LUANA DE CAMPOS

**Estudo clínico, bioquímico e histológico comparativo do efeito das
fototerapias LED, laser de baixa e alta potência na mucosite oral e do
efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares em *hamsters*
tratados com 5-Fluorouracil**

São Paulo

2013

LUANA DE CAMPOS

Estudo clínico, bioquímico e histológico comparativo do efeito das fototerapias LED, laser de baixa e alta potência na mucosite oral e do efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares em *hamsters* tratados com 5-Fluorouracil

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Biomateriais e Biologia oral.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

Co-orientadora: Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves

São Paulo

2013

Campos L. Estudo clínico, bioquímico e histológico comparativo do efeito das fototerapias LED, laser de baixa e alta potência na mucosite oral e do efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares em *hamsters* tratados com 5-Fluorouracil. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____

À Deus, pela vida e força que me permitiu realizar esse trabalho...

...aos meus amados pais, pela paciência, amor incondicional, incentivo na minha formação, por estarem sempre presentes em minha vida e pelo exemplo de competência e profissionalismo!

À vocês tenho eterna gratidão e amor...

...ao meu avô Mário (*in memoriam*) pelo exemplo de força e caráter, espero ser um dia tão grande quanto ele...

...a Alyne, pela confiança, incentivo, amizade e pelo exemplo de responsabilidade como pesquisadora...

...eu dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades! Por ter me presenteado com pessoas tão especiais com quem pude estudar e trabalhar durante todos estes anos. Agradeço a ELE por estar sempre no comando da minha vida!

Em especial ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, um grande amigo e orientador deste trabalho, por ter me recebido, confiado em meu trabalho, ter me dado a honra de fazer parte do seu laboratório, por todas as oportunidades a mim concedidas, sempre me mostrando o caminho certo a ser seguido, de forma única, admirável e exemplar. Meu grande exemplo de dedicação à ciência, ética e profissionalismo. Orgulho-me muito por ter sido sua aluna!

À minha co-orientadora, prima e amiga Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, minha mãe na ciência! Minha tutora mesmo antes de entrar na FOU SP, continuou me acompanhando por todos os anos de graduação e iniciação científica. Sempre acreditando no meu potencial, forneceu-me a base para minha vida de pesquisadora, me ensinando a ter dignidade, honestidade, coragem e responsabilidade na minha vida profissional. Agradeço muito por tê-la ao meu lado, por toda sua dedicação e por todas as “brincas”, hoje percebo o quanto elas foram importantes para o meu crescimento! Sou, com muito orgulho, sua “cria” e espero continuar crescendo e aprendendo ao seu lado! Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata a você.

Ao ilustre Prof. Dr. Arthur R. Hand, meu supervisor durante o doutorado sânduíche que realizei na Universidade de Connecticut – Health Center, por me receber em sua casa e laboratório, me proporcionar a oportunidade de aprender mais sobre microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica. Sua educação, humildade, determinação e entusiasmo me motivaram e inspiraram muito.

(I would like to acknowledge Prof. Dr. Arthur R. Hand, my co-mentor during my sandwich doctorate period at University of Connecticut – Health Center, for hosting me in his house and laboratory, and also allowing me the opportunity to learn more about transmission electron microscopy and immunogold labeling. His politeness, humility, determination and enthusiasm have motivated and inspired me).

À FAPESP (Processo 2011/14013-1), CAPES (Processo 6257-12-7) e PROAP pelo apoio financeiro.

Aos meus amados pais, pelo constante apoio, incentivo, paciência e incansável torcida! Obrigada por me fornecerem uma base sólida, uma vida repleta de amor e compreenderem minha ausência em tantos eventos.

Aos meus irmãos, que sempre me acompanharam e apoiaram. A minha avó, tios, primos, madrinha e todos os meus familiares. Amo muito vocês!

Aos colegas do curso de graduação em Odontologia da FOU SP, Vinícius Teixeira, Magaly Zubieta, Mariana Abenza, Chelo, Márcio Cristóforo, Pedro Henrique Sá e Paty Uchiyama pela companhia e amizade. Em especial às amigas Lilian paraguaia e Simone Moretto por estarem sempre prontas a me ajudar, em qualquer circunstância, e pelas risadas diárias. Espero tê-las por perto para o resto da minha vida!

Aos professores do Laboratório de Bioquímica Oral, Prof. Dr. José Nicolau, quem me orientou durante dois anos de iniciação científica e tenho como grande mestre, e ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, pelos ensinamentos, bom-humor e amizade.

Ao coordenador da Pós-Graduação, Prof. Dr. Rafael Y. Ballester e aos demais professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Roberto Braga, Carlos Francci, Igor S. Medeiros, Josete Meira, Leonardo Eloy, Paulo

Cesar, Rosa Helena Grande, Paulo Capel e Walter Miranda. Vocês foram muito importantes para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Antonio Muench pela atenção e paciência ao me ajudar com as análises estatísticas. Eu jamais esquecerei a diferença entre fator e variável!

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, Douglas Nesadal, pela amizade, bom-humor e ensinamentos sem os quais esta tese jamais teria sido finalizada, e do Laboratório de Biologia Oral, Fernando pela dedicação e ajuda com os animais e limpeza das infinitas gaiolas que usei!

À técnica do laboratório de Biologia Celular da Universidade de Connecticut, Maya Yankova, por ter me ajudado em todos os momentos e ter se tornado uma grande amiga.

(I would also like to acknowledge the assist technical of Laboratory of Cell Biology at University of Connecticut, Maya Yankova, to help me in all moments and for becoming a great friend).

Às secretarias do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Rosa Cristina e Elidamar Guimarães, pela competência e disponibilidade em ajudar durante os momentos burocráticos da minha pós-graduação.

Às colegas do Laboratório de Biologia Oral (LBO), Vivian Bradaschia, Lorraine Braga, Mariana Moreira, Erika Cruz, Danielle Carvalho, Ana Carolina Romero, Flavia Ibuki, Claudia Rothbarth, Tatiane Donato, Eloiza de Rezende e Natasha Matheus, pessoas muito especiais das quais jamais esquecerei. Adoro vocês!

Aos “mascotes” tão queridos Juliana Castro, Giovanna de Castro, Taís Carvalho de Oliveira, Gabriela Campos Magliano e Filipi Pereira. Vocês foram

incríveis! Foi muito bom trabalhar com vocês, guardarei cada um de vocês em um espaço especial dentro do meu coração.

À secretaria do LBO, Edilene Mário, sempre prestativa, por cuidar do laboratório e pelo cafezinho especial, sempre nos momentos certos!

Aos colegas do programa de pós-graduação, Emerson, Fernando Maeda, André Guaraci, Fernando Taddeo, Erik de Lima, Lucas Pabis, Marcela Rodrigues, Lucas Hian, Ana Carolina Freitas e Bruno pela convivência descontraída. Em especial aos amigos Karen Akemi, por me acompanhar desde a graduação, Eugenio Garcia, pelas viagens históricas e temakis no posto, e Eduardo Inada por todas as risadas e confidências! Foi muito divertido trabalhar ao lado de vocês!

Ao grupo Cisne, Letícia Boaro, Marina Di Francescantonio e Helena Burlamaqui pela amizade sincera, viagens inesquecíveis e companheirismo. Vocês, com certeza, foram um dos melhores presentes que ganhei nos últimos anos.

Aos professores e colegas do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, quem me orientou em meu último ano de iniciação científica, meu exemplo de liderança, Profa. Dra. Patrícia Freitas e Profa. Dra. Ana Cecília Aranha pelo tempo de convivência, ensinamentos e oportunidades.

Ao “grupo mucosite”, Ana Claudia e Fernanda por todos os ensinamentos e amizade. Aos meus queridos e inesquecíveis pacientes, atendidos pelo grupo, minha eterna gratidão! Aprendi, cresci e me apaixonei ainda mais pelo meu trabalho graças a vocês.

Às secretárias do LELO, Liliane, Gê, Jô, Aroldo e Elaine pela amizade, momentos que passamos juntas e apoio. Vocês são muito especiais! Agradeço muito o carinho de vocês.

À minha querida Sunshine! Pela fiel companhia, carisma e amor.

Aos meus Brilhos, hamsters que doaram suas vidas para que este trabalho pudesse ser concluído. A eles eu dedico meu profundo respeito e gratidão!

À grande amiga Natalia de Angelis, minha fiel companheira, pela motivação, alegria, incentivo e por compreender minhas ausências em eventos. Você foi muito importante durante toda a minha jornada!

Ao meu amigo Nae, por todo apoio que me deu enquanto estudei nos Estados Unidos, um dos momentos mais difíceis e importantes da minha vida. A quem serei eternamente grata!

RESUMO

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

Considerando a mucosite oral (MO) e a hipofunção das glândulas salivares (HGS) consequências debilitantes da quimioterapia (QT), este trabalho teve como objetivo induzir, em *hamsters*, MO e HGS, através do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU), e comparar, através de análises clínicas, bioquímicas e histológicas, diferentes fototerapias no tratamento da MO, assim como o efeito do laser no tratamento da HGS. Cento e oitenta animais foram divididos em dois grupos, controle e experimental, onde, o grupo controle foi subdividido em grupo **C**, o qual recebeu somente anestesia/veículo de diluição do quimioterápico e o **CQ**, o qual recebeu anestesia/quimioterapia e indução da MO. O grupo experimental foi também subdividido em grupo **L**: com indução de MO e tratamento com LED, 630nm, 1,2J/cm²; **LA**: MO e tratamento com laser de alta potência (LAP), 808nm, 10J/cm²; **LB**: MO e tratamento com laser de baixa potência (LBP), 660nm, 6J/cm² e o **LG**: sem MO e tratamento com LBP, 780nm, 5J/cm², na região das glândulas salivares (GS) submandibulares (GSSM) e sublinguais GSSL). A MO foi induzida através de ranhuras após QT e foi avaliada, clinicamente, através de escalas específicas. Os animais foram sacrificados após 5, 7 e 10 dias de experimento e a mucosa oral e as GS removidas para análises bioquímicas (TNF- α e análise de proteína total, LDH e parâmetros do sistema antioxidante, respectivamente) e histológicas (análise por microscopia de luz e imuno-histoquímica para as amostras de mucosa, e por microscopia de luz, eletrônica de transmissão e imunocitoquímica para as amostras de GS). Após análises estatísticas, os resultados clínicos, bioquímicos e histológicos mostraram que os tratamentos com LBP e LED foram eficazes no tratamento da MO, com diminuição da concentração de TNF- α no dia 7 ($p<0.05$) e completa cicatrização das lesões ao término do

experimento, com maior formação de tecido de granulação e angiogênese. Além disso, a expressão de citoqueratina 10, analisada por imunohistoquímica, apresentou-se menos intensa comparada ao grupo CQ. O LAP não prejudicou a cicatrização final da MO quando comparada ao grupo CQ. O LBP também se mostrou eficaz para a HGS causada pelo 5-FU, uma vez que os parâmetros estudados para o grupo LG foram similares para os animais do grupo C na maior parte dos tempos experimentais. A HGS do grupo CQ foi representada por importantes alterações morfológicas, estruturais e bioquímicas, como a atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do estroma glandular na GS sublingual e alterações na expressão de EGF, NGF e PIP2 nas GSSM, assim como alteração na expressão de mucina e p16 nas GSSL. De acordo com as análises bioquímicas, foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase e superóxido dismutase e da atividade da enzima lactato desidrogenase ($p < 0.05$) tanto para a GSSM quanto para a GSSL. Com base nos resultados, podemos concluir que as fototerapias com LBP e LED diminuem a severidade da MO por acelerar a reparação tecidual e diminuir o processo inflamatório, assim como o LBP é eficaz no tratamento da HGS induzida pelo quimioterápico 5-FU.

Palavras-Chave: Quimioterapia. Mucosite oral. Hipofunção das glândulas salivares.

Campos L. Comparative study of therapeutic effects of different phototherapies on 5-Fluorouracil-induced salivary glands hypofunction and oral mucositis in hamster [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2013.
Versão Corrigida.

ABSTRACT

Considering oral mucositis (OM) and salivary glands hypofunction (SGH) debilitating consequences of chemotherapy (CT), the aim of this study was to compare, through clinical, biochemical and histological analysis, different phototherapies on the treatment of OM and SGH induced by injections of the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil in hamsters. One-hundred-eighty animals were divided into two groups, control and experimental, which were subdivided in group **C**: anesthesia/chemotherapy vehicle and **CQ**: anesthesia, chemotherapy/OM induction, for control group and in group **L**: anesthesia, chemotherapy/OM and phototherapy with LED (1,2 J/cm², 1.2 J of total energy), **LA**: anesthesia, chemotherapy/OM and phototherapy with high-power laser (HPL) (10 J/cm², 10 J of total energy), **LB**: anesthesia, chemotherapy/OM and phototherapy with low-power laser (LPL) (6 J/cm², 1.2 J of total energy) and **LG**: anesthesia, chemotherapy and phototherapy with LPL (5 J/cm²) on salivary gland (SG) (submandibular and sublingual) areas for experimental group. The OM was induced by slots on oral mucosa, which were performed after chemotherapy treatment. The OM was analyzed through specific clinical scales and after 5, 7 and 10 days, the animals were sacrificed and the oral mucosa and submandibular and sublingual glands removed for biochemical (TNF- α and total protein concentration, LDH and antioxidant system parameters, respectively) and histological (light microscopy and immune-histochemical for OM samples, and light microscopy, electronic transmission and immunocytochemical for SG samples) analysis. After statistical analysis, the clinical, biochemical and histological results showed Led and LPL as efficient treatments for OM, with decrease of TNF- α concentration on day 7 ($p < 0.05$) and complete lesions healing on last day of experiment, showing increase of granulation tissue and new blood vessels

formation. In agreement, the cytokeratin 10 expression by immunohistochemistry, showed less intensity when was compared with CQ group. The HPL had no interference on OM final healing in comparison with CQ group. The LPL also showed good results on treatment of SGH induced by 5-FU. The SGH on CQ group included important morphological, structural and biochemical changes, as acinar atrophy, increase of glandular stroma on sublingual glands and important changes for EGF, NGF and PIP₂ expression on submandibular glands, and for mucin and p16 gene expression on sublingual glands. Furthermore, the biochemical analysis showed changes on antioxidant enzyme system activity, catalase, peroxidase and superoxide dismutase, and also for dehydrogenase lactate activity ($p < 0.05$). The results of the present study suggest the phototherapies with LPL and LED where efficient on decrease of OM severity, accelerating tissue repair and decreasing the inflammatory process, as well as, the LPL efficient as treatment of SGH induced by 5-FU.

Keywords: Chemotherapy. Oral mucositis. Salivary glands hypofunction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Câncer e terapias antineoplásicas	20
2.2 Mucosite oral.....	22
2.3 Hipofunção das glândulas salivares	28
2.4 Fototerapias com LASERs e LED	33
2.5 Fototerapias e mucosite oral	38
2.5 Fototerapias e hipofunção das glândulas salivares	40
3 PROPOSIÇÃO.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Material	44
4.2 Métodos	44
5 RESULTADOS	60
5.1 Efeito das fototerapias na mucosite oral	60
5.2 Efeito da fototerapia na hipofunção das glândulas salivares	74
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
A	Área
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ⁺	Cálcio
CH ₂ -FH ₄	Metilenotetrahidrofolato
cK	Citoqueratina
Cl ⁻	Cloro
cm	Centímetro
DAG	Diacilglicerol
DE	Densidade de energia
DG	Ducto granular
DNA	Acido desoxirribonucleico
E	Energia
EGF	Epidermal growth fator
F ⁻	Flúor
FDA	Food and Drug Administration
FLBI	Fototerapia com laser em baixa intensidade
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FdUMP	Fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado
GS	Glândulas salivares
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HGS	Hipofunção das glândulas salivares
HPO ₄ ²⁻	Hydrogen phosphate
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP ₃	Trifosfato de inositol
J	Joules
K ⁺	Potássio
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBO	Laboratório de Biologia Oral
LED	Light emitting diode
Lu	Lúmen
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mg	Miligrama
Mg ²⁺	Magnésio
mM	Milimolar
MO	Mucosite oral
mW	Miliwatts
Na ⁺	Sódio
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCI	National Cancer Institute
NCIC CTG	National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group
NF-κB	Fator de transcrição da família kappa-B
NGF	do inglês, Nerve growth factor
Nm	Nanômetros
Nu	Núcleo
O ₂ ⁻	Superóxido
P	Potência
pH	Potencial hidrogeniônico
PGE ₂	Prostaglandina E2
PIP ₂	Phosphatidylinositol trisphosphate
PKA	Protein Kinase A
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group

OMS	Organização Mundial de Saúde
S	Segundos
SCN ⁻	Tiocianato
STAT ₃	Signal transducer activator of transcription 3
T	Tempo
TNF	Tumor necrosis Factor
U	Unidade
WHO	World Health Organization
Ug	Microlitros

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2011, houve 489.270 novos casos de câncer no Brasil e o número de novos casos cresce a cada ano (INCA, 2011).

O tratamento para o câncer está fundamentado em uma avaliação multidisciplinar que determinará um plano terapêutico, seja por ressecção cirúrgica, radioterapia ou quimioterapia, visando melhores chances de cura e a preservação do paciente. Os tratamentos cirúrgico e radioterápico são medidas locais, muito eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase, todavia, na maioria dos casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micro metástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, na grande maioria dos casos com a quimioterapia.

A quimioterapia antineoplásica baseia-se no bloqueio do ciclo celular, tendo a inibição da mitose celular como resultado. Seu objetivo primário é destruir somente as células neoplásicas, entretanto, seus efeitos citotóxicos não se limitam apenas às células tumorais, atingindo também tecidos normais com grande replicação, como o gastrointestinal, capilares e sistema imunológico.

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 é o Fluorouracil (5-Fluorouracil, 5-FU), fármaco antagonista das pirimidinas. Em especial, o 5-FU, promove severas alterações hematológicas e no sistema gastrointestinal, incluindo danos importantes à cavidade oral, como as lesões de mucosite e hipofunção das glândulas salivares. Esses danos, por sua vez, promovem o aumento da susceptibilidade às infecções orais, hemorragia, alteração do paladar, disfagia, dor e contribuem

para a perda das funções orais normais (alimentação, deglutição e fala), situação de grande impacto na qualidade de vida do paciente oncológico.

A mucosite oral (MO) e a hipofunção das glândulas salivares (HGS) acometem mais de 50% dos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico e contribuem para o aumento da frequência e custos de internação, medicações, assim como contribuem para o adiamento ou até interrupção do tratamento antineoplásico proposto. Trabalhos clínicos recentes relatam que diversas fototerapias têm sido utilizadas na tentativa de prevenir e tratar a MO, tais como a fototerapia com laser em baixa intensidade (FLBI) e, mais recentemente, a fototerapia com LED. Além disso, um número crescente de trabalhos apontam a FLBI como tratamento eficaz em casos de HGS. No entanto, não há na literatura nenhum trabalho *in vivo* ou *in vitro* que compare estas diferentes fototerapias no tratamento da MO, assim como não se sabe sobre o efeito da FLBI no tratamento da HGS induzida pela quimioterapia.

Sendo assim, com o intuito de buscarmos as respostas científicas do que nos tem sido evidenciado na clínica, este trabalho tem como objetivo comparar, por meio de análise clínica, bioquímica e histológica, as diferentes fototerapias (laser de baixa potência, alta potência e o uso do LED) no tratamento das lesões de MO, assim como o efeito da FLBI na HGS submandibulares e sublinguais, ambas induzidas pelo quimioterápico 5-Fluorouracil em *hamsters*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer e terapias antineoplásicas

O nome câncer é dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, as quais tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos de forma rápida, agressiva e incontrolável, acarretando transtornos funcionais (Matuo, 2008). Dentre outros fatores, as anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (oncogenes), como nos bloqueadores do ciclo celular (supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais e sabe-se que a progressão do ciclo celular é governado, principalmente, pelos genes p16 e p53. Em especial, o gene p16 é alvo frequente de mutações, exclusão e silenciamento epigenético em todos os tipos de câncer (Wang et al., 1998; Guo et al., 2007). Como resultado, as neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo) correspondem a essa forma não controlada de crescimento celular (Almeida et al., 2005; Brasil, 2011).

Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. De acordo com as informações de mortalidade do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2008, as neoplasias representaram a segunda causa de óbito na população brasileira, o que implica em mais de 14,6% do total de mortes ocorridas no país, e estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões em todo o mundo, onde cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2011).

A partir de uma avaliação multidisciplinar, o plano terapêutico inclui três formas principais de tratamento: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Porém, somente 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 micro metástases, 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; Galletta, 2006).

A quimioterapia é a forma de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados “quimioterápicos” administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos. De forma geral, têm como alvo as diferentes fases do ciclo celular, impedindo que ocorra a mitose e, assim, promovendo a apoptose celular. Mesmo tendo como objetivo destruir somente as células neoplásicas, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica e seus efeitos citotóxicos não se limitam apenas às células tumorais, atingindo tecidos normais com grande divisão celular, sendo o trato gastrintestinal um dos mais afetados (Murad; Katz, 1996; Salmon et al., 1998).

O critério classificatório clássico para os quimioterápicos é baseado no ponto de interferência das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução. Sendo assim, os quimioterápicos foram classificados da seguinte forma: agentes antimetabólitos, antagonistas purínicos, inibidores de microtúbulos, inibidores da topoisomerase, agentes alquilantes e produtos naturais (Chabner; Calabresi, 1995; Almeida et al., 2005).

Um dos grupos de quimioterápicos mais usados na prática clínica são os agentes antimetabólicos, antagonistas do ácido fólico, purinas e pirimidinas, compostos essenciais para a síntese do DNA. 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) (Lansiaux, 2011).

O 5-FU é um análogo sintético do uracil, sendo metabolizado pela mesma via. Ao longo da via de metabolização, inibe a enzima timidilato sintase

pela ligação do fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado (FdUMP), formando um complexo terciário FU,5,10-metilenotetrahidrofolato ($\text{CH}_2\text{-FH}_4$) que interrompe a produção de timidina e, conseqüentemente, a síntese do DNA. O 5-FU incorporado ao DNA e RNA altera as funções normais e induz a morte celular (Heidelberger, 1965; Chabner; Calabresi, 1995). Os principais efeitos citotóxicos causados pelo 5-FU são alterações hematológicas e no sistema gastrointestinal, incluindo danos importantes à cavidade oral, como mucosite e hipofunção das glândulas salivares, que por sua vez aumentam a susceptibilidade às infecções orais, hemorragia, alteração do paladar, disfagia e dor, comprometendo as funções orais normais como mastigação, deglutição e fonação (Vissink et al., 2003; Vissink, 2004; Mazzeo et al., 2009).

2.2 Mucosite oral

O termo mucosite oral (MO) surgiu em 1980 para descrever a inflamação da mucosa bucal, induzida pela quimioterapia e radioterapia, representando uma entidade distinta das lesões orais chamadas genericamente de estomatite (Peterson, 1999). Fatores como tipo de neoplasia, estado geral do paciente, idade e higiene bucal, assim como, tipo, via de administração, frequência, número de ciclos e mecanismo de ação do fármaco influenciam no aparecimento e severidade da MO. Estudos afirmam que cerca de 50% dos adultos e 90% das crianças submetidos à quimioterapia, desenvolvem mucosite (Sonis, 1998; Trotti et al., 2003; Carvalho et al., 2011).

O diagnóstico da MO é clínico e baseia-se no conhecimento da estomatotoxicidade da terapia antineoplásica, no tempo de aparecimento e localização das lesões. As superfícies queratinizadas da mucosa oral, por exemplo, são raramente afetadas devido ao menor índice de renovação celular (Trotti et al., 2003; Silverman, 2007). Os primeiros sinais da MO incluem edema

e eritema da mucosa, que podem evoluir para áreas de ulceração, aumentando a dor, limitação das funções orais normais (mastigação, deglutição e fonação) e morbidade do paciente oncológico. Em casos mais severos pode ocorrer sangramento, infecção local e sistêmica, dor intensa, necessidade de alimentação parenteral, administração de analgésicos, prolongamento do tempo de internação e aumento da mortalidade (Rubenstein et al., 2004; Zur, 2012).

A etiopatogenia da mucosite ainda não foi completamente elucidada. Até o final dos anos 90, acreditava-se que o principal mecanismo biológico responsável pelo aparecimento da mucosite era baseado na ação direta do agente citotóxico, tanto nas células cancerígenas quanto nas células normais da camada basal, através do bloqueio do ciclo celular. Isto resultaria no aparecimento de lesões ulceradas até que os mecanismos de reparo fossem ativados para promover a cicatrização local. Os efeitos indiretos seriam pela toxicidade do agente quimioterápico na medula óssea promovendo leucopenia, anemia e trombocitopenia, que agravariam seus efeitos diretos (Peterson et al., 2003; Eduardo et al., 2009).

Atualmente, a biopatologia desta enfermidade está melhor esclarecida em 5 fases sucessivas: fase de iniciação, resposta ao dano primário, de amplificação, de ulceração e de cura (Sonis, 2004; Lalla et al., 2010; Sonis, 2011) (Figura 2.1). Na fase de iniciação, o agente quimioterápico promove o bloqueio do ciclo celular, danos ao DNA, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente estresse oxidativo. As ROS, por sua vez, induzem a transcrição de dois fatores importantes, o fator de transcrição da família kappa-B (NF-kB) e STAT₃, os quais promovem a ativação de genes associados aos danos celulares pela mediação de citocinas. Como resultados, ocorre a apoptose, necrose celular, alteração do epitélio e nos vasos sanguíneos. A mucosa ainda apresenta-se clinicamente normal e saudável, as alterações podem ser vistas somente microscopicamente (Sonis, 2004; 2011).

A fase de resposta ao dano primário, consiste na continuação da ativação dos fatores de transcrição (NF-kB) e produção de citocinas pró-

inflamatórias, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 β e IL-6) e o fator de necrose tumoral do epitélio (TNF- α) por produtos da fase anterior. As interleucinas estimulam a resposta inflamatória, resultando em aumento da vascularização sub-epitelial e da concentração de agentes citotóxicos no local, enquanto o TNF promove danos ao epitélio e pode acelerar o processo de formação da mucosite. Tais danos ao tecido conjuntivo reduzem a oxigenação epitelial, resultando em dano e morte dessas células. Clinicamente, o paciente apresenta quadro de ardência bucal (Sonis, 2004).

A fase seguinte, de amplificação de sinal, ocorre um *feedback* positivo das citocinas inflamatórias, amplificando-se o dano. Segue então a fase ulcerativa, quando há perda da integridade da mucosa. Estas lesões extremamente dolorosas são de grande importância, pois funcionam como porta de entrada para bactérias, principalmente em pacientes com neutropenia, os quais têm maior probabilidade de desenvolver septicemia nesta fase. Sendo assim, o paciente apresenta úlceras, eritemas mais intensos e dor (Parulekar et al., 1998; Sonis et al., 2000; Sonis, 2004).

Finalmente, na fase de cura, com o fim dos agentes agressores, iniciam-se os processos de migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais, caracterizando a resolução das lesões na mucosa bucal (Parulekar et al., 1998; Sonis et al., 2000; Sonis, 2004).

Figura 2.1 - Biopatologia da mucosite oral dividida em cinco fases: iniciação, resposta ao dano primário (sinalização), amplificação do sinal, ulceração e cura (Sonis, 2011)

A literatura revela que os tratamentos antineoplásicos, incluindo radio ou quimioterapia, além de promoverem danos ao epitélio celular, diminuem a expressão das citoqueratinas (cK), proteínas predominantes do citoesqueleto dos queratinócitos e os marcadores mais sensíveis da diferenciação e proliferação epitelial. Tal alteração contribui para a morte celular e inibição da proliferação de células basais. Os autores relatam encontrar as cK 1 e 10, que são normalmente expressas em epitélio queratinizado, na mucosa oral não queratinizada de pacientes submetidos à radioterapia, e sugerem que estas passam a ser expressas como forma de proteção do epitélio frente ao trauma de radiação (Bonan et al., 2006).

Existem diversos sistemas de graduação da MO e, na literatura, isso dificulta a avaliação e padronização dos instrumentos utilizados para documentar e quantificar as lesões. Um dos sistemas de graduação mais

simples e usados é o da Organização Mundial de Saúde (OMS), onde são levados em conta critérios objetivos e subjetivos, que consideram o estado geral físico e nutricional do paciente, bem como a inspeção da cavidade oral. Através dela, a MO é dividida em graus que variam de 0 a 4, onde (WHO, 1979; Parulekar et al., 1998):

- 0- Inexistência de alteração da mucosa;
- 1 - Inflamação, eritema;
- 2 – Eritema, úlceras; impossibilidade de ingerir alimentos sólidos;
- 3 – Eritema, úlceras, ingestão apenas de alimentos líquidos;
- 4 – Eritema, úlceras, impossibilidade de alimentar-se via oral.

Outras escalas comumente usadas para classificar as lesões de MO, descritos desde 1979, são as propostas pelo Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute* - NCI), Grupo Oncológico de Radioterapia (*Radiation Therapy Oncology Group* - RTOG), e Instituto Nacional do Câncer do Grupo de Triagem Canadense (*National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group* - NCIC CTG) (Parulekar et al., 1998).

A MO severa (graus 3 e 4 pela OMS) interfere não só na qualidade de vida e nutrição do indivíduo acometido, promove a perda significativa de peso, por vezes tornando necessário o emprego de sonda nasoenteral ou gastrotomia para a alimentação enteral, como também interfere no próprio tratamento oncológico, onde muitas vezes se torna necessária a interrupção temporária ou definitiva do mesmo. (Sonis; Costello 1995; Avritscher et al., 2004; Rubenstein et al., 2004; Jones; Rankin, 2012; Tringali; Kanaskie, 2012).

Através de um estudo multicêntrico, realizado para avaliar o impacto econômico da mucosite de 92 pacientes transplantados de medula óssea, verificaram que houve diferença significativa no tempo de internação, terapia

intensiva e uso de medicamentos entre os pacientes com e sem a presença de infecções provocadas pela mucosite (Sonis et al., 2001).

Além disso, um estudo prospectivo foi realizado para avaliar a incidência e severidade da MO induzida pelo tratamento quimioterápico convencional para tumores sólidos e linfomas. Mesmo indicando maior incidência das lesões em pacientes com câncer de mama (76.5%), os autores apontam que os diferentes regimes de tratamento quimioterápico induziram o aparecimento da MO, que contribuiu para a morbidade dos pacientes. Como conclusão, apontam que a MO é um efeito colateral frequente para pacientes com diversos tipos de tumor e regimes quimioterápicos, que afeta diretamente a qualidade de vida do paciente oncológico, por isso a prevenção e tratamento da MO se mostra imprescindível (Nishimura et al., 2012).

Não há um consenso sobre a melhor abordagem no tratamento e prevenção da MO. A maioria dos estudos relacionados possuem pequenas amostragens e foram realizados em um único centro, além disso, muitos não têm escalas detalhadas para a graduação da mucosite (Bjordal et al., 2011; Miller et al., 2012; Al-Dasooqi et al., 2013; Gibson et al., 2013; Nicolatou-Galitis et al., 2013; Thorpe et al., 2013).

As estratégias básicas para a prevenção e tratamento da MO incluem: citoprotetores, crioterapia, fatores de crescimento, vitamina E, suplementos metabólicos, antibióticos, antimicrobianos, agentes lubrificantes, anti-inflamatórios, terapia gênica, agentes como sulcrafato, glutamina e, mais recentemente, a terapia com laser em baixa intensidade (FLBI) (Rubenstein et al., 2004; Bjordal et al., 2011; Eilers; Million, 2011; Gibson et al., 2013; Nicolatou-Galitis et al., 2013).

Por ser uma terapia bem aceita pelos pacientes e de fácil aplicação, a FLBI tem sido cada vez mais estudada e utilizada na tentativa de prevenir e tratar a MO. A FLBI pode ser realizada com o laser de baixa potência, o laser de alta potência desfocado e os LEDs vermelhos (Cowen et al., 1997; Corti et al., 2006; Schubert et al., 2007; Lang-Bicudo et al., 2008; Sacono et al., 2008;

Campos et al., 2009; Eduardo et al., 2009; Simões et al., 2009; Lima et al., 2010; Carvalho et al., 2011; Gautam et al., 2012; Migliorati et al., 2012). No entanto, não há nenhum trabalho *in vitro* ou *in vivo* que compare e avalie a eficácia destas diferentes fototerapias, as quais já são aplicadas na clínica.

2.3 Hipofunção das glândulas salivares

As glândulas salivares (GS) são órgãos exócrinos importantes para manter a integridade dos tecidos orais, através da secreção salivar. As glândulas salivares maiores encontram-se aos pares e incluem as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, sendo as submandibulares responsáveis por cerca de 70% da produção de saliva não estimulada e os outros 35% pelas parótidas, sublinguais e pelas GS menores e acessórias (Humphrey; Williamson, 2001; Nicolau, 2008; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

As GS são compostas por unidades morfofuncionais denominadas adenômeros, que por sua vez são constituídos de uma unidade secretora terminal e um sistema de ductos. Células da unidade terminal produzem uma saliva primária, isotônica em relação ao plasma, e o sistema ductal funciona como regulador eletrolítico, dando à saliva uma característica hipotônica em relação ao plasma através da reabsorção de Na^+ (sódio) e Cl^- (cloro), e desta maneira o fluído será secretado ao meio bucal (Humphrey; Williamson, 2001; Nicolau, 2008; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A secreção de saliva pelas GS é controlada pelo sistema nervoso autônomo, onde os neurotransmissores são liberados por terminações nervosas, simpática e parassimpática e interagem com receptores específicos de membrana plasmática. A acetilcolina, neurotransmissor parassimpático, é o principal neurotransmissor colinérgico que estimula as GS, ligando-se ao receptor muscarínico, o qual promove a ativação da via sinalizadora do

Ca^{2+} /calmodulina através da proteína Gq, que ativa a fosfolipase C (PLC) promovendo a hidrólise do PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) em IP_3 (trifosfato de inositol) e DAG (diacilglicerol) que serão responsáveis pela secreção de água, eletrólitos e pequena quantidade de proteínas. A norepinefrina, neurotransmissor simpático, ativa os receptores adrenérgicos promovendo uma mudança conformacional da proteína Gs de membrana, a qual libera uma subunidade catalítica que interage com a proteína adenilato ciclase, aumentando a concentração do segundo mensageiro AMPc que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) e, conseqüentemente, a exocitose da saliva rica em muco e enzimas (Figura 2.2) (Nicolau, 2008; Nanci, 2013).

Figura 2.2 - Mecanismo de secreção salivar através de um esquema representando a unidade secretora terminal (Nanci, 2013)

O produto final produzido e secretado pelas GS, a saliva, é composto por eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , SCN^- , F^- , etc), enzimas (amilase, proteína rica em prolina, mucina, histatina, cistatina, peroxidase, lisozima, lactoferrina, anidrase carbônica, defensina, catalase, lactato desidrogenase, superóxido dismutase, lipase, etc), imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), compostos orgânicos (glicose, aminoácidos, ureia, ácido úrico, moléculas lipídicas, etc) e outros componentes (EGF, NGF, insulina, AMPc, etc) (Nicolau, 2008; Nanci, 2013). Com isso, além de exercer suas funções de lubrificação e formação do bolo alimentar, também exerce atividade antimicrobiana, maturação e remineralização do esmalte, *clearance*, paladar e proteção contra estímulos mecânicos e químicos (Wang et al., 1998; Diaz-Arnold; Marek, 2002; Nicolau, 2008; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

As GS são órgãos frequentemente afetados por diversas doenças sistêmicas e terapias medicamentosas. Condições sistêmicas, incluindo desordens auto-imunes (síndrome de *Sjögren*, AIDS, lúpus eritematoso e artrite reumatoide), desordem hormonais (diabetes, disfunção da glândula tireoide), desordens neuronais (Parkinson, paralisia de Bell, paralisia cerebral), depressão, tratamento antineoplásico que inclui radioterapia na região de cabeça e pescoço ou quimioterapia e mais de 500 medicamentos interferem no funcionamento das GS, tendo, como efeito principal a xerostomia (sintoma de boca seca) e a hipofunção glandular, com consequente quadro de hipossalivação (diminuição objetiva do fluxo salivar) (Diaz-Arnold; Marek, 2002; Nicolau, 2008; Grundmann et al., 2009; Simões et al., 2009; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2010a; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Pouco se sabe sobre o efeito dos agentes quimioterápicos nas GS. O restrito número de trabalhos relacionado mostra que os regimes quimioterápicos que incluem agentes antimetabólitos e alquilantes, como a doxorubicina, ciclofosfamida, metotrexato e 5-FU resultam em dilatação dos ductos, degeneração acinar, formação cística e inflamação do tecido glandular em mais de 50% dos pacientes submetidos ao tratamento. Além disso, o fluxo e composição salivar também são alterados pela quimioterapia (Lockhart;

Sonis, 1981; McBride; Siegel, 1988a; McBride; Siegel, 1988b; Vissink et al., 2004; Jensen et al., 2010).

Em modelo experimental com animais, observaram aumento na concentração de β -adrenoreceptor nas glândulas submandibulares, mas não nas parótidas de ratos submetidos ao tratamento com o agente antimetabólito metotrexato, receptor este que está envolvido na secreção de proteínas da saliva (McBride; Siegel, 1988b; Vissink et al., 2004).

Dados da literatura revelam que o regime quimioterápico incluindo 5-FU e leucovorin nas GS, promove alterações no fluxo e pH salivar, assim como variação na concentração dos íons Na^+ e K^+ da saliva. Além disso, estas alterações assumem a possibilidade de desordens nos ductos das GS e, ainda, a hipofunção glandular induzida pela quimioterapia aumenta o risco de inflamação em cavidade oral, risco de cárie dental, infecções oportunistas e compromete a mastigação, deglutição e gustação (Mazzeo et al., 2009).

A duração dos efeitos causados pela quimioterapia nas GS ainda é questionado. Alguns estudos reportam que a hipofunção glandular tende a cessar em até um ano após término do tratamento quimioterápico (Jensen et al., 2008). Porém, através de uma revisão sistemática da hipofunção glandular e xerostomia induzidas por tratamento antineoplásicos, afirmam que, mesmo sendo possivelmente temporários, os efeitos da quimioterapia nas glândulas salivares são importantes e devem ser diagnosticados e tratados o quanto antes, afim de prevenir outras alterações em cavidade oral e aumentar a qualidade de vida do paciente oncológico (Jensen et al., 2010).

Frente à condição de hipossalivação e xerostomia os profissionais utilizam-se de terapias paliativas a base de lubrificantes orais, substituto salivar, enxaguatórios acupuntura e eletroestimulação. Em casos mais severos e específicos, indicam medicamentos parassimpatomiméticos como a pilocarpina, betanecol e o cevemeline, a amifostina e, mais recentemente, iniciou-se a utilização da FLBI (Jham et al., 2007; Sennhenn-Kirchner et al., 2009; Simões et al., 2010a).

A amifostina (ETYOL®) é um citoprotetor, de amplo espectro, com potencial de proteger órgãos e tecidos contra a toxicidade dos tratamentos radio e quimioterápico, no entanto, o seu custo ainda é elevado e, portanto, inviável para a maioria dos pacientes, além de relacionar-se com importantes efeitos colaterais como náuseas, vômitos, hipotensão e transitória hipocalcemia (Ma et al., 2009). A pilocarpina, betanecol e o cevemiline, como fármacos parassimpaticomiméticos possuem a capacidade de aumentar o fluxo salivar e conforto oral, porém, devem ser usados com cautela em pacientes com problemas sistêmicos por ser um agonista muscarínico e, conseqüentemente, causar efeitos colaterais (Scarpace et al., 2009; Sennhenn-Kirchner et al., 2009).

Recentemente, encontramos um crescente número de trabalhos que avaliam o efeito da FLBI no tratamento da hipofunção das GS, os quais possuem resultados promissor (Takeda, 1988; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009b; Simões et al., 2010b). No entanto, poucos destes trabalhos são relacionados com algum tratamento antineoplásico (Cowen et al., 1997; Simões et al., 2010a).

Determinados autores, ao avaliarem o efeito do laser de Helio-Neonio (He-Ne) na prevenção da MO induzida por altas doses de quimioterapia, revelam que os pacientes submetidos ao laser relataram alívio no sintoma de xerostomia e maior habilidade para deglutir (Cowen et al., 1997). Sendo assim, outro grupo de pesquisadores verificaram o quanto a FLBI, usada no tratamento para a MO, poderia influenciar no sintoma de xerostomia e na hipossalivação de pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. Os pacientes tratados com laser manifestaram alívio no sintoma de xerostomia, sugerindo que a fototerapia pode ser uma terapia auxiliar para a hipofunção das GS (Simões et al., 2010a).

Além de haver poucos trabalhos na literatura que analisam o efeito da FLBI no tratamento da hipofunção das GS induzida por tratamento antineoplásico, nenhum deles relaciona-se aos agentes quimioterápicos.

2.4 Fototerapias com LASERs e LED

Laser é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* e desde o seu desenvolvimento numerosos estudos mostram efeitos benéficos. Apresenta características especiais como coerência, monocromaticidade e unidirecionalidade, e são divididos na literatura de acordo com o efeito aos tecidos biológicos, sendo classificados em laser de baixa e alta potência.

Os lasers de alta potência possuem efeito térmico no tecido que absorve a luz, sendo usados para vaporizar ou incisionar tecido mole (Gontijo et al., 2005; Azevedo et al., 2013), coagular e descontaminar o tecido alvo, assim como ablacionar ou causar fusão e resolidificação em tecido duro (Gouw-Soares et al., 2001; Eduardo et al., 2009; Ferreira et al., 2010). Os lasers de baixa potência, ao contrário dos lasers de alta potência, não são baseados em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons não será transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nos tecidos, os quais são particularmente evidentes se a célula em questão tem sua função debilitada (Karu, 1989a; Karu, 1989b; Tunér; Hode, 2010). No entanto, os lasers de alta potência podem trabalhar em baixa intensidade, assim como os lasers de baixa potência, quando usados de maneira desfocada em relação ao tecido alvo (Pourzarandian et al., 2005; Campos et al., 2009; Simões et al., 2009a; Tuner; Hode, 2010).

Os efeitos terapêuticos da FLBI nos diferentes comprimentos de onda e doses são conhecidos, mas seu mecanismo de ação ainda não é bem definido (Prindeze et al., 2012). A FLBI demonstra efeitos básicos: anti-inflamatório, analgésico e de biomodulação, sendo utilizada como terapia coadjuvante em quase todos os procedimentos odontológicos (Midda; Renton-Harper, 1991; Schindl et al., 2000). Estes efeitos biológicos básicos associados à FLBI induzem o crescimento celular estimulado, regeneração celular (estimula a síntese de DNA e RNA), produção de ATP, reduz o processo inflamatório,

reduz o edema e a formação de tecido fibrinoso, aumenta a produção de colágeno, adesão celular, estimulação da função nervosa, etc (Ribeiro; Zezell, 2004; Prindeze et al., 2012).

A região do espectro terapeuticamente mais efetiva é compreendida no visível (vermelho) e infravermelho próximo (Vladimirov et al., 2004), correspondendo esta região com características energéticas e níveis de absorção relevantes para a cadeia respiratória (Karu, 1986; Wilden; Karthein, 1998). Porém, a FLBI também pode inibir processos celulares. Os principais responsáveis pelos efeitos de estimulação ou inibição são os fotorreceptores primários (Karu et al., 1987), os quais são danificados ao receber altas doses de energia. Doses ainda maiores podem destruir os fotorreceptores e inibir o crescimento celular (Mester et al., 1985; Schindl et al., 2000).

Foi proposto um modelo para explicar o mecanismo de ação da FLBI, o qual sugere que os fótons do comprimento de onda vermelho são absorvidos pelas mitocôndrias, desencadeando efeitos fotoquímicos nestas organelas, promovendo a alteração do pH, aumento da síntese de ATP, mudanças na atividade bioquímica e maior transferência de elétrons (Karu, 1989). Estes sinais, por sua vez, seriam transduzidos para as outras organelas e núcleo, promovendo alterações citoplasmáticas e na membrana celular, regulando a entrada e saída de íons da célula, além de aumentar o metabolismo e proliferação celular. Para o comprimento de onda infravermelho, os fotorreceptores se encontram principalmente nas membranas celulares, promovendo alterações fotofísicas nos canais iônicos. Esse sinal também é transduzido ao núcleo e citoplasma, resultando, também, em aumento do metabolismo e proliferação celular (Karu, 1989a).

Diversos estudos científicos comprovaram que o efeito biológico da FLBI tem grande potencial na reparação tecidual e analgesia. A aplicação da FLBI em cultura de fibroblastos mostrou tanto um aumento da divisão celular, como aumento da produção de colágeno. No periodonto estimulou a síntese de DNA dos miofibroblastos e diferenciação celular, acelerando o processo de cura (Kreisl et al., 2001).

Além do aumento na produção de ATP, a FLBI também promove mudanças estruturais e bioquímicas nas mitocôndrias (Karu et al., 1985). Além disso, observou-se evidências de que a luz visível pode regular o metabolismo celular via cAMP em cultura de células irradiadas com luz nos comprimentos de onda 632 e 404 nm (Karu et al., 1989b) e que a interação entre a luz visível monocromática com a mitocôndria, pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, outros autores relatam não encontrar diferença na atividade da enzima superóxido dismutase, ou até aumento na atividade do sistema antioxidante, o qual remove ROS e reduz danos celulares (Parlato et al., 1983; Ibuki et al., 2012).

Com relação à sintomatologia dolorosa, um dos mecanismos propostos para a diminuição da mesma, é a modulação de nociceptores através da modificação da condução dos impulsos nervosos de dor e da liberação de endorfinas e encefalinas (Chow et al., 2007). Também têm sido mostrados que a estimulação dos nervos periféricos pela FLBI diminui a hiperpolarização da membrana celular e aumenta a concentração de ATP, o que poderia contribuir para a manutenção da estabilidade da membrana (Laor et al., 1965; Niccoli-Filho et al., 2005; Chow et al., 2007).

Estudos revelam que a FLBI (830 nm), aplicado de forma desfocada, reduz o potencial de membrana mitocondrial e bloqueia o rápido impulso em axônios de pequeno e médio diâmetros em neurônios situados em gânglio da raiz dorsal de ratos. Com esta informação, os autores concluem que repetidas aplicações de laser na clínica, promove a modulação de nociceptores e redução da dor (Chow et al., 2007).

A propriedade antiinflamatória é defendida por alguns autores ao demonstrarem a diminuição da produção da prostaglandina E2 (PGE2) e efeitos no metabolismo linfocitário, incluindo a ativação dos linfócitos T supressores e a modulação da secreção da histamina, quininas e TNF (Mester et al., 1985; Prindeze et al., 2012).

Os efeitos da FLBI também podem ser avaliados pela atividade

enzimática e outras análises bioquímicas. Sabe-se que a FLBI promove aumento na atividade da enzima isocitrato desidrogenase após irradiação com laser de He-Ne, aumento da atividade da enzima catalase, após exposição à luz laser vermelha, assim como melhora significativa nos níveis de metaloproteinase 8 (MMP-8) e interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6), sugerindo que a FLBI pode melhorar os resultados do tratamento periodontal não cirúrgico (Lombard, 1999; Artykhov et al., 2000; Saglam et al., 2012).

O diodo emissor de luz (*Light emitting diode* - LED) é outra fonte de luz, a qual tem sido utilizada como alternativa ao laser. Nas últimas décadas, alguns pesquisadores demonstraram a aplicabilidade do LED terapêutico em estudos experimentais e clínicos, ainda que poucos, demonstrando a eficiência biomoduladora semelhante à FLBI (Young et al., 1989; Vinck et al., 2003). Diante das evidências demonstradas pela NASA na aplicação do LED, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou testes clínicos da aplicação de LEDs, devido ao insignificante risco de lesões na pele (Whelan et al., 2001).

Diferente do laser, a luz emitida pelo LED é ausente de coerência e colimação (Bagnato, 2002). Karu et al. em 2004, determina que a coerência seja retida ao longo dos primeiros extratos da pele, antes que produza a absorção da luz pelas moléculas fotorreceptoras especializadas (melanina, porfirina, citocromo c oxidase e hemoglobina) (Karu et al., 2004). Por outro lado, outros estudos afirmam que a coerência é fundamental para a promoção dos efeitos terapêuticos proporcionados pela luz (Pontinen et al., 1996).

O espectro de ação eletromagnético da luz emitida pelo LED é mais amplo em relação ao do Laser, já que sua densidade de energia está distribuída em uma banda eletromagnética maior, podendo interagir com um maior número de fotorreceptores específicos. Porém, mesmo diante dessas diferenças na distribuição de energia, sabe-se que existe uma ampla janela biológica de absorção da luz nos tecidos biológicos, permitindo a ação biomoduladora nos respectivos receptores de luz (Corazza et al., 2007; Sacono et al., 2008).

No comprimento de onda na faixa do visível, pode estimular o metabolismo oxidativo mitocondrial, assim como o laser, acelerando os processos de reparação celular e tecidual e estimulando a proliferação das células, bem como a produção de colágeno, fatores importantes para o processo de cicatrização (Corti et al., 2006).

Os estudos demonstram que o LED pode ter um efeito semelhante ao laser na reparação de feridas em pele e mucosa (Sacono et al., 2008) através da diminuição do processo inflamatório e melhora na reparação tecidual de feridas, assim como na estimulação da angiogênese (Corazza et al., 2007; Parente, 2012).

Ao compararem a FLBI em diferentes comprimentos de onda (660 e 780 nm) com o LED (630 e 880 nm), todos ajustados a uma fluência de $5\text{J}/\text{cm}^2$, na reparação de feridas, indicam a fotomodulação da fase inflamatória e aumento do número de fibroblastos nos dois grupos, ressaltando que o comprimento de onda infravermelho é mais efetivo para a fibroplasia. Os autores concluem que o LED e o Laser possuem comportamento semelhante no tratamento de ulcerações cutâneas (Corazza et al., 2007).

Apesar de poucos, os estudos sugerem que o LED pode ser uma alternativa mais econômica e acessível, além de, apresentar uma área de feixe maior, o que diminui o tempo da irradiação.

2.5 Fototerapias e mucosite oral

Desde a década de 90, muitos trabalhos demonstram os efeitos benéficos da FLBI no tratamento da MO em pacientes submetidos ao tratamento de radio ou quimioterapia. Um estudo avaliou 67 pacientes oncológicos que seriam submetidos ao quimioterápico 5-FU e desenvolveram MO, os quais foram divididos em três grupos: controle, laser preventivo e laser curativo. Foi utilizado o laser de hélio-neônio no comprimento de onda na faixa do vermelho, potência de 25 mW e dose de $0,75\text{J}/\text{cm}^2$, aplicado em apenas 12 pontos da mucosa e os autores relataram que, tanto para o uso preventivo quanto curativo, o laser contribuiu de forma significativa para a melhora dos pacientes (Ciais et al., 1992).

A partir de então, outros estudos foram desenvolvidos utilizando-se, em especial, os lasers de He-Ne e AsGaAl nos comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho, entre 680 e 880 nm. De forma geral, observou-se que o laser foi eficaz na prevenção e cicatrização das lesões de MO; todavia, os estudos são unânimes em apontar controvérsias com relação à dosimetria, ou seja, os parâmetros relacionados aos equipamentos (energia, densidade de energia, potência, área, etc), ao modo de aplicação da luz (em contato ou à distância do tecido alvo) e a diversidade de escalas para classificar as lesões, dificultando a comparação e avaliação das fototerapias e seus protocolos (Bensadoun et al., 1999; Schubert et al., 2007; Campos et al., 2009; Kuhn et al., 2009; Simões et al., 2009a; Lima et al., 2010; Bjordal et al., 2011; Carvalho et al., 2011; Migliorati et al., 2012).

Alguns autores concluem que doses altas, variando de 2.0 a 3.5J de energia por ponto, são eficazes na redução da severidade das lesões de MO (Nes et al., 2005; Abramoff et al., 2008; Lima et al., 2010; Lopes et al., 2010; Zanin et al., 2010). Um estudo recente, onde os autores avaliaram a dor em cavidade oral de pacientes em tratamento oncológico que estavam em tratamento com laser de baixa potência para MO, no comprimento de onda na

faixa do infravermelho (830 nm), potência de 250 mW e fluência de 35 J/cm² e observaram efeito analgésico imediato da FLBI nas lesões de MO (Nes et al, 2005).

Além disso, um estudo randomizado incluindo 220 pacientes submetidos à altas doses de quimioterapia que desenvolveram MO, o tratamento com o laser de He-Ne no comprimento de onda de 632.8 nm, densidade de potência de 24 mW/cm² e dose de 3J por ponto foi avaliado. Os autores concluíram que o grupo laser desenvolveu graus menos severos de MO, diminuindo o uso de analgésicos e a necessidade de nutrição parenteral (Gautam et al., 2012).

Entretanto, em outros trabalhos, onde a FLBI foi aplicada em doses menores, entre 0.05 e 1.5J de energia por ponto para o tratamento e prevenção de MO, houve relatos de menor tempo de reparação das lesões e menor quantidade de medicação analgésica requerida por consequente efeito analgésico da FLBI (Ciais et al., 1992; Ciais et al., 1992; Cowen et al., 1997; Bensadoun et al., 1999; Schubert et al., 2007; Eduardo et al., 2009; Simões et al., 2009a; Silva et al., 2011).

Através de um estudo clínico, foram verificadas a incidência e severidade da MO de 30 pacientes submetidos ao transplante de células hematopoiéticas (allogénico ou autólogo) que receberam tratamento com a FLBI (InGaAlP laser, no comprimento de onda de 660 nm, 40 mW de potência e 0.08J de energia por ponto) diariamente e os autores concluem que a FLBI foi benéfica, mantendo graus menos severos de MO (Eduardo et al., 2009).

Simões et al. (2009a), avaliaram o efeito da FLBI, incluindo as fototerapias com laser de baixa e alta potência, em lesões de MO de pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço, com o objetivo de analisar a reparação e a analgesia destas lesões. Os resultados revelaram que as terapias tiveram o mesmo efeito para reparação, no entanto a maior frequência de aplicação e a irradiação com laser de alta potência aumentaram o efeito analgésico. Campos et al. (2009), em um caso clínico, também destacaram os

efeitos positivos da FLBI realizadas com laser de alta potência, na redução da severidade e analgesia das lesões de MO.

Porém, além da FLBI, a fototerapia com LED também tem sido utilizada no tratamento da MO (Corti et al., 2006; Lang-Bicudo et al., 2008; Sacono et al., 2008). Em um estudo onde a MO foi induzida em animais que receberam o quimioterápico 5-fluorouracil, sendo um grupo tratado com LED e o outro acompanhado sem tratamento para as lesões de MO, os autores concluíram que o grupo tratado com o LED teve lesões menos severas quando comparadas ao grupo não tratado (Sacono et al., 2008).

Além disso, um caso clínico envolvendo um paciente de 34 anos, com diagnóstico de linfoma Hodgkin, submetido à altas doses de quimioterapia, o qual foi submetido ao tratamento da MO com LED ($3,6 \text{ J/cm}^2$, 74 mW) por cinco dias consecutivos, não desenvolveu lesões de MO durante os cinco ciclos de quimioterapia, assim como não referiu dor em cavidade oral durante o tratamento antineoplásico. Como conclusão os autores sugerem que a terapia com LED foi segura e efetiva para tal tratamento (Lang-Bicudo et al., 2008).

Apesar da fototerapia com LED ser apontada como semelhante à FLBI, nenhum estudo compara o efeito das duas fototerapias no tratamento da MO.

2.5 Fototerapias e hipofunção das glândulas salivares

Poucos estudos foram realizados analisando o efeito da FLBI nas glândulas salivares (Takeda, 1988; Cowen et al., 1997; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009b; 2009c; Ibuki et al., 2012). Trabalhos laboratoriais desenvolvendo modelo animal, como o publicado por Takeda, em 1988, o qual analisou o efeito da irradiação com laser de baixa potência GaAs, 904 nm, em glândulas submandibulares de ratos, constatou aumento do número de

mitoses, principalmente, nas células epiteliais do ducto granuloso e após 24 h da irradiação, do grupo irradiado com 760 Hz (Takeda, 1988).

Outros autores revelam que a irradiação com laser de He-Ne, com 11,2 J/cm² de total de energia aplicada por área, altera a síntese proteica e a secreção das glândulas salivares de cobaias, além de produzir modificações estruturais relacionadas com a inflamação em 0-12 horas após a irradiação, quando houve necrose das células do parênquima glandular (Plavnik et al., 2003). Ambos os trabalhos descritos acima, expuseram as glândulas submandibulares para irradiação. Alterações de fluxo salivar e da composição das glândulas salivares foram previamente demonstradas por nosso grupo, quando as glândulas parótida e submandibular de ratos foram irradiadas transcutaneamente com laser infravermelho em doses de 4 e 8 J/cm² (Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009b; Simões et al., 2010b).

Além disso, mais recentemente, o efeito do laser de baixa potência no sistema antioxidante das glândulas parótida e submandibular de ratos diabéticos foi avaliado através de um modelo experimental em ratos diabéticos. Os autores observaram que o laser aumentou a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e o valor total de antioxidantes na glândula submandibular, além do aumento da atividade da catalase na glândula parótida. Com isso, concluíram que o laser de baixa potência pode afetar a atividade das enzimas antioxidantes das glândulas salivares de ratos diabéticos (Ibuki et al., 2012).

Clinicamente, a FLBI tem sido inicialmente estudada em pacientes com síndrome de Sjögren, que apresentam hipossalivação, e resultados preliminares mostraram que as glândulas salivares reagem rapidamente ao tratamento (Fructuoso; Moset, 1987; Simões et al., 2009). Além disso, a irradiação com laser de He-Ne pode alterar o nível de lisozima salivar, onde os pacientes irradiados mostraram o nível desta enzima aumentado (Hubacek; Matouskova, 1987).

Com relação ao paciente oncológico, autores revelam melhora na produção salivar, assim como na habilidade de deglutição nos pacientes submetidos à quimioterapia como condicionamento para o transplante de medula óssea e que foram irradiados, na cavidade oral, com laser de He-Ne por cinco dias consecutivos (Cowen et al., 1997). Ademais, diminuição do sintoma de xerostomia com menor redução do fluxo salivar em pacientes submetidos a FLBI como tratamento da MO induzida por radioterapia na região de cabeça e pescoço (Simões et al., 2010a).

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo comparar, por meio de análise clínica, bioquímica e histológica, as diferentes fototerapias (laser de baixa potência, alta potência e o uso do LED) no tratamento das lesões de MO, assim como o efeito da FLBI na hipofunção das glândulas salivares submandibulares e sublinguais, ambas induzidas pelo quimioterápico 5-Fluorouracil em *hamsters*.

Os objetivos específicos foram realizar as seguintes análises:

1. Dos efeitos da FLBI na mucosa oral:

- clínica diária, utilizando a classificação da OMS e W-Smith modificada para avaliar o grau de mucosite dos animais;
- bioquímica, através de ensaios imunoenzimáticos para TNF- α ;
- histológicas e morfológicas, por microscopia de luz;
- expressão da citoqueratina 10 por imuno-histoquímica.

2. Dos efeitos da FLBI nas glândulas salivares:

- bioquímica, através da determinação de parâmetros do metabolismo protéico, como concentração total de proteína, atividade da lactato desidrogenase; análise do sistema antioxidante, como atividade da superóxido dismutase, peroxidase e catalase;
- histológicas e morfológicas por microscopias de luz e eletrônica de transmissão;
- quantitativa da expressão de proteínas envolvidas no processo secretório, NGF, EGF, PIP2, P16 e mucina, por imunocitoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A descrição de materiais e métodos, para melhor entendimento, foi subdividida.

4.1 Material

Foram selecionados 180 (cento e oitenta) *hamsters* sírios dourados, machos, com 8 semanas de vida e massa corpórea aproximada de 150g, mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP (LBO/FOUSP). Os animais foram separados em um por gaiola, com água e comida *ad libitum* e em condições controladas de iluminação (12hs luz/ 12hs escuro), temperatura $23^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{ C}$ e umidade $55 \pm 10\%$. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA/ICB (ANEXO).

4.2 Métodos

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

4.2.1 Método experimental

O método experimental deste estudo consistiu em duas fases sucessivas e distintas. Na primeira fase, foi estabelecido o protocolo de indução da mucosite e hipofunção das glândulas salivares e na segunda fase, com as complicações orais já instaladas, foi avaliada a ação das diferentes fototerapias no tratamento da MO, assim como a da FLBI na hipofunção das glândulas salivares foi avaliada.

4.2.1.1 indução da mucosite e hipofunção das glândulas salivares

A indução da MO e da HGS foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Sonis et al. (1990) em um experimento com duração de 10 dias consecutivos.

Para isso, todos os animais foram pesados e anestesiados com uma associação de Copazine (Xilazina) 0,53ml/kg e Vetanarcol (Quetamina) 0,86ml/kg todos os dias do experimento e aleatoriamente divididos em dois grandes grupos, controle e experimental, os quais foram subdivididos em seis grupos, dois controles (C e CQ) e quatro grupos experimentais (L, LA, LB e LG), com um total de 30 animais por grupo, sendo tratados ou não como se segue:

Grupo C: grupo controle, onde houve somente injeção do anestésico e veículo de diluição do quimioterápico (n=30);

Grupo CQ: grupo controle positivo, submetidos ao quimioterápico, passando pelas mesmas etapas dos demais grupos experimentais com exceção da irradiação (n=30);

Grupo L: animais submetidos ao quimioterápico, indução da MO e à fototerapia com LED, $\lambda 630$ nm, $1,2 \text{ J/cm}^2$; $1,2 \text{ J}$ de energia total em mucosa oral ($n=30$);

Grupo LA: animais submetidos ao quimioterápico, indução da MO e à fototerapia com laser de alta potência, $\lambda 808$ nm, 10 J/cm^2 ; 10 J em mucosa oral ($n=30$);

Grupo LB: animais submetidos ao quimioterápico, indução da MO e à fototerapia com laser em baixa intensidade, $\lambda 660$ nm, 6 J/cm^2 ; $1,2 \text{ J}$ em mucosa oral ($n=30$);

Grupo LG: animais submetidos ao quimioterápico, sem MO e irradiados com laser em baixa intensidade nas glândulas salivares maiores, $\lambda 780$ nm, 5 J/cm^2 ; ($n=30$);

Nos dias 1 e 3 do experimento, foi injetado o quimioterápico 5-fluorouracil via intraperitoneal nos *hamsters* de cinco grupos (CQ, L, LA, LB e LG). No dia 1 foi injetado 100 mg/kg de quimioterápico por animal, enquanto no dia 3 foi injetado 65 mg/kg . Como complemento para a indução da mucosite, nos dias 4 e 5 a mucosa jugal direita e esquerda dos grupos CQ, L, LA e LB foi arranhada com a ponta de uma agulha por duas vezes pelo mesmo operador. Tais ranhuras seguiram um padrão para todos os grupos, onde todas tiveram o mesmo tamanho, o qual foi conseguido pelo uso de uma moldura pré-fabricada, com 1 cm^2 de área interna (Tabela 4.1).

A análise clínica foi feita diariamente e nos dias 5, 7 e 10 do experimento, 10 animais de cada grupo foram eutanasiados. A eutanásia dos animais foi realizada por destroncamento cervical após serem anestesiados. Imediatamente após, a mucosa oral e as glândulas salivares submandibulares e sublinguais foram removidas para as análises bioquímicas e histológicas.

Tabela 4.1 - Cronograma do procedimento experimental para o tratamento de mucosite oral e hipofunção das glândulas salivares induzidas em hamsters

DIA	TRABALHO REALIZADO
1	Injeção do diluente do quimioterápico para o grupo C Dose inicial de quimioterapia (100mg/kg) para os grupos CQ, L, LB, LA e LG
2	Acompanhamento dos animais, sem procedimentos clínicos
3	Diluente do quimioterápico para o grupo C Dose complementar de quimioterapia (65mg/Kg) para os grupos CQ, L, LB, LA e LG;
	Anestesia grupo C
	Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (grupos CQ, L, LB, LA)
4	Anestesia e remoção de pêlos na região de glândulas salivares maiores e demarcação da área (grupo LG) Fototerapias (grupos L, LB, LA e LG)
5	Anestesia grupo C Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (grupos CQ, L, LB, LA) Fototerapias (grupos L, LB, LA e LG) Sacrifício de dez animais por grupo (n=60)
6	Anestesia grupo C Anestesia e fototerapias (grupos L, LB, LA e LG)
7	Anestesia grupo C Anestesia e fototerapias (grupos L, LB, LA e LG) Sacrifício de dez animais por grupo (n=60)
8	Anestesia grupo C Anestesia e fototerapias (grupos L, LB, LA e LG)
9	Anestesia grupo C Anestesia e fototerapias (grupos L, LB, LA e LG)
10	Anestesia grupo C Anestesia e fototerapias (grupos L, LB, LA e LG) Sacrifício de dez animais por grupo (n=60)

4.2.1.2 fototerapias

Três tipos de fototerapias foram aplicadas para o tratamento da MO (fototerapia com laser de baixa potência, fototerapia com laser de alta potência e fototerapia com LED) e apenas uma fototerapia para o tratamento das glândulas salivares (fototerapia com laser de baixa potência).

A fototerapia com laser de baixa potência foi realizada com um laser do tipo InGaAlP da MMOPTICS Ltda (TWIN laser, São Carlos, SP, Brasil) com ponteiros de diodo com a área do spot de $0,04 \text{ cm}^2$. Para o grupo LB foi programado no comprimento de onda vermelho (660 nm) com 40 mW de potência, 6 J/cm^2 e energia de 0,24J por ponto. Cinco pontos foram realizados na mucosa oral, totalizando 1,2J de energia total. O mesmo aparelho foi programado no comprimento de onda infravermelho (780 nm) com 20 mW de potência, 5 J/cm^2 e energia de 0,2J por ponto para o grupo LG.

O laser de alta potência utilizado foi do tipo diodo (DMC, São Carlos/São Paulo - Brasil) com comprimento de onda de 808 nm, potência de 1W, aplicado de forma desfocada (distante 1cm do tecido alvo) e por varredura durante cinco segundos no sentido vertical e mais cinco segundos no sentido horizontal da mucosa bucal. Desta forma, ao término da aplicação, 10J de energia foi entregue ao tecido, aplicados somente no grupo LA.

A fototerapia com LED (Fisio LED – MMOptics® Ltda, São Carlos, São Paulo, Brazil) foi realizada com uma ponteira reta com a área do spot de 1 cm^2 e foi programado no comprimento de onda de 635 nm, potência de 120 mW, 1 J/cm^2 . As aplicações serão de forma pontual, sendo apenas um ponto central realizado, tendo 1,2J de energia total, assim como o grupo LB.

Para as aplicações feitas em mucosa oral, o número de pontos será diferente entre os grupos devido à diferença no diâmetro do spot e potência de cada aparelho, porém todas as aplicações serão distribuídas em uma área de 1 cm^2 , previamente selecionada na mucosa oral dos animais (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Mostra a área de indução da mucosite oral (1cm²) e a forma de aplicação das diferentes fototerapias: com laser de baixa potência (LB), cinco pontos, com LED (LED) para o grupo L, apenas um ponto central e com laser de alta potência desfocado (LA), aplicação feita em varredura, onde as setas ilustram a direção da radiação laser quando aplicada de forma vertical e horizontal

Com relação ao grupo LG, a área das GS submandibulares e sublinguais foram previamente tricotomizadas e demarcadas com um retângulo (2 cm²), de forma bilateral. A irradiação também foi realizada de maneira pontual (3 fileiras de 5 pontos), e o número de pontos foi padronizado para todas as sessões da terapia (Figura 4.2).

Figure 4.2 - Irradiação realizada no grupo LG. (A) Tricotomia dos pelos na região das glândulas submandibulares e sublinguais; (B) demarcação da área (2cm²); (C) disposição dos pontos de irradiação; (D) irradiação laser

Para todas as técnicas foram obedecidas as seguintes fórmulas:

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

Sendo DE a dose de energia laser [J/cm²] e E a energia laser (J). P = potência [mW], T = tempo de irradiação [s] e A = área do spot laser (L, LB e LG) ou superfície tratada (LA) [cm²].

Sempre antes do início e após cada sessão o laser foi checado, através do *power meter Coherent®*, e a potência de entrega do feixe de luz devidamente registrada. Todos os princípios de segurança foram rigorosamente seguidos, onde o investigador usou óculos de proteção específicos para cada comprimento de onda emitido pelo aparelho, durante todo o tempo em que o laser esteve ligado.

Os procedimentos de controle de infecção também foram seguidos para proteção do investigador, o qual fez uso de luva de látex, peça de mão e ponta do laser devidamente recobertas por filme de PVC. Após cada utilização, as peças de mão, mangueiras e o corpo do equipamento foram desinfetados com lenços próprios umedecidos em solução de etanol a 70%.

4.2.2 Análise clínica

Durante o período experimental, não somente os animais, mas também toda a comida e bebida não ingeridas foram pesadas diariamente. Além disso, a mucosa jugal dos grupos foi evertida para ser fotografada e a severidade da MO classificada. O critério para avaliação do grau de mucosite foi através de duas escalas :

1. Escala do Instituto Nacional do Câncer ou OMS modificado para animais (Murphy, 2007):

0 - Inexistência de alterações da mucosa;

1 - Eritema e vasodilatação discretos ou severos e ausência de úlceras;

2 - Eritema e vasodilatação severos, com erosão da camada superficial da mucosa;

3 - Eritema e vasodilatação severos, incluindo a presença de úlceras em $\frac{1}{4}$ da área de ranhura, podendo apresentar pseudomembrana;

4 - Eritema e vasodilatação severos com presença de úlceras confluentes em $\frac{1}{2}$ da área de ranhura, com diminuição da elasticidade da mucosa;

5 - Toda área de ranhura ulcerada e sem elasticidade tecidual.

2. Escala para avaliação de Mucosite Oral modificada para hamsters, de acordo com a área de ulceração e a severidade do eritema (Wilder-Smith et al., 2007) (Quadro 4.1):

Área de ulceração*	Severidade do eritema†		
0	0	1	2
1	1	2	3
2	2	3	4
3	3	4	5

Quadro 4.1 - (*) Área de ulceração: 0 = nada; 1 = < 4 mm²; 2= 4-9 mm²; 3 = > 9 mm². (†) Severidade do eritema: 0 = nada; 1 = não severo; 2= severo

Para a realização das fotografias, foi utilizada a máquina fotográfica acoplada a um suporte apropriado para macro e micro reproduções fotográficas, sempre ajustadas à 23,6 cm de distância da mesa cirúrgica (Figura 4.3). As fotos foram realizadas, para os grupos CQ, L, LA e LB, nos dias 5, 7 e 10 do experimento.

Figura 4.3 - Suporte para a máquina fotográfica. Todas as fotografias foram realizadas de forma padronizada, sempre 23,6 cm distantes da mesa cirúrgica

Todos os dados clínicos foram anotados em tabelas do programa Microsoft Excel para posterior análise estatística, onde os resultados obtiveram significância quando $p < 0.05$.

4.2.3 Análise bioquímica

Para as análises bioquímicas, logo após a eutanásia dos animais, o fragmento de mucosa oral (grupos C, CQ, L, LA e LB) e as glândulas salivares submandibular e sublingual (grupos C, CQ e LG), coletados nos dias 5, 7 e 10 do experimento, foram imediatamente removidos e previamente mantidos em gelo seco e armazenadas em freezer a -80°C . No momento de uso foram pesadas e homogeneizadas em tampão específico para cada experimento.

4.2.3.1 ensaio imunoenzimático (ELISA) para TNF- α

Foram analisados através de ensaios imunoenzimáticos para a detecção de TNF- α os fragmentos de mucosa oral. Todos eles foram pesados e homogeneizados a 10% em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,2. Após a homogeneização, foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos e, então, analisados através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), pelo kit para detecção de TNF- α (RayBio®, Rat TNF-alpha, USA), o qual promove a medição quantitativa da citocina no sobrenadante pipetado em poços contendo anticorpo imobilizado, após serem lavados e conjugados ao substrato TMB. A leitura da absorbância foi realizada através de micro-placas, usando espectrofotômetro com filtros de 570 e 450 nm.

4.2.3.2 concentração de proteína

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

4.2.3.3 atividade enzimática da peroxidase

A determinação da peroxidase foi realizada nos fragmentos de GS, pelo método de Chandra (Chandra et al., 1977), modificado por Anderson (Anderson, 1986). Este método consiste na medida da variação da absorbância 460nm, pelo espectrofotômetro, de uma mistura de amostras de saliva ou do homogenado das glândulas, de tampão fosfato 10 mM, odianisidina 10 mM e H_2O_2 2,1 mM. Foi usado como padrão a solução de lactoperoxidase 1mg/mL com diluição 1:25.

4.2.3.4 atividade enzimática da catalase

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

4.2.3.5 atividade enzimática da superóxido dismutase

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada nos fragmentos de GS, os quais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato (PBS) 0.01 M pH 7,0 . Após a centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da SOD

através do kit comercial RANDOX. Este método consiste na análise espectrofotométrica a 600nm (Woolliams et al., 1983).

4.2.3.6 atividade enzimática da lactate desidrogenase

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada nos fragmentos de GS. Após serem homogeneizados a 10% em meio de homogeneização, pH 7,4 e centrifugados, o sobrenadante foi analisado através do método descrito por Bergmeyer & Bernt (Bergmeyer; Bernt, 1965). Este se baseia na oxidação de NADH pela adição do piruvato. A diminuição da absorbância foi acompanhada a 340 nm por 3 minutos.

4.2.4 Análise histológica

Para a realização das análises histológicas (microscopia de luz, eletrônica de transmissão, imunocitoquímica ou imuno-histoquímica), após sacrifício do animal, os fragmentos da mucosa oral (grupos C, CQ, L, LA e LB) e GS submandibular e sublingual (grupos C, CQ e LG) foram obtidos nos dias 5, 7 e 10 do experimento, com o auxílio de uma tesoura e prontamente imersos em solução fixadora (0,1% glutaraldeído + 4% formaldeído em tampão cacodilato 0,1M – pH 7,4). Todas as análises foram realizadas por avaliadores calibrados.

4.2.4.1 microscopia de luz

Foram analisados por microscopia de luz os fragmentos de mucosa oral e glândulas salivares em todos os tempos experimentais. Para isso, os espécimes foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 e submetidos à desidratação em concentrações crescentes de etanol, seguido de acetona absoluta, infiltrados e incluídos em historesina JB-4 (Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Foram obtidos cortes de 3 μ m em um micrótomo MICROM HM360 (Alemanha) com a utilização de navalhas de vidro preparadas no *knife-maker* Leica EM KMR3 (Leica, Wetzlar, Germany), os quais foram corados com fucsina ácida e hematoxilina. As lâminas foram montadas utilizando-se como meio o Entellan (Merck, Germany), examinadas e fotografadas em um microscópio de luz Olympus BX 60.

4.2.4.2 microscopia electronica de transmissão

Foram analisados através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) somente os fragmentos de GS obtidos no décimo dia do experimento. Os espécimes foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 durante uma hora, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% durante duas horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol, seguido de acetona absoluta, infiltrados e incluídos em resina epóxica Spurr (Electron Microscopy Sciences, USA) em formas de silicone, cuja polimerização ocorreu a 60° C durante 72 horas em ambiente livre de humidade. Cortes semifinos de 1 μ m de espessura foram obtidos no micrótomo citado no item anterior e corados com azul de toluidina para seleção das áreas a serem examinadas em MET. A partir de então, os blocos foram aparados e cortes ultrafinos (60 nm de espessura) foram obtidos em um ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT (Leica, Switzerland). Os cortes foram coletados em telas de cobre com 200 *meshes*,

contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinados e fotografados em um MET JEOL 1010 (JEOL, Japan).

4.2.4.3 imuno-histoquímica

Foram submetidos à reação de imuno-histoquímica somente os espécimes de mucosa oral obtidos no décimo dia do experimento. As reações foram feitas pelo método da streptavidinabiotina peroxidase a partir de cortes com 3 µm de espessura, em lâminas silanizadas, do material previamente desidratado em concentrações crescentes de etanol, infiltrados e embocado em parafina como descrito no item 4.2.4.1. As lâminas contendo cortes não corados foram submetidas ao processo de incubação com o anticorpo primário anti-citoqueratina 10 (cK10, Dako Corp., CA, EUA) por oito horas cada e incubação do complexo estreptoavidina-biotina (kit LSAB Peroxidase K0609 – Dako Corp. CA, USA) por 30 minutos. Para a revelação da reação imuno-histoquímica foi usado o cromógeno diaminobenzidina a 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis MO/USA) por 30 minutos. Após 10 minutos de lavagem em água corrente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada por 5 minutos e submetidos à desidratação em uma cadeia ascendente de etanol e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro utilizando-se como meio o Entellan (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). O controle negativo foi realizado através da abolição do anticorpo primário. A imunomarcação foi avaliada por examinadores pré-calibrados em microscópio de luz com aumento de 100x. Foi realizada análise descritiva e semi-quantitativa de todos os cortes, através da escala de intensidade: 0 a 3 (0= ausência; 1= marcação fraca; 2= marcação moderada; 3= marcação intensa).

4.2.4.4 imunocitoquímica

Foram submetidos à reação imunocitoquímica os espécimes de glândulas salivares obtidos no décimo dia do experimento, para a quantificação de proteínas envolvidas no processo secretório. Para isso, os espécimes foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 durante uma hora, desidratados em concentrações crescentes de etanol, infiltrados e incluídos em resina acrílica L.R. White (London Resin Company Ltd., England) em cápsulas de gelatina, cuja polimerização ocorreu a 60° C durante 72 horas. Cortes de 1 µm de espessura foram corados com azul de toluidina para seleção das áreas e, então, corte ultrafinos (70 nm) foram obtidos, em telas de níquel de 150 *meshes*, recobertas com película de formvar, através de um ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT (Leica, Switzerland). Após serem bloqueadas com albumina (BSA), as telas com os cortes de glândula submandibular foram incubadas em anticorpos primários anti-NGF, anti-EGF e anti-PIP2, enquanto as telas com cortes de glândula sublingual foram incubadas em anticorpos primários anti-p16 e anti-mucina por 24 horas a 4° C e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal (partículas de 15 nm) (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) durante uma hora a 25° C e posteriormente contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Para determinar a concentração e distribuição das proteínas, as telas foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CX (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) do Laboratório de Biologia Celular da Universidade de Connecticut, USA e fotografadas no aumento de 10.000x para a contagem de partículas de ouro/ µm².

4.2.5 Análise estatística

Os resultados clínicos foram analisados pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis, Friedman e teste de contraste de Turkey. Os resultados bioquímicos foram analisados pelo teste estatístico de variância (ANOVA) e o teste de contraste de Turkey. Os resultados de imunocitoquímica foram analisados pelo teste estatístico logaritmo natural (LN). Para todos os testes aplicados, aceitou-se uma significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados foram subdivididos em efeitos das fototerapias na mucosite oral e efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares.

5.1 Efeito das fototerapias na mucosite oral

Através dos subitens a seguir, foram descritos os resultados das análises clínicas, bioquímicas e histológicas.

5.1.1 Peso e consumo de ração e água

Os animais do grupo C foram os que consumiram mais água e ração, seguido pelo grupo LB, o que representou uma relação positiva com os dados referentes à perda de peso corporal, uma vez que os animais do grupo C apresentaram aumento de peso, em 4%, e os do grupo LB foram os que mais se aproximaram deste valor. O grupo CQ teve redução de 18% do peso inicial e o grupo LA apresentou a perda de peso mais acentuada, de aproximadamente 26% (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Médias da variação de peso corporal e contrastes* pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$) (n=10)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	1 (± 2.6) Aa	1 (± 3.0) Ca	2 (± 3.3) Fa	5 (± 3.1) Ia
CQ	-13 (± 6.0) Bb	-16 (± 8.6) DEbc	-19 (± 11.5) GHbc	-26 (± 16.2) KLc
LB	-5 (± 7.8) Abd	-8 (± 7.5) Cdd	-10 (± 10.1) Gde	-16 (± 13.3) Ke
LED	-12 (± 5.0) Abf	-15 (± 13.1) Defg	-20 (± 8.5) GHg	-32 (± 11.4) LMh
LA	-16 (± 7.0) Bi	-21 (± 7.0) Eik	-27 (± 11.8) Hk	-40 (± 15.2) MI

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

O consumo de ração foi menor para os grupos LED e LA desde o início do experimento. Porém, o grupo LB foi semelhante aos grupos LED e LA nos dias 5 e 7. O grupo CQ manteve o consumo semelhante ao grupo C somente nos dias 4 e 5, sendo 26% e 33% menor que o grupo C nos dias 7 e 10, respectivamente. No dia 10, último tempo experimental, o consumo do grupo C permaneceu maior que os demais grupos, os grupos CQ e LB foram semelhantes e consumiram aproximadamente 40% a menos que o grupo C e 50% a mais que os grupos LED e LA (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Médias da variação do consumo de ração (gramas) e contrastes* pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$) (n=10)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	34 (± 8.0) Ad	42 (± 8.1) Dc	57 (± 9.2) Gb	81 (± 17.5) Ja
CQ	25 (± 10.5) ABg	29 (± 12.8) DEg	42 (± 17.8) Hf	54 (± 23.6) Ke
LB	16 (± 8.0) BCk	20 (± 6.1) EFik	27 (± 8.4) li	42 (± 18.3) Kh
LED	9 (± 5.9) Co	13 (± 6.8) Fmo	19 (± 10.1) Im	27 (± 13.4) LI
LA	5 (± 3.5) Cr	22 (± 5.5) Fqr	14 (± 6.0) lpq	21 (± 7.1) Lp

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

Diferente do consumo de ração, o consumo de água foi semelhante entre os grupos C e LB em todos os tempos experimentais. Ao comparar todos os grupos, até o dia 5 não houve diferença estatística, diferenciando-se somente a partir do dia 7. No dia 10, o consumo dos grupos CQ, LED e LA foi aproximadamente 15% menor quando comparado aos grupos C e LB (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Médias da variação do consumo de água (mL) e contrastes* pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$) (n=10)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	44 (± 10.9) Ad	57 (± 9.7) Bc	79 (± 10.9) DEb	119 (± 5.5) Ga
CQ	27 (± 5.5) Ag	38 (± 8.1) Bcg	63 (± 13.2) EFf	89 (± 17.6) He
LB	37 (± 16.0) Ak	51 (± 20.0) Bcj	84 (± 24.9) Di	120 (± 41.3) Gh
LED	29 (± 8.6) An	40 (± 8.2) Bcn	58 (± 8.7) Fm	84 (± 15.0) HI
LA	26 (± 7.3) Aq	33 (± 9.5) Cq	59 (± 18.8) Fp	82 (± 29.6) Hr

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

5.1.2 Análise clínica

A avaliação clínica das lesões de mucosite oral, realizada através das escalas propostas pela OMS e W-Smith apresentaram resultados semelhantes (Tabela 5.4). Pela escala OMS, o grau de mucosite inicial, induzido no dia 4, foi igual para todos os grupos experimentais. No dia 5 houve melhora significativa apenas para o grupo LA, o qual retornou ao grau mais elevado no dia 7. Diferente dos demais, o grupo LB apresentou redução significativa do grau de mucosite a partir do dia 7, chegando a zero no dia 10. O grupo LED foi semelhante ao grupo LB no dia 10 ($p < 0.05$). Os grupos CQ e LA mantiveram graus mais elevados de mucosite até o último dia do experimento, porém, o grupo CQ não apresentou diferença significativa entre os graus de mucosite inicial e final, diferente do grupo LA, que apresentou diminuição estatisticamente significativa no dia 10 (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Médias do grau de mucosite, pelas escalas propostas pela OMS e W-Smith. Testes Kruskal-Wallis para entre os grupos em cada dia e de Friedman para entre os tempos experimentais em cada grupo, realizados de forma independente, sem relação entre as escalas * (n=10)

Grupos	Classificação da mucosite oral			
	Escala OMS			
	Dias			
	4	5	7	10
CQ	3.7 Aa	4.2 Cb	3.2 Ea	2.4 Ga
LB	4.0 Ae	4.0 Ce	1.6 Dd	0.0 Fc
LED	3.9 Ah	4.0 Ch	3.0 Eg	0.3 Ff
LA	4.0 Ak	3.3 Bj	3.7 Ek	1.6 Gi
Escala W-Smith				
CQ	3.2 Aa	4.1 Db	3.3 Fab	2.3 Ha
LB	2.8 Af	2.8 Bef	1.4 Ed	0.1 Gc
LED	3.0 Aij	3.2 Bcj	2.6 Fhi	0.3 Gg
LA	3.0 Alm	3.5 Cn	3.2 Fmn	1.5 Hk

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

A análise clínica da mucosite oral realizada através da escala proposta por W-Smith revelou, assim como observado pela escala OMS, que todos os grupos iniciaram o experimento com o mesmo grau de mucosite. Os grupos LB e LED apresentaram graus semelhantes no dia 5 e significativamente menores que os grupos CQ e LA. A partir do dia 7, somente o grupo LB evidenciou significativa redução no grau de mucosite quando comparado aos demais grupos, os quais mantiveram graus mais elevados e semelhantes entre si. No último dia do experimento os grupos LB e LED apresentaram melhora significativa com graus próximos de zero. Os grupos CQ e LA mostraram valores semelhantes durante todo o experimento, porém, ao analisar o grupo

CQ nos diferentes dias de experimento, não houve diferença estatística entre os graus de mucosite inicial (dia 4) e final (dia 10), diferente do grupo LA, que apresentou diferença no dia 10 ($p<0.05$) (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Aspecto clínico das lesões de mucosite oral para os grupos CQ (A, B, C), LB (D, E, F), LED (G, H, I) e LA (J, K, L) nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente

5.1.3 Análise bioquímica

A análise bioquímica, realizada através de ensaios imunoenzimáticos para TNF- α , revelou concentração semelhante da citocina nos dias 5 e 10 para todos os grupos experimentais, porém, no dia 7 do experimento os grupos CQ e LA apresentaram um aumento de aproximadamente 84% na concentração de TNF- α com relação ao grupo C, enquanto os grupos LB e LED mantiveram valores semelhantes ao grupo C (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Média da concentração de TNF- α (picogramas por mililitro) para cada grupo (segundo os períodos experimentais. Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($2 < n < 10$))

5.1.4 Análise morfológica – microscopia de luz

5.1.4.1 grupo controle

Todos os cortes, em todos os tempos experimentais, caracterizam-se por fragmentos de mucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, corrugado, com poucas camadas de células e interface plana com o tecido conjuntivo. A lâmina própria esteve constituída por tecido conjuntivo ora denso ora frouxo, bem celularizado; não detectou infiltrado inflamatório. A submucosa exibia feixes organizados de fibras musculares esqueléticas (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Fotomicrografia de mucosa oral do grupo C. 20X. Coloração com Hematoxilina & Fucsina ácida

5.1.4.2 grupo controle positivo

Os cortes histológicos obtidos no dia 5 revelaram fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com áreas de atrofia epitelial, área extensa de solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo. O estrato basal apresentou áreas hiperplásicas e intensa basofilia nuclear. Na lâmina própria notou-se aumento do tecido conjuntivo denso e infiltrado inflamatório misto, variando de moderado a intenso, com hiperemia vascular (Figura 5.3 A).

No dia 7 do experimento, os cortes revelaram fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com áreas de espessamento epitelial, ainda com solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo. A lâmina própria manteve-se com predominância do tecido conjuntivo denso e hiperemia vascular, bem como de infiltrado inflamatório intenso associado a área de necrose (Figura 5.3 B).

No dia 10, o fragmento de mucosa apresentou-se revestido por epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado corrugado. A camada basal apresentou áreas hiperplásicas, e queratinócitos com núcleos em paliçada e intensamente basófilos. Na lâmina própria verificou-se intenso infiltrado inflamatório crônico difuso, hiperemia vascular e fibras colágenas desorganizadas (Figura 5.3 C).

5.1.4.3 grupo tratado com LED

Os cortes histológicos obtidos no dia 5 mostraram fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com estrato basal preservado e áreas de solução de continuidade e de exposição

do tecido conjuntivo. Na lâmina própria houve a presença de processo inflamatório discreto (Figura 5.3 G).

No dia 7 do experimento, os cortes revelaram epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com áreas hiperplásicas, solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo. A lâmina própria apresentou infiltrado inflamatório misto, variando de moderado a intenso, numerosos vasos sangüíneos e tecido de granulação (Figura 5.3 H).

No dia 10 notou-se o fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, estabelecendo uma interface plana com o tecido conjuntivo subjacente. A lâmina própria estava constituída por tecido conjuntivo permeado por discreto infiltrado inflamatório, associado a áreas de tecido de granulação. Pode ser notada neoformação de vasos com calibres variados (Figura 5.3 I).

5.1.4.4 grupo tratado com laser de baixa potência

Os cortes histológicos obtidos no dia 5 revelaram fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com área de solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo. O estrato basal apresentou áreas hiperplásicas e intensa basofilia nuclear. A lâmina própria apresentou discreto infiltrado inflamatório (Figura 5.3 D).

No dia 7 do experimento, os cortes revelaram uma camada uniforme de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, indicativo de re-epitelização recente. A lâmina própria esteve permeada por infiltrado inflamatório misto variando de moderado a intenso e por áreas de edema (Figura 5.3 E).

No dia 10 notou-se o fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. A camada basal ainda apresentou

áreas hiperplásicas isoladas. A lâmina própria esteve constituída por tecido conjuntivo denso com fibras colágenas organizadas, associado a tecido de granulação, por numerosos vasos sanguíneos e em meio a fibras (Figura 5.3 F).

5.1.4.5 grupo tratado com laser de alta potência

Os cortes obtidos no dia 5 mostraram fragmentos de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com áreas de atrofia, além de solução de continuidade, exposição do tecido conjuntivo e presença de áreas hiperplásicas no estrato basal (Figura 5.3 J).

No dia 7 do experimento, os cortes revelaram epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com atrofia de células do estrato basal, as quais apresentaram intensa basofilia e halo perinuclear; observaram-se áreas de solução de continuidade com exposição do tecido conjuntivo.. A lâmina própria esteve formada por tecido conjuntivo denso, com hiperemia vascular e infiltrado inflamatório intenso, associado a área extensa de necrose (Figura 5.3 K).

No dia 10 notou-se o fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O estrato basal esteve constituído por moderado infiltrado inflamatório crônico difuso, associado a tecido de granulação, fibras colágenas desorganizadas e numerosos vasos sanguíneos (Figura 5.3 L).

Figura 5.3 – Fotomicrografias de mucosite oral para os diferentes grupos experimentais. Na primeira linha o grupo CQ, expondo em (A) dia 5 do experimento, fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, atrofia epitelial, área extensa de solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo (seta), na lâmina própria nota-se aumento do tecido conjuntivo denso e infiltrado inflamatório (II) misto variando de moderado a intenso e hiperemia vascular (VS); em (B) dia 7, fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com áreas de espessamento epitelial. Lâmina própria revela hiperemia vascular e infiltrado inflamatório (II) intenso associado à área de necrose (N); em (C) dia 10, fragmento de mucosa apresenta-se revestido por epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado. Áreas hiperplásicas na camada basal, hiperchromatismo nuclear e núcleos em paliçada. Na lâmina própria verifica-se intenso infiltrado inflamatório crônico difuso (II), hiperemia vascular e fibras colágenas desorganizadas. Na segunda linha o grupo LB, expondo em (D) dia 5 do experimento, fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com área de solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo (seta). A camada basal apresenta áreas hiperplásicas e hiperchromatismo nuclear. Lâmina própria apresenta discreto infiltrado inflamatório; em (E) dia 7, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, homogêneo e indicativo de re-epitelização recente. Lâmina própria permeada infiltrado inflamatório (CI) misto variando de moderado a intenso e áreas de edema; em (F) dia 10, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e lâmina própria constituída por tecido conjuntivo denso associado a tecido de granulação, fibras colágenas organizadas, intensa angiogênese (VS) e fibrogênese. Na terceira linha o grupo LED, expondo em (G) dia 5 do experimento, fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com camada basal preservada e áreas de solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo (seta). Na lâmina própria presença de processo inflamatório discreto (II); em (H) dia 7, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com áreas hiperplásicas, solução de continuidade e exposição do tecido conjuntivo (seta). Lâmina própria com infiltrado inflamatório (II) misto variando de moderado a intenso, angiogênese e tecido de granulação; em (I) dia 10, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com interface plana com o tecido conjuntivo, lâmina própria constituída por tecido conjuntivo permeado por discreto infiltrado inflamatório associado a tecido de granulação. Fibras musculares (M) e neoformação de vasos sanguíneos com calibres variados (VS). Na quarta linha o grupo LA, expondo (J) dia 5 do experimento, fragmento de mucosa revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, áreas de atrofia, com solução de continuidade, exposição do tecido conjuntivo (seta) e presença de áreas hiperplásicas na camada basal, em (K) dia 7, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, atrofia de células da camada basal, hiperchromatismo nuclear e halo perinuclear. Lâmina própria revela aumento do tecido conjuntivo denso, hiperemia vascular e infiltrado inflamatório (II) intenso associado à área extensa de necrose (N), em (L) dia 10, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, lâmina basal constituída por moderado infiltrado inflamatório (II) crônico difuso associado a tecido de granulação, fibras colágenas desorganizadas, fibras musculares (M) e angiogênese. Aumento original: 20X – Coloração Hematoxilina & Fucsina ácida

5.1.5 Imunomarcacão para citoqueratina 10

As células da camada córnea de todos os grupos expressaram citoqueratina 10, sendo a marcação fraca para os grupos C, LB e LA, moderada para o grupo LED e intensa para o grupo CQ (Figura 5.4). Para os grupos LA e CQ, a marcação foi observada com maior intensidade na região da injúria (Figura 5.4 G e J).

Figura 5.4 – Expressão de citoqueratina 10 por imuno-histoquímica, em fragmentos de mucosa oral. Em (A e F) grupo C, mostrando camada córnea fina, distribuída de forma homogênea no epitélio com fraca expressão da citoqueratina 10. Em (C e G) grupo CQ, com camada córnea espessa em toda extensão epitelial e expressão intensa da citoqueratina. Em (E e H) grupo LB, mostrando camada córnea fina, distribuída de forma homogênea no epitélio e fraca marcação da citoqueratin. Em (D e I) grupo LED, mostrando camada córnea fina distribuída de forma heterogênea no epitélio, sendo inexistente na região correspondente à injúria. A marcação para a citoqueratina 10 passa de fraca a moderada a medida que se distancia da ferida. Em (E e J) grupo LA, mostrando camada córnea fina e fracamente marcada pela citoqueratina 10. Sua distribuição no epitélio é heterogênea, sendo mais expressa e marcada no local da injúria. Aumento original: A, B, C, D e E, 20X; E, F, G, H, I e J, 40X

5.2 Efeito do laser na hipofunção das glândulas salivares

Através dos subitens a seguir, foram descritos os resultados das análises clínicas, bioquímicas e histológicas.

5.2.1 Peso e consumo de ração e água

O grupo LG manteve o peso semelhante ao grupo C até o dia 7 do experimento ($p < 0.05$). Apesar de estatisticamente semelhante ao grupo LG no dia 7, o grupo CQ apresentou diferença de mais de 50% do peso corporal. Ao término do experimento, no dia 10, os grupos CQ e LG apresentaram perda de peso semelhantes, com redução de aproximadamente 80% quando comparados ao grupo C (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Médias da variação de peso corporal e contrastes* pelo teste de Turkey ($p=0,05$) ($n=10$)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	1 (± 2.6) Aa	1 (± 3.0) Ca	2 (± 3.3) Fa	5 (± 3.1) Ia
CQ	-13 (± 6.0) Bb	-16 (± 8.6) Dbc	-19 (± 11.5) Gbc	-26 (± 16.2) Kc
LG	-5 ($\pm$) ABm	-7 ($\pm$) CDm	-9 ($\pm$) FGm	-21 ($\pm$) Kn

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

O consumo de ração não mostrou correlação positiva com a perda de peso. Os grupos C e CQ mantiveram consumo semelhante até o dia 7 do experimento ($p<0.05$), enquanto o grupo LG, ao ser comparado ao grupo C, apresentou menor consumo em todos os tempos experimentais. Ao término do experimento, os grupos CQ e LG apresentaram valores semelhantes, 35% menor que o valor de consumo apresentado pelo grupo C ($p<0.05$) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Médias da variação do consumo de ração (gramas) e contrastes* pelo teste de Turkey ($p=0,05$) ($n=10$)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	34 (± 8.0) Ad	42 (± 8.1) Dc	57 (± 9.2) Gb	81 (± 17.5) Ja
CQ	25 (± 10.5) ABg	29 (± 12.8) DEg	42 (± 17.8) Hf	54 (± 23.6) Ke
LG	18 (± 5.0) Bct	22 (± 5.5) Et	23 (± 6.0) It	52 (± 7.1) Ks

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

O consumo de água foi semelhante entre os três grupos, C, CQ e LG até o dia 7. Somente no dia 10 do experimento, os grupos CQ e LG apresentaram menor consumo, cerca de 25% a menos que o grupo C (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Médias da variação do consumo de água (mL) e contrastes* pelo teste de Turkey ($p=0,05$) ($n=10$)

Grupos	Dias			
	4	5	7	10
C	44 (± 10.9) Ad	57 (± 9.7) Bc	79 (± 10.9) DEb	119 (± 5.5) Ga
CQ	27 (± 5.5) Ag	38 (± 8.1) Bg	63 (± 13.2) Ef	89 (± 17.6) He
LG	32 (± 13.0) At	42 (± 13.0) Bt	63 (± 17.2) Es	96 (± 17.0) Hr

* Letras iguais significam semelhança, maiúsculas para entre os grupos e minúsculas para entre os dias.

5.2.2 Análise bioquímica

Os resultados das análises bioquímicas foram descritas separadamente para as glândulas salivares submandibular e sublingual.

5.2.2.1 glândula submandibular

Com relação às análises bioquímicas realizadas na glândula submandibular, observa-se significativo aumento na concentração de proteína total para os grupos CQ e LG com relação ao grupo C no dia 7 do experimento e no dia 10, o grupo CQ, ao ser comparado aos valores por ele mesmo

apresentados nos tempos experimentais anteriores, apresentou diminuição ($p<0.05$) (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Médias da concentração de proteína total (mg de prot/ml), da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p<0.05$) ($n=10$)

Entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes peroxidase e catalase aumentou mais de 50% no grupo CQ quando comparado ao grupo C ($p<0.05$). A atividade da peroxidase aumentou, no grupo CQ, a partir do dia 7 (Gráfico 5.4), enquanto a atividade da catalase aumentou somente no dia 10 (Gráfico 5.5). O grupo LG apresentou valores semelhantes ao grupo C em todos os dias do experimento, tanto para a atividade da peroxidase quanto da catalase. Com relação ao grupo CQ, o grupo LG apresentou menor atividade da peroxidase no dia 7 do experimento ($p<0.05$) e nenhuma diferença na atividade da catalase (Gráficos 5.3 e 5.4).

Gráfico 5.3 - Médias da atividade específica da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

Gráfico 5.4 - Médias da atividade específica da enzima catalase (U/mg prot) da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

Com relação à atividade da SOD, o grupo CQ apresentou diminuição dos valores quando comparado ao grupo C ($p<0.05$) em todos os dias do experimento. Entretanto, o grupo LG mostrou aumento da atividade enzimática nos dias 7 e 10 quando comparado ao grupo CQ (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5 - Médias da atividade específica da enzima SOD (U/mg prot) da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p<0.05$) ($n=10$)

A atividade da enzima LDH foi maior para o grupo CQ no dia 5 ($p<0.05$). Nos outros dias experimentais não houve diferença entre os grupos (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 - Médias da atividade específica da enzima LDH (U/mg prot/ml) da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

5.2.2.2 glândula sublingual

Nas análises realizadas na glândula submandibular, a concentração de proteína total semelhante entre os grupos C e CQ em todos os dias do experimento. O grupo LG apresentou diminuição da concentração de proteína total nos dias 7 e 10 do experimento, ao comparar com os valores por ele apresentado no dia 5 ($p < 0.05$) (Gráfico 5.7).

Gráfico 5.7 - Médias da concentração de proteína total (mg de prot/ml), na glândula sublingual, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

A atividade das enzimas antioxidantes peroxidase e catalase do grupo CQ aumentaram de forma significativa no dia 10 do experimento ($p < 0.05$). A atividade da peroxidase permaneceu semelhante em todos os grupos no dia 5. No dia 7, houve aumento da atividade da enzima para os grupos CQ e LG quando comparados aos valores apresentados pelos mesmos grupos no dia 5, permanecendo aumentados, no dia 10, somente para o grupo CQ ($p < 0.05$) (Gráfico 5.8). A atividade da catalase aumentou para o grupo CQ no dia 10 em aproximadamente 110% quando comparado ao grupo C ($p < 0.05$) (Gráfico 5.9).

Gráfico 5.8 - Médias da atividade específica da enzima peroxidase (ug lacto/mg prot) da glândula sublingual, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

Gráfico 5.9 - Médias da atividade específica da enzima catalase (U/mg prot) da glândula sublingual, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

Com relação a atividade da SOD, os animais do grupo CQ apresentaram diminuição dos valores quando comparados ao grupo C ($p < 0.05$) em todos os dias do experimento. Nota-se que o grupo LG também apresenta baixa atividade da enzima no dia 5, no entanto, recupera o valor nos dias 7 e 10.

Além disso, a atividade da SOD apresentada pelo grupo LG no dia 10 é aproximadamente 75% maior que o grupo CQ (Gráfico 5.10).

Gráfico 5.10 - Médias da atividade específica da enzima SOD (U/mg prot) da glândula sublingual, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

A atividade da enzima LDH diminuiu gradualmente para o grupo LG, enquanto o oposto ocorreu para o grupo CQ, o qual manteve atividade enzimática elevada desde o dia 5 ($p < 0.05$). Não houve diferença entre os grupos C e LG. No dia 10, a atividade da LDH apresentada pelo grupo CQ foi aproximadamente 130% maior que a do grupo LG (Gráfico 5.11).

Gráfico 5.11 - Médias da atividade específica da enzima LDH (U/mg prot/ml) da glândula submandibular, para os grupos C, CQ e LG, nos diferentes tempos experimentais (dias 5, 7 e 10). Letras iguais significam semelhança ($p < 0.05$) ($n=10$)

5.2.3 Análise morfológica – microscopia de luz e eletrônica de transmissão

Os resultados das análises histológicas foram descritas separadamente para as glândulas salivares submandibular e sublingual.

5.2.3.1 glândula submandibular

Em todos os tempos experimentais, notou-se no grupo C, áreas de glândula salivar mista com predomínio de células serosas contendo grânulos de secreção, núcleo esférico e citoplasma basófilo, as quais apresentam-se íntegras. Presença de mastócitos no estroma. Os ductos intercalares, granuloso e estriado também apresentaram-se íntegros (Figura 5.5 A, B e C).

A partir do dia 5 do experimento e de forma crescente para os demais tempos experimentais (7 e 10 dias), o grupo CQ revelou características de glândula salivar mista com predomínio de células serosas. Foi evidente a atrofia das unidades secretoras terminais e o aumento dos espaços intercelulares (Figura 5.5 D, E e F), enquanto o grupo LG manteve as características originais (Figura 5.5 G, H e I).

Figura 5.5 – Fotomicrografia das glândulas salivares submandibulares. Em (A, B e C) grupo C nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando integridade das unidades secretoras terminais e ductos granular (DG), intercalar, estriado (DE) e secretório. Em (B) Presença de mastócitos (▲) no estroma. Em (D, E e F) grupo CQ nos dias 5, 7 e 10, respectivamente, revela atrofia das unidades secretoras terminais de forma progressiva entre os tempos experimentais e, ao decimo dia (F) revela aumento do espaço intercelular. Aumento original: 20X – Coloração Hematoxilina & Fucsina ácida

Ao analisar, comparativamente, as amostras de glândula submandibular dos mesmos grupos (C, CQ e LG) em microscópio eletrônico de transmissão, notou-se que o quimioterápico 5-FU, além de promover a atrofia das unidades secretoras terminais, promoveu a fusão dos grânulos secretórios. O grupo CQ apresentou, ainda, maior número de apoptose celular e mastócitos no estroma glandular (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das glândulas salivares submandibulares. Em (A, B e C) grupo C nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando integridade das unidades secretoras terminais. Em (D, E e F) grupo CQ nos dias 5, 7 e 10, respectivamente. Em (D) atrofia celular em fase inicial, em (E) presença de núcleo apoptótico (Ap) e restos celulares, em (F) atrofia celular em fase avançada e fusão granular. Em (G, H e I) grupo LG nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando preservação das unidades secretoras e integridade granular. Lu, lúmen, Nu, núcleo. Aumento original: 10.000X

5.2.3.2 glândula sublingual

Em todos os tempos experimentais, para o grupo C, notou-se características de glândula mista com predomínio de células mucosas, estas com citoplasma basófilo pouco corado e núcleos de cromatina densa localizados na base da célula. Foi observada, também, integridade dos ductos intercalares, secretório e estriado (Figura 5.7 A, B e C).

A partir do dia 5 do experimento e de forma crescente para os demais tempos experimentais (7 e 10 dias), o grupo CQ revelou áreas de glândula salivar mista com predomínio de células mucosas, as quais mostraram evidente atrofia das unidades secretoras terminais, perda do limite entre as células e aumento do estroma glandular (Figura 5.7 D, E e F), enquanto o grupo LG manteve suas características próximas às originais (Figura 5.7 G, H e I).

Figura 5.7 – Fotomicrografia das glândulas salivares sublinguais. Em (A, B e C) grupo C grupo C nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando integridade das unidades secretoras terminais e ductos intercalares, estriado e secretório. Em (D, E e F) grupo CQ nos dias 5, 7 e 10, respectivamente, revela atrofia das unidades secretoras terminais de forma progressiva entre os tempos experimentais e, ao decimo dia (F) revela aumento do espaço intercelular. Aumento original: 20X – Coloração Hematoxilina & Fucsina ácida

Ao analisar, comparativamente, as amostras de glândula sublingual dos mesmos grupos (C, CQ e LG) em microscópio eletrônico de transmissão, notou-se o quimioterápico 5-FU, além de promover a atrofia das unidades

secretoras terminais, perda do limite celular e aumento do estroma, promoveu, a fusão dos grânulos secretórios a partir do dia 7 do experimento (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das glândulas salivares sublinguais. Em (A, B e C) grupo C nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando integridade das unidades secretoras terminais. Em (D, E e F) grupo CQ nos dias 5, 7 e 10, respectivamente. Em (E) presença de núcleo apoptótico (Ap), estroma aumentado e fusão dos grânulos secretórios (seta), em (F) atrofia celular em fase avançada com perda do limite celular, aumento do estroma e fusão granular (seta). Em (G, H e I) grupo LG nos dias 5, 7 e 10 do experimento, respectivamente, revelando preservação das unidades secretoras e integridade granular. *Lu*, lúmen, *Nu*, núcleo. Aumento original: 10.000X

5.2.4 Análise imunocitoquímica

Os resultados das análises histológicas por imunocitoquímica foram descritas separadamente para as glândulas salivares submandibular e sublingual.

5.2.4.1 glândula submandibular

As análises por imunocitoquímica nos fragmentos de glândula submandibular coletados no décimo dia do experimento mostram que o 5-FU promove diminuição do fator de crescimento neural (NGF, do inglês nerve growth factor) e fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂, do inglês phosphatidylinositol biphosphate), e aumento do fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês epidermal growth factor) ($p < 0.05$) (Figura 5.9).

O grupo LG apresentou diminuição do NGF semelhante ao grupo CQ ($p < 0.05$), mostrando que a FLBP não foi capaz de prevenir tal alteração (Figura 5.9 H). O PIP₂ foi encontrado em menor quantidade no grupo CQ, enquanto que o grupo LG manteve os valores mais próximos ao grupo C ($p < 0.05$) (Figura 5.9 F e I). O EGF apresentou tendência de aumento no grupo CQ, mas não houve significância (Figura 5.9 D). O grupo LG novamente manteve os dados mais próximos ao grupo C (Figura 5.9 G).

Figura 5.7 – Imunocitoquímica com marcação por partículas de ouro, para as proteínas EGF, NGF e PIP2 na glândula submandibular dos grupos C, CQ e LG. Aumento original: 10.000X

5.2.4.2 glândula sublingual

As análises por imunocitoquímica nos fragmentos de glândula sublingual coletados no décimo dia do experimento mostraram que o 5-FU promoveu diminuição da expressão do gene P16 e da proteína mucina ($p<0.05$) (Figura 5.10).

O grupo LG apresentou valores intermediários tanto para a expressão do gene P16 quanto para a mucina, não apresentando diferença significativa quando comparada aos grupos C e CQ (Figura 5.10).

Figura 5.10 – Imunocitoquímica quantitativa, com marcação por partículas de ouro, para o gene P16 e enzima mucina na glândula sublingual dos grupos C, CQ e LG. Aumento original: 10.000X

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como finalidade avaliar a mucosite oral (MO) e a hipofunção das glândulas salivares (HGS) induzidas pela administração do quimioterápico 5-Fluorouracil em *hamsters*, assim como comparar o efeito das diferentes fototerapias, com LED, laser de baixa e alta potência, no tratamento da MO e o efeito da fototerapia com laser em baixa intensidade (FLBI) no tratamento da HGS. Os resultados indicaram que a FLBI e a terapia com LED são eficazes na redução da severidade da MO, acelerando o processo de cicatrização da mucosa pela diminuição do processo inflamatório e neoformação de vasos sanguíneos. Além disso, a FLBI foi capaz de prevenir, nas glândulas salivares (GS) submandibular e sublingual, alterações estruturais e funcionais causadas pelo agente quimioterápico.

O modelo de mucosite experimental adotado no presente trabalho utilizou *hamsters* aos quais foi administrado o quimioterápico 5-FU, seguindo a metodologia proposta por Sonis et al. (1995). Os sinais clínicos decorrentes do tratamento quimioterápico, observados em todos os animais tratados, tais como diarreia, sangramento gastrointestinal, redução da ingestão de alimentos e do consumo de água, com consequente perda de peso (Sonis; Costello, 1995; Daniele et al., 2001) confirmaram a padronização da metodologia.

Muito embora os animais do grupo CQ tenham apresentado pior condição para a MO e HGS, o consumo de alimento e água por eles apresentado foi semelhante aos demais grupos experimentais, porém, diferente do grupo C. De fato, o 5-FU afeta não somente os tecidos da cavidade oral, mas de todo o trato gastrointestinal, incluindo importantes alterações na mucosa intestinal, as quais resultam em acentuada diminuição da absorção de água e nutrientes, contribuindo, também, para a perda de peso dos animais (Daniele et al., 2001). Além disso, as características anatomo-fisiológicas do *hamster* podem mascarar o consumo de alimento, uma vez que estes animais o armazenam

em bolsas situadas em cavidade oral e nem sempre o ingerem (Arruda; Montenegro, 1995).

As análises clínicas para as lesões de MO mostraram que os animais tratados com o LED e com a FLBI tiveram completo reparo das lesões de MO ao término de experimento, comprovando a maior efetividade no tratamento com estas fototerapias. Porém, o grupo LB desenvolveu graus menos severos de MO, reparação tecidual evidentemente acelerada e menor infiltrado inflamatório desde o dia 7 do experimento. Estes achados concordam com trabalhos já encontrados na literatura, onde os autores avaliaram o efeito do laser terapêutico na mucosite induzida por quimioterapia em modelo similar e a trataram com laser em baixa intensidade (comprimento de onda de 685nm, potência de 35mW e dose de 12J/cm²) por sete dias, o que promoveu a diminuição da severidade da MO e acelerou a reparação das lesões (Ferrari et al., 2004). Além disso, um estudo prospectivo randomizado, ao determinar o efeito da FLBI (comprimento de onda de 660nm, 15mW e 3.8J/cm²) na prevenção e tratamento da MO de pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, através da avaliação clínica diária, os autores concluíram que o laser foi eficaz no controle da intensidade da MO, assim como promover o efeito analgésico das lesões (Carvalho et al., 2011).

Ao contrário, do observado com os animais dos grupos LB e LED, os animais do grupo LA mantiveram graus mais elevados da lesão durante todos os tempos experimentais, apresentando edema severo e intenso infiltrado inflamatório. Porém, ainda assim, esse grupo apresentou grau de MO mais brando que o apresentado pelo grupo CQ, indicando que, apesar de não ser a melhor opção, pode ser uma alternativa positiva no tratamento da MO.

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo recente, onde os autores, ao compararem o efeito da fototerapia com a FLBI com o uso de laser de alta e baixa potência no tratamento da MO, sugerem que o laser de alta potência, ao contrário do laser de baixa potência, não foi capaz de reduzir a severidade das lesões de MO, porém foi mais eficaz na promoção da analgesia (Simões et al., 2009a).

O efeito analgésico promovido pela FLBI realizada com o laser de alta potência desfocado também tem sido avaliada outros autores. Recentemente, ao estudarem o efeito analgésico do laser no comprimento de onda de 830nm, 1W de potência, 4,5 cm distante de um modelo de cultura de células do gânglio dorsal de ratos, os autores sugerem que a aplicação repetida de laser resulta em bloqueio do fluxo axonal rápido através de mudanças eletroquímicas, modulando a nocicepção e reduzindo a dor, sendo uma alternativa não medicamentosa eficaz para o tratamento da dor crônica (Chow et al., 2009).

Os resultados bioquímicos para a determinação da concentração de TNF- α , citocina pró-inflamatória responsável pela indução do processo inflamatório e danos ao epitélio, revelam que os grupos LB e LED apresentaram menor expressão da citocina no dia 7 do experimento, quando comparados ao grupo CQ e LA. Estes dados confirmam que os tratamentos com laser de baixa potência e LED promovem a diminuição do processo inflamatório e a severidade das lesões das lesões de MO.

Apesar da falta de trabalhos que fundamentem o mecanismo de ação das fototerapias, os resultados encontrados neste estudo confirmam as evidências de que as células respondem à irradiação monocromática dos lasers e LED, através de mudanças metabólicas que resultam nos efeitos básicos anti-inflamatório, analgésico e de biomodulação (Karu, 1986; Karu, 1989a). Dados da literatura mostram que uma das formas de contribuição do laser para a reparação tecidual é através da promoção da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Pourreau-Schneider et al., 1992), além de estimular a divisão celular (Morimoto et al., 1994). Também é capaz de aumentar a capacidade fagocitária dos leucócitos (Mester et al., 1985), aumentar a resistência tênsil do tecido cicatricial pela estimulação da síntese de colágeno (Kovacs et al., 1974; Lyons et al., 1987), reduzir cicloxigenase 2 (COX-2) (Lopes et al., 2010) e auxiliar na promoção da analgesia por estimular a ação de nervos periféricos e liberação de endorfinas e encefalinas (Tuner; Hode, 2010; Chow et al., 2007).

Ao examinar possíveis mecanismos pelos quais as fototerapias com laser de baixa potência e o LED diminuíram a concentração de TNF- α , podemos

considerar que estudos *in vitro* com cultura de linfócitos, revelam que o laser reduz a taxa de proliferação destas células. Sendo o linfócito um dos responsáveis pela produção e liberação de TNF- α , o laser promove, consequentemente, a diminuição da liberação da citocina (Oliveira et al., 2012). Além disso, o laser também modula a atividade dos macrófagos, outra célula do tecido conjuntivo responsável pela liberação de TNF- α (Lopes et al., 2010).

Em um estudo comparativo entre a FLBI, atuando nos comprimentos de onda de 660nm (40mW), 780 nm (50mW), e a terapia com LED nos comprimentos de onda de 630nm (90mW) e 880nm (50mW), e todos ajustados a uma fluência de 5J/cm², utilizaram 40 ratos, nos quais foram induzidas mecanicamente uma ferida no quadríceps dos animais com o auxílio de um *punch*, os resultados indicaram uma fotomodulação da fase inflamatória de todos os grupos, diminuindo o número de células inflamatórias com relação ao grupo controle, além de haver aumento no número de fibroblastos e, consequentemente, maior deposição de colágeno. Frente aos resultados obtidos, os autores sugerem que o LED promove fotomodulação similar à FLBI em tratamento para lesão cutânea (Corazza et al., 2007).

Além disso, mais recentemente, o efeito anti-inflamatório do LED foi avaliado por um modelo experimental de tendinite induzido por collagenase em ratos, através de análises histológicas e pela quantificação de mediadores da inflamação, tiveram como resultado a diminuição significativa das células do processo inflamatório, além das interleucinas 1 e 6, TNF- α e cicloxigenase 2. Os autores concluem, então, que o LED é capaz de reduzir e modular o processo inflamatório pela diminuição de citocinas (Xavier et al., 2010).

Os nossos resultados estão de acordo com os estudos recentes, os quais apontam o LED como uma fototerapia promissora, com mecanismo de ação similar ao laser (Corti et al., 2006; Sacono et al., 2008; Lee; Kim, 2012). No entanto, ao comparar as duas fototerapias com relação à velocidade de reparação tecidual, têm-se que o laser de baixa potencia promoveu o reparo de forma mais acelerada, indicando que a coerência e colimação da luz podem influenciar na velocidade de reparação tecidual proporcionada pela luz.

Além disso, em oposição ao que se esperava, os dados coletados neste estudo revelam que o grupo LA apresentou exacerbação do edema e sangramento da MO no sétimo dia do experimento, indicando que apesar de ser usado a distância do tecido alvo, o calor emitido pelo aparelho pode ter sido o fator responsável pela vasodilatação e o aumento do processo inflamatório local, fazendo com que a indicação clínica desta fototerapia seja feita com cautela. Uma vez que estudos anteriores indicam o laser de alta potência como uma fototerapia eficaz na promoção da analgesia (Chow et al., 2007; Simões et al., 2009a), podemos sugerir que ela seja realizada em regiões específicas da MO, somente em locais onde a promoção da analgesia seja prevalente.

Sabendo que a reparação tecidual depende não apenas da lâmina própria mas também da organização e proliferação das células epiteliais (Moll et al., 1982), este trabalho também avaliou a expressão da citoqueratina 10 nas amostras de mucosa oral dos grupos CQ, LB, LED e LA coletadas no dia 10, tempo experimental marcado pela fase de cicatrização mais avançada.

As citoqueratinas são expressas no tecido epitelial através de grupos específicos de polipeptídeos, característicos de determinados tipos celulares e, portanto, permitem que possamos distingui-las e classificá-las de acordo com o seu padrão expresso (Moll et al., 1982). A citoqueratina 10, em especial, é expressa especificamente em queratinócitos que já perderam sua atividade mitótica e começam a sintetizar uma nova série de proteínas estruturais e enzimas características da queratinização (corneificação) (Candi et al., 2005).

Em nosso estudo, a expressão da citoqueratina 10 foi diferente entre os grupos experimentais, sendo expressa de forma mais intensa e em maior quantidade no grupo CQ. A literatura revela que o aumento da expressão da citoqueratina 10 ocorre como forma de proteção em tecidos lesionados, como se o tecido agredido criasse memória defensiva pela queratinização (Bonan et al., 2006). Este resultado indica, então, que o tratamento com as fototerapias diminui o trauma tecidual, havendo maior rapidez na maturação do epitélio migrado dos grupos LB, LED e LA, os quais mantiveram a expressão da citoqueratina 10 semelhante ao grupo C.

Ao avaliar todos os resultados obtidos e relaciona-los com as necessidades clínicas do paciente oncológico com MO, podemos apontar a associação de todas as fototerapias LED, laser de baixa e alta potência no tratamento da MO. Onde o tratamento com LED ou laser de baixa potência, realizado de forma diária, pode auxiliar no controle do processo inflamatório e reparação das feridas, enquanto o laser de alta potência, sendo usado com cautela e somente em regiões de dor intensa, para a promoção da analgesia.

Os efeitos benéficos da FLBI também foram confirmados para o tratamento da HGS, ao prevenir as alterações estruturais e funcionais provocadas pelo agente quimioterápico 5-FU.

Apesar de que alguns autores defendem a ideia que as glândulas salivares são pouco ou nada alteradas pela quimioterapia (Laine et al., 1992; Harrison et al., 1998; Ohrn et al., 2001), os resultados deste trabalho comprovam que o agente 5-FU promove alterações bioquímicas e morfológicas importantes, como alteração na atividade das enzimas antioxidantes e lactato desidrogenase, assim como clara atrofia das unidades secretoras terminais, apoptose, aumento dos espaços intercelulares e fusão dos grânulos de secreção das GS submandibulares, assim como atrofia das unidades secretoras terminais, aumento do estroma, fusão dos grânulos de secreção e perda do limite intercelular das GS sublinguais. Situação compreendida tendo que o principal mecanismo de ação do agente quimioterápico é a inibição da divisão celular pelo bloqueio do ciclo celular, além de promover a liberação de radicais livres e, conseqüentemente, aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, efeitos citotóxicos que resultam em dano severo ou morte celular.

Além disso, o grupo CQ também apresentou maior quantidade de mastócitos no estroma glandular. O mastócito é uma célula do tecido conjuntivo, de origem mesenquimatosa, que contém grande quantidade de grânulos cheios de histamina (substância envolvida em processos de reações alérgicas) e heparina (substância anticoagulante) (Prussin; Metcalfe, 2003). Logo, a presença de mastócitos nas GS do grupo CQ indica que o agente quimioterápico também pode provocar uma reação alérgica neste tecido.

Poucos trabalhos que analisam o efeito da FLBI na HGS são encontrados na literatura (Takeda, 1988; Cowen et al., 1997; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2009b; Simões et al., 2010a; Ibuki et al., 2012), sendo que nenhum deles está relacionado à hipofunção induzida por agentes quimioterápicos. Alguns autores, ao avaliarem o sintoma de xerostomia, fluxo e composição salivar de pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço, que foram submetidos ao tratamento com a FLBI intra-oral para MO, concluíram que a FLBI não foi capaz de alterar o fluxo salivar dos pacientes, porém promoveu a alteração da composição salivar, possível responsável pela da xerostomia relatada pelos pacientes (Simões et al., 2010a). Este e outros grupos de pesquisadores sugerem os efeitos positivos da FLBI na HGS de pacientes oncológicos, induzida pelo tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço (Cowen et al., 1997; Simões et al., 2010a).

Frente aos resultados deste trabalho, os quais revelam maior preservação morfológica e estrutural das GS para o grupo LG quando comparado ao grupo CQ, podemos sugerir que a FLBI foi um tratamento eficaz, possivelmente por promover efeitos opostos aos induzidos pelo agente quimioterápico.

Além da alteração que a FLBI causa no pH da célula irradiada, por agir no transporte de elétrons na mitocôndria e consequentemente no bombeamento de prótons resultando em aumento na secreção de ATP, proliferação celular e produção de proteínas (Karu, 1986), a irradiação com laser de baixa potência, no comprimento de onda na faixa do infravermelho, promove o aumento do número de mitoses em células epiteliais de glândulas salivares submandibulares de ratos (Takeda, 1988). Mais recentemente, foi sugerido o efeito antiinflamatório da FLBI nas glândulas salivares ao revelarem modificações estruturais e diminuição de células do processo inflamatório no parênquima glandular (Plavnik et al., 2003), dados que sugerem comportamento similar das GS tratadas com a FLBI, frente aos efeitos citotóxicos induzidos pela quimioterapia.

Afim de compreender ainda melhor os efeitos deletérios da quimioterapia nas GS, assim como o efeito da FLBI no tratamento da hipofunção glandular,

foi realizada a determinação dos parâmetros bioquímicos. A partir dos resultados, tanto para as amostras de GS submandibular quanto sublingual, a atividade das enzimas antioxidantes catalase e peroxidase aumentaram de forma significativa após tratamento quimioterápico. Ao contrário, o grupo LG apresentou parâmetros semelhantes ao grupo C.

O aumento destas enzimas pode representar uma resposta do organismo ao agente quimioterápico na tentativa de neutralizar o excesso de radicais livres do meio, derivados do metabolismo do oxigênio, para que não haja quebra das fitas de DNA (Almeida et al., 2005). A catalase é uma enzima antioxidante que apresenta, em seu sítio ativo, um grupo heme e NADPH. Em altas concentrações age cataliticamente, catalisando a reação de conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Scibior; Czechtot, 2006; Kirkman; Gaetani, 2007), enquanto a peroxidase, na presença de H_2O_2 , catalisa a transformação do tiocianato em hipotiocianato, conferindo-lhe função antimicrobiana e antioxidante (Ihalin et al., 2006). Em complemento, o grupo CQ mostrou diminuição da atividade da superóxido dismutase, outra enzima antioxidante importante na proteção do tecido glandular exposto à espécies reativas de oxigênio. Responsável por catalisar a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio, esta é a primeira via antioxidante a atuar.

Em um estudo recente, os autores, ao avaliarem a cardiotoxicidade do 5-Fluorouracil através da determinação de fatores apoptóticos, observaram um aumento nos níveis de O_2^- intracelular (Lamberti et al., 2012). Sendo o radical livre O_2^- produto do 5-Fluorouracil e a superóxido dismutase a primeira enzima antioxidante a agir e ser responsável pela dismutação do O_2^- em H_2O_2 , com os dados de diminuição da atividade da SOD para o grupo CQ, especulamos que a atividade desta enzima pudesse estar aumentada entre os dias 1 e 3, dias em que o quimioterápico foi administrado nos animais e, que, a partir do aumento de H_2O_2 , produto da reação catalisada pela superóxido dismutase, é esperado o aumento das enzimas peroxidase e catalase, fato ocorrido neste estudo.

A atividade de todas as enzimas antioxidantes foi claramente afetada pela

FLBI. A variação pode ser explicada pelo fato de que a catalase é um homotetrâmero com uma subunidade pequena, que contém um grupo heme e ferriprotoporfirina IX no sítio ativo e é capaz de se ligar de NADPH, sendo, então, capaz de absorver a luz laser (Kirkman; Gaetani, 2007). De forma similar, os substratos da peroxidase incluem proteínas como o citocromo c, glutatona, pequenas moléculas como o NADPH e ácidos graxos, cromóforos já conhecidos como absorvedores de luz laser (Karu, 1986). Além disso, há relatos de que a irradiação com laser vermelho de baixa potência pode ativar algumas das metaloenzimas e que as enzimas que contêm cobre e ferro, tais como a superóxido dismutase, podem ter sua atividade catalítica preservada ao absorver a luz laser (Ibuki et al., 2012).

A enzima lactato desidrogenase, liberada após lise celular, apresentou atividade aumentada nas amostras coletadas nos dias 5 para as GS submandibulares e 7 para sublinguais do grupo CQ. Mais uma vez a FLBI manteve o resultado do grupo LG similar ao grupo C em todos os tempos experimentais. Todavia, a diminuição da taxa de apoptose apresentada pelo grupo LG pode haver sido originada pela modulação de processos celulares como proliferação e diferenciação celular, assim como pela produção intracelular de antioxidantes endógenos modulados pela FLBI (Ibuki et al., 2012), compensando a formação de radicais livres e stress oxidativo, com a consequente lise celular, que o agente quimioterápico promove.

Por fim, a expressão de moléculas relacionadas ao processo de secreção salivar também revelou alterações importantes no grupo CQ. Na GS submandibulares houve significativa diminuição do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂, do inglês phosphatidylinositol biphosphate) e fator de crescimento neural (NGF, do inglês nerve growth factor), e aumento do fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês epidermal growth factor).

O PIP₂, molécula importante no processo secretório das glândulas salivares mediado pelo sistema nervoso parassimpático, o qual promove a secreção de proteínas, água e eletrólitos através do aumento da concentração de cálcio intracelular, foi encontrado em menor quantidade no grupo CQ,

enquanto que o grupo LG manteve os valores mais próximos ao grupo C. Estes dados realmente sugerem um efeito nocivo do 5-Fluorouracil também no processo secretório da GS submandibular indicando o quadro de hipossalivação com provável sintoma de xerostomia associado.

A irradiação com laser na faixa do vermelho ou infravermelho próximo causa modificação cinética (sem aumento de temperatura) em isoformas de fosfato, levando a modificações na distribuição de cargas, tornando-o mais instável e fácil de ser clivado (Gagliardi et al., 1997). O PIP_2 é um fosfolípídeo estrutural de membrana, cujo fosfato pode ser modificado pelo deslocamento da carga e, ao ficar instável, é facilmente quebrado pela fosfolipase C originando IP_3 (inositol trifosfato) + DAG (diacilglicerol). O IP_3 atua abrindo os canais de cálcio no retículo endoplasmático, promovendo a fosforilação de proteínas e secreção salivar (Nicolau, 2008).

O EGF, que estimula o crescimento, proliferação e diferenciação celular, apresentou tendência de aumento no grupo CQ, mas não houve significância. A FLBP novamente manteve os dados mais próximos ao grupo C. Tal resultado revela que o tecido afetado pela quimioterapia possivelmente ativou a produção de EGF como mecanismo de defesa, na tentativa de reparação tecidual.

O NGF é um polipeptídeo responsável pela estimulação do crescimento, diferenciação, sobrevivência e manutenção de neurônios sensoriais periféricos e simpáticos, durante seu desenvolvimento ou após serem lesionados (Nicolau, 2008). É reconhecido que GS de roedores se constituem em fontes muito ricas de NGF, no entanto, seu papel na saúde oral ainda é questionável. Muito embora o NGF seja um polipeptídeo neurotrófico mandatório, foi também demonstrado que está envolvido na regulação de respostas inflamatórias e imunológicas (Nicolau, 2008; Nanci, 2013).

Estudos apontam a neurotoxicidade como um dos efeitos colaterais do quimioterápico 5-FU, incluindo o NGF como alvo do fármaco (Vardy; Tannock, 2007), dado que pode justificar a alteração observada nos animais do grupo CQ. Este resultado pode tanto implicar no processo secretório, diminuindo a

secreção salivar estimulada pelo sistema nervoso simpático (saliva viscosa, rica em glicoproteínas), quanto na atividade anti-inflamatória e imunológica exercida pelo NGF na saliva. O grupo LG também apresentou diminuição, semelhante ao grupo CQ.

Apesar de ter sido quantificado apenas na GS submandibular, os dados deste trabalho indicam que a expressão de NGF pode ter sido afetada também na GS sublingual, principal glândula secretora de saliva viscosa, rica em glicoproteínas. Sendo que, além disso, diferenças importantes na expressão de mucina foram observadas no grupo CQ.

A mucina é uma glicoproteína e o principal constituinte orgânico do muco, exercendo a função de cobrir os tecidos duros e moles da cavidade oral para proteção e lubrificação, facilitando o deslizamento do bolo alimentar e modulando a adesão e proliferação de microrganismos. Apesar da inexistência de trabalhos na literatura que tenham avaliado a expressão de mucina produzida pelas GS após administração de agentes quimioterápicos, a expressão reduzida encontrada como resultado deste trabalho pode ser comparada à dados revelados por Saegusa et al. (2008), que avaliaram a secreção de mucina pelas glândulas gástricas (oxíntica e pilórica) após administração do quimioterápico 5-Fluorouracil em ratos. Neste trabalho os autores observaram alterações significativas da imunoreatividade e diminuição da secreção de mucina na mucosa gastrointestinal dos animais e concluíram que tal diminuição provoca piora das lesões de mucosite intestinal, também induzida pelo quimioterápico (Saegusa et al., 2008)

Logo, a diminuição de mucina produzida e liberada pelas GS sublinguais, apresentada pelo grupo CQ, pode ter relação direta com a severidade da MO apresentada pelo grupo, além de contribuir para o sintoma de xerostomia por diminuir a lubrificação da cavidade oral. O grupo LG, ao apresentar expressão de mucina semelhante ao grupo C, indica que tais situações podem ser prevenidas pelo tratamento com a FLBI na região das GS, resultado que pode ser comparado ao encontrado por Simões et al. (2010a) que, ao avaliarem a composição salivar de pacientes após tratamento radioterápico na região de

cabeça e pescoço e que receberam a FLBI como tratamento para a MO, observaram que o laser foi capaz de alterar a composição da saliva, aumentando a concentração de ácido siálico (oligossacarídeo contido na mucina), promovendo melhora significativa no sintoma de xerostomia dos pacientes tratados.

Além disso, o agente quimioterápico diminuiu a expressão do gene p16, enquanto o grupo LG expressou valores intermediários para entre os outros grupos. Porém, pelo fato de estar relacionado ao ciclo celular, principal alvo do agente quimioterápico, esta diminuição era esperada para o grupo CQ, uma vez que os produtos citotóxicos do quimioterápico também atuam como agentes mutagênicos para o gene (Borràs et al., 2012).

O gene p16, supressor tumoral, tem como função governar a progressão do ciclo celular, sendo alvo frequente de mutações, exclusões e silenciamento genético em todos os tipos de câncer (Guo et al., 2007). A genotoxicidade do 5-FU é desencadeada a partir da inibição da enzima timidilato sintase (TS), ativando vias de morte celular programada, resultando em fragmentação do DNA parental. A inibição de TS leva a depleção de 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) e aumento de 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), seguido pela incorporação de uracil no DNA. O desbalanço dos dNTPs induz várias enzimas, como endonucleases, a promoverem danos ao DNA seguido por mudanças em proteínas que atuam na via de apoptose, a qual finalmente leva a célula à morte (Peters et al., 2000). Além disso, supressores tumorais podem atuar na resposta celular ao estresse genotóxico causado por inibição de TS (Grem, 1997; Violette et al., 2002). O resultado apresentado pelo grupo LG, mantendo a expressão do gene intermediária aos grupos C e CQ, revela que a FLBI, ao diminuir os efeitos citotóxicos dos agentes quimioterápicos, tende a prevenir exclusões ou mutações genéticas.

Em suma, o presente estudo, que incluiu análises clínicas, bioquímicas e histológicas, incluindo imunomarcacão ultraestrutural, contribui para a melhor compreensão do efeito do agente quimioterápico 5-Fluorouracil na mucosite oral, assim como seu efeito deletério nas glândulas salivares submandibular e

sublingual, além do efeito de diferentes fototerapias no tratamento da mucosite e da fototerapia com laser em baixa intensidade na hipofunção glandular. O conhecimento destes aspectos biológicos tem grande impacto clínico, devido a queixa severa de dor em cavidade oral e sintoma de xerostomia com consequente diminuição da qualidade de vida do paciente oncológico, dados pouco discutidos ou discutidos de forma conflitante na literatura.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições deste estudo e nos resultados obtidos podemos concluir que as fototerapias com laser de baixa potência e com LED foram mais eficazes na diminuição da severidade das lesões de mucosite oral do que a fototerapia com laser de alta potência, acelerando a reparação tecidual, promovendo a diminuição de TNF- α e aumentando a formação de tecido de granulação e angiogênese.

Além disso, as análises bioquímicas e histológicas sugerem que o quimioterápico 5-Fluorouracil induz a alteração no metabolismo das glândulas salivares submandibular e sublingual, assim como sugerem que a fototerapia com laser em baixa intensidade é eficaz no tratamento destas alterações.

REFERÊNCIAS¹

Abramoff MM, Lopes NN, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran EM, et al. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):393-400.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 1984;105:121-6.

Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer (MASCC/ISOO)*. 2013 Apr 21.

Almeida VL, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes neoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*. 2005;28:11.

Anderson LC. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells in vitro. *Arch Oral Biol*. 1986;31(7):501-3.

Arruda MS, Montenegro MR. Granulomatous reaction in the hamster cheek pouch induced by killed *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res*. 1995;28(2):209-12.

Artyukhov VG, Basharina OV, Pantak AA, Sveklo LS. Effect of helium-neon laser on activity and optical properties of catalase. *Bull Exp Biol Med*. 2000;129(6):537-40.

Avritscher EB, Cooksley CD, Elting LS. Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(1):3-10.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Azevedo LH, Del Vecchio A, Nakajima E, Galletto V, Migliari DA. Lip and oral venous varices treated by photocoagulation with high-intensity diode laser. *Quintessence Int.* 2013;44(2):171-4.

Bagnato VS. *Uso dos LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora.* São Paulo: Renovarum; 2002.

Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer.* 1999;7(4):244-52.

Bergmeyer HU, Bernt E. [Enzymatic Determination of Ketone Bodies in Blood]. *Enzymologia biologica et clinica.* 1965;19:65-76.

Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner 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;19(8):1069-77.

Bonan PR, Kaminagakura E, Pires FR, Vargas PA, Almeida OP. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(2):205-11.

Borràs E, Dotor E, Arcusa A, Gamundi MJ, Hernan I, de Sousa Dias M, et al. High-resolution melting analysis of the common c.1905+1G>A mutation causing dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and ethal 5-fluorouracil toxicity. *Front Genet.* 2012; 3:312.

Brasil. Ministério da Saúde. [citado] 2011. Disponível em: www.saude.gov.br.

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

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molr Cell Biol.* 2005;6(4):328-40.

Carvalho PA, 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 Oncol.* 2011a;47(12):1176-81.

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

Chandra T, Das R, Datta AG. Role of thyroid gland on the peroxidase and iodinating enzymes of submaxillary gland. *Eur J Biochem / FEBS.* 1977;72(2):259-63.

Chow RT, David MA, Armati PJ. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. *J Peripher Nerv Syst.* 2007;12(1):28-39.

Ciais G, Namer M, Schneider M, Demard F, Pourreau-Schneider N, Martin PM, et al. [Laser therapy in the prevention and treatment of mucositis caused by anticancer chemotherapy]. *Bull Cancer.* 1992;79(2):183-91.

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;25(2):102-6.

Corti L, Chiarion-Sileni V, Aversa S, Ponzoni A, D'Arcais R, Pagnutti S, et al. Treatment of chemotherapy-induced oral mucositis with light-emitting diode. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):207-13.

Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;38(4):697-703.

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

Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent.* 2002;88(3):337-43.

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;27(1):137-44.

Eilers J, Million R. Clinical update: prevention and management of oral mucositis in patients with cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2011;27(4):e1-16.

Ferrari JSNC, Abreu-E-Lima FCB. Avaliação do efeito terapêutico na mucosite induzida por quimioterapia em hamsters. *Pesq Odontol Bras.* 2004;18:139.

Ferreira LS, Apel C, Francci C, Simoes A, Eduardo CP, Gutknecht N. Influence of etching time on bond strength in dentin irradiated with erbium lasers. *Lasers Med Sci.* 2010;25(6):849-54.

Fructuoso FJG, Moset JM. Randomized double blind study on biostimulatory effect of laser irradiation of the parotid gland in patients suffering of Sjögren syndrome. *Invest Clin Laser.* 1987;1:18-25.

Gagliardi S, Atlante A, Passarella S. A novel property of adenine nucleotides: sensitivity to helium-neon laser in mitochondrial reactions. *Biochemistry and Mol Biol int.* 1997;41(3):449-60.

Galletta VC. Desenvolvimento de modelo de indução de mucosite oral por radiação em *hamsters* prevenção e tratamento por *laser* de baixa potência [dissertação]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2006.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhira BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - A triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol.* 2012; 104(3):349-54.

Gibson RJ, Keefe DM, Lalla RV, Bateman E, Blijlevens N, Fijlstra M, et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013;21(1):313-26.

Gontijo I, Navarro RS, Haypek P, Ciamponi AL, Haddad AE. The applications of diode and Er:YAG lasers in labial frenectomy in infant patients. *J Dent Child.* 2005;72(1):10-5.

Gouw-Soares S, Tanji E, Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd:YAG and Ga-Al-As lasers in periapical surgery: a 3-year clinical study. *J Clin Laser Med Surg.* 2001;19(4):193-8.

Grem JL. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol.* 1997;7(4):249-59.

Grundmann O, Mitchell GC, Limesand KH. Sensitivity of salivary glands to radiation: from animal models to therapies. *J Dent Res.* 2009;88(10):894-903.

Guo XL, Sun SZ, Wang WX, Wei FC, Yu HB, Ma BL. Alterations of p16INK4a tumour suppressor gene in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(4):350-3.

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

Heidelberger C. Fluorinated pyrimidines. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1965;4:1-50.

Hubacek J, Matouskova I. Effect of He-Ne laser radiation on lysozyme in saliva. *Acta Univ Palack Olomuc Fac Med*. 1987;116:353-8.

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

Ibuki FK, Simoes A, Nicolau J, Nogueira FN. Laser irradiation affects enzymatic antioxidant system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2012.

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

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer [citado] 2011. Disponível em: www.inca.gov.br.

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

Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. *Support Care Cancer*. 2010;18(8):1061-79.

Jham BC, Teixeira IV, Aboud CG, Carvalho AL, Coelho Mde M, Freire AR. A randomized phase III prospective trial of bethanechol to prevent radiotherapy-induced salivary gland damage in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2007;43(2):137-42.

Jones DL, Rankin KV. Management of the oral sequelae of cancer therapy. *Tex Dent J.* 2012;129(5):461-8.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health physics.* 1989a;56(5):691-704.

Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B.* 1989b;3(4):638-40.

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

Karu TI, Lobko VV, Lukpanova GG, Parkhomenko IM, Chirkov I. [Effect of irradiation with monochromatic visible light on the cAMP content in mammalian cells]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1985;281(5):1242-4.

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

Karu TI, Ryabykh TP, Fedoseyeva GE, Puchkova NI. Helium-neon laser-induced respiratory burst of phagocytic cells. *Lasers Surg Med.* 1989;9(6):585-8.

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

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

Katzung AG. Farmacologia básica e clínica. ed 10. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill. 1998. 629-655 p.

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

Kovacs IB, Mester E, Gorog P. Laser-induced stimulation of the vascularization of the healing wound. An ear chamber experiment. *Experientia.* 1974;30(4):341-3.

Kreisler M, Daublander M, Willershausen-Zonnchen B, d'Hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the survival rate of gingival fibroblast cell cultures. *Lasers Surg Med.* 2001;28(5):445-50.

Kuhn A, Porto FA, Miraglia P, Brunetto AL. Low-level infrared laser therapy in chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized placebo-controlled trial in children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009;31(1):33-7.

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

Lalla RV, Pilbeam CC, Walsh SJ, Sonis ST, Keefe DM, Peterson DE. Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. *Support Care Cancer.* 2010;18(1):95-103.

Lang-Bicudo L, Eduardo Fde P, Eduardo Cde P, Zezell DM. LED phototherapy to prevent mucositis: a case report. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(6):609-13.

Lamberti M, Porto S, Marra M, Zappavigna S, Grimaldi A, Feola D, Pesce D, Naviglio S, Spina A, Sannolo N, Caraglia M. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *J Exp Clin Cancer Res.*

2012 Jul 19;31:60.

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

Laor Y, Simpson CL, Klein E, Fine S. The pathology of laser irradiation of the skin and body wall of the mouse. *Am J Pathol*. 1965;47(4):643-63.

Lima AG, Antequera R, Peres MP, Snitcosky IM, Federico MH, Villar RC. Efficacy of low-level laser therapy and aluminum hydroxide in patients with chemotherapy and radiotherapy-induced oral mucositis. *Braz Dent J*. 2010;21(3):186-92.

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

Lombard CW. Welcome to the Journal of Veterinary Cardiology. *J Vet Cardiol*. 1999;1(1):3.

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

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

Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg*. 1987;18(1):47-50.

Ma C, Xie J, Chen Q, Wang G, Zuo S. Amifostine for salivary glands in high-dose radioactive iodine treated differentiated thyroid cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. [citado 2009];(4):CD007956.

Mackiewicz A, Kushner I. Acute phase proteins molecular biology, biochemistry, and clinical applications. CRC Press; 1993. 704 p.

Matuo R. Avaliação da atividade citotóxica de 5-Fluorouracil e seu metabólito FdUMP, e os sistemas de reparo envolvidos [mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

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

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

McBride RK, Siegel IA. The influence of plasma catecholamines on methotrexate-enhanced rat salivary gland protein secretion. Arch Oral Biol. 1988b;33(8):575-8.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. Lasers Surg Med. 1985;5(1):31-9.

Midda M, Renton-Harper P. Lasers in dentistry. Br Dent J. 1991;170(9):343-6.

Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B, et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. Support Care Cancer. 2012.

Miller MM, Donald DV, Hagemann TM. Prevention and treatment of oral mucositis in children with cancer. J Pediatr Pharmacol Therap. 2012;17(4):340-50.

Moll R, Franke WW, Volc-Platzer B, Krepler R. Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *The Journal of cell biology*. 1982;95(1):285-95.

Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M, Nakajima S, Nakamura H. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. *Lasers Surg Med*. 1994;15(2):191-9.

Murad AM, Katz A. *Oncologia: bases clínicas do tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

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

Nes AG, Posso MB. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *International nursing review*. 2005;52(1):68-72.

Niccoli-Filho W, Murilo-Santos L, Schubert M, Morosolli AC. Treatment of developmental defect of upper lip with carbon dioxide laser radiation (CO₂): first surgical time. *J Cosmet Laser Ther*. 2005;7(2):97-100.

Nicolatou-Galitis O, Sarri T, Bowen J, Di Palma M, Kouloulis VE, Niscola P, et al. Systematic review of amifostine for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(1):357-64.

Nicolau J. *Fundamentos de bioquímica oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Nishimura N, Nakano K, Ueda K, Kodaira M, Yamada S, Mishima Y, et al. Prospective evaluation of incidence and severity of oral mucositis induced by conventional chemotherapy in solid tumors and malignant lymphomas. *Support Care Cancer*. 2012;20(9):2053-9.

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

Oliveira RG, Ferreira AP, Côrtes AJ, Aarestrup BJ, Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser reduces the production of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 induced by OVA. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan 22.

Onizawa K, Muramatsu T, Matsuki M, Ohta K, Matsuzaka K, Oda Y, et al. Low-level (gallium-aluminum-arsenide) laser irradiation of Par-C10 cells and acinar cells of rat parotid gland. *Lasers Med Sci*. 2009;24(2):155-61.

Parente M. Análise do efeito do LED (Light Emitting Diode) de 640nm no modelo experimental de tendinopatia traumática em ratos desnutridos [mestrado] São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2012.

Parlato G, Cimmino G, De Vendittis E, Monfrecola G, Bocchini V. Superoxide dismutase activity in the skin of rats irradiated by He-Ne laser. *Experientia*. 1983;39(7):750-1.

Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol*. 1998;34(1):63-71.

Peters GJ, van Triest B, Backus HH, Kuiper CM, van der Wilt CL, Pinedo HM. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer*. 2000;36(7):916-24.

Peterson DE. Research advances in oral mucositis. *Curr Opin Oncol*. 1999 Jul;11(4):261-6.

Peterson BA, Petroni GR, Frizzera G, Barcos M, Bloomfield CD, Nissen NI, et al. Prolonged single-agent versus combination chemotherapy in indolent

follicular lymphomas: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):5-15.

Plavnik LM, De Crosa ME, Malberti AI. Effect of low-power radiation (helium/neon) upon submandibular glands. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(4):219-25.

Pontinen PJ, Aaltokallio T, Kolari PJ. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acupunct Electro-ther Res*. 1996;21(2):105-18.

Pourreau-Schneider N, Soudry M, Franquin JC, Zattara H, Martin PM, Ciais G, et al. Soft-laser therapy for iatrogenic mucositis in cancer patients receiving high-dose fluorouracil: a preliminary report. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(5):358-9.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2005;76(2):187-93.

Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med*. 2012;237(11):1241-8.

Prussin C, Metcalfe DD. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S486-94.

Ribeiro MS, Zezell DM. *Laser em Baixa Intensidade*. 1. São Paulo: Quinessence; 2004.

Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*. 2004;100(9 Suppl):2026-46.

Sacono NT, Costa CA, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FC. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg Med.* 2008;40(9):625-33.

Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Okayasu I, Ikezawa T, et al. Changes in the mucus barrier of the rat during 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(1):59-65.

Saglam M, Kantarci A, Dundar N, Hakki SS. Clinical and biochemical effects of diode laser as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012.

Scarpace SL, Brodzik FA, Mehdi S, Belgam R. Treatment of head and neck cancers: issues for clinical pharmacists. *Pharmacotherapy.* 2009;29(5):578-92.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000;48(5):312-26.

Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, et al. 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;15(10):1145-54.

Scibior D, Czczot H. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006;60:170-80.

Sennhenn-Kirchner S, Freund F, Grundmann S, Martin A, Borg-von Zepelin M, Christiansen H, et al. Dental therapy before and after radiotherapy--an evaluation on patients with head and neck malignancies. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):157-64.

Silva GB, Mendonca EF, Bariani C, Antunes HS, Silva MA. The prevention of induced oral mucositis with low-level laser therapy in bone marrow transplantation patients: a randomized clinical trial. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):27-31.

Silverman S, Jr. Mucosal lesions in older adults. J Am Dent Assoc. 2007;138 Suppl:41S-6S.

Simoes A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sa PH, Cristofaro M, et al. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. Lasers Surg Med. 2009a;41(4):264-70.

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

Simoes A, Siqueira WL, Lamers ML, Santos MF, Eduardo Cde P, Nicolau J. Laser phototherapy effect on protein metabolism parameters of rat salivary glands. Lasers Med Sci. 2009c;24(2):202-8.

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

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

Simoes A, Nogueira FN, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Diode laser decreases the activity of catalase on submandibular glands of diabetic rats. Photomed Laser Surg. 2010b;28(1):91-5.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncol. 1998;34(1):39-43.

Sonis ST. Oral mucositis. Anti-cancer drugs. 2011;22(7):607-12.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-84.

Sonis ST, Costello KA. A database for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31B(4):258-60.

Sonis ST, Peterson DE, McGuire DB, Williams DA. Prevention of mucositis in cancer patients. *J Nat Cancer Inst*. 2001;(29):1-2.

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000;36(4):373-81.

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

Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988;17(6):388-91.

Thorpe DW, Stringer AM, Gibson RJ. Chemotherapy-induced mucositis: the role of the gastrointestinal microbiome and toll-like receptors. *Experimental biology and medicine*. 2013;238(1):1-6.

Tringali CA, Kanaskie ML. Measuring the impact of an educational program on nurses: teaching an evidence-based approach to oral mucositis. *J Nurs Staff Develop*. 2012;28(6):E1-4.

Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al. 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.

Tunér J, Hode L. The new laser therapy handbook. ed. Sweden: Prima Books AB; 2010.

Vardy J, Tannock I. Cognitive function after chemotherapy in adults with solid tumours. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2007;63(3):183-202.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):95-9.

Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*. 2002;98(4):498-504.

Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):213-25.

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

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

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

Wang SL, Zhao ZT, Li J, Zhu XZ, Dong H, Zhang YG. Investigation of the clinical value of total saliva flow rates. *Arch Oral Biol*. 1998;43(1):39-43.

Whelan HT, Smits RL, Jr., Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(6):305-14.

WHO. WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organization; 1979.

Wilder-Smith P, Hammer-Wilson MJ, Zhang J, Wang Q, Osann K, Chen Z, et al. In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography. Clin Cancer Res : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007;13(8):2449-54.

Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. Res Vet Science. 1983;34(3):253-6.

Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. Lasers Surg Med. 2010;42(6):553-8.

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. Lasers Surg Med. 1989;9(5):497-505.

Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, Castro PH, Pacheco MT, Zanin IC, et al. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. Photomed Laser Surg. 2010;28(2):233-7.

Zur E. Oral mucositis: etiology, and clinical and pharmaceutical management. Int J Pharm Compd. 2012;16(1):22-33.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Unidade Universitária "Gonçalves de Sá" - Ribeirão Preto
Av. Prof. Lúcio Prates, 2410 - CEP: 13060-970 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (051) (011) 3091-7100 - e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **96** nas fls. **91** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Victor Elias Arana Chavez**, Coordenador(a) da linha de pesquisa **Estado comparativo do efeito terapêutico de diferentes fototerapias na hipofunção das glândulas salivares e na mucosite oral induzidas por 5-fluorouracil em hamsters** do qual participam o(s) aluno(s) **Luana de Campos** e a pesquisadora **Alyne Simões Gonçalves**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SIBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **13.09.2010**, com validade de **1** anos.

São Paulo, 14 de setembro de 2010.

Prof. Dr. WUTHIAN TEIXEIRA DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP