

EFEITO PROTETOR DO PICNOGENOL EM GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS QUE SOFRERAM RADIAÇÃO IONIZANTE NA REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO

Protective effect of pycnogenol in parotid glands of rats that suffered ionizing radiation in the head and neck

Bruno Augusto Benevenuto de Andrade¹

Lucas Alves Bonisson²

Solange Maria de Almeida³

Frab Noberto Bóscolo³

Amaro Ilídio Vespasiano Silva²

Flávio Ricardo Manzi²

Helenice de Andrade Marigo²

1- Universidade Federal do Rio de Janeiro

2- Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

3- Universidade Estadual de Campinas

augustodelima33@hotmail.com

RESUMO

A radioterapia de cabeça e pescoço aplicada para o tratamento do câncer promove diversos efeitos colaterais dentre eles alterações estruturais e funcionais da glândula parótida, o qual resulta em um impacto negativo na qualidade de vida do paciente. O presente estudo se baseou na utilização de uma poderosa substância antioxidante, o picnogenol, em ratos antes do evento da radiação, com o objetivo de verificar morfológicamente se essa substância promoveria efeito protetor nas glândulas parótidas de ratos irradiados. Cortes histológicos mostraram melhor preservação da estrutura das glândulas parótidas de ratos tratados com picnogenol comparados com os ratos controles irradiados onde foi realizado somente administração de água sem picnogenol. O tratamento com o picnogenol preservou a forma e o contorno dos ácinos e suas células. Concluiu-se que o picnogenol pode ser uma substância que auxilia na proteção contra os efeitos secundários da radiação ionizante em glândula parótida.

Descritores: Glândula parótida. Radiação ionizante. Picnogenol.

ABSTRACT

The head and neck radiotherapy applied to cancer treatment promotes different collateral effects including structural and functional alterations of the parotid gland, which results in a negative impact on quality of life of patients. This study was based on the use of a powerful antioxidant substance, pycnogenol in rats before the event of radiation, with the aim to verify whether this substance morphologically promotes protective effect on irradiated parotid glands of rats. Histological sections showed better preservation of the structure of the parotid glands of rats treated with pycnogenol compared with the control rats where it was held only water administration without pycnogenol. Treatment with pycnogenol preserved the shape and contour of the acini and their cells. It was concluded that pycnogenol may be a substance that helps to protect against side effects of ionizing radiation on the parotid gland..

Key words: Parotid gland. Ionizing radiation. Pycnogenol.

INTRODUÇÃO

A radioterapia é a modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes com o objetivo de destruir as células neoplásicas visando uma redução

ou desaparecimento da neoplasia maligna¹⁻⁵. É considerado o tratamento não cirúrgico mais importante para o câncer, sendo que 70% desses pacientes

recebem a radioterapia como modalidade de tratamento^{3,4}.

Essa modalidade de tratamento quando aplicada na região de cabeça e pescoço e dependendo da dose da radiação, área irradiada, tempo de tratamento, dose de distribuição e do uso associado de outras terapias, provoca alterações reversíveis e irreversíveis nos tecidos neoplásicos, mas também afeta de forma inespecífica o tecido sadio^{3,4}. Esse é o caso das glândulas salivares maiores, dentre elas a parótida, que geralmente encontra-se presente no campo irradiado⁶. A exposição das glândulas salivares maiores à radiação resulta em severas alterações em suas estruturas e funções^{5,7-9}. As consequências da radioterapia de cabeça e pescoço são várias incluindo xerostomia, mucosite, disfagia, alterações no paladar, aumento do risco à cárie, dificuldades na fala e na respiração, resultando em um impacto negativo na qualidade de vida do paciente^{1,2,5,6,9-14}.

Segundo Eisbruch et al.¹¹ e Guebur et al.⁴, a xerostomia é considerada o efeito colateral mais comum durante a radioterapia de cabeça e pescoço, ao passo que a presença de saliva é um fator essencial para a saúde da cavidade bucal.

Apesar das glândulas salivares serem consideradas radioresistentes devido à alta diferenciação celular, quando são expostas à radiação ionizante, severas alterações em sua morfologia são observadas^{5,8}. É comprovado através dos estudos de Ramos et al.⁵ que a glândula parótida é a mais sensível e afetada durante a radioterapia em comparação com as glândulas submandibular e sublingual que são mais resistentes. Isso se deve à maior radiosensibilidade das células serosas em comparação com as células mucosas, pois células serosas secretam grânulos que são ricos em metais como zinco, ferro e manganês que se dirigem para o citoplasma, causando autólise e morte celular.

Os efeitos da radiação ionizante são mediados pela formação de radicais livres que são altamente reativos, removendo átomos de hidrogênio de

ácidos fortes causando peroxidação lipídica e consequente morte celular^{2,5,8}.

Para o tratamento da xerostomia várias modalidades terapêuticas têm sido adotadas como saliva artificial, cremes bucais e estimulantes gustatórios. Porém esses artifícios oferecem um alívio curto para os sintomas^{2,6,10,14}.

Atualmente, um grande número de agentes antioxidantes e drogas radioprotetoras têm sido estudados e usados para minimizar os efeitos colaterais causados pela radioterapia de cabeça e pescoço. Entre as substâncias utilizadas podemos citar o picnogenol, a vitamina E e a pilocarpina^{2,5,6,8}.

O picnogenol, alvo de nosso estudo, é uma substância exclusivamente extraída da casca do pinheiro marítimo francês (*Pinus pinaster*), com efeito anti-inflamatório, antioxidante e anticarcinogênico confirmado em estudos clínicos e laboratoriais^{8,15-19}.

Atualmente o picnogenol é utilizado ao redor do mundo como um suplemento nutricional e medicamento fitoterápico para várias doenças desde inflamações crônicas a disfunções circulatórias¹⁵. Prevenção de eritemas após exposição à radiação ultravioleta e redução dos níveis de leucotrienos circulantes em pacientes com asma também são ações promovidas pelo picnogenol, além de melhorar a integridade vascular e a função endotelial¹⁸.

Segundo estudos de Ramos et al.⁸, o picnogenol tem demonstrado ser um potente antioxidante tanto em pesquisas laboratoriais quanto em ensaios clínicos, pois promove um eficiente efeito radioprotetor comprovado em estudo utilizando mucosa intestinal de ratos.

Com relação ao efeito protetor do picnogenol contra alterações morfológicas e funcionais promovidas pela radioterapia de cabeça e pescoço em glândulas salivares maiores, poucos estudos de cunho científico foram realizados até o presente momento. Por esse motivo esse trabalho tem por objetivo avaliar o efeito protetor antioxidante do picnogenol

contra os efeitos da radioterapia de cabeça e pescoço na glândula parótida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 24 camundongos divididos em 4 grupos, cada um constituído por 6 animais. Como se observa na tabela 1, os dois primeiros grupos de animais não foram expostos a radiação. Eles serviram como grupo controle. No primeiro grupo foi administrado somente água destilada. No segundo, 200mg/kg de picnogenol foi administrado de forma oral. Essas administrações foram realizadas 6, 48 e 72 h antes da simulação da irradiação. Os

outros dois grupos foram tratados utilizando o mesmo princípio, porém após a administração de água destilada e 200 mg/kg de picnogenol eles foram expostos à radiação com uma dose de 15 Gy.

Os grupos de ratos irradiados, trinta minutos antes do procedimento, foram pesados e anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (0,1 mg/kg) e xylazin (0,05 mg/kg). Os ratos então foram posicionados em uma mesa e expostos a uma dose de radiação de 15 Gy. Os animais controle foram também anestesiados, porém não irradiados.

Tabela 1- Grupos de ratos tratados com picnogenol e irradiados

Grupo	Administração de picnogenol (mg/ kg)	Radiação (Gy)
(1) Controle	Água	-
(2) Picnogenol	200	-
(3) Irradiado	Água	15
(4) Irradiado	200	15

Os grupos controle e os ratos irradiados que utilizaram picnogenol 200 mg/kg foram sacrificados 7 dias após a simulação da irradiação e suas glândulas parótidas foram fixadas em formol a 10%. Com relação aos ratos irradiados que utilizaram água destilada, três foram mortos 7 dias após a irradiação e três 21 dias após a irradiação. Suas glândulas parótidas também foram fixadas em formol a 10%. Todos esses procedimentos foram realizados na Faculdade de Odontologia da UNICAMP/ Piracicaba, SP.

O material fixado em formol a 10% foi encaminhado para o laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC-Minas, onde foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70°, 80°, 95° e absoluto) e diafanizados em xilol. Logo após foram

banhados em parafina e incluídos na mesma.

O material incluído então foi levado ao micrótomo e finos cortes de 4 µm foram realizados para uma melhor coloração das lâminas e estudo das estruturas celulares. Foi realizada a técnica de coloração com hematoxilina e eosina. Após a coloração, os cortes histológicos foram avaliados em microscópio óptico (Axiostar da Carl – Zeiss) em aumento de 40X, 100X, 200X, 400X e 1.000X, com o objetivo de estudar as alterações teciduais existentes.

RESULTADOS

O grupo de ratos controle serviu de parâmetro para avaliação e comparação com o grupo de ratos irradiados que não utilizaram o picnogenol. Com relação à glândula parótida dos ratos controle, ela se

mostrou sem nenhuma alteração morfológica significativa. Observou-se a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo que contorna toda a estrutura glandular, da qual partem septos que dividem a glândula em lóbulos, constituídos por ácinos serosos com contorno e forma definidos. Presença de ductos intralobulares e extralobulares com material de secreção no seu interior também foi um achado comum. Os ácinos serosos apresentavam em média oito células por ácino. Os ácinos apresentavam-se com forma esférica (Figura 1).

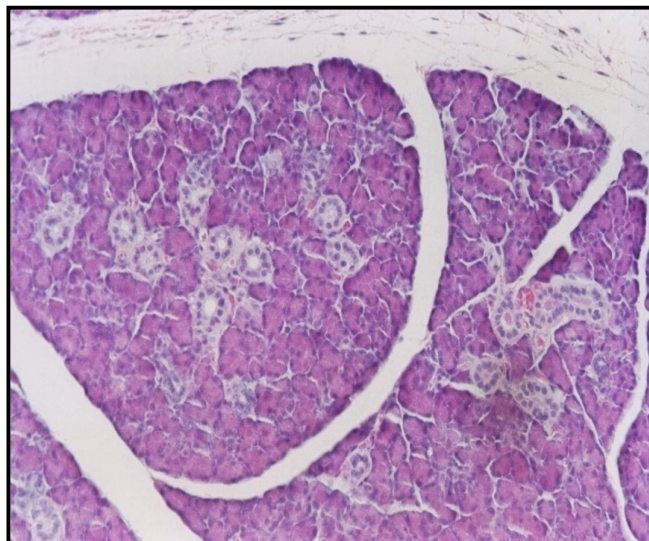


Figura 1- Glândula parótida controle. Aumento de 200 X. Coloração HE.

Comparando esses achados com os ratos que sofreram irradiação e foram mortos após 7 dias, observou-se: redução do número de células por ácino, com média de aproximadamente cinco células por ácino. Morfologicamente, notou-se presença de células acinares em processo de apoptose, com redução no número de seus núcleos, presença de núcleos mais corados e condensados, indicando a presença de células apoptóticas, além do aparecimento de corpos apoptóticos (Figura 2).

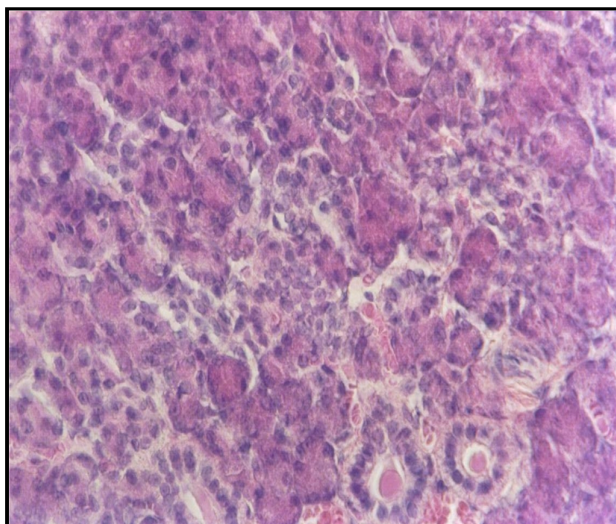


Figura 2- Glândula parótida irradiada. Aumento de 400 X. Coloração HE.

Comparando a glândula parótida dos ratos controle com a dos ratos irradiados e mortos após 21 dias, a diferença foi ainda mais significativa: observou-se presença de processo de vacuolização do citoplasma das células acinares, aumento do número de septos, presença de células com citoplasma granuloso, diminuição do lúmen dos ductos, que se encontravam sem material de secreção. Estes estavam mais irregulares com as células que o revestem em processo de apoptose. Os ácinos serosos encontravam-se mais desorganizados, sem contorno e forma definidos, com média de três a quatro células por ácino (Figura 3).

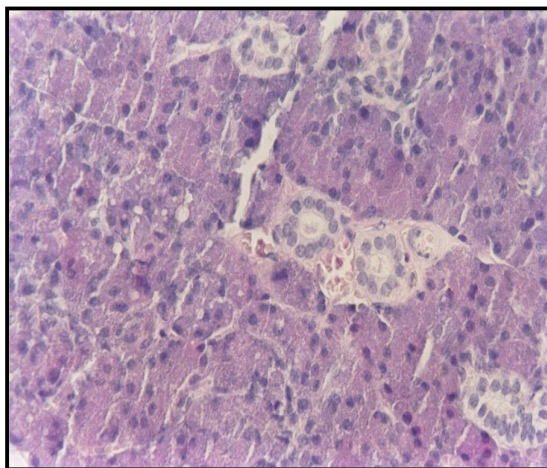


Figura 3- Glândula parótida irradiada. Aumento de 400 X. Coloração HE.

O grupo de ratos que utilizaram picnogenol 200mg/kg sem irradiação serviu de parâmetro para avaliação e comparação com o grupo de ratos que foram irradiados e utilizaram picnogenol 200mg/kg. Com relação à glândula parótida do grupo não irradiado que fez uso de picnogenol 200 mg/kg, observou-se a presença de ácinos serosos com contorno e forma definidos, alguns ductos com material de secreção no seu interior, presença de vasos sanguíneos hiperemiados e média de seis células por ácino (Figura 4).

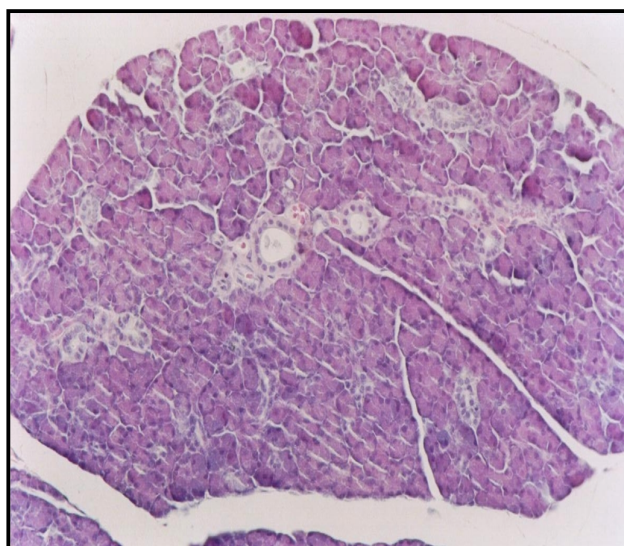


Figura 4- Glândula parótida tratada com picnogenol 200 mg/kg. Aumento de 200 X. Coloração HE.

Comparando esses achados com os ratos que sofreram irradiação e fizeram uso do picnogenol 200mg/kg, não se observou diferença significativa em relação ao número de células por ácino e a forma e contorno desses ácinos. Nesse grupo também foi observado a presença de ácinos serosos com contorno e forma definidos, além da média de seis células por ácino (Figura 5).

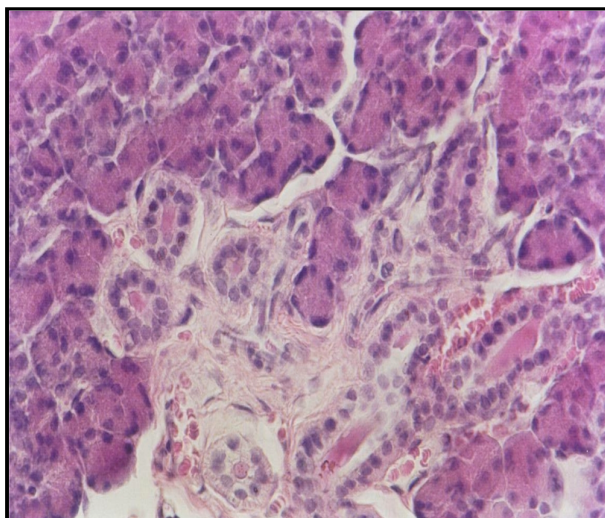


Figura 5- Glândula parótida irradiada e tratada com picnogenol 200 mg/kg. Aumento de 400 X. Coloração HE.

Por ultimo, comparou-se a glândula parótida de ratos que sofreram radiação e utilizaram picnogenol 200mg/kg com os ratos que foram irradiados sem fazer uso dessa substância. Observou-se que no grupo de ratos que fizeram uso do picnogenol, suas parótidas apresentaram-se com menos alterações em relação à forma e contorno dos ácinos e número de células por ácino, comparando com as parótidas dos ratos que foram somente irradiados.

DISCUSSÃO

A radioterapia é uma modalidade terapêutica, que utiliza as radiações ionizantes, com o objetivo de destruir as células neoplásicas, visando uma redução ou desaparecimento da neoplasia maligna. É uma terapia complementar ao procedimento cirúrgico e amplamente utilizada em pacientes com câncer^{1-4,8}.

A radioterapia, quando aplicada na região de cabeça e pescoço, provoca alterações reversíveis e irreversíveis nos tecidos neoplásicos, mas também afeta de forma inespecífica o tecido sadio^{3,4}. Esse é o caso das glândulas salivares maiores, entre elas a parótida, que geralmente encontra-se presente no campo irradiado⁶. A exposição das glândulas salivares maiores à radiação resulta em

severas alterações em suas estruturas e funções^{5, 7-9}.

De acordo com o nosso estudo, as alterações encontradas nas glândulas parótidas de ratos irradiados e sacrificados após 7 e 21 dias, tais como redução do número de células por ácino, presença de células acinares em processo de apoptose, vacuolização do citoplasma das células acinares, diminuição do lúmen dos ductos, desorganização dos ácinos com perda de contorno e forma são achados próprios em processos de irradiação. Tais características, encontradas em nosso estudo, foram também relatadas na literatura nos estudos de Burgess e Dardick²⁰ e de English et al.²¹. Estas alterações morfológicas poderiam ser responsáveis pelos efeitos clínicos como o aparecimento da xerostomia, sendo uma das principais consequências das radiações na região de cabeça e pescoço.

Na xerostomia ocorre redução da salivagem na boca, com redução das imunoglobulinas (IgAs) presentes na saliva tendo como consequência a redução da resposta dos tecidos bucais às agressões. Há o ressecamento da mucosa bucal, podendo resultar em mucosites e cáries, o que resulta em um impacto negativo na qualidade de vida do paciente^{1,2,5,6,9-14}.

O nosso estudo foi o pioneiro na utilização da substância picnogenol com o intuito de avaliar se essa substância protege as glândulas parótidas dos efeitos negativos do processo de irradiação. Como descrito na literatura, o picnogenol tem sido considerado um potente antioxidante e antiinflamatório^{2,5,6}.

O nosso estudo demonstrou que os ratos que foram irradiados, mas que fizeram uso do picnogenol apresentaram menores alterações em seus ácinos e células, quando comparados com os ratos que só foram irradiados, assemelhando-se às parótidas dos grupos controle. Os ácinos das parótidas de ratos que fizeram uso do picnogenol sem irradiação apresentavam-se com contorno e forma definidos com média de seis células por ácino, com presença de alguns ductos com material de secreção no seu interior.

Entretanto, nos ratos que foram irradiados e sacrificados 7 dias após a irradiação, as parótidas apresentaram-se com ácinos desorganizados, sem contorno e forma definidos, com média de cinco células por ácino. Nos ratos sacrificados 21 dias após a irradiação observaram-se de três a quatro células por ácino, com apoptose e vacuolização das células, além da ausência de material de secreção no interior dos ductos e com redução do seu lúmen.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o picnogenol promoveu uma proteção nos ácinos e nas células acinares da glândula parótida, o que poderia implicar em uma redução no quadro de xerostomia. Espera-se que este efeito protetor possa promover uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes que se submetem à radioterapia de cabeça e pescoço.

Este estudo foi inovador, pois descreveu pela primeira vez as alterações morfológicas encontradas em glândulas parótidas de ratos que foram submetidos à radiação, sugerindo o efeito protetor do picnogenol. Porém novos estudos são necessários para que se possa fazer outras avaliações e comprovar de forma mais acurada tal efeito.

REFERÊNCIAS

1. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC. Scoring oral mucositis. **Oral Oncol**. 1998;34:63-71.
2. Roesink JM, Konings AW, Terhaard CH, Battermann JJ, Kampinga HH, Coppes RP. Preservation of the rat parotid gland function after radiation by prophylactic pilocarpine treatment: radiation dose dependency and compensatory mechanisms. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 1999;45:483-9.
3. Lima, AAS et al. Velocidade do fluxo e pH salivar após radioterapia da região de cabeça e pescoço. **R Bras Canc**. 2004;50: 287-93.

4. Guebur, MI et al. Alterações do fluxo salivar total não estimulado em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e orofaringe submetidos à radioterapia por hiperfracionamento. **R Bras Canc.** 2004;50:103-8.
5. Ramos FM, Pontual ML, de Almeida SM, Bóscolo FN, Tabchoury CP, Novaes PD. Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats. **Arch Oral Biol.** 2006;51:96-101.
6. Münter MW, Karger CP, Hoffner SG, Hof H, Thilmann C, Rudat V et al. Evaluation of salivary gland function after treatment of head-and-neck tumors with intensity-modulated radiotherapy by quantitative pertechnetate scintigraphy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2004;58:175-84.
7. Garg M. et al. Effect of Ionizing Radiation (IR) on Expression of Apoptosis Related Genes in a Rat Salivary Gland Derived Cell Line: Implication of Bcl-2 Gene Therapy in Xerostomia. **Int J Radiation Oncology Biol Phys.** 2001;51:181-2.
8. Ramos FM, Schönlaue F, Novaes PD, Manzi FR, Bóscolo FN, de Almeida SM. Pycnogenol protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. **Phytother Res.** 2006;20:676-9.
9. Redda MG, Allis S. Radiotherapy-induced taste impairment. **Cancer Treat Rev.** 2006;32:541-7.
10. Fernando IN, Patel T, Billingham L, Hammond C, Hallmark S, Glaholm J, Henk JM. The effect of head and neck irradiation on taste dysfunction: a prospective study. **Clin Oncol (R Coll Radiol).** 1995;7:173-8.
11. Eisbruch A, Kim HM, Terrell JE, Marsh LH, Dawson LA, Ship JA. Xerostomia and its predictors following parotid-sparing irradiation of head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2001;50:695-704.
12. Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, Reed B, Denham JW. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2002;52:911-7.
13. Garden AS. Mucositis: current management and investigations. **Semin Radiat Oncol.** 2003;13:267-73.
14. Li Y, Taylor JM, Ten Haken RK, Eisbruch A. The impact of dose on parotid salivary recovery in head and neck cancer patients treated with radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2007;67:660-9.
15. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. **Free Radic Biol Med.** 1999;27:704-24.
16. Bito T, Roy S, Sen CK, Packer L. Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN-gamma-induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. **Free Radic Biol Med.** 2000;28:219-27.
17. Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, Cho YS, Rimbach G, Packer L, Chung AS. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2000;168:64-71.
18. Grimm T, Schäfer A, Högger P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). **Free Radic Biol Med.** 2004;36:811-22.
19. Sime S, Reeve VE. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. **Photochem Photobiol.** 2004;79:193-8.
20. Burgess KL, Dardick I. Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1998;85:699-706.

- 21.** English JA, Wheatcroft MG, Lyon HW, Miller C. Long-term observations of radiation changes in salivary glands and the general effects of 1,000 R. to 1,750 R. of x-ray radiation locally administered to the heads of dogs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1955;8:87-9.