CLAUDIA CARRARA COTOMACIO

**Estudo dosimétrico do efeito do laser de baixa potência na mucosite oral
induzida por 5-fluorouracil em *hamsters***

São Paulo

2016

CLAUDIA CARRARA COTOMACIO

**Estudo dosimétrico do efeito do laser de baixa potência na mucosite oral
induzida por 5-fluorouracil em *hamsters***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, pelo
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia (Biomateriais e Biologia
Oral), para obter o título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alyne
Simões Gonçalves

São Paulo

2016

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

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

Cotomacio, Claudia Carrara.

Estudo dosimétrico do efeito do laser de baixa potência na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em *hamsters* / Claudia Carrara Cotomacio ; orientador Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2016.

69 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Mucosite Oral. 2. Laser não cirúrgico. 3. Laser de baixa potência. 4. Quimioterapia. I. Gonçalves, Alyne Simões. II. Título.

Cotomacio, CC. Estudo dosimétrico do efeito do laser de baixa potência na mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil em *hamsters*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biomateriais e Biologia Oral.

Aprovado em: 28 / 09 /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Martha Ribeiro _____

Instituição: IPEN - CENEN/SP _____ Julgamento: Aprovada.

Prof(a). Dr(a). Maria Teresa Botti R. Santos _____

Instituição: UNICSUL _____ Julgamento: Aprovada.

Prof(a). Dr(a). Fabio de Abreu Alves _____

Instituição: FOU SP _____ Julgamento: Aprovada.

A **Deus** por sempre abençoar a mim e toda a minha família, por me proporcionar caminhos abertos, boas oportunidades, saúde e felicidade ao lado de pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida.

Aos meus pais, **Flavio e Carla**, exemplos de pessoas batalhadoras que sempre atingiram seus objetivos com muito esforço e trabalho e que me ensinaram a valorizar a maior riqueza que uma pessoa pode ter na vida: o conhecimento. Por todo o amor, apoio e incentivo dado para atingir cada conquista. Cada uma delas é principalmente de vocês também.

Ao meu irmão mais velho, **André**, por ser o meu exemplo de vida, de determinação pessoal e profissional, pela inteligência e pela parceria de anos, além de ser um professor nato.

Às minhas tias, **Claudia e Cintia**, minhas queridas fadas-madrinhas, ao meu tio e padrinho querido **Riccardo**, ao meu tio **Claudio** e à minha tia **Carolina**, minha madrinha na vida e na profissão, primeira dentista da família que me abriu portas e proporcionou o meu início de carreira, transmitindo conhecimentos valiosos, principalmente aqueles que não se encontram em livros.

Aos meus amados avós, **Teresinha, Giuseppe, Ivany e Zezo**, sempre presentes em minhas memórias, pela minha linda e feliz infância, pelo exemplo de superação, carinho e amor que sinto todos os dias em nossa família.

Ao meu namorado, **Marcelo**, o grande amor da minha vida, por ter estado ao meu lado nessa e em tantas outras, me ensinando principalmente a ver as dificuldades com olhares mais leves, me tornando uma pessoa melhor a cada dia que passa.

Aos meus amigos-irmãos **Barbara e Daniel**, pela amizade que transcende a distância e o tempo, sempre me motivando a crescer como pessoa e profissionalmente. E também minhas queridas **Carla, Camila e Vivi**, que não mediram esforços para correr atrás de seus sonhos, exemplos a serem

seguidos e constante lembrete para que eu nunca desanime e esqueça o quão isso é importante.

Às minhas queridas amigas, Laura, Juliana e Kamilla, os presentes que a graduação na FOU SP me deu. Obrigada pela parceria de sempre!

Ao grande amigo **Zecão**, por sempre zelar por mim e pela minha família e por me acompanhar em cada passo, ajudando sempre a superar os meus medos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves**, pelos ensinamentos científicos, clínicos, acadêmicos e pessoais. Muito obrigada por todas as grandes oportunidades e por proporcionar meu crescimento profissional na carreira acadêmica, além de todo incentivo, amizade, compreensão e confiança depositada.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez**, pelo acolhimento no Laboratório de Biologia Oral, por toda a ajuda, ensinamentos e atenção em todo o tempo em que estive realizando os meus experimentos.

Ao **Prof. Dr. Fabio Abreu Alves**, um dos meus mentores, grande exemplo de profissional e meu orientador de iniciação científica, além de todos os ensinamentos desde a época de graduação.

Aos outros professores da Disciplina de Biologia Oral, **Prof. Dr. José Nicolau** e **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira**, ao coordenador da Pós-Graduação, **Prof. Dr. Rafael Y. Ballester** e aos demais professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, **Antonio Muench, Carlos Eduardo Francci, Igor S. Medeiros, Josete B. C. Meira, José Fortunato F. Santos, Leonardo Eloy Rodrigues Filho, Paulo Francisco Cesar, Roberto Braga, Paulo Eduardo Capel, Rosa Helena Grande** e **Walter Miranda** por me aceitaram no curso de pós-graduação, por todos os ensinamentos acadêmicos e científicos, pelo exemplo de postura profissional e contribuição para meu aprendizado.

À **Profa Dra Luana Campos**, que se tornou uma grande amiga, desde as épocas de iniciação científica, me ensinando e dividindo sempre as angustias e conquistas da vida de pesquisadora.

Ao **Prof. Dr. Dorival Pedroso**, orientador da minha primeira iniciação científica, grande conselheiro, amigo e o responsável pelo início do meu caminho no mundo da pesquisa.

À todos os amigos de meu ano do curso de Mestrado da Disciplina de Biologia Oral, as alunas de doutorado **Cintia** e **Juliana**, aos alunos de iniciação **Filipi, Gabi, Gabriela** e **Andressa** e às companheiras de Laboratório de Bioquímica Oral, **Flavia** e **Ana**, pela amizade, companheirismo, por compartilhar bons e maus momentos, por toda a ajuda e por tornarem mais fácil o dia-a-dia na pós-graduação.

Aos meus grandes amigos do dia a dia de Laboratório, **Douglas** e **Elis**. Obrigada por todo o apoio, ajuda, paciência e bons momentos de descontração que tornaram as preocupações e obrigações menos árduas.

Às secretárias do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral **Eli e Rosinha**, e do Laboratório de Biologia Oral, **Edi** (minha companheira de almoços), pela paciência, prontidão e profissionalismo.

Às secretárias do LELO, **Liliane** e **Ana Maria**, pela ajuda e prestabilidade e ao grupo Mucosite pela experiência que adquiri nos últimos tempos.

Aos meus pacientes que confiaram em mim e dividiram suas experiências de vida comigo, me tornando melhor como pessoa e profissionalmente.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, que faz parte de toda a minha carreira profissional até então, desde 2009.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

Marie Curie

RESUMO

Cotomacio, CC. Estudo dosimétrico do efeito do laser de baixa potência na mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil em *hamsters*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biomateriais e Biologia Oral. Versão Corrigida.

A Mucosite Oral (MO) é uma consequência debilitante do tratamento oncológico, que pode ser tratada com o uso do laser de baixa potência (LBP). Entretanto, ainda não há consenso na literatura a respeito de parâmetros dosimétricos para o reparo da mucosa oral. Dessa forma, o objetivo do estudo foi comparar diferentes protocolos com laser de baixa potência (FLBP) para o tratamento da MO, através de análises clínicas e histológicas. Quinze *hamsters* foram usados, em um modelo de indução de MO por 5-Fluorouracil (5-FU) e ranhuras superficiais na mucosa oral, com 7 dias de acompanhamento clínico. Os animais foram divididos em cinco grupos: Controle (C), que recebeu apenas anestesia e o veículo do quimioterápico, Controle-Quimioterapia (CQ) que recebeu anestesia, 5-FU e ranhuras, Laser Protocolo 1 (L1) que recebeu o mesmo do grupo CQ + FLBP 6 J/cm²/0,24 J (um ponto), Laser Protocolo 2 (L2) o mesmo do grupo CQ + FLBP 25 J/cm²/1 J (um ponto) e Laser Protocolo 3 (L3), o mesmo do grupo CQ + FLBP 6 J/cm²/0,96 J (4 pontos de 0,24J). O laser foi utilizado em $\lambda=660$ nm, com área do spot de 0,04 cm² e 40 mW de potência. O melhor protocolo de FLBP para manter os graus de MO mais baixos, em relação ao grupo CQ, foi o L1, seguido dos protocolos L2 e L3. Os resultados histológicos demonstraram padrão semelhante entre os grupos L1, L2 e C, com alguns vasos sanguíneos e a presença de um fino epitélio de aspecto contínuo no dia 7. Nossos resultados sugerem que o modo de aplicação do LBP e a energia entregue por área pode interferir na reparação da MO.

Palavras-chave: Mucosite Oral. Laserterapia. Laser de Baixa Potência. Quimioterapia.

ABSTRACT

Cotomacio, CC. Dosimetric study of Low Level Laser Therapy in oral mucositis induced by 5-Fluorouracil in *hamsters* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Oral mucositis (OM) is a dose-limited debilitating consequence from cancer treatment that could be treated with low level laser therapy (LLLT); however, there is no consensus about its dosimetric parameters for oral mucosa healing. Thus, the aim of this study is to compare different LLLT protocols on the treatment of OM, through clinical and histological analysis. Fifteen *hamsters* were used, in an induced model of OM by 5-Fluorouracil (5-FU) and superficial scratching in oral mucosa, in seven days of follow-up. The animals were divided into 5 groups: Control (C) which received only anesthesia and chemotherapeutic vehicle; Control-Chemotherapy (Ch) which received anesthesia, 5-FU and scratches; Laser Protocol 1 (L1) the same as Ch group + LLLT 6 J/cm²/0.24J (one point); Laser Protocol 2 (L2) the same as Ch group + LLLT 25J/cm²/1J (one point); and Laser Protocol 3 (L3) the same as Ch group + LLLT 6 J/cm²/0.96 J (4 points of 0.24J). The laser that was used has $\lambda=660$ nm, 0.04 cm² of spot area and 40 mW of power. The best LLLT protocol to maintain lowest OM levels compared to Ch group was L1, followed by L2 and L3. Histological results demonstrated a similar pattern among L1, L2 and C groups, with some blood vessels presence and continuous aspect of a thin epithelium, on day 7. Our results suggest that the application mode of LLLT and the energy delivered per area could interfere in the oral mucositis healing.

Keywords: Mucositis. Laser therapy. Low level laser therapy, Chemotherapy. *Hamsters*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
A	Área
ATP	Adenosina trifosfato
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm ²	Centímetro quadrado
COX	Ciclo-oxigenase
DE	Densidade de Energia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Energia
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FLBP	Fototerapia com Laser de Baixa Potência
g	Gramas
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IN	Infiltrado inflamatório
InGaAlP	Índio Galio Alumínio e Fósforo
ISOO	<i>International Society of Ocular Oncology</i>
J	Joule
kg	Quilograma
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBP	Laser de Baixa Potência
LED	Light Emitting Diode
m	Fibras musculares
M	Molar
MASCC	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer.</i>
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MO	Mucosite oral
mW	Miliwatts

n	Número amostral
NE	Necrose
NF-KB	Fator nuclear kB
nm	nanômetros
O ₂	Oxigênio
NO	Óxido nítrico
P	Potência
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
QT	Quimioterapia
RE	Regeneração epitelial
Redox	Reação oxirredução
RTCP	Radioterapia de cabeça e pescoço
s	Segundo
STAT-3	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	Tempo
TNF	fator de necrose tumoral
US\$	Dólar Americano
USP	Universidade de São Paulo
VS	Vasos sanguíneos
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5	RESULTADOS.....	43
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (França, 2012), para a América do Sul, foram calculados cerca de 810 mil casos de câncer, com estimativa de incidência de aproximadamente 1,02 milhão de casos em 2020. Para o Brasil, em 2012, foram calculados 438 mil casos de câncer, com estimativa de 550 mil casos em 2020, o que mostra tendência de aumento da doença ao longo dos anos. Entretanto, com os avanços na medicina, o estigma de “morte” associado à doença está sendo diminuído, principalmente pelo surgimento de novas terapias menos invasivas, como as terapias alvo, menos agressivas e com efeitos colaterais menos intensos (Chan et al., 2015; Michel et al., 2015). No entanto, essas terapias ainda não possuem aplicação para todos os tipos de neoplasias, além dos custos mais elevados, tornando o tratamento convencional de quimioterapia e radioterapia ainda bastante utilizado.

Os efeitos colaterais da radioterapia de cabeça e pescoço (RTCP) e quimioterapia (QT) são agressivos aos pacientes, pois além das alterações hematológicas e no sistema gastrointestinal, ocorrem danos importantes à cavidade oral, como mucosite oral, aumento da susceptibilidade às infecções orais, hemorragia, alteração do paladar, dor, disfagia e hipofunção das glândulas salivares (Machado; Sawada, 2008).

A mucosite oral (MO) é uma inflamação da mucosa bucal induzida pela QT e RTCP, representando uma entidade distinta das lesões orais chamadas genericamente de estomatites (Mazzeo et al., 2009). Essa condição é um dos efeitos adversos mais frequentes e um dos mais debilitantes do tratamento oncológico, pois diminui severamente a qualidade de vida dos pacientes, estando diretamente associada à dor severa e comprometimento das funções orais cotidianas como fala, mastigação, gustação, deglutição e fonação (Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012; Mazzeo et al., 2009; Shih et al., 2002). A sua prevalência é de 40 a 100%, dependendo do tipo de câncer e da terapia utilizada (Mortensen et al., 2012; Keefe et al., 2007). Dessa forma, o conhecimento e utilização de um tratamento que possa diminuir a incidência,

severidade ou estimular a reparação tecidual da MO é essencial para o bem estar e adequada recuperação desses pacientes.

Muitos trabalhos demonstram que o laser de baixa potência (LBP) é eficaz na prevenção e tratamento da MO em pacientes submetidos ao tratamento de quimio e/ou radioterapia (Campos et al., 2009; Carvalho et al. 2011; Eduardo et al., 2009; Sonis et al., 2016). O efeito biológico do LBP tem grande potencial na reparação tecidual e analgesia, reduzindo a severidade ou atrasando o aparecimento da MO (Fekrazad; Chiniforush, 2014), devido a provável modulação de inflamação (Silva et al., 2015; Sonis et al., 2016), ao aumento da circulação local, da proliferação celular, da síntese do colágeno (França et al., 2009; Lopes et al., 2010), induzindo o processo de reparação. Porém, o LBP também pode inibir processos celulares ao danificar os fotorreceptores com altas doses de energia (Karu et al., 1987).

Embora um grande número de estudos demonstraram a eficácia da fototerapia com laser de baixa potência (FLBP) sobre a MO induzida por QT ou RTCP, existem vários protocolos de laser e modos de aplicação descritos na literatura. Assim, devido a essa ampla gama de estudos que utilizaram diferentes quantidades de energia, variados modos de aplicação (em contato ou desfocado, frequência das aplicações de laser e um número diferente de pontos de entrega, por exemplo), ainda é necessário que estudos sejam realizados para estabelecer os mecanismos de ação da FLBP e assim sugerir a melhor energia e forma de aplicação da terapia laser.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As Terapias Antineoplásicas e a mucosite oral:

O tratamento para o câncer envolve uma avaliação e plano multidisciplinar que determinará pela ressecção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia, visando melhores chances de cura e a preservação do paciente (Galleta, 2006; Campos, 2013). Várias estratégias têm sido exploradas para aumentar a sobrevida dos pacientes, entretanto, a taxa de sobrevivência nos últimos cinco anos ainda é apenas de 40%. Tal dado deve-se principalmente à resistência às terapias e aos efeitos colaterais secundários, extremamente debilitantes (Chen; Malhotra, 2015).

Com os tratamentos para câncer de cabeça e pescoço, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (Almeida et al., 2005; Campos, 2013).

A quimioterapia, assim como a radioterapia, baseia-se no bloqueio do ciclo celular, tendo a inibição da mitose celular como resultado. Entretanto, os seus efeitos citotóxicos não se limitam apenas às células tumorais, atingindo também tecidos normais com grande replicação, tais como mucosa bucal, trato gastrointestinal e medula óssea. Como consequência, haverá comprometimento das barreiras mucosas, acarretando no surgimento dos efeitos colaterais debilitantes e no aumento dos riscos de morbidade dos pacientes (Brasil, 2015).

Os efeitos secundários da radioterapia de cabeça e pescoço (RTCP) envolvem mucosite oral (MO), alterações de paladar, redução na microvasculatura, trismo, cáries, doença periodontal progressiva,

osteoradionecrose, hipossalivação e xerostomia, principalmente pela sua ação local em cabeça e pescoço (Cooper et al., 1995; Jaguar et al., 2015).

A quimioterapia, no geral, causa efeitos adversos que podem ser agudos ou tardios. Os agudos iniciam logo após a administração do fármaco e persistem por alguns dias, como náuseas, vômitos, mal estar, adinamia, artralguas, exantemas, flebites, anemia, mucosites, cistite, imunossupressão e potencialização dos efeitos das radiações. Os tardios, que aparecem meses após a infusão dos quimioterápicos, e em sua maioria são consequências dos efeitos primários, são: miocardiopatia, hiperpigmentação e esclerodermia, alopecia, pneumonite, imunossupressão, neurotoxicidade e nefrotoxicidade (Vissink, 2004; Mazzeo et al., 2009; Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012).

Brunton et al. (2012) estabeleceram um critério classificatório clássico para os quimioterápicos, baseado no ponto de interferência de cada droga nas etapas da síntese, transcrição e transdução do DNA. Dentre os tipos de quimioterápicos incluídos na classificação, encontramos os antimetabólitos, os agentes alquilantes e os taxóis. Os alquilantes são compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil, impedindo a separação das duas fitas de DNA para sua replicação. Os taxóis possuem ação de inibição do fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, o que resulta na perda da viabilidade celular. (Brunton et al., 2012; Almeida et al., 2005).

Os agentes antimetabólicos, um dos grupos de quimioterápicos mais usados na prática clínica, exercem seus efeitos farmacológicos através do bloqueio bioquímico da síntese do DNA e são restritos à fase S do ciclo celular. Um exemplo de antimetabólico bastante utilizado no tratamento do câncer é o Fluorouracil (5-Fluorouracil, 5-FU) (Almeida et al., 2005; Lansiaux, 2011). Em especial, o 5-FU, promove severas alterações hematológicas e alterações no sistema gastrointestinal, incluindo danos importantes à cavidade oral, como mucosite, aumento da susceptibilidade às infecções orais, hemorragia, alteração do paladar, disfagia, dor e hipofunção das glândulas salivares (Machado; Sawada, 2008; Lansiaux, 2011).

A MO é um dos efeitos colaterais mais frequentes após o tratamento de quimioterapia e radioterapia convencionais, podendo estar presente em aproximadamente 50% dos casos tratados com apenas quimioterapia, em 80%

dos casos com quimioterapia mais agressiva (como na técnica mieloablativa, por exemplo) e em 100% dos casos quando a RTCP está presente no plano terapêutico (Trotti et al., 2003; Sonis et al., 2004; Blijlevens et al., 2008). Essa condição diminui severamente a qualidade de vida do paciente oncológico, estando diretamente associada à dor severa e comprometimento das funções orais cotidianas, como fala, mastigação, gustação, deglutição e fonação, caracterizando-se como uma inflamação da mucosa bucal, distinta das estomatites bucais (Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012; Mazzeo et al., 2009; Sonis, 2011). Dessa forma, a definição da etiologia e de tratamentos que possam diminuir a incidência, severidade ou estimular a reparação tecidual em MO é essencial para o bem estar e adequada recuperação desses pacientes.

A apresentação da MO pode variar de um leve eritema e ardência bucal, nos estágios iniciais, até úlceras confluentes e dolorosas. A sua resolução depende principalmente do tipo de tratamentos ou de suas associações (Villa; Sonis, 2015). Em pacientes que receberam transplante de medula, por exemplo, os primeiros sinais de MO ocorrem de 3-4 dias após infusão e o pico ocorre entre o 7º e 14º dia e geralmente cura-se após uma semana (Schubert et al., 2007; Villa; Sonis, 2015). Em pacientes que recebem a terapia padrão de quimioterapia associada à RTCP, a severidade é maior, pois já apresentam os primeiros estágios de MO no final da primeira semana e na segunda semana, a integridade da mucosa oral já está comprometida, com lesões ulcerativas e dolorosas que se prolongam por todo o tratamento oncológico (principalmente quando envolve radioterapia), até 2 a 4 semanas após o término da terapia (Villa; Sonis, 2015).

Sonis (2007, 2011) revisou e esclareceu a etiopatologia da mucosite em 5 fases: Na primeira fase, de iniciação, há a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e consequente estresse oxidativo devido a quimio (sistemicamente) ou radioterapia (localmente), que ativam fatores de transcrição como fator nuclear kB (NF-kB) e STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), os ativadores de genes associados a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, há o envolvimento do sistema imune inato do hospedeiro. Na segunda fase, mesmo sem dano visível, há intensa atividade inflamatória que iniciará o dano ao tecido conjuntivo e endotélio,

reduzindo a oxigenação e nutrição das células epiteliais, causando mais dano e morte celular. A fase seguinte, de amplificação de sinal, promove um feedback positivo das citocinas inflamatórias: O NF- κ B é agora estimulado pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) a prosseguir sua atividade, amplificando o dano iniciado pela radiação ou agente quimioterápico. Segue então a fase ulcerativa, quando há perda da integridade da mucosa, sendo os macrófagos, neutrófilos e mastócitos observados em grande quantidade, além de colonização bacteriana, que contribui para o aumento da severidade da lesão. Finalmente, a fase de cura corresponde à cessação dos estímulos de estresse oxidativo pelos agentes quimioterápicos, possibilitando a migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais, caracterizando a resolução das lesões na mucosa oral (Sonis, 2007, 2011; Sonis et al., 2016) (Figura 2.1).

O NF- κ B foi descoberto em 1985, quando um fator nuclear (NF), uma vez ativado, ligou-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (Huxford et al., 1999). NF- κ B é o nome coletivo para um grupo de fatores de transcrição, que compreendem a família Rel, presente em quase todas as células. A família NF- κ B/Rel tem cinco membros: NF- κ B1 (p50/p105), o NF- κ B2 (p52/p100), p65 (Rel A), Rel 3 e C-rel (Sen; Baltimore, 1986). Esse fator pode ser ativado por diversos estímulos como bactérias, vírus e seus produtos, estresses fisiológicos, estresses oxidativos por agentes antineoplásicos (cisplatina, taxois, vincristina, vinblastina, entre outros) e outras drogas (fenobarbital, metanfetamina, tamoxifeno), mediadores apoptóticos, fatores de crescimento, hormônios e citocinas inflamatórias (Siebenlist, 1997). Após estímulo, o NF- κ B pode também atuar como um estimulador de várias vias inflamatórias, como a das citocinas inflamatórias. Geralmente, picos de NF- κ B precedem picos de citocinas pro-inflamatórias (Al-Dasooqi et al., 2013).

As citocinas pro-inflamatórias mais associadas ao aparecimento de MO e ativadas pelo NF- κ B são principalmente TNF α , interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL – 6), excelentes marcadores da resposta inflamatória induzida pela quimioterapia (Logan et al., 2008). Devido a destruição tecidual causada pela ação dessas citocinas, diversas terapias e outros agentes dirigidos para inibição dessas citocinas inflamatórias tem sido estudados para reduzir a mucosite em modelos animais, entretanto ainda não foram encontrados resultados consistentes que comprovem completa eficácia (Mazzeo et al., 2008).

2.2 Laser de Baixa Potência

Desde o desenvolvimento do primeiro laser por Maiman (1960), a utilização de LASERs (acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) na medicina e na odontologia vêm crescendo a cada dia, com várias aplicações na oftalmologia, dermatologia, periodontia, semiologia,

cirurgia, endodontia e dentística, principalmente por ser uma técnica simples, com expressiva resposta biológica e com grande aceitação dos pacientes.

Os lasers são divididos em duas classes, de acordo com o efeito aos tecidos biológicos: lasers de alta e baixa potência (LBP) (Freitas; Simões, 2015; Simões et al., 2009). Os lasers de alta potência possuem efeitos fototérmicos resultando em desidratação, coagulação, vaporização e ablação (Gutknecht; Eduardo, 2004). O LBP possui efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células e no tecido, com efeito anti-inflamatório, analgésico e de biomodulação (Freitas; Simões, 2015). O LBP ainda pode ser dividido em vermelho (λ 600-700 nm) e infravermelho (λ 750-1000nm), correspondendo à região com características energéticas e níveis de absorção relevantes para a cadeia respiratória (Karu, 1986; Vladimirov et al., 2004; Freitas; Simões, 2015) e varia seu local de ação de acordo com o comprimento de onda utilizado. O comprimento de onda vermelho absorve luz nos cromóforos das mitocôndrias (Karu, 1986, 2004a), com uma penetração superficial no tecido, enquanto que no comprimento infravermelho, a luz laser é absorvida nos cromóforos de membrana (Smith, 1991), sendo geralmente mais associada à analgesia, devido a sua maior penetração no tecido (Freitas; Simões, 2015).

As respostas celulares ao LBP no comprimento de onda vermelho iniciam-se principalmente a partir do estímulo de um fotorreceptor, a molécula citocromo c-oxidase presente nas mitocôndrias. A fotoexcitação dessa molécula influencia o estado redox e a taxa do fluxo de elétrons (Brown, 1999; Karu, 2008) para seu estado mais oxidado. Acredita-se que possam existir quatro reações primárias que explicariam os mecanismos celulares de fotobioestimulação. A primeira seria a aceleração de transferência eletrônica na cadeia respiratória, devido à mudança do estado redox, seguidos pela fotoexcitação de seus carreadores. A segunda seria a hipótese do óxido nítrico (NO), que regula a ativação da citocromo c-oxidase. Assim, com a luz laser e a ativação do fluxo de elétrons na molécula, inibição parcial do ON seria revertida, aumentando a ligação por O₂ e as taxas de respiração (Brown, 1999; Karu et al., 2004a, 2004b). A terceira hipótese seria a de produção de pequenas quantidades de oxigênio sinteto pelas porfirinas neutras ou os citocromos na célula (Karu et al., 1991; Lubart et al., 1992). A última seria a do ânion

superóxido, na qual haveria aumento da produção desse ânion após estímulo pelo laser e ativação da cadeia respiratória (Karu et al., 1993). Esses mecanismos ocorrem simultaneamente, mas ainda não se sabe qual seria o mais importante no processo de fotobiomodulação, estimulando o estado redox da mitocôndria para seu estado mais oxidado. Após esses estímulos mitocondriais, haveria algumas alterações no citoplasma celular, como o aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP), de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), do potencial redox, do cálcio intracelular e aumento do pH, que sinalizariam estímulos ao núcleo celular, resultando nos efeitos biológicos da laserterapia já citados: aumento na síntese de colágeno, modulação da inflamação, angiogênese, reparação tecidual e proliferação celular (Karu, 2008; Freitas; Simões, 2015; Pandeshwar et al., 2015).

Sonis et al. (2016) revisaram os efeitos de fotobiomodulação do LBP. Apesar da etiologia desses efeitos ainda estar em fase de pesquisa, a proliferação celular (como por exemplo, de fibroblastos e células epiteliais), o aumento da motilidade celular e a angiogênese são os principais efeitos atribuídos ao LBP e estão diretamente relacionados à reparação tecidual, através da ativação de genes e da modulação da concentração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, há indícios que o LBP favorece a síntese de colágeno, inibe apoptose e é capaz de modular citocinas e fatores nucleares relacionados à inflamação, propiciando modulação inflamatória e melhor organização tecidual para a reparação.

2.3 Fototerapia com laser de baixa potência e o reparo tecidual

A fototerapia com laser de baixa potência (FLBP) é um tratamento não térmico, baseado na acumulação de efeitos dependendo da dose usada. Tais efeitos devem-se principalmente a um aumento da circulação local, da proliferação celular e de síntese de colágeno (França et al., 2009; Lopes et al., 2010), além do aumento da redução de mediadores inflamatórios, do aumento da produção de fatores de crescimento e proliferação de fibroblastos (Corazza

et al., 2007; Silva et al., 2015; Sonis et al., 2016), induzindo ao processo de reparação tecidual.

Muitos trabalhos demonstraram que a FLBP é eficaz na prevenção e tratamento da MO, aumentando a qualidade de vida de pacientes submetidos ao tratamento de QT e/ou RTCP (Campos et al., 2009; França et al., 2009; Bjordal et al., 2011; Fekrazad; Chiniforush, 2014; Gobbo et al., 2014). Além de a morbidade ser menor em pacientes que usam FLBP, Antunes et al. (2016) mostraram que o uso do laser é capaz de promover uma economia de aproximadamente US\$ 5,000.00 em relação ao grupo placebo, por cada caso de mucosite prevenido. No entanto, há ainda muita divergência com relação à dosimetria, ou seja, os parâmetros relacionados aos equipamentos e ao modo de aplicação da luz que trariam os melhores efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos para os pacientes.

Modelos animais têm sido utilizados com sucesso para determinar o melhor protocolo de LBP que mantenha MO em graus baixos e acelere a reparação. Seguindo o modelo de indução de MO em *hamsters*, proposto por Sonis et al. (1990), alguns estudos testaram os efeitos da FLBP na MO. Em 2009, França et al., observaram que o grupo que recebeu FLBP (660 nm, 30 mW, 1,2 J/cm² em quatro pontos de 0,4 J de energia cada) em lesões de MO, apresentaram resolução mais rápida da MO que o grupo que não recebeu tratamento. Lopez et al. (2013) utilizaram 96 *hamsters*, divididos nos grupos Controle (sem tratamento) e em grupos experimentais (FLBP para prevenção de MO; FLBP para tratar MO e ambos) e obtiveram resultados positivos ao reduzir os níveis de MO com o uso de FLBP terapêutico. Nesse estudo, a FLBP foi utilizada em 40 mW, 6,6 J/cm² e 0,24 J de energia por ponto, sendo 6 pontos de 6 segundos cada, em contato com o tecido.

Em 2015, Cruz et al. aplicou uma maior dose de 120 J/cm², 40 mW e 4,4 J de energia em mucosa oral de *hamsters*, que receberam o mesmo protocolo de indução de MO do presente trabalho. Os autores demonstraram que os animais que receberam a laserterapia apresentaram reparação total da MO somente no 10º dia de experimento, sendo que não houve diferença com o grupo controle, o qual não recebeu o tratamento com laser para as lesões orais. Corazza et al. (2007) analisaram os efeitos do LBP e do “*Light Emitting*

Diode" (LED) na reparação da pele de ratos. Foi constatado que a dose utilizada de 5 J/cm^2 (FLBP 0,2 J por ponto, em sete pontos, total de 1,4 J) foi melhor que a de 20 J/cm^2 (FLBP 0,8 J por ponto, em 7 pontos, total de 5,6 J). Esses resultados evidenciam que o LBP e o LED foram capazes de promover a reparação tecidual, mas a diferença na velocidade dos resultados pode estar relacionada à quantidade de energia entregue à superfície do tecido (Tunér; Hode, 2010; Freitas; Simões, 2015).

A janela terapêutica, ou seja, a densidade de energia que produziria respostas relacionadas ao reparo do tecido pode ser exemplificada pela lei de Arndt-Schultz. Já é de conhecimento que energia muito baixa ou muito alta não possui efeito ou efeito reduzido quando comparado a outras densidades de energia (Tunér; Hode, 2010; Corazza et al., 2007; Cruz et al., 2015; Freitas, Simões, 2015). A lei de Arndt-Schultz diz que, para úlceras abertas haveria uma janela terapêutica de reparação e o objetivo seria entregar ao tecido doses que estariam dentro desse intervalo energético para que haja efeitos desejáveis de fotobioestimulação (Tunér; Hode, 2010). Além da densidade de energia, a energia que é efetivamente entregue ao tecido também precisa estar dentro da janela terapêutica. A energia leva em conta dois componentes, a potência e o tempo, que também influenciam no reparo das feridas e não são grandezas compensatórias, pois um tempo muito curto com energia maior não seria suficiente para respostas do tecido alvo (Huang et al., 2009). Dessa forma, o modo que a energia é entregue pode interferir nos resultados e no processo de reparo e na cicatrização de feridas (Freitas; Simões, 2015).

Alguns estudos em pacientes também demonstraram a eficácia da FLBP no tratamento da MO e no aumento do conforto dos pacientes oncológicos. Autores sugerem que a FLBP é eficaz na redução da severidade das lesões de mucosite e no tempo de seu aparecimento (Schubert et al., 2007; Antunes et al., 2007; Jaguar et al., 2007; Campos et al., 2009; Simões et al., 2009; Eduardo et al., 2009; Carvalho et al., 2011). Schubert et al. (2007) usou o comprimento de onda infravermelho e vermelho de LBP, em 60 e 40 mW, respectivamente, com 2 J/cm^2 para ambos (0,08 J por ponto e total de 3,84 J de energia), em 70 pacientes que sofreram transplante de medula óssea. O grupo que recebeu o comprimento de onda vermelho apresentou melhores resultados que o grupo infravermelho, quanto à severidade da MO e dor. No mesmo ano, Antunes et al.

(2007) também testou os efeitos do comprimento de onda vermelho em 38 pacientes que receberam transplante de medula, com dose de 4 J/cm² (0,78 J por ponto e total de 11,76 J de energia por região) e constataram diminuição da incidência de MO nos grupos positivos para FLBP. Jaguar et al. (2007) demonstraram os efeitos da FLBP (10 mW, 2,5 J/cm² e 0,1 J por ponto) em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Segundo os autores, a FLBP foi capaz de diminuir a dor e a severidade da mucosite.

Em 2009, Eduardo et al., usou dois protocolos de LBP em um mesmo grupo de pacientes submetidos a transplante de medula, em doses de 4 J/cm² e 0,16 J por ponto para prevenir e 6 J/cm² e 0,24 J por ponto para tratar MO. Os pesquisadores perceberam que a laserterapia de baixa potência tendeu a manter a MO em níveis baixos. Carvalho et al. (2011) testaram dois diferentes protocolos em 70 pacientes que receberam quimioterapia e radioterapia. O grupo que recebeu 1,3 J/cm² e 0,05 J de energia por ponto foi capaz de controlar a intensidade da MO e da dor.

Simões et al.(2009) avaliaram o efeito do LBP, incluindo as fototerapias com laser de baixa e alta potência desfocado, em lesões de MO em pacientes submetidos à RTCP, com o objetivo de analisar a reparação e a analgesia destas lesões. Os resultados mostraram que a maior frequência de aplicação do LBP assim como a associação do LBP (vermelho) com o alta potência desfocado (infravermelho) melhorou o efeito analgésico. No entanto, com a associação, houve um prejuízo na reparação tecidual.

O mais recente guia para manejo da MO publicado pela MASCC/ISOO (Lalla et al., 2014) já assume a laserterapia como uma técnica de intervenção no tratamento ou prevenção dessa lesão, mas ainda não há trabalhos suficientes para determinar o melhor protocolo a ser utilizado. Dessa forma, já é de conhecimento que o LBP traz benefícios para o manejo do paciente oncológico quanto à MO, mas ainda há bastante divergência quanto ao protocolo que gera os melhores efeitos de reparo nessa lesão e, além disso, os efeitos histológicos e clínicos de diferentes protocolos ainda não foram inteiramente elucidados.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar através de análises clínicas e histológicas diferentes protocolos de LBP na reparação tecidual de MO, utilizando um modelo experimental em *Hamsters* Sírios.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

Foram utilizados 15 *Hamsters* Sírios fêmeas adultas, pesando por volta de 150 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Um ciclo de iluminação claro/escuro de 12 em 12 horas foi adotado com umidade e temperatura de ambiente controlada. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 010/2015) (Anexo A).

4.2 Delineamento experimental

Os 15 *hamsters* foram separados aleatoriamente em 5 grupos. Todos os grupos foram avaliados por 7 dias, sendo que no dia 1 e 3 foi injetado o quimioterápico ou o seu veículo, dependendo do grupo de estudo. Nos dias 4 e 5 foram realizadas ranhuras na mucosa oral e, a partir do dia 4, foram aplicados os protocolos de fototerapia com laser de baixa potência (FLBP), como se segue:

- Grupo Controle (C): recebeu apenas injeção do anestésico e veículo do quimioterápico (hidróxido de amônia, 1M) (n=3);
- Grupo Controle-Quimioterápico (CQ): recebeu injeção do anestésico, quimioterápico (5-FU) e ranhuras, sem receber tratamento com LBP (n=3);
- Grupo Laser 1 (L1): recebeu doses anestésicas, quimioterápico, ranhuras e protocolo 1 de FLBP, λ 660 nm, 6 J/cm²; 0,24 J em mucosa oral (n=3);

- Grupo Laser 2 (L2): recebeu doses anestésicas, quimioterápico, ranhuras e protocolo 2 de FLBP, λ 660 nm, 25 J/cm²; 1 J em mucosa oral (n=3);
- Grupo Laser 3 (L3): recebeu doses anestésicas, quimioterápico, ranhuras e FLBP, λ 660 nm, 6 J/cm²; 0,96 J em mucosa oral.

4.3 Procedimento clínico

Os 15 *hamsters* foram separados aleatoriamente em cinco grupos: C, CQ, L1, L2 e L3, com um total de 3 animais por grupo e 6 mucosas avaliadas por grupo. Nos dias 1 e 3 os animais do grupo C, receberam dose do veículo do quimioterápico e os grupos CQ, L1, L2 e L3 receberam dose do quimioterápico, sendo que no primeiro dia foi uma dose de 100 mg/kg e, no terceiro dia, dose complementar de 65 mg/kg, com intervalo de um dia entre as doses (dia 2) (Sonis et al., 1990, Cruz et al., 2015).

Do dia 4 ao dia 7 os animais foram anestesiados com uma associação de Copazine (Xilazina) 13,8 mg/kg e Vetanarcol (Ketamina) 11,6 mg/kg e nos dias 4 e 5 as mucosas direita e esquerda foram arranhadas com a ponta de uma agulha por duas vezes pelo mesmo operador (Figura 4.1). Tais ranhuras seguiram um padrão para todos os grupos, onde todas tiveram o mesmo tamanho inicial, dentro de uma moldura pré-fabricada, com 1cm² de área interna. A partir do dia 4 do experimento, as mucosas bucais direita e esquerda dos animais foram expostas e fotografadas para análise da evolução das possíveis lesões durante o período experimental, dentro da área demarcada de 1 cm² (Cruz et al., 2015) (Tabela 4.1), totalizando um n amostral total de 30 mucosas e 6 mucosas por grupo. Os dois lados foram utilizados com a mesma fototerapia devido a um possível efeito sistêmico da FLBP.

Quadro 4.1 – Cronograma de execução dos procedimentos clínicos

DIA	TRABALHO REALIZADO
1	Veículo do quimioterápico C; Dose inicial de quimioterapia (100 mg/kg) para os grupos CQ, L1, L2 e L3
2	Acompanhamento dos animais, sem procedimentos clínicos;
3	Veículo do quimioterápico C; Dose complementar de quimioterapia (65 mg/Kg) para os grupos CQ, L1, L2, L3;
4	Anestesia grupo C; Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (CQ, L1, L2 e L3); Fototerapias (L1, L2, L3);
5	Anestesia grupo C Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (grupos CQ, L1, L2 e L3); Fototerapias (L1, L2, L3);
6	Anestesia grupo C e CQ; Anestesia e fototerapias (grupos L1, L2 e L3);
7	Anestesia grupo C e CQ; Anestesia e fototerapias (grupos L1, L2, L3); Eutanásia.

Figura 4.1 – Indução da MO nos dias 4 e 5 dentro da moldura de 1 cm², após injeção de quimioterápico 5-FU, com agulha afiada.

4.4 Fototerapias

O laser de baixa potência (LBP) utilizado foi um laser do tipo InGaAlP da MMOPTICS® Ltda (TWIN laser, São Carlos, SP, Brasil) com ponteiras de diodo com a área do spot de 0,04 cm² (Figura 4.2). Para todos os grupos o equipamento foi programado no comprimento de onda vermelho (660 nm) com 40 mW de potência. Os protocolos foram definidos levando em consideração 3 modos de aplicação e energia diferentes: protocolo 1, com uma energia mais baixa com um ponto central; protocolo 2, energia mais alta em um ponto central e protocolo 3, energia alta total dividida ao redor da área demarcada, em quatro pontos. Dessa forma, para os grupos L1 e L3 foi aplicado 6 J/cm² e energia de 0,24 J por ponto, onde para o grupo L1 apenas um ponto central foi realizado e, para o grupo L3, quatro pontos foram realizados na mucosa bucal, totalizando 0,96 J de energia total e 24J/cm² de densidade de energia total. Para o grupo L2 foi utilizado 25 J/cm² e energia de 1 J por ponto. Apenas um ponto central foi realizado para o tratamento da mucosite oral (MO) dos animais pertencentes a esse grupo.

Para todas as técnicas a seguinte fórmula foi obedecida:

$$DE = \frac{P \times T}{A} \quad E = DE \times A$$

Onde: DE é densidade de energia laser (J/cm²) e E representa a energia laser (J); P = potência (W) T = tempo de irradiação (s) e A = área do spot do laser (cm²).

Todos os princípios de segurança foram seguidos, onde o investigador usou óculos de proteção específicos para o comprimento de onda emitido pelo aparelho, durante todo o tempo em que o laser esteve ligado. Os procedimentos de biossegurança também foram seguidos: o investigador fez uso de luva de látex, a peça de mão e a ponta do laser foram devidamente recobertas por filme de Policloreto de Vinila (PVC) e após cada utilização, as peças de mão e o corpo do equipamento foram desinfetados com lenços umedecidos em solução de álcool (70%).

Figura 4.2 – A: Método de aplicação do Laser, perpendicular a superfície, em contato; B: Equipamento de Laser MMOptics utilizado (TWIN laser, São Carlos, SP, Brasil); C: Esquema representativo dos métodos de aplicação do laser: 1- área representativa de ranhura induzida, 2- Modo de aplicação do grupo L1 ($6\text{J}/\text{cm}^2$, $0,24\text{J}$ total em 6 segundos) e grupo L2 ($25\text{J}/\text{cm}^2$, 1J total em 25 segundos), 3- Modo de aplicação do grupo L3 ($6\text{J}/\text{cm}^2$, $0,96\text{J}$ total em 6 segundos cada ponto).

4.5 Análises clínicas e Histológicas

4.5.1 Análise clínica – Mucosite Oral

As duas mucosas de cada *hamster*, direita e esquerda, foram avaliadas por dois examinadores calibrados, usando a escala proposta por Sonis et al., (1999) modificada para *hamsters* por Wilder-Smith et al., (2007) (Tabela 4.2) e fotografadas em um suporte próprio nos dias 5 e 7 do experimento (Figura 4.3). Dessa forma, 6 mucosas foram avaliadas por grupo. Para a classificação usando essa escala, a área demarcada de 1 cm^2 foi estimada, em relação à úlcera, em sem úlcera (grau 0), $<4\text{mm}^2$ (grau 1), $4-9\text{ mm}^2$ (grau 2) ou $>9\text{mm}^2$

(grau 3), e a severidade do eritema foi classificada em nenhum (grau 0), não severo (grau 1, com eritema leve, próximo a vermelho mais vivo) e severo (grau 2, eritema severo, com coloração próxima a vermelho escuro e roxo). Depois disso, as informações de ulcera e eritema foram cruzadas para chegar ao grau de MO em cada mucosa.

Tabela 4.2 - Classificação da mucosite oral de acordo com Wilder-Smith (2007)

Área de ulceração		Severidade do eritema		
Nada	0	Nada	Não severo	Severo
		0	1	2
<4 mm ²	1	1	2	3
	2	2	3	4
4-9 mm ²	2	2	3	4
> 9mm ²	3	3	4	5
	3	3	4	5

Figura 4.3 – Suporte para fotografia. A câmera foi posicionada a distância de 17,9cm da base do suporte para as fotos.

4.5.2 Massa corpórea dos animais e consumo de comida e água

Durante o período experimental, os animais foram pesados todos os dias. Em relação ao consumo de água e comida, no dia 1 eram colocados 300 mg de comida paletizada e 600 ml de água para os animais, suficientes para o tempo de acompanhamento experimental. No último dia, eram aferidas as quantidades de água e comida consumidas.

4.5.3 Análises Histológicas - Microscopia de luz

As mucosas direita e esquerda de cada *hamster* foram removidas imediatamente após a eutanásia e fixadas em formaldeído 4% (preparado momentos antes com paraformaldeído) e 0,1% de glutaraldeído (Polysciences, PA, USA) tamponado em fosfato 0,1 M a pH 7,2. Os tecidos foram preparados para análises histológicas em microscopia de luz, em concentrações crescentes de álcool para subsequente inclusão em parafina. Seções centrais de 4 micrometros foram cortadas usando uma navalha de baixo perfil (Crystal PlusTM) em um micrótomo (MICROM HM 360, Germany) e marcadas com hematoxilina e eosina. As imagens digitais foram adquiridas utilizando um microscópio de luz (Olympus BX60 optical microscope, Olympus, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera digital (Olympus DP72 Camera, Olympus, Tóquio, Japão) e conectados a um microcomputador com *software* para análise de imagens (Cell F, Olympus, Tóquio, Japão) (Figura 4.4), em aumento de 20x.

Figura 4.4 – Sistema para obtenção das imagens dos cortes histológicos através do microscópio de luz acoplado a uma câmera digital e conectado a um microcomputador.

4.6 Análises estatísticas

Testes estatísticos de Kruskal-Wallis foram realizados para comparação dos resultados clínicos intergrupos em cada dia de avaliação (comparação entre grupos) e testes de Friedman foram realizados intragrupo ao longo dos dias (evolução de cada grupo). Todos dados coletados foram registrados em um banco de dados elaborado em programa Microsoft Excel versão 2007 e as análises estatísticas foram realizadas no programa BIOSTAT versão 5.0 para Windows Vista. Foi utilizado um nível de significância α de 5% em todos os testes estatísticos. Para a elaboração de gráficos e tabelas, foi utilizado o software Microsoft Office Excel 2007 com a extensão Stat Action Pro 2005 - Estatcamp.

5 RESULTADOS

5.1 Análises qualitativas da distribuição das classificações da mucosite oral em cada grupo

➤ **Grupo C:**

- Dia 4 ao dia 7: Todas as mucosas não apresentaram MO (classificação 0 na escala utilizada);

➤ **Grupo CQ:**

- Dia 4: a distribuição das classificações de MO manteve-se entre os graus 1 e 2, com mediana igual a 2 e média calculada igual a 1,67, interpretada como: a média é igual a 1, mas apresenta tendência a se tornar 2;
- Dia 5: a distribuição das classificações de MO ficou entre os graus 2 e 3, com mediana igual a 3 e média calculada 2,6, interpretada como: a média é 2, mas apresenta tendência a se tornar 3;
- Dia 6: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada nos graus 3 e 4, sendo mediana e média calculada igual a 3,5, interpretada como: a média é 3, com tendência a se tornar 4;
- Dia 7: a maioria das mucosas recebeu classificação de MO 5, com apenas uma mucosa classificada como grau 4. Mediana 5 e média calculada igual a 4,83, interpretada como: a média é 4, com tendência a se tornar 5;

➤ **Grupo L1**

- Dia 4: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre graus 1 e 2, com mediana e média calculada iguais a 1,5, interpretada como: a média é 1, com tendência a se tornar 2;
- Dia 5: a distribuição das classificações de MO ficou entre 1 e 2, com mediana igual a 2 e média 1,67, interpretada como: a média é 1, com tendência a se tornar 2.

- Dia 6: a distribuição das classificações de MO ainda se manteve entre 1 e 2, mas com mediana igual a 1 e média 1,3, interpretada como: a média é 1 apresentando tendência em permanecer nesse valor;
- Dia 7: as classificações de MO ficaram entre 0 e 1, com mediana 1 e média 0,83 e apenas uma classificação igual a 2, interpretada como: a média é 0 com tendência a se tornar 1;

➤ **Grupo L2**

- Dia 4: apresentou distribuição de MO semelhante ao grupo CQ, com também mediana igual a 2 e média igual a 1,67, apresentando a mesma tendência;
- Dia 5: distribuição de MO semelhante ao grupo L1, com mediana igual a 2 e média 1,67, apresentando a mesma tendência;
- Dia 6: única classificação de MO com valor 1 e todas as outras com classificação 2, com mediana igual a 2 e média 1,83, interpretada como: a média é 1, com tendência a se tornar 2;
- Dia 7: todas as classificações ficaram entre os graus 1 e 2, com um único valor igual a 3, mediana 1,5 e média calculada 1,67, interpretada como: a média é 1, com tendência a se tornar 2;

➤ **Grupo L3**

- Dia 4: todas as classificações foram iguais a 2 e, conseqüentemente, média e mediana assumiram o mesmo valor
- Dia 5: As classificações ficaram entre 2 e 3, com mediana igual a 2 e média calculada 2,33, interpretada como: a média é 2, com tendência a permanecer nesse valor;
- Dia 6: Todas as classificações foram iguais a 3, com exceção de duas mucosas classificadas em 4 e 2. Média e mediana também foram iguais a 3.
- Dia 7: Classificações de MO ficaram compreendidas entre os graus 2 e 4, apenas uma mucosa classificada com grau 2. Mediana e média calculada igual a 3, interpretada como: a média é 3, com tendência a permanecer nesse valor.

Clinicamente, no dia 5, o aspecto da mucosa foi similar entre os grupos CQ, L1, L2 e L3, mas no dia 7 foi possível observar uma melhora da MO no grupo L1 e L2, que não foi observada nos grupos CQ e L3 (Figura 5.1). Todos os animais tratados com QT apresentaram sinais sistêmicos como: alopecia, secreções nos olhos e diarreia.

Figura 5.1 – Comparação clínica das mucosas dos *hamsters* de cada grupo, nos dias 5 (D5) e 7 (D7). C, Controle; CQ, Controle-Quimioterapia; L1, FLBP 6 J/cm²/0,24J – um ponto; L2, FLBP 25J/cm²/1J – um ponto; L3, FLBP 6 J/cm²/0,96 J – quatro pontos de 0,24J.

5.2 Avaliações clínicas Intergrupos da Mucosite Oral

Os valores da escala de Wilder Smith foram atribuídos para cada mucosa a partir do dia 4. O gráfico 5.1 apresenta os valores máximo, mínimo, média e mediana, com as distribuições de cada grupo em cada dia de observação. Em relação à média e à distribuição de classificações obtida por cada grupo em cada dia, no dia 4, o primeiro dia de indução da MO, os grupos CQ, L1, L2, L3 apresentaram grau de mucosite maiores que o grupo C, como esperado ($p<0,05$). O grupo L3 apresentou todas as mucosas com grau de mucosite 2, enquanto os demais grupos variaram as classificações entre 1 e 2. No dia 5, o grau de mucosite dos grupos L1 e L2 mantiveram-se com graus próximos aos valores anteriores e menores do que o grupo CQ, em cerca de 40%. O grupo L1 apresentou grau de MO menor que o grupo CQ em aproximadamente 62% no dia 6 e 83% no dia 7 ($p<0,05$), ficando mais próximo do grupo C. O grupo L2 também apresentou MO menor do que o grupo CQ: 49% menor no dia 6 e 65% menor no dia 7 ($p<0,05$). O grupo L3, assim como o grupo L2, manteve os níveis de MO similares do dia 4 ao dia 7, com diferença estatística com o grupo CQ somente no dia 7, no qual o grau de MO foi cerca de 38% menor. Entre os protocolos de FLBP, o que manteve os graus de MO mais baixos foi o L1, seguido dos protocolos L2 e L3 ($p<0,05$) (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Evolução da mucosite oral em cada grupo do dia 4 ao dia 7, de acordo com a escala de W-Smith para MO. Letras diferentes indicam relevância estatística entre os grupos em cada tempo experimental ($p < 0,05$); C, Controle; CQ, Controle-Quimioterapia; L1, FLBP 6 J/cm²/0,24J – um ponto; L2, FLBP 25J/cm²/1J – um ponto; L3, FLBP 6 J/cm²/0,96 J – quatro pontos de 0,24J; Círculos coloridos: média; Linha em negrito: mediana; Ponto escuro: Máximo e mínimo valores únicos. Teste de Kruskal-Wallis.

5.3 Avaliações clínicas Intragrupos da mucosite oral

Na comparação intragrupo durante o tempo experimental, apenas o grupo CQ apresentou diferenças estatísticas na classificação de mucosite oral, quando comparadas as classificações determinadas nos dias 4 e 5 com a classificação do dia 7 ($p = 0,0008$), no qual foram observados aumento de 190% e 81%, respectivamente, enquanto o grupo L1 mostrou tendência a diminuir o grau de MO do dia 4 ao dia 7, de 1,5 (aproximadamente 2) para 0,83

(aproximadamente 1); o grupo L2 manteve o grau ao redor de 1,67 (aproximadamente 2) e o grupo L3 aumentou do grau 2 para 3.

5.4 Consumo de comida, água e perda de massa corpórea

Nenhuma diferença estatística foi encontrada no consumo de água e comida, ou na perda de massa corpórea. Entretanto, o grupo L1 teve o maior consumo de água, 8% a mais que o grupo C, 15% a mais que o grupo CQ, 75% mais que o grupo L2 e 80% mais que o grupo L3. Para consumo de comida, o grupo L1 seguiu o mesmo padrão: 8% mais que o grupo C, 47% mais que o grupo CQ, 31% mais que o grupo L2 e 43% mais que o grupo L3. No entanto, o grupo C foi o que teve menor perda de massa corpórea: 66% menos que o grupo CQ, 67% menos que o grupo L1, 78% menos que o grupo L2 e 64% menos que o grupo L3 (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 – Comparação entre o consumo de água e comida e a perda de massa corpórea no dia 7 ($p>0,05$). Teste de Kruskal-Wallis. C, Controle; CQ, Controle-Quimioterapia; L1, FLBP 6 J/cm²/0,24J – um ponto; L2, FLBP 25J/cm²/1J – um ponto; L3, FLBP 6 J/cm²/0,96 J – quatro pontos de 0,24J.

5.5 Análises histológicas

Alguns aspectos histológicos foram observados nos grupos experimentais no dia 7. O grupo C apresentou um exemplo de aspecto de tecido íntegro: epitélio contínuo e tecido conjuntivo da lamina própria com presença de fibras musculares e vasos sanguíneos (Katchburian; Arana-Chavez, 2012) (Figura 5.2). O grupo CQ apresentou uma úlcera evidente e um epitélio descontínuo; o tecido conjuntivo subjacente apresentou infiltrado inflamatório moderado a intenso, com presença de extravasamento de células sanguíneas e necrose abaixo da ulcera. O aspecto do grupo L1 foi semelhante ao do grupo C, com um epitélio contínuo e mais organizado que o grupo CQ e ausência de células inflamatórias no tecido conjuntivo. O grupo L2 apresentou o mesmo padrão dos grupos C e L1, com um aspecto contínuo de um fino epitélio, e alguns vasos sanguíneos no tecido conjuntivo. O padrão do grupo L3 parece ser um estágio intermediário entre o grupo CQ e os grupos L1 e L2, devido à aparência de regeneração epitelial na região de úlcera, na qual a camada basal parece estar se formando e o epitélio não está totalmente organizado; é também observado um extravasamento de células sanguíneas e uma pequena região de necrose na lamina própria (Figura 5.3).

Figura 5.2 – Fotomicrografia da mucosa oral do grupo Controle. m, fibras musculares; VS, vasos sanguíneos. Coloração com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 20x.

Figura 5.3 – Fotomicrografia da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos grupos CQ (Controle-Quimioterapia), L1 (FLBP 6 J/cm²/0,24J – um ponto), L2 (FLBP 25J/cm²/1J – um ponto) and L3 (FLBP 6 J/cm²/0,96 J – quatro pontos de 0,24J) no dia 7. Setas, úlceras; Asteriscos (*), extravasamento de células sanguíneas; IN, infiltrado inflamatório; VS, vasos sanguíneos; M, fibras musculares; NE, necrose; RE, regeneração epitelial. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 20x.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a laserterapia tem se mostrado uma boa alternativa para o manejo da mucosite oral (MO). Modelos animais têm sido utilizados com sucesso para determinar qual seria o melhor protocolo (comprimento de onda, potência, frequência, tempo e modo de aplicação) para manter a MO em graus baixos ou para acelerar a sua reparação. No presente estudo, os três protocolos propostos foram capazes de manter a MO em graus menores que o grupo CQ, mas apenas o grupo L1, que recebeu um ponto central de aplicação e 0,24 J de energia, apresentou diferença expressiva no dia 7.

A distribuição das classificações em cada grupo não foi muito discrepante, o que resultou na média das classificações em graus de mucosite de cada grupo próxima à mediana, indicando que o fenômeno analisado obedece a uma distribuição normal de probabilidades que poderá ser futuramente comprovada com um maior número de animais por grupo. Mesmo assim, foi possível determinar diferenças e tendências importantes com um número menor de amostras.

Seguindo o modelo de indução de MO em *hamsters*, proposto por Sonis et al. (1990), alguns estudos testaram os efeitos da fototerapia com laser de baixa potência (FLBP) na MO. Em 2009, França et al., comparando um grupo controle (sem tratamento) com um grupo de FLBP em 660 nm, 30 mW e 1,2 J/cm² divididos em quatro pontos de 0,4 J, observaram que o grupo que recebeu a laserterapia apresentou reparação mais rápida do que o grupo sem tratamento. Outro estudo (Lopez et al., 2013) dividiu os *hamsters* em dois grupos: controle (sem tratamento) e grupos experimentais, que receberam FLBP para prevenção e tratamento de MO, ou associação dos dois. O grupo que recebeu a FLBP apresentou resultados positivos para diminuição da MO, quando o laser aplicado no protocolo terapêutico, com 40 mW, 6,6 J/cm² de densidade de energia divididos em 6 pontos de 0,24 J de energia em 6 segundos por ponto (Lopez et al., 2013)

Similarmente, no presente estudo, o grupo L1 que recebeu 6 J/cm²/0,24 J, 6 segundos de aplicação em um ponto central da superfície de indução da MO, mostrou os melhores resultados em reparação da MO, seguido pelos grupos L2 (25 J/cm²/ 1 J, 25 segundos em um ponto central) e L3 (6 J/cm²/0,96 J divididos em

quatro pontos de 6 segundos cada, no perímetro da área de indução da MO). Assim, é possível inferir que o modo de aplicação de um ponto localizado centralmente dos grupos L1 e L2 é mais efetivo que os quatro pontos aplicados no perímetro da área de indução da MO, do grupo L3. A menor energia por ponto também se mostrou melhor para o reparo de MO no grupo L1. Dessa forma, se o grupo L3 tivesse um quinto ponto central de aplicação, talvez esse grupo apresentasse melhores resultados, até mesmo que os apresentados pelo grupo L1, assim como os resultados descritos por Lopez et al. (2013), onde foram aplicados seis pontos distribuídos em toda superfície de MO, com 0,24 J por ponto.

Baseado na literatura dos últimos anos, Simões et al. (2015) sugeriram alguns aspectos e parâmetros importantes da FLBP, que endossam os resultados obtidos. Um deles é a aplicação em contato e perpendicular à superfície, porque isso garante que a quantidade de energia calculada atinja o tecido alvo. Além disso, levando em conta os resultados obtidos no presente estudo, a posição do feixe de laser em relação com o centro da lesão e a menor quantidade de energia por ponto poderia ser outro fator importante a ser considerado durante a irradiação com laser.

Em relação ao consumo de água e comida, embora não houve diferenças estatísticas entre os grupos, o grupo C e o grupo que recebeu menor quantidade de energia por ponto (L1) apresentaram resultados semelhantes, indicando melhor reparo de MO no grupo L1, o que teria proporcionado aos *hamsters* comer e beber mais que os animais dos outros grupos. Assim como esperado, o grupo C teve menor perda de massa corpórea, ao contrário do grupo que recebeu maior energia em um ponto (L2), que perdeu mais massa corpórea que os demais grupos. O grupo CQ apresentou perda de massa corpórea similar ao grupo L1 e L3 e consumo de comida similar ao grupo L3 (grupo que recebeu a energia distribuída em 4 pontos ao redor da lesão). Entretanto, são necessários mais estudos com um maior número de amostras para confirmar esses resultados. Todavia, os sinais clínicos decorrentes do tratamento quimioterápico, observados em todos os animais tratados, tais como diarreia, alopecia, presença de secreções e redução da ingestão de alimentos e água, com consequente perda de peso, confirmam a padronização da metodologia (Daniele et al., 2001; França et al., 2009; Cruz et al., 2015; Sonis et al., 2016). A perda de massa corpórea pode ter sido provocada também pela indução de MO e a consequente dificuldade de alimentação, além dos efeitos sistêmicos do 5-FU, da

manipulação diária, aplicação de anestesia e estresse do animal (França et al., 2009; Cruz et al., 2015).

A mucosite ocorre em todo o trato gastrointestinal, que, além de impossibilitar a ingestão pela boca, dificulta a absorção de água e nutrientes, causando deficiência nutricional e debilitando ainda mais a condição física, tanto dos animais utilizados em estudos, quanto dos pacientes oncológicos (Daniele et al., 2001; Kefee, 2007; Villa, Sonis, 2015; Sanders et al., 2016).

Em relação aos achados histológicos, outros estudos com animais também mostraram resultados similares aos observados nesse presente estudo. França et al. (2009) demonstraram intenso infiltrado inflamatório e escasso tecido de granulação no grupo que recebeu apenas indução de MO, sem tratamento; por outro lado, na mucosa que recebeu a FLBP, foi observado uma organização de fibrilas colágenas, menor infiltrado inflamatório e expressiva angiogênese. Esses resultados são confirmados por Lopes et al. (2010), que constataram que a FLBP induziu organização do colágeno e pareceu estar relacionada à regulação da inflamação, ao reduzir o infiltrado de neutrófilos. Além disso, Cruz et al. (2015), em um estudo realizado em *hamsters*, que receberam o mesmo protocolo de indução de MO (Sonis et al., 1990) e protocolo de laser de baixa potência (LBP) com uma dose maior de irradiação (120 J/cm^2 , 40 mW e 4,4 J de energia) mostraram resultados histológicos similares no grupo laser, no dia 10, aos observados nos grupos L1 e L2, do presente estudo, no dia 7. Assim, a menor quantidade de energia aplicada, perpendicular e no centro da lesão demonstrou processo de reparo mais rápido, quando comparado com aqueles achados por Cruz et al. (2015), que está em acordo com a idéia de que há diversos parâmetros que podem interferir no efeito do LBP na superfície do tecido irradiado.

O grupo L3 apresentou aspecto melhor que o grupo CQ, com o início da formação da camada basal e organização epitelial e conjuntiva, sinalizando que a irradiação com LBP em maior número de pontos de baixa energia (0,24J) também pode ser interessante para o reparo e, como discutido, poderia apresentar resultados ainda melhores se houvesse um quinto ponto de estímulo central na área da lesão, como foi realizado para os grupos L1 e L2 que apresentaram tendência a melhores graus de MO e melhores aspectos histológicos (sem presença de úlcera).

Corazza et al. (2007), analisaram os efeitos do LBP e do LED na cicatrização da pele de rato e mostraram que a densidade de energia de 5 J/cm² foi melhor que a de 20 J/cm², similarmente aos resultados obtidos para os grupos L1 (6J/cm²) e L2 (25J/cm²), no presente estudo. Esses resultados mostram que a FLBP promove o reparo do tecido, mas a diferença na velocidade e efetividade dos resultados pode estar relacionada à quantidade de energia entregue, além dos outros parâmetros já citados do modo de aplicação (Corazza et al., 2007; Tunér, Hode, 2010; Freitas, Simões, 2015).

Em estudos envolvendo pacientes, além da aceleração no reparo da MO, também foi observada a capacidade do LBP em manter a MO em níveis mais brandos (Schubert et al., 2007; Jaguar et al., 2007; Simões et al., 2009; Eduardo et al., 2009; Carvalho et al., 2011). Simões et al. (2009), observaram que o LBP, quando aplicado três vezes na semana, foi capaz de manter os graus de classificação de MO entre 1 e 2. Essa constatação também foi feita por Eduardo et al. (2009), que perceberam que o tratamento de MO com LBP manteve as classificações em graus baixos (1 e 2) em pacientes de transplante de medula óssea. Os dois trabalhos usaram energia por ponto de 0,24 J e mostraram resultados semelhantes aos grupos L1 (0,24 J) e L2 (1 J) do presente estudo, que foram capazes de manter por todo o tempo experimental (do dia 4 ao dia 7) os graus de MO das mucosas também entre os graus 1 e 2, sendo que o grupo L1 apresentou tendência a resultados melhores que o grupo L2.

Em estudo piloto mais recente, Soto et al. (2015), também verificaram a capacidade do LBP em manter os graus de MO entre 1 e 2, usando energia por ponto de 0,35 J em crianças submetidas a transplante de medula óssea. Outros estudos, com energia um pouco menores, evidenciaram o potencial da FLBP em diminuir a severidade da MO (Schubert et al., 2007; Jaguar et al., 2007; Carvalho et al., 2011). Entretanto, ainda falta um consenso a respeito de qual seria o melhor protocolo para proporcionar os melhores resultados e aumentar a qualidade de vida dos pacientes durante tratamento oncológico.

Alguns trabalhos tem mostrado que esses efeitos de reparação, provocados pelo LBP em MO, tem relação com a modulação da via da Ciclo-Oxigenase (COX) da inflamação, consequentemente diminuindo seus produtos como prostaglandinas (Wallace, 2006), além de constatar diminuição de neutrófilos (Lopes et al., 2010). Além disso, já foi sinalizada a influência dessa terapia em citocinas pro-inflamatórias,

como interleucinas e TNF- α (Gao; Xing, 2009; Simunović-Soskić et al., 2010) e essa resposta tecidual de reparação ao LBP parece ser dependente da quantidade de energia e protocolo utilizado (Lopes et al., 2010). Apesar disso, não há ainda evidências científicas suficientes que comprovem esses mecanismos de ação do LBP.

Dessa forma, estudos que comparem diferentes protocolos e que expliquem o mecanismo de modulação do LBP, principalmente em inflamação e reparo da MO, ainda são necessários para comprovar os resultados obtidos e determinar qual protocolo produz a melhor resposta.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, dentro das limitações do presente estudo, nossos resultados sugerem que a energia e o modo de aplicação do LBP interferem na cura da mucosite oral, sendo que o protocolo de menor energia em um ponto central foi o melhor para manter os graus de mucosite mais baixos e para reparação tecidual. Entretanto, são necessários mais estudos dosimétricos que explorem os mecanismos de ação da laserterapia.

REFERÊNCIAS¹

Al-Dasooqi N , Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, Logan RM, Nair RG, Stringer AM, Yazbeck R, Elad S, Lalla RV. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer*. 2013 Nov;21(11):3233-41.

Almeida VL, A Leitão, LCB Reina, CA Montanari, CL Donnici. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím. Nova*. 2005 Jan; 28(1):118-129.

Antunes HS, de Azevedo AM, da Silva Bouzas LF, Adão CA, Pinheiro CT, Mayhe R, Pinheiro LH, Azevedo R, D'Aiuto de Matos V, Rodrigues PC, Small IA, Zangaro RA, Ferreira CG. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood*. 2007 Mar; 1;109(5):2250-5.

Antunes HS, Schluckebier LF, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CM, Viégas CM, Rampini MP, Ferreira EM, Dias FL, Teich V, Teich N, Ferreira CG. Cost-effectiveness of low-level laser therapy (LLLT) in head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation. *Oral Oncol*. 2016 Jan; 52:85-90.

Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tunè J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2011 Aug; 19(8):1069-77.

Blijlevens N1, Schwenkglenks M, Bacon P, D'Addio A, Einsele H, Maertens J, Niederwieser D, Rabitsch W, Roosaar A, Ruutu T, Schouten H, Stone R, Vokurka S, Quinn B, McCann S. Prospective oral mucositis audit: oral mucositis in patients receiving high-dose melphalan or BEAM conditioning chemotherapy – European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. *J Clin Oncol*. 2008 Mar; 20;26(9):1519-25.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2015. 122p.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):351-69.

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2012. p.903-49.

Campos L, Simões A, Sá PH, Eduardo Cde P. Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2009 Apr;27(2):371-4.

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

Carvalho PAG, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD, Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: A double-blind randomized study in head and neck cancer patients. *Oral Oncology*. 2011 Dec;47(12):1176-81.

Chan KK, Glenny AM, Weldon JC, Furness S, Worthington HV, Wakeford H. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: targeted therapy and immunotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Dec;12:CD010341

Chen L, Malhotra A. Combination Approach: the future of the war against cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Jul;72(3):637-41.

Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S. Late effects of Radiation Therapy in the head and Neck Region. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 1995 Mar;31(5):1141-64.

Corazza, AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr;25(2):102-6.

Cruz, EP, Campos L, Pereira FS, Magliano GC, Benites BM, Arana-Chavez VE, Ballester RY, Simões A. Clinical, biochemical and histological study of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Jun;12(2):298-309.

Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, Pignata S, De Magistris L, Delrio P, Palaia R, Barletta E, Tambaro R, Carratù R. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol*. 2001, Mar;32(3):228-30.

Eduardo FP, Bezinelli L, Luiz AC, Correa L, Vogel C, Eduardo CP. Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. *Photomed Laser Surg*. 2009 Feb;27(1):137-44.

França. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [internet]. Lyon,FR: IARC; 2012. [citado 2016]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

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

Freitas, PM, Simoes, A. Lasers in dentistry: Guide for clinical practice. 1 ed. New York: Willey Blackwell; 2015.

Fekrazad R, Chiniforush N. Oral Mucositis Prevention and Management by Therapeutic Laser in Head and Neck Cancers. *J Lasers Med Sci*. 2014 Winter; 5(1): 1–7.

Galletta, VC. Desenvolvimento de modelo de indução de mucosite oral por radiação em hamsters prevenção e tratamento por laser de baixa potência [mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Elétricas e Nucleares; 2006.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009 Jan; 12;16:4.

Gobbo M, Ottaviani G, Perinetti G, Ciriello F, Beorchia A, Giacca M, Di Lenarda R, Rupel K, Tirelli G, Zacchigna S, Biasotto M. Evaluation of nutritional status in head and neck radio-treated patients affected by oral mucositis: efficacy of class IV laser therapy. *Support Care Cancer*. 2014 Jul;22(7):1851-6.

Gutknecht NE, Eduardo de PC. A Odontologia e o Laser - Atuação do Laser na Especialidade Odontológica. 1. ed. São Paulo: Quintessence; 2004. 309p.

Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009 Sep;7(4):358-83.

Huxford T, Malek S, Ghosh G. Structure and mechanism in NFkB/IkB signaling. *Cold Spring Harbor Symp Quantit Biol*. 1999; 64:533-540

Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, Pinheiro MC, de Castro DO Jr, da Cruz Perez DE, Alves FA. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis*. 2007 Nov;13(6):538-43.

Jaguar GC, Lima EN, Kowalski LP, Pellizzon AC, Carvalho AL, Boccaletti KW, Alves FA. Double blind randomized prospective trial of bethanechol in the prevention of radiation-induced salivary gland dysfunction in head and neck cancer patients. *Radiother Oncol*. 2015 May;115(2):253-6.

Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1986; 291(5):1245-9.

Karu TI, Piatibrat LV, Kalendo GS. Radiation-modifying effect of UV and visible laser light. *Radiobiologiya*, 1987 Nov-Dec;27(6):804-9.

Karu TI, Tiphlova OA, Matveyets YuA, Yartsev AP, Letokhov VS. Comparison of the effects of visible femtosecond laser pulses and continuous wave laser radiation of low average intensity on the clonogenicity of *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Sep;10(4):339-44.

Karu T, Andreichuk T, Ryabykh T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers Surg Med*. 1993;13(4):453-62.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci*. 2004a Feb;3(2):211-6.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol*. 2004b Set-Oct;80(2):366-72.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*. 2008 Sep-Oct;84(5):1091-9.

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

Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD, Peterson DE. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 2007; 109:820–831.

Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Curr Opin Oncol*. 2007 Jul;19(4):323-7.

Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, McGuire DB, Migliorati C, Nicolatou-Galitis O, Peterson DE, Raber-Durlacher JE, Sonis ST, Elad S. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014 May;120(10):1453-61.

Lansiaux A. Antimetabolites. *Bull Cancer*. 2011 Nov;98(11):1263-74.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol Ther*. 2008 Jul;7(7):1139-45.

Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MA, Alves MT. Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):546-52..

Lopez TC, MD Martins, VC Pavesi, LS Ferreira, SK Bussadori, MS Moreira, MM Marques. Effect of laser phototherapy in the prevention and treatment of chemo induced mucositis in hamsters. *Braz Oral Res*. 2013 Jul-Aug;27(4):342-8.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J. Photo&em. Photobiol. B: Biol*. 1992; 12: 305-310.

Machado SM, Sawada NO. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. *Texto Contexto Enferm* 2008 Oct-Dec; 17(4): 750-7.

Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*. 1960 Aug;187,493- 4. doi:10.1038/187493a0.

Mansano-Schlosser TC, Ceolim MF. Quality of life of cancer patients during the chemotherapy period. *Text Context Nursing*. 2012 Jul-Set; 21(3): 600-7.

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

Michel C, Neubauer A, Burchert A. Molecular tumour therapy. *Internist (Berl)*. 2015 Dec;56(12):1389-402.

Mortensen HR1, Overgaard J, Specht L, Overgaard M, Johansen J, Evensen JF, Andersen LJ, Andersen E, Grau C. Prevalence and peak incidence of acute and late normal tissue morbidity in the DAHANCA 6&7 randomised trial with accelerated radiotherapy for head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2012 Apr;103(1):69-75.

Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastry SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review. *J Investig Clin Dent*. 2015 Feb;0,1-3. doi: 10.1111/jicd.12148.

Sanders KJ, Hendriks LE, Troost EG, Bootsma GP, Houben RM, Schols AM, Dingemans AC. Early weight loss during chemoradiotherapy has detrimental impact on outcome in NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2016 Feb;1556-0864(16)00435-4.

Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, Lloid CM, Eduardo CP, Walter NF, Marques MM, Hamdi M. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2007 Oct;15(10):1145-54.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug; 46(5):705-16.

Shih AM, Miaskowski C, Ddd MJ, Stotts NA, MacPhail L. A Research Review of the Current Treatments for Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients with Head and Neck Cancer. *Continuing Education*. 2002 Aug;29(7):1063-80.

Siebenlist U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb;1332(1):R7-13.

Silva GBL, Sacono NT, Othon-Leite AF, Mendonça EF, Arantes AM, Bariani C, Duarte LGL, Abreu MHN, Queiroz-Junior CM, Silva TA, Batista AC. Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan;30(1):117-26.

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

Simões A, Eduardo FP, Migliorati CA, Schubert M. Low Level Laser Therapy in the Prevention and treatment of Oral Mucositis. In: Fretas P, Simões A. *Lasers in Dentistry: Guide for clinical practice*. York: Willey Blackwell; 2015. p. 321-30.

Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarić S, Brumini G, Glazar I, Grzić R, Miletić I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2010 Apr;28(2):189-93.

Smith KC. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Therapy*. 1991; (3):9-25.

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

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004 May; 100(9):1995–2025.

Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol*. 2007, Oct;5(9):3-11.

Sonis ST. Oral Mucositis. *Anti-Cancer Drugs*. 2011 Feb; 22:607–612.

Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2016 Mar;54:7-14.

Sonis, ST, JP Eilers, JB Epstein, FG LeVeque, WH Jr Liggett, MT Mulagha, DE Peterson, AH Rose, MM Schubert, FK Spijkervet, JP Wittes. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. *Cancer*. 1999; 85(10):2103-13.

Soto M, Lalla RV, Gouveia RV, Zecchin VG, Seber A, Lopes NN. Pilot study on the efficacy of combined intraoral and extraoral low-level laser therapy for prevention of oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Photomed Laser Surg*. 2015 Nov;33(11):540-6.

Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol*. 2003; 66(3):253-62. 3.

Tunér J, Hode L. *The new Laser Therapy Handbook*. ed. Sweden: Prima Books AB; 2010.

Villa A, Sonis ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 2015 May;27(3):159-64.

Vissink A. Oral Medicine, more than just a mouth full. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2004;111(6):230-1.

Vladimirov luA, Klebanov GI, Borisenko GG, Osipov AN. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. *Biofizika*. 2004 Mar-Apr;49(2):339-50.

Wallace JL. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. *Sci World J*. 2006; 6:577—88.

Wilder-Smith, P, MJ Hammer-Wilson, J Zhang, Q Wang, K Osann, Z Chen, H Wigdor, J Schwartz, J Epstein. In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(8):2449-54.

ANEXO A – Certificado CEUA **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **010/2015** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, Coordenadora da Linha de Pesquisa **"Efeito terapêutico de diferentes protocolos de LBP na mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil em hamsters"** do qual participam os pesquisadores Lúana Campos, Claudia Carrara Cotomacio, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **04/05/2015**, com validade de **03 (três) anos**.

São Paulo, 15 de maio de 2015.

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