de novas pesquisas com a mesma metodologia, porém utilizando outros fatores de estimulação do colágeno, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Outra sugestão seria a ampliação do período de morte dos animais após à finalização da radioterapia, visando acompanhar a remodelação do colágeno pós-reparo tecidual.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados provenientes deste estudo pode-se concluir que no reparo tecidual :

- As fibras colágenas nos animais submetidos à radioterapia se apresentaram mais delgadas e desorganizadas quando comparados aos demais grupos controle, morfológicamente.
- A expressão imunohistoquímica do anticorpo anti-TGF- β foi mais intensa para o grupo submetido à radioterapia e ulceração, sugerindo que a associação de injúrias provoca alterações do sistema fibroblasto/fibrócito, morfológicamente.
- O tempo de avaliação não foi suficiente para observar uma fibrose tecidual, contudo que a associação de injúria apresentou maior formação de fibras colágenas.
- Foi ausente a correlação entre o colágeno e o TGF- β , sugerindo que a citocina isoladamente não é capaz de alterar a produção do colágeno nos parâmetros avaliados.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate quantitatively the expression of TGF- β in oral mucosa treated with radiotherapy correlate with collagen production. We used 20 paraffin blocks containing tissue of the tongue of the rats were divided into four groups, three control and one experimental, with five animals each. Animals in groups 3 and 4 received 6000 cGy of radiotherapy and groups 2 and 4 had the tongue with ulcers on the 19th day of the experiment. At the end of the experiment, the tongue of the animals was surgically removed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin to make the slides. The expression of TGF- β was observed by immunohistochemical staining for detection of TGF- β , and collagen fibers with picrosirius analyzed by staining with morphometric quantification. The group that underwent radiotherapy and ulceration possessed greater production of collagen and TGF- β (21% and 9.44% respectively) compared with the other groups. However, significant differences were observed only between groups 3 and 4, when applied statistical test of Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), Dunn ($p < 0.0406$) and Student-Newman-Keuls ($p < 0, 0064$), with a significance level

of 5% and 1% respectively. There were no statistical differences in expression of TGF- β . There was no positive correlation between TGF- β and collagen ($p > 0.05$) in any of the analyzes. It was concluded that the presence of collagen and expression of TGF- β is increased in tissue repair of ulcers undergoing radiotherapy compared to radiotherapy alone or ulcer, and there was no correlation between TGF- β and collagen.

Keywords: Radiotherapy, TGF- β , collagen, wound repair.

REFERÊNCIAS

- 1 Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor- beta. *Biochem. Biophys. Acta.* 1990, 1032: 79-87.
- 2 Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor- beta: recent progress and new challengens. *J. Cell. Biol.* 1992, 119: 1017-1021.
- 3 Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG *et al.* Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- β 1 in the epidermis. *Am J Pathol.* 2001, 159(6): 2147-2157.
- 4 Ruifrok ACC, McBride Wh. Growth factors: biological and clinical aspects. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 1999, 43(4): 877-881.
- 5 Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF- β 1 knockout mice. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2000, 115(1): 03-11.
- 6 Sonis ST. The Pathobiology of mucosite. *Nature Reviews.* 2004, 4: 277-24.
- 7 Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G, Sauerbier M. TGF- β antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes *in vitro*. *Arc Med Res.* 2007, 38: 45-51.
- 8 Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralization of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wound reduces scarring. *Journal of Cell Science.* 1995, 108: 985-1002.
- 9 Martin M, Lefaix JL, Delanian S. TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and specific therapeutic target? *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2000, 47(2): 277-290.
- 10 Rodemann HP, Bomberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol.* 1995, 35(2): 83-90.
- 11 Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang MLS, Weatherbee JA. Transforming growth factor - β activation in irradiated murine mammary gland. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 892-899.

- 12 Affonso-Júnior RJ, Oshima CTF, Kimura ET, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA, Segreto HRC. Expressão da proteína TGF- β 1 em coração irradiado *in vivo*. Radiol. Bras. 2004, 37(2): 107-113.
- 13 Mattos MD, Kimura ED, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA, Segreto HRC. Ativação da proteína TGF- β 1 latente em pulmão irradiado *in vivo*. Rev. Assoc. Med. Bras. 2002, 48(4): 329-334.
- 14 Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2008.
- 15 Sassi ML, Jukkola A, Riekkö R, Höyhty M, Risteli L, Oikarinen A *et al*. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiated skin of breast cancer patients. Radiotherapy and Oncology. 2001. 58: 317-323.
- 16 Scully C, Sonis S, Diz PD. Mucosal diseases series. Oral Diseases. 2006, 12: 229-241.
- 17 Martins GB. Efeito do laser não-ablativo no reparo de úlceras produzidas em língua de ratos submetidos à radioterapia na região da cabeça [tese]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do rio Grande do Sul; 2004.
- 18 Mariano TA. Avaliação das alterações do reparo tecidual em mucosa bucal submetida à radioterapia [dissertação]. Salvador: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; 2008.
- 19 Dörr W, Weber-Frisch M. Repopulation response of mouse oral mucosa during unconventional radiotherapy protocols. Radiother Oncol. 1995, 37(3):230-236.
- 20 August M, Wang J, Plante D, Wang CC. Complications associated with therapeutic neck radiation. J Oral Maxillofac Surg. 1996, 54: 1409-1415.
- 21 Sonis ST. The biologic roole for nuclear factor-kappaB in disease and its potent involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2002, 13(5): 380-389.
- 22 Bonan PRF, Lopes MA, Alves FdeA, Almeida OPde. Aspectos clínicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. Rev Bras Cancerol. 2005, 51(3): 235-242.
- 23 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 24 Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury – a complex wound. Radiotherapy and Oncology. 20002, 63: 129-145.
- 25 Hom DB, Adam GL, Monyai D. Irradiated soft tissue and its management. Otolaryngol. Clin. North Am. 1995, 28(5): 1003-1019.

26 Riekkki R, Jukkola A, Sassi ML, Höyhty M, Allioinen M, Risteli J *et al.* Modulation of skin collagen metabolism by irradiation: collagen synthesis is increased in irradiated human skin. *Britics Journal of Dermatology*. 2000, 142: 874-880.

27 Cromack TD, Porras-Reyes B, Purdy AJ, Pierce GF, Mustoe TA. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor β 1: Identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits. *Surgery*. 1993, 113(1): 36- 42.

28 Schoultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rödel F, Amann K, Rodespiel-Tröger M, Kopp J *et al.* Anti-TGF- β ₁ antibody for modulation of expression of endogenous transforming growth factor beta 1 to prevent fibrosis after plastic surgery in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004, 42: 112-119.

29 Schrementi ME, Ferreira AM, Zender C, DiPietro LA. Site-specific prodtion of TGF- β in oral mucosal and cutaneous wounds. *Wound repair regen*. 2008, 16: 80-86

30 Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, O`Malley BW, Roop D. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor β 1 in the epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999, 96: 8483-8488.

31 Philipp K, Riedel F, Sauerbier M, Hörmann K, Germann G. Targening TGF- β in human keratinocytes and its potential role in wound healing. *Int J Mol Med*. 2004,14: 589-593.

ANEXOS

- ANEXO 01 – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética do presente experimento
- ANEXO 02 – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética da dissertação de Martins (2004)
- ANEXO 03 – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética da dissertação de Mariano (2008)
- ANEXO 04 – Documento de qualificação do presente experimento

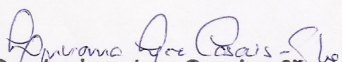
ANEXO 01



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS NO ENSINO E
PESQUISA (EBMSP)

Salvador, 05 de outubro de 2009

O projeto, do curso de Mestrado Profissional em Odontologia, protocolado nesta comissão sob nº 004/2009, intitulado "**Expressão do TGF- β em mucosa oral submetida à radioterapia**", sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Gabriela Botelho Martins foi **APROVADO** pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).


Dra. Luciana Lyra Casais e Silva

Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais Escola Bahiana de Medicina e Saúde
Pública
(CEUA-EBMSP)

ANEXO 02



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade de Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 27 de agosto de 2003.

O Projeto de: Tese

Protocolado sob n°: 0053/03

Intitulado: *Efeitos do laser não-ablativo no tratamento da radiomucosite oral induzida em ratos: avaliação clínica e histológica*

do(a) aluno(a): *Gabriela Botelho Martins*

Programa do: *Estomatologia Clínica*

do curso de:

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Maria Antonia Z. de Figueiredo*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 14 de agosto de 2003.

Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO 03**FUNDAÇÃO BAHIANA PARA DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Salvador, 27de Agosto de 2007

O protocolo de ensino protocolado nesta comissão sob o nº **012/2007**, intitulado como **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES NO REPARO DE ULCERAS PRODUZIDAS EM LÍNGUAS DE RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA NA REGIÃO DA CABEÇA**, foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Abrahão', is positioned above a horizontal line.

Abrahão Fontes Baptista
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

ANEXO 04



Coordenação de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão
Programa de Pós-graduação em Odontologia / PPGO

**ATA DA SESSÃO DE EXAME DE QUALIFICAÇÃO
DO MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

Título: Expressão de TGF- β em mucosa oral submetida à radioterapia

Candidata: Lara Correia Pereira

Orientadora: Prof.ª Dr.ª. Gabriela Botelho Martins

Comissão Examinadora: Prof.ª. Dr.ª. Michelle Miranda Lopes Falcão
Prof.ª. Dr.ª. Emilena Maria Castor Xisto Lima

A Comissão Examinadora, indicada pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, conforme o que estabelecem as normas em vigor, deu início aos trabalhos de Exame de Qualificação, às 14:00 horas, do dia 29 de janeiro de 2010. A candidata realizou apresentação oral de seu trabalho, com duração de 30 minutos. As arguições e as defesas foram encerradas às 14:10 horas. A Comissão Examinadora reuniu-se e, após avaliação conjunta dos conhecimentos demonstrados e da capacidade de discutir e analisar os resultados obtidos, a aluna foi considerada aprovada. E para constar do processo respectivo, a Comissão Examinadora elaborou a presente ATA, que vai assinada por todos os seus membros.

A Comissão Examinadora é:

() Favorável à defesa da Dissertação na sua forma atual.

(x) Favorável à defesa da Dissertação, após as modificações sugeridas pela Comissão

Modificações:

Salvador, 29 de janeiro de 2010.

Membros da Banca Examinadora

Emilena M.º C. Xisto Lima

Michelle Miranda Lopes Falcão

Orientadora

Gabriela Botelho Martins

Aluna

Lara Correia Pereira

APÊNDICES

APÊNDICE A – Média por área da produção de colágeno por animal e grupo.

APÊNDICE B – Média por área da expressão de TGF- β por animal e grupo.

APÊNDICE A – Média por área da produção de colágeno por animal e grupo.

	Grupo	Média da área 01	Média da área 02	Média da área 03	Média/ animal
Animal 01	Controle 01	8878,663086	13417,29199	3,491956	7433,149011
Animal 02	Controle 01	7,69395351	11,13046551	3,60227728	7,475565433
Animal 03	Controle 01	15,67904186	9,39772987	6,96094799	10,67923991
Animal 04	Controle 01	4,87376785	9,84079933	5,85166407	6,855410417
Animal 05	Controle 01	10,46699047	8,37036419	7,79541397	8,877589543
Média do grupo					1493,407363
Animal 01	Controle 02	23,03541374	12552,5	21125,05078	11233,53873
Animal 02	Controle 02	4,22283602	8,15751362	14,67979908	9,020049573
Animal 03	Controle 02	4,9801116	8,73279953	2,83378816	5,51556643
Animal 04	Controle 02	3,14059186	6,90326738	9,86753273	6,637130657
Animal 05	Controle 02	6,62199926	7,72452974	5,7051301	6,683886367
Média do grupo					2252,277073
Animal 01	Controle 03	6,17495298	5,51458836	4,828475	5,506005447
Animal 02	Controle 03	5,60092926	5,72372246	6,97722244	6,10062471
Animal 03	Controle 03	6,70523596	7,34552002	6,80911112	6,953289033
Animal 04	Controle 03	5,75881338	5,4668684	9,6175127	6,947731493
Animal 05	Controle 03	8,85888481	5,64156055	7,60460377	7,36834971
Média do grupo					6,575200081
Animal 01	Experimental	17,05886578	12,25543213	9,25057507	12,85495766
Animal 02	Experimental	8,64342499	33,54639435	6,01657295	16,06879743
Animal 03	Experimental	10,82737446	12,18446827	6,99087667	10,00090647
Animal 04	Experimental	14,32458782	21,40837669	23,49691582	19,74329344
Animal 05	Experimental	14,05046177	9,78824329	18,4590667	14,09925725
Média do grupo					14,55344245

APÊNDICE B – Média por área da expressão de TGF- β por animal e grupo.

	Grupo	Média da área 01	Média da área 02	Média da área 03	Média/animal
Animal 01	Controle 01	0,000002	1520,277588	1157,973267	892,7503
Animal 02	Controle 01	1,58517313	1,12332904	0,924317	1,21094
Animal 03	Controle 01	3365,020752	1281,918579	1362,497925	2003,146
Animal 04	Controle 01	3,85289216	1,55609715	2,43781638	2,615602
Animal 05	Controle 01	3,23801851	3,09700632	3,62847567	3,321167
Média do grupo					502,5734
Animal 01	Controle 02	1,43400955	0,40402468	4321,364746	1441,068
Animal 02	Controle 02	1,34098276	2,78370285	2,35537587	2,16002
Animal 03	Controle 02	4,34540796	5,15687513	0,62893343	3,377072
Animal 04	Controle 02	4385,37207	1,03064929	0,73831284	1462,38
Animal 05	Controle 02	2,24279404	1,97137365	1,20973921	1,807969
Média do grupo					582,1586
Animal 01	Controle 03	5,50432491	5,9877533	7,20131779	6,231132
Animal 02	Controle 03	2,3014276	2,43071171	1,56000841	2,097383
Animal 03	Controle 03	2016,176025	4212,78125	2,35309815	2077,103
Animal 04	Controle 03	2,43689799	0,78250968	2,04939246	1,756267
Animal 05	Controle 03	0,78890765	0,60633874	0,50366539	0,632971
Média do grupo					417,5642
Animal 01	Experimental	792387,8125	1660250	1731133	1394590
Animal 02	Experimental	0,56592375	0,70498198	0,62893343	0,63328
Animal 03	Experimental	2,43682909	5,1827426	3166,089111	1057,903
Animal 04	Experimental	0,57082427	0,97400862	1,66372154	1,069518
Animal 05	Experimental	3,31575418	2,44637012	2,60096669	2,787697
Média do grupo					279130,5