**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

REGINA HADDAD BARRACH ZABALIA

**Análise da Ação do Gel de Plaquetas e Glutamina em
Mucosite causada por quimioterapia induzida em
Ratos *Wistar***

**BAURU
2015**

REGINA HADDAD BARRACH ZABALIA

**Análise da ação do gel de plaquetas e glutamina em mucosite
causada por quimioterapia induzida em ratos *Wistar***

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Versão Corrigida

BAURU
2015

Zabalía, Regina Haddad Barrach

Z1a

Análise da ação do gel de plaquetas e glutamina em mucosite causada por quimioterapia induzida em ratos *Wistar* / Regina Haddad Barrach Zabalía. – Bauru, 2015.

94 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética FOB- USP
Protocolo nº 039/2013
Data:27/11/2013

DEDICATÓRIAS

Deus: eterno orientador da minha vida...

“Rezar muito e ter fé... Porque as coisas estão todas amarradinhas em Deus” (Guimarães Rosa)

Este é o verdadeiro sentido da vida!

Ao meu pai Cássio (in memoriam) :

Sei que de onde você está ainda se orgulha de mim... Tenho muitas saudades de você meu pai!

À minha mãe Suad:

Obrigada mãe por tudo : pelo seu amor, pela sua confiança e por me ensinar a lutar e a perseverar pelos nossos sonhos e por um mundo melhor .

Ao Richard , meu marido e amor da minha vida:

A luta nunca é em vão... obrigada pelo seu apoio ,pela sua compreensão e pelo seu amor...

Aos meus filhos Michel e Davi:

Não existe amor maior no mundo do que o meu amor por vocês...Filhos obrigada por entenderem os momentos que não pude estar com vocês. O exemplo que deixo é que o estudo nos leva não somente ao conhecimento, vai mais longe: nos leva à sabedoria...Vivam isto em suas vidas!

Minhas queridas irmãs Ana, Fátima e Leila:

Obrigada pelo apoio , carinho e pelo amor! “ O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquentada e esfria; aperta e afrouxa; sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é a coragem!!” (Guimarães Rosa) Amo vocês...

Aos meus cunhados Evandro, Sandro, Rodrigo e Carina ;aos meus sobrinhos: Rafael, Renan, Alexandre, Alan; as minhas sobrinhas: Luísa , Carolina e Vitória:

Obrigada por compartilharem de meus sonhos ...que possamos viver intensamente e celebrar o amor e alegria em cada dia de nossas vidas!

AGRADECIMENTOS

Meu querido orientador Profº Dr. Luís Taveira:

Uma pessoa é gigante para você quando se interessa pela sua vida, quando busca alternativas para seu conhecimento. Foi assim que através de seus conhecimentos e da sua compreensão de minhas aspirações que ajudou-me a descobrir os caminhos que levaram à realização deste trabalho.

Obrigada pela sua paciência e sua dedicação!

Profª Dra. Rosana Rossi:

“ O real não está na saída e nem na chegada; ele se dispõe para a gente no meio da travessia...” (Guimarães Rosa)

Amiga especial e de profunda inteligência e sabedoria. Obrigada pela sua amizade, pela sua paciência, por seus conhecimentos fundamentais para este sonho se tornar realidade!

Profª Dra. Denise e Profª Dra. Vanessa:

“ O rio não quer chegar a lugar algum, só quer ser mais profundo” (Guimarães Rosa)

Obrigada queridas professoras pelos seus ensinamentos que me levaram à lugares mais profundos em minha vida!

Funcionárias do Departamento de Patologia: Cristina, Fatiminha e Marina

“ O segredo é não correr atrás das borboletas...é cuidar do jardim para que as borboletas venham até você” (Mario Quintana)

Obrigada por vocês estarem presentes neste sonho...

Amigos da Patologia:

“ Só se pode viver perto do outro e conhecer outra pessoa sem perigo e sem ódio se a gente tem amor...qualquer amor já é um pouquinho de saúde , um descanso na loucura” (Guimarães Rosa)

Vocês são pessoas maravilhosas !Obrigada por fazerem parte desta caminhada comigo.

Amigos de Pederneiras:

“Ser amigo é interpretar olhares, entender silêncio, ter compreensão, perdoar erros, guardar segredos, prevenir quedas e secar lágrimas...” (autor desconhecido)

Vocês são a família do meu coração! Obrigada por me apoiarem, me ajudarem e por acreditarem em mim! “

Aos meus pacientes:

“Aquilo que se faz por amor está sempre além do bem e do mal”.

(Friedrich Nietzsche)

Obrigada pela compreensão e pelo apoio para realização deste sonho!

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a ação do gel de Plaquetas e da Glutamina no processo de cicatrização de lesões bucais causadas por mucosite induzida por quimioterapia em ratos Wistar. Foram utilizados 50 animais divididos em 05 grupos: um Grupo A (Gel de Plaquetas), Grupo B (Glutamina tópica), Grupo C (Glutamina gavagem), Grupo D (Glutamina + Gel de plaquetas) e Grupo E (controle +). A partir do 7º dia após a quimioterapia, avaliou-se os graus de mucosite e iniciou-se a aplicação dos medicamentos propostos para cada grupo. O sacrifício dos animais ocorreu em 5 e 10 dias após o início de aplicação dos medicamentos. Foram realizadas as biópsias da mucosa jugal e língua para análise do exame histopatológico onde se avaliou a quantidade de macrófagos, linfócitos e queratinização. Os graus de mucosite desenvolvidos na 1ª e 2ª fase do experimento apresentaram variação numérica importante, mas sem diferenças estatísticas significantes. Na análise histológica, resultados estatisticamente significativos foram obtidos (Fase 1) para linfócitos em mucosa jugal, onde o grupo B (glutamina) foi maior que o do grupo D (gel de plaquetas + glutamina) ($p = 0,032$); os linfócitos em língua do grupo A (gel de plaquetas) ($p = 0,000$) foi superior quando comparado com todos os outros grupos. A queratinização em mucosa jugal no grupo D (Fase 1) apresentou resultados significativamente superiores quando comparada com a queratinização dos demais grupos. A queratinização em língua no grupo D apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,000$) e maior em relação aos outros grupos. Na fase 2, os macrófagos em língua tiveram resultados significantes entre os grupos A e C ($p = 0,031$) e A e E ($p = 0,006$), onde A foi maior. Diante dos resultados encontrados, concluiu-se que os biocurativos utilizados neste estudo promoveram uma maior reação inflamatória no conjuntivo e maior queratinização no epitélio. Entretanto, clinicamente, nas lesões observadas, o tempo de cicatrização foi semelhante em todos os grupos. A dificuldade em induzir uma mucosite mais grave e os cuidados preventivos à morbidade não propiciou a avaliação dos biocurativos em lesões mais extensas, fato este importante para análise mais efetiva da ação dos medicamentos propostos para este estudo.

Palavras chaves: Gel de plaquetas. Glutamina. Mucosite.

ABSTRACT

Analysis of Platelet Gel Action and Glutamine in Mucositis caused by chemotherapy induced in Wistar Rats

Among bio-curatives there are those derived from the addition "in vitro" of thrombin and calcium gluconate to the platelet rich human plasma that stimulate its degranulation to releasing of growth factors acting on the healing process. Glutamine is the amino acid present in plasma and muscle tissue being considered an important energetic source for the immune system cells. Mucositis is a denomination for the changes that occur in the oral mucosa, mainly due to the cancer treatments. In this study, the action of platelet gel and Glutamine was evaluated in the oral lesions healing process caused by mucositis induced by chemotherapy in Wistar rats. 50 animals divided into 05 groups were used: A Group (Platelet Gel), B Group (Topical glutamine), C Group (Glutamine gavage), D Group (Glutamine + Platelet Gel) and E Group (control +). From the 7th day after chemotherapy, the degree of mucositis was evaluated and the proposed drug application began for each group. The animal sacrifice occurred within 5 to 10 days after the medicine application beginning. Jugal and tongue mucosa biopsies for histopathological examination analysis were carried out which evaluated the macrophages amount, lymphocytes and keratinization. The mucositis degrees developed in the 1st and 2nd phase of the experiment showed important numerical variation, but without meaningful statistical differences. In the histological analysis, statistically meaningful results were obtained (Phase 1) for lymphocytes in the jugal mucosa where the B group (glutamine) was higher than D group (platelet gel + glutamine) ($p = 0,032$); lymphocytes in tongue in A group (platelet gel) ($p = 0,000$) was higher when compared to all other groups. Keratinization in the jugal mucosa in D group (Phase 1), showed meaningfully superior results when compared to the keratinization of the other groups. The Keratinization in tongue in D group showed meaningful statistical differences ($p = 0,000$) and higher compared to the other groups. In phase 2, the macrophages in tongue showed meaningful results between A and C groups ($p = 0,031$) and A and E ($p = 0,006$), where A was the highest. Considering the results, it was concluded that bio-curatives used in this study promoted greater inflammatory reaction in the connective and increased keratinization in epithelium. However, clinically, in the observed lesions, the healing time was similar in all groups. The difficulty in inducing

a more severe mucositis and the preventive care to morbidity did not propitiate the bio-curatives evaluation in more extensive lesions, an important fact for more effective analysis of proposed medicine action for this study.

Key words: Platelet Gel. Glutamine. Mucositis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

FIGURA 1:	Quimioterápico 5-fu preparado em doses individualizadas.....	40
FIGURA 2:	Suplemento Nutricional Aminomix (Pet Vetnil) e medicamento Vomistop.....	41
FIGURA 3:	Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.....	43
FIGURA 4:	Preparação dos Biocurativos	45
FIGURA 5:	Apresentação Gel Glutamina ,Gel de Plaquetas e Gel de Plaquetas associado com Glutamina	45
FIGURA 6:	Lesão em língua, área de biópsia	47
FIGURA 7:	Células inflamatórias no tecido conjuntivo	49
FIGURA 8:	Espessura da camada de queratina.	50

- GRÁFICOS

GRÁFICO 1:	Graus de mucosite Grupo A (Fase 1)	55
GRÁFICO 2:	Graus de mucosite Grupo B (Fase 1)	55
GRÁFICO 3:	Graus de mucosite Grupo C (Fase 1)	56
GRÁFICO 4:	Graus de mucosite Grupo D (Fase 1)	56
GRÁFICO 5:	Graus de mucosite Grupo E (Fase 1)	57
GRÁFICO 6:	Média da espessura de queratina em mucosa jugal e língua (Fase1).....	59
GRÁFICO 7:	Graus de mucosite Grupo A (Fase 2)	60
GRÁFICO 8:	Graus de mucosite Grupo B (Fase 2)	60
GRÁFICO 9:	Graus de mucosite Grupo C (Fase 2)	61
GRÁFICO 10:	Graus de mucosite Grupo D (Fase 2)	61
GRÁFICO 11:	Graus de mucosite Grupo E (Fase 2)	62
GRÁFICO 12:	Média da espessura de queratina em mucosa jugal e língua (Fase 2).....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Média de peso (g) por grupo (N=10)	53
TABELA 2: Média de peso (g) por grupo (N=5)	53
TABELA 3: Média de peso (g) por grupo (N=5)	54
TABELA 4: Lesões bucais por região anatômica e por grupo (N=10)	58
TABELA 5: Média de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal e língua (N=5)	58
TABELA 6: Lesões bucais por região anatômica e por grupo	62
TABELA 7: Média de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal e língua (N=5)	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP:	adenosina difosfato
bFGF:	fator de crescimento fibroblástico básico
CPA:	concentrado de plaquetas por aférese
CP:	concentrado de plaquetas
5-FU:	5-fluoruracila
DNA:	ácido desoxirribonucleico
EGF:	fator de crescimento epidérmico
GSH:	glutathiona
IGF-I:	fator de crescimento de insulina-I
IL-1:	interleucina 1
IL-2:	interleucina 6
OMS:	organização mundial da saúde
PDGF:	fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP:	plasma rico em plaquetas
RNA_m:	ácido ribonucleico mensageiro
TGF-β-:	fator de crescimento transformador -beta
TNF-α:	fator de necrose tumoral-alfa
VEGF:	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Plasma rico em Plaquetas e Biocurativos.....	15
1.2	Glutamina	16
1.3	Mucosite	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Gel de Plaquetas	21
2.2	Glutamina	24
2.3	Mucosite	26
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Materiais	39
4.1.1	Critérios de inclusão	39
4.1.2	Grupos de estudo	39
4.1.3	Descrição do Plano de Trabalho.....	39
4.1.3.1	Imunossupressão	40
4.2	Metodologia	43
4.2.1	Obtenção do concentrado de plaquetas por aférese (CPA)	43
4.2.2	Controle de Qualidade dos CPs	44
4.2.3	Obtenção do Gel de Plaquetas.....	44
4.2.4	Obtenção do Gel inerte de Glutamina	45
4.3	Grupos de estudo	46
4.4	Avaliações	47
5	RESULTADOS	51
5.1	Resultados Mucosite Fase 1	55
5.2	Resultados Lesões Bucais Fase 1.....	57
5.3	Resultados Análise Histopatológica.....	58
5.4	Resultados Fase 2.....	59

5.4.1	Resultados Mucosite Fase 2	59
5.4.2	Resultado Lesões Bucais Fase 2	62
5.4.3	Resultados Análise Histopatológica Fase 2.....	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gel de Plaquetas

A cura de feridas é um processo complexo mediado através de sinais de interação molecular, os quais envolvem o recrutamento de células mesenquimais, proliferação e regeneração da matriz extracelular. (NEFFA PINTO; PISANI; KANG ; KNECHT, 2014)

O processo de cicatrização é uma resposta da imunidade inata para a restauração da integridade dos tecidos, sendo regulado por uma série de eventos, incluindo a coagulação, inflamação, formação de tecido de granulação, epitelização e remodelação. Esses eventos são mediados por fatores de crescimento e citocinas que modulam essas atividades celulares. (NEFFA PINTO; PISANI; KANG ; KNECHT, 2014).

As plaquetas são componentes importantes dentro do processo cicatricial, pois são capazes de liberar um grande número de substâncias biologicamente ativas, a partir de grânulos alfa intracelulares ,em resposta a um evento inflamatório ou farmacológico, apresentando um grande potencial terapêutico. (MAIA ; SOUZA, 2009); (DEL FANTE et al., 2011).

Entre estes grânulos, uma categoria muito importante é representada pelos fatores de crescimento, que iniciam e modulam os mecanismos de reparação tecidual, tais como a proliferação celular, angiogênese, a quimiotaxia, deposição de matriz extracelular e a remodelação. (DEL FANTE et al., 2011).

Os fatores de crescimento mais estudados são os derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador - beta (TGF- β), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de insulina – I (IGF-I) e fator de crescimento fibroblástico (bFGF). (DEL FANTE et al., 2011)

Os fatores de crescimento podem ser classificados em dois grupos: morfométricos e mitogênicos. Os fatores de crescimento morfométricos estão

envolvidos no crescimento ósseo por meio da transformação de células-tronco mesenquimais multipotentes em células osteoprogenitoras na presença da proteína óssea morfogênica. (MAIA; SOUSA, 2009). Já os fatores de crescimento mitogênicos estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese. Resumidamente, os fatores de crescimento provenientes dos α -grânulos plaquetários produzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição da matriz extracelular. (MAIA ;SOUSA, 2009).

Alguns destes fatores de crescimento estão disponíveis na forma purificada. Entretanto, a reparação dos tecidos não pode ser eficazmente mediada por um único agente, sendo necessários múltiplos sinais para completar o processo de regeneração. (DEL FANTE et al., 2011). Sendo assim, o plasma rico em plaquetas (PRP) é um processo que consiste na concentração de plaquetas por meio da centrifugação do sangue. (GUPTA, 2014). São incorporados a estas plaquetas trombina e gluconato de cálcio, os quais estimulam a degranulação das plaquetas para a liberação dos fatores de crescimento dando origem aos “biocurativos”.

1.2 Glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L-alfa-aminoácido, não carregado, polar, composto por carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%). No organismo, todos os tecidos podem sintetizar glutamina. É o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular e encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros tecidos corporais. (CRUZAT;PETRY;TIRAPEGUI,2009).

A depleção da glutamina é atribuída a suas múltiplas funções no organismo, como um metabólito intermediário no suprimento de carbono e nitrogênio para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e proteínas, como combustível para células em divisão e como substrato para a síntese de GSH, o principal antioxidante endógeno. (LIM et al.; 2009). A proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço acidobásico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, entre outros,

são algumas das funções em que a glutamina está envolvida. (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Hormônios como a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, ao passo que glicocorticoides estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular. (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Estudos relatam o uso simultâneo de glutamina com certos regimes de quimioterapia, na prevenção e tratamento da diarreia induzida por quimioterapia, bem como o tratamento de outros efeitos secundários da quimioterapia. (STUBBE; VALERO, 2013). A glutamina ajuda a minimizar a lesão da mucosa induzida pela radiação através da alteração da resposta inflamatória com a glutathione, um subproduto do metabolismo da glutamina que auxilia na proteção contra a lesão oxidante. (CHATTOPADHYAY et al., 2014).

1.3 Mucosite

A mucosite é uma inflamação da mucosa oral e/ou gastrointestinal devido a complicações da terapia antineoplásica. (AUGUSTO; BORRA; GAGIOTI et al., 2010). Especificamente, na mucosite bucal ocorre o aumento da inflamação e a morte das células dessa mucosa (células epiteliais e fibroblastos). Apresenta sintomas específicos como eritema, sangramento, úlceras e dor intensa causando dificuldades para alimentação, podendo levar à desnutrição.

A fisiopatologia da mucosite é dividida em 4 fases: inflamatória, epitelial, ulcerativa e curativa. Na fase inflamatória o tecido epitelial libera interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) causando aumento da vascularização local. Na fase epitelial ocorre redução da renovação das células em função da radioterapia e da quimioterapia, ocasionando ulceração do epitélio. Quando ocorre a colonização por micro-organismos e intensificação das lesões se estabelece a fase ulcerativa propriamente dita. Por último ocorre a fase curativa, que corresponde à renovação celular e posterior cicatrização da mucosite. (SCHIRMER; FERRARI; TRINDADE; 2012).

É relatado que a incidência e severidade das infecções em pacientes sob tratamento antineoplásico são inversamente proporcionais a contagem de neutrófilos no sangue circulante, devido ao comprometimento da defesa celular. (GORDÓN-NÚÑEZ et al., 2010).

No paciente sob quimioterapia, por volta do quinto dia da medicação, geralmente ocorre o desenvolvimento de um período caracterizado por granulocitopenia e linfocitopenia, aumentando assim a susceptibilidade a infecções diversas, sendo as infecções por *Candida* sp. as mais frequentes. (GORDÓN-NÚÑEZ et al., 2010). Outro fator que contribui para o aumento dos riscos de infecções locais por outros microorganismos como vírus herpes simplex (HSV) é a perda da integridade do epitélio da mucosa oral. (YOSHIDA; et al., 2014).

Sendo a mucosite uma complicação grave e comum após quimioterapia e radioterapia com consequentes riscos para infecções oportunistas, se faz necessária a utilização de mecanismos que acelerem o processo de cicatrização das lesões bucais em pacientes imunocomprometidos atuando desta forma na prevenção da morbidade e mortalidade. Portanto, na tentativa de encontrar subsídios mais consistentes para a aplicabilidade desses medicamentos na mucosite bucal em seres humanos, induzimos a mucosite em animais para uma análise da ação do gel de plaquetas e da glutamina no processo cicatricial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gel de Plaquetas

A concentração de plaquetas com seus fatores de crescimento são capazes de iniciar uma atividade de células indiferenciadas transformando-as em uma forma madura ou diferenciada, contribuindo para os processos de cicatrização. (MARX ; GARG, 1999).

Trata-se de um constituinte sanguíneo que é separado por centrifugação diferencial e exibe alta concentração de plaquetas. (ANTONIADES ; OWEN, 1982; VENGELEN, 1996; TORRES et al., 2007). Este componente sanguíneo promove a aceleração do processo cicatricial por meio da concentração desses fatores de crescimento, que são os iniciadores universais de quase todos os eventos cicatriciais, envolvendo tanto tecidos duros quanto moles. (ARORA et al. 2009).

A constituição básica desse extrato sanguíneo é plasma, leucócitos e plaquetas. (WHITMAN; BERR; GREE, 1997; MARX; GARG, 1998). As plaquetas são os componentes mais importantes dentro do processo cicatricial devido à sua capacidade de liberação de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador – beta (TGF- β), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de insulina-I (IGF-I) e fator de crescimento fibroblástico (bFGF). (SCHLIEPHAKE, 2002).

Normalmente as plaquetas estão no estado inativo (EVERTS et al., 2006) e sua ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (ex: trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ex: o ionóforo de cálcio, o cloreto de cálcio e os análogos de endoperóxido cíclico). (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995; CARMONA, 2007). Acredita-se que todos esses agonistas desencadeiam seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas. (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995). Após estimulação pelo agonista, os α -grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local de lesão para

iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas. (HARRISON; CRAMER, 1993).

Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfologicamente e desenvolvem pseudópodos, os quais promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários. (EVERTS et al., 2006). Em particular, os α -grânulos das plaquetas são ricos em fatores de crescimento com diversas ações biológicas. Entretanto, é importante ressaltar que a ativação das plaquetas deve ser realizada próximo ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar uma adequada concentração dos fatores de crescimento presentes nessas plaquetas. (MAIA, 2008).

Os fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular por meio da interação com um complexo de receptores de superfície celular, das vias de sinalização intracelular e, finalmente, pelo aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas que resultam na proliferação e diferenciação celular, bem como no aumento da produção da matriz extracelular. (DAHLGREN; NIXON; BROWER-TOLAND, 2001). Esses peptídeos liberados na matriz extracelular se ligam ao receptor tirosina-quinase, presente nas células teciduais. A ativação desse receptor resulta na sinalização de informações para genes responsáveis pelo controle da divisão celular, ocorrendo assim a transcrição do RNAm. Esse evento resulta em uma resposta biológica que inicia a cascata e que, por sua vez, ocasiona a reparação e a regeneração tecidual. (SCHLIEPHAKE, 2002).

Os fatores de crescimento também são mediadores biológicos naturais que auxiliam no processo de regeneração, regulando diversos eventos celulares, tais como síntese de DNA, quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz. (LYNCH et al. 1991, PIERCE; TARPLEY; YANAGIHARA, 1992; GAMAL et al., 1998, ANITUA, 1999), apresentando potencial mitogênico e angiogênico e aumentando a proliferação osteoblástica. (OBARRIO et al., 2000, SOFFER et al., 2004).

O processo de cicatrização de lesões é um complexo biológico muito bem caracterizado em nível microscópico, porém sua regulação em nível molecular é pobremente conhecida. (CARTER et al., 2003).

Os fatores de crescimento polipeptídicos, como os fatores derivados da ativação plaquetária (PDGF) e o fator de crescimento de transformação (TGF- β), medeiam atividades consideradas essenciais para o início da cicatrização, através do recrutamento, estimulação e proliferação de células para posterior deposição da matriz extracelular. Ambos os fatores de crescimento são liberados através da degranulação de plaquetas, quando estas são ativadas pela trombina. (BARBIERI; COSTA, 2004; CARTER et al., 2003). O PDGF E O TGF- β , particularmente, estimula a proliferação e quimiotaxia de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos que produzem e secretam fatores de crescimento envolvidos em diversas fases do processo de cicatrização. O TGF- β participa também da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (CARVALHO; 2002), enquanto o PDGF regula a produção de proteínas da matriz extracelular, inibe a produção de proteases, determinando a fase de remodelação. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MALDELBAUM, 2003; CROVETTI et al., 2004, CARTER; 2003).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é derivado do sangue total, contendo cinco vezes mais plaquetas (aproximadamente $1.000.000\mu\text{L}^{-1}$) que os níveis fisiológicos. (MARX; GARG, 1998). Esse componente pode ser obtido mediante uma (CAMARGO et al., 2002; PAGLIOSA; ALVES, 2007) ou duas centrifugações (PAGLIOSA; ALVES, 2007; BARBOSA et al., 2008; MAIA, 2008) entre 200 e 2000 g, durante três a cinco minutos. Já o concentrado de plaquetas (CP) é preparado a partir da centrifugação do PRP, sendo utilizada uma força gravitacional mais alta (entre 2000 e 6000 g, durante dois minutos e meio a seis minutos), dependendo da força anteriormente utilizada para a obtenção do PRP. (VENGELEN, 1996).

Durante o preparo do PRP/CP, é importante o estudo prévio do agente ativador. Segundo SANCHEZ et al., (2003), a trombina bovina pode ocasionar o desenvolvimento de anticorpos contra os fatores de coagulação V, XI e a trombina, resultando em risco de vida decorrente de coagulopatias. De acordo com os autores, métodos seguros para o preparo do PRP incluem a utilização de trombina recombinante humana, trombina autóloga ou talvez extra-purificada. Estudo realizado por SILVA (2007), com o propósito de avaliar a ação do PRP em falhas ósseas realizadas no crânio de coelhos, demonstrou que a tromboplastina utilizada para a formulação do gel de plaquetas incitou uma reação semelhante a do tipo corpo-estranho que atuou negativamente na fase inicial de reparação.

As perspectivas atuais para o tratamento tópico direcionam para pesquisas no campo da bioengenharia tecidual abordando a síntese de substâncias proteicas e químicas (fatores de crescimento) envolvidas nos fenômenos cicatriciais sendo proposto para tal fim inovações como o “biocurativo”. Os biocurativos obtidos a partir da adição “*in vitro*” de trombina e gluconato de cálcio ao plasma humano rico em plaquetas, estimulam a degranulação das plaquetas para liberação de fatores de crescimento (PDGF e TGF- β), de maneira a atuar diretamente no processo de cicatrização. (CARTER, 2003).

A aplicação tópica de fatores de crescimento sempre foi um recurso bastante atrativo e estudado pelos cientistas por serem mediadores químicos que promovem a comunicação intercelular e estão relacionados ao processo de cicatrização. (BRASIL,2014). A sua aplicação tópica diretamente sobre a superfície da ferida com o objetivo de estimular e acelerar a cicatrização tem se mostrado uma alternativa terapêutica promissora. (BRASIL,2014).

2.2 Glutamina

A glutamina é um aminoácido considerado uma fonte energética importante para os macrófagos, linfócitos e demais células do sistema imunológico. (CURI et al., 1999). Os macrófagos e os linfócitos utilizam a glutamina de forma semelhante à utilização da glicose. Este aminoácido estimula a proliferação de linfócitos e diferenciação das células B, produção de IL-1 e a fagocitose dos macrófagos. (BORGES; DUARTE; WAITZBERG, 1995).

O aminoácido glutamina é conhecido por aumentar a resposta imunológica (WILMORE; SHABERT, 1998, HOUDIJK et al., 1998), facilitar o crescimento celular e promover a reparação da mucosa após tratamentos de radioterapia e medicamentos . (BAI et al., 1996; KLIMBERG; SOUBA, DOLSON, 1990; VAN DER HULST et al., 1993).

A depleção da glutamina é atribuída as suas múltiplas funções no organismo, como metabólito intermediário no suprimento de carbono e nitrogênio, para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e proteínas, como combustível para células em

divisão e como substrato para a síntese de GSH, o principal antioxidante endógeno. (LIM et al., 2009). A proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço acidobásico, o transporte de amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, entre outros, são algumas das funções em que a glutamina está envolvida. (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Estudos têm demonstrado que a glutamina pode influenciar uma variedade de funções e vias de sinalização celular. Entre os papéis mais estudados da glutamina estão a modulação da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas relacionadas com proliferação celular, resposta antiapoptótica, hemostasia e sobrevivência da célula em decorrência da exposição a agentes agressores, como radiação ultravioleta, calor, agentes infecciosos. (CURI et al., 2005).

O aumento da demanda de glutamina nos tecidos resulta na redução significativa dos seus níveis plasmáticos, mesmo ocorrendo aumento na liberação de glutamina pelos músculos esqueléticos. Por isto, a glutamina é considerada um aminoácido condicionalmente essencial em situações de hiper-catabolismo associadas a grandes cirurgias, queimaduras extensas, sepse e inflamações, onde existe balanço nitrogenado negativo e elevação das taxas de degradação muscular. (PADOVESE et al., 2000).

Glutamina é considerada uma fonte importante de energia para os enterócitos e para a integridade e função da mucosa intestinal. Deste modo, o aminoácido faz parte da terapia nutricional das patologias intestinais com o objetivo de preservar estruturalmente a parede das mucosas do aparelho digestivo. (CAMPOS et al., 1996).

A multiplicidade de funções da glutamina e sua importância em estados patológicos reforçam a seguinte declaração do bioquímico Hans Krebs: “a maioria dos aminoácidos tem múltiplas funções, mas a glutamina parece ser o mais versátil”. (MASSAMBANI; BAZOTTE, 1998). A suplementação pode ainda abrandar os efeitos tóxicos determinados pela radioterapia e quimioterapia, aumentando a tolerância do paciente a seus efeitos colaterais, entre eles a mucosite. Estudos realizados apontam que a glutamina retardaria a resposta inflamatória de citorredução ou

infecções e ativaria os linfócitos T. Além de benefícios metabólicos e clínicos que incluem melhora das taxas de nitrogênio, redução do tempo de hospitalização, redução da taxa de infecção e proteólise muscular. (ALBERTINI; RUIZ, 2004).

2.3 Mucosite

As células da mucosa bucal se renovam rapidamente, entre 10 a 14 dias, e são particularmente susceptíveis a vários tipos de quimioterapia e radioterapia. Os efeitos diretos da toxicidade resultam em uma diminuição das células basais com consequente surgimento de ulcerações. (SONIS et al., 2004).

A mucosite é uma denominação para as alterações que ocorrem na mucosa bucal em função dos tratamentos oncológicos (LÓPEZ-CASTAÑO et al., 2005), sendo uma complicação comum, com incidência de 90%. (PEREIRA, 2004). Esta terminologia, segundo KÖSTLER et al. (2001), surgiu no final dos anos 80 para definir a inflamação da mucosa bucal induzida por quimioterapia e radioterapia, representando uma entidade distinta de outras lesões, como a estomatite. Para SONNIS et al. (2004), a mucosite é caracterizada por eritema, ulceração, presença de pseudomembrana, com aparecimento entre 5 a 7 dias após o início da quimioterapia. O início da cicatrização das lesões ocorre em 2 ou 3 semanas em mais de 90% dos pacientes, coincidindo com a recuperação da contagem de células fagocitárias. (BOROWSKI; BENHAMOU; LAPLANCHE, 1994).

Para vários autores, a mucosite bucal representa um fator de risco significativo para infecções sistêmicas, particularmente em pacientes em estado neutropênico nos quais 20 a 50% das septicemias se originam na cavidade bucal. (LÓPEZ-CASTAÑO et al., 2005, KÖSTLER et al., 2001, POROCK, 2002, AWIDI; HOMSI, 2001).

Na prática clínica, a presença de mucosite, dependendo do grau de gravidade, pode ter como consequência atrasos no tratamento antineoplásico (AWIDI; HOMSI, 2001), limitação das doses (POROCK, 2002; SONIS, 1998; DODD et al., 2001) e interferência na qualidade de vida do paciente (LÓPEZ-CASTAÑO;

OÑATE-SÁNCHEZ; ROLDÁN-CHICANO, 2005; CARIBÉ-GOMES ; CHIMENES – KÜSTNER ; LÓPEZ-LÓPEZ , 2003).

Macroscopicamente, a mucosite bucal se apresenta, inicialmente, como uma placa eritematosa, que evolui para ulcerações que são afetadas por fatores específicos da cavidade bucal, como xerostomia e colonização por microbiota oportunista.

Os fatores extrínsecos como o tabagismo e o abuso de álcool durante a radioterapia e / ou quimioterapia podem desenvolver lesões exuberantes e, quando associada a infecções fúngicas e má higiene oral é considerada grave. Este fato pode requerer a suspensão parcial ou total da radioterapia antes da realização do protocolo previsto, o que afeta negativamente o prognóstico do paciente. (NEGRIN; TOLIJANIC, 2012; SONIS , 2004 ; YEOH et al., 2007).

De acordo com a literatura , os sintomas da mucosite bucal podem variar desde uma sensação de queimação , dor severa até hemorragia espontânea que dificulta a alimentação de rotina, podendo eventualmente levar a caquexia e nutrição parenteral por meio de sonda nasogástrica. (BARBER et al., 2007; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008).

AZEVEDO; RIBEIRO, 2010, enfatizaram que a dor é um componente significativo da mucosite bucal, contribuindo para a diminuição da qualidade de vida de pacientes com câncer.

De um ponto de vista histopatológico, as lesões eritematosas da mucosa bucal são caracterizadas pela atrofia, a qual está associada com uma reação inflamatória na lâmina própria. Com a persistência do agente, a ação secundária do fármaco quimioterápico e / ou a radioterapia produzem ulcerações em pontos isolados que eventualmente convergem para formar lesões maiores e mais profundas. (PETERSON; D'ÁMBRÓSIO, 1994). Vários autores atribuem a evolução da reação inflamatória local da mucosite à uma condição sistêmica, em particular, a contagem de células brancas do sangue do paciente durante o tratamento do câncer. (SONIS, 1998; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008).

SONIS (1998), por meio de várias observações clínicas e experimentais, propôs que a estomatotoxicidade dos medicamentos utilizados leva a um

mecanismo fisiopatológico complexo subjacente ao desenvolvimento da mucosite bucal, com uma história natural, incluindo 4 estágios biológicos:

- ✓ inicial, vascular ou fase inflamatória (aguda , desencadeada pelo estímulo inicial do agente de quimioterapia);
- ✓ fase epitelial (ação da droga sobre o ciclo das células epiteliais, o que resulta numa taxa reduzida da divisão celular);
- ✓ fase ulceração (exposição da lâmina própria por perda epitelial);
- ✓ fase de cura (resolução devido à proliferação e diferenciação de células).

Posteriormente, a história natural da mucosite bucal foi descrita em cinco etapas, segundo a Organização Mundial de Saúde (SONIS, 2010 a; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008). Cada fase sequencial representa as ações das citocinas e fatores de crescimento associados com o efeito de fármacos quimioterápicos no epitélio, a flora bacteriana bucal e o estado geral do paciente. (SONIS, 2004; PICO; AVILA-GARAVITO;NACCACHE,1998).

A fase inflamatória, também conhecida como inicial ocorre devido a um efeito direto do fármaco quimioterápico o qual estimula a liberação precoce de mediadores químicos dos neutrófilos e de interleucina-1 por macrófagos e linfócitos. Estas citocinas pró-inflamatórias desencadeiam uma resposta inflamatória resultando num aumento da permeabilidade vascular no tecido conjuntivo sub-epitelial. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998, SILVERMAN, 2007). A ação da droga está associada com a liberação de radicais livres e inibe a mitose das células da camada basal do epitélio da mucosa por danificar diretamente o DNA celular. Uma reação inflamatória aguda ocorre e promove diapedese predominante de neutrófilos que liberam mediadores vasoativos e quimiotáticos e se inicia em 4-5 dias após o início da quimioterapia. Esta fase pode ser maior em termos do desenvolvimento de lesões ulcerativas. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). O estágio de maximização está associada à liberação e ativação de fatores de crescimento que controlam a transcrição do DNA celular; concomitantemente, fármacos quimioterápicos e radiação ativam enzimas que aumentam a apoptose (morte celular programada). A etapa de amplificação e de sinalização caracteriza-se por uma

predominância de citocinas pró-inflamatórias que têm a capacidade de regular fatores de transcrição. Os níveis de substâncias produzidas pelas células da lâmina própria são aumentadas e melhoram o dano celular, além de amplificar a ação dos fatores de transcrição. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

A fase ulcerativa é considerada o período mais significativamente sintomático. Nesta fase, a destruição superficial do epitélio com a exposição da lâmina própria leva a dissolução da barreira de proteção entre o meio interno e externo. Durante a fase de ulceração, a integridade da mucosa está danificada e as terminações nervosas estão expostas, levando a dor severa. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998). A colonização da superfície ulcerada na microflora bucal como resultado da liberação de toxinas nos tecidos e com posterior liberação de citocinas adicionais causam mais danos aos tecidos e levam a uma diminuição do número de neutrófilos. As bactérias também podem invadir a lâmina própria e penetrar nas paredes vasculares, levando a bacteremia ou sepse. Esta fase está associada a uma degradação da saúde do paciente. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

O estágio de cura é caracterizado pela resolução da lesão, com o controle da microflora, diminuindo gradualmente a reação inflamatória e predominância de estímulos de reparação, com o desenvolvimento de tecido de granulação e remissão das lesões e é histopatologicamente associado com a proliferação celular local e diferenciação. Os eventos finais culminam com a restauração hemodinâmica periférica e controle da flora bacteriana bucal. A duração desta fase depende da condição sistêmica do paciente. (PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998).

LIMA et al., (2004) relataram que a etapa de cura pode ser associada com a normalização do número de leucócitos circulantes e controle subsequente do microbiota bucal.

O controle da mucosite bucal tem sido o foco de diversos estudos, que destacam o fato de que o seu tratamento eficaz pode permitir doses terapêuticas mais agressivas e um tratamento de câncer mais eficaz com uma melhor sobrevida do paciente. (NEGRIN et al., 2012; KOWANKO et al., 1998, PICO; AVILA-GARAVITO; NACCACHE, 1998; LALLA; SONIS; PETERSON, 2008).

Devido à sua alta incidência e significado clínico no prognóstico do paciente, vários estudos foram realizados para avaliar o tratamento e prevenção da mucosite bucal. (KOWANKO et al., 1998, SILVERMAN, 2007, MIGLIORATI et al., 2013). Considerando-se a dor associada com a mucosite e o seu efeito sobre a qualidade de vida dos pacientes, a utilização de anestésicos locais e analgésicos foi recomendada por alguns autores. (SONIS, 2010 (b); ROOPASHRI; JAYANTHI, 2010). Agentes naturais com ação antimicrobiana, como a camomila, glicerina, sálvia e mirra, administrados como antissépticos bucais, também são citados na literatura. (SONIS, 2004; SONIS, 2010 (a). No entanto, apesar da aplicação destas terapias, sozinhas ou com o uso combinado de antibióticos, para prevenção ou redução da gravidade da mucosite bucal, atualmente não há registros conclusivos sobre sua eficiência ou protocolos de prescrições estabelecidos. (STEINMANN et al., 2012, SILVERMAN, 2007).

ROOPASHRI; JAYANTHI, 2010, tem listado várias opções de tratamento para a mucosite bucal, incluindo crioterapia, a utilização de laser de hélio-néon e a construção de campos de radiação para proteger os tecidos bucais durante a irradiação. Além disso, uma variedade de opções de lavagem bucal são utilizadas porque possuem propriedades anti-inflamatórias, anestésica, analgésica, antipirética e propriedade antimicrobianas.

JAIN; KESERVANI; DAHIMA, 2010, realizaram um estudo utilizando um hidrogel contendo L-glutamina, que foi aplicada às lesões intraorais com um cotonete de algodão e foi demonstrado ser eficaz na redução da sensibilidade à lesão inflamatória.

A crioterapia é uma prática indicada para o alívio de lesões causadas por mucosite. A sucção de pequenos cubos de gelo durante 30 min, proporciona o alívio da dor e pode prevenir o desenvolvimento de novas lesões. (PETERSON et al.,2013).

A terapia laser de hélio-néon, que utiliza o laser de baixa intensidade, é indicado como um pré-tratamento para reduzir a gravidade da mucosite em pacientes submetidos a quimioterapia. No entanto, uma vez que este tipo de tratamento requer equipamento dispendioso e operadores especializados, a sua utilização é muitas vezes restrita a um número limitado de pacientes. (KUHN et al.,

2009, MIGLIORATI et al., 2013, GAUTAM et al., 2012). A aplicação tópica de vitamina E também foi investigada e a resolução completa das lesões foi relatada. No entanto, são necessários mais estudos, uma vez que este medicamento tem demonstrado ser eficaz para o tratamento de lesões já estabelecidas, mas não impede o desenvolvimento de novas lesões. (CAMPOS CRUZ et al., 2014).

Além dos benefícios locais de tratamento de mucosite bucal, é essencial melhorar o estado nutricional, a hidratação e a qualidade de vida dos pacientes afetados. Além disso, a prevenção e controle da mucosite bucal são vitais para o prognóstico do câncer, uma vez que o estabelecimento de lesões graves podem levar à interrupção do tratamento temporário ou permanente diminuindo consideravelmente a sobrevida e chances de cura do paciente. (DODD et al., 2000; NEGRIN et al., 2012, SONIS, 2010 b).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação do Gel de Plaquetas e Glutamina no processo de cicatrização de lesões bucais causadas pela mucosite induzida por quimioterapia em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo em parceria com a Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. (CEEPA-PROC. Nº 039/2013) (ANEXO 1)

4.1 Materiais

4.1.1 Critérios de inclusão

- ✓ Ratos wistar, machos jovens com 90 dias de vida, peso médio de 300g

4.1.2 Grupos de estudo

- ✓ 50 animais divididos em 05 grupos, contendo 10 animais por grupo: Grupo A (Gel de Plaquetas), Grupo B (Glutamina tópica), Grupo C (Glutamina por gavagem), Grupo D (Glutamina + Gel de Plaquetas) e Grupo E (controle +, sem a utilização de biocurativos).

4.1.3 Descrição do Plano de Trabalho

Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, dentro de gaiolas plásticas específicas para este fim, contendo 5 animais por caixa e devidamente identificada com o tipo de medicamento proposto para cada grupo ; forradas com raspas de madeira seca e esterilizadas as quais eram substituídas de acordo com o programa do Biotério da FOB-USP, para a higiene necessária ao bem estar e saúde dos animais.

O controle da temperatura e iluminação também ocorreu de acordo com as normas do Biotério da FOB-USP. A sala onde os animais foram mantidos possuía um sistema de ar com exaustão de 15 a 20 vezes por hora com temperatura em 22° C (podendo variar 1 grau a mais ou 1 grau a menos). Já o sistema de iluminação foi estabelecido em 12 horas em 60 Lm e 12 horas sem iluminação.

A alimentação foi constituída por ração (Purina, Ribeirão Preto, Brasil) para animais de laboratório – roedores e juntamente com a água potável *ad libitum*, garantiram o suprimento constante aos animais.

4.1.3.1 Imunossupressão

A imunossupressão foi realizada por dois dias alternados com o objetivo de induzir a mucosite. Os animais receberam injeção intraperitoneal de fluoruracila 500 mg (5-FU) (LIBBS, São Paulo, Brasil) nas doses de 100mg/kg (1º dia) e 60mg/kg (2º dia). (SONIS ST et al, 1990). (FIGURA 1).

Figura 1 - Quimioterápico 5-fu preparado em doses individualizadas

Os efeitos colaterais da quimioterapia como êmese (vômito) são controlados com medicamentos específicos como a combinação de metoclopramida (3mg/kg) e dexametasona. (CARVALHO MP,1992) . Neste estudo, utilizou-se somente o Vomistop (cloridrato de metoclopramida, 4mg/ ml, Medquímica), na dosagem de 5 gotas misturadas com a água potável ingerida diariamente para cada caixa, de acordo com a posologia do fabricante. (FIGURA 2).

A alimentação foi triturada e misturada com suplementos nutricionais (Aminomix Pet, Vetnil) com a finalidade de facilitar a deglutição e evitar a morbidade, na dosagem de 1g por caixa com 5 animais, de acordo com as especificações do fabricante. (FIGURA 2).

Figura 2 - Suplemento Nutricional Aminomix (Pet Vetnil) e medicamento Vomistop

Após a imunossupressão induzida por quimioterapia utilizando o protocolo acima descrito, os animais dos cinco grupos foram avaliados quanto ao grau de mucosite desenvolvida obedecendo aos critérios de classificação segundo a OMS.

O sistema de graduação de mucosite mais utilizado atualmente é o da Organização Mundial de Saúde (OMS), no qual se leva em consideração critérios objetivos e subjetivos, que consideram o estado físico geral e nutricional do paciente, bem como a inspeção da cavidade bucal. O grau da mucosite é determinado pela combinação do exame clínico sobre a dor, estado nutricional e pelas reações locais na mucosa bucal. Segundo essa classificação, a mucosite varia do grau 0 ao grau IV:

- 0 - inexistência de alterações da mucosa;
- I - inflamação e eritema;
- II - eritema e úlceras (ingestão alimentos sólidos);
- III - ulceração (ingestão apenas de líquidos);
- IV - impossibilidade de alimentação oral.

Neste experimento, utilizou-se o critério da Organização Mundial de Saúde modificado, devido às limitações para o trabalho animal:

- 0 - inexistência de alteração da mucosa,
 - 1 - edema;
 - 2 - eritema;
 - 3 - úlceras;
 - 4 - úlceras severas com formação de pseudomembrana
-

4.2 Metodologia

4.2.1 Obtenção do concentrado de plaquetas por aférese (CPA):

Obtidos a partir do procedimento de coleta por Aférese (Plaqueta Aférese), utilizando COBE Spectra Apheresis System. Essas plaquetas são oriundas de coleta específica de doador de sangue fidelizado (no mínimo quatro doações nos últimos 18 meses). Este critério foi usado para minimizar os efeitos de coleta de doador de sangue em janelas imunológicas. Esta bolsa é processada de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Processamento de Hemocomponentes do Hemocentro de Botucatu/UNESP.

O prazo de validade e o processamento do CPA seguem os mesmos padrões do concentrado de plaquetas (CP) de acordo com a legislação (RDC 34 de 16/12/2014) ,o qual determina que o concentrado de plaquetas tem validade de 3 a 5 dias para fins transfusionais, dependendo do tipo de plastificante da bolsa de conservação. Findo este prazo, o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu resgata essas unidades de CP que iriam para descarte e inicia um processo de controle de qualidade dessas plaquetas com a finalidade de utilizá-las na confecção do gel. (FIGURA 3)

Figura 3 - Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu

4.2.2 Controle de Qualidade dos CPs

As características dos CPs produzidos pelo Hemocentro de Botucatu são definidas por publicações científicas e pela legislação vigente para este hemocomponente, que são:

- Volume de 45 a 60mL
- Número de plaquetas por unidade $\geq 5,5 \times 10^{10}$
- $< 0.2 \times 10^9$ glóbulos brancos por unidade
- $< 1.0 \times 10^9$ glóbulos vermelhos por unidade
- $< 6.5 \times 10^8$ linfócitos por unidade
- pH 6.4 - 7.4

Com a expiração do prazo de validade para fins transfusionais, as unidades de CPs são enviadas ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu e armazenadas para congelamento a -30°C em pools de até 12 unidades. Esses pools recebem o rótulo de “não liberados” até que os testes de qualificação deste lote estejam finalizados. Os Testes de Qualificação da matéria prima são: Hemocultura (BactAlert®), Determinação do numero de Plaquetas e Dosagem de PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) e VEGF (Fator de crescimento vasoendotelial).

4.2.3 Obtenção do Gel de Plaquetas

É preparado um creme-base onde são adicionadas substâncias lipossolúveis como óleos e vitaminas, importantes no processo de cicatrização e também tem a função de manter o leito da lesão hidratado. Em seguida são incorporados os princípios ativos derivados dos CPs e Trombina humana purificada. Todo esse procedimento é realizado em câmara de fluxo laminar (FIGURA 4).O produto final é envasado em bisnagas estéreis de 60g (FIGURA 5)

Figura 4 – Preparação dos Biocurativos

Figura 5 – Apresentação Gel Glutamina, Gel de Plaquetas e Gel de Plaquetas associado com Glutamina

4.2.4 Obtenção do Gel inerte de Glutamina

Esta formulação é composta de um polímero hidrossolúvel (Carbopol®) acrescido de solvente (propilenoglicol), conservantes e L-glutamina na concentração de 10mg/mL e 20mg/mL e foi preparada pelo setor de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

4.3 Grupos de estudo

Grupo A:

Para o grupo A (dez animais), nas lesões observadas, utilizou-se o Gel de Plaquetas preparado no setor de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Grupo B

No grupo B (dez animais), foi utilizado o Gel Inerte de Glutamina, preparado no setor de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu

Grupo C

No grupo C (dez animais), utilizou-se a glutamina por gavagem, preparada com 0,5g/kg de peso/dia de glutamina em uma concentração de 3,75g/100ml de água. O volume utilizado era inferior a 4 ml para evitar aspiração, sem contato com a cavidade bucal.

Grupo D

No grupo D (10 animais), foi utilizada a associação da glutamina + gel de plaquetas, seguindo as mesmas formulações de acordo com o setor de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Grupo controle +

No grupo controle, não foi utilizado nenhum biocurativo nas lesões desenvolvidas.

4.4 Avaliações

A primeira avaliação clínica ocorreu em sete dias após o início da imunossupressão, período no qual se iniciou a formação das lesões de mucosite. Nesta fase avaliou-se o grau de mucosite desenvolvido nos 5 grupos e também a pesagem dos animais. A partir desta avaliação, iniciamos o tratamento 1 vez ao dia (manhã) de acordo com o grupo, conforme descrito. As avaliações de mucosite eram feitas diariamente e os graus desenvolvidos eram anotados em planilhas .(ANEXO 2)

No 5º dia após o início dos tratamentos , 5 animais de cada grupo foram pesados e eutanasiados com aplicação de dose excessiva de anestésico (Ketamina / Xilazina).

Nestes animais foram realizadas as biópsias da mucosa jugal e língua para análise histológica de células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e queratinização das áreas anatômicas citadas. (FIGURA 6)

Figura 6 - Lesão em língua, área de biópsia

Nos animais restantes de cada grupo, continuou-se o tratamento proposto para este estudo e as avaliações diárias dos graus de mucosite até completar 10 dias, após o início da utilização dos medicamentos.

Ao final deste período, os animais foram pesados e eutanasiados com aplicação de dose excessiva de anestésico (Ketamina / Xilazina) e realizou-se as biópsias da língua e mucosa jugal para avaliação das mesmas variáveis descritas acima.

As lâminas foram confeccionadas no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) e coradas pela eosina e hematoxilina. Foram feitas 1 lâmina da mucosa jugal e 1 lâmina da língua, de cada animal de cada grupo contendo 3 cortes cada uma.

Para a determinação numérica das células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e captação das imagens, utilizou-se o programa de computador composto por câmera digital (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha), contendo uma objetiva de 40x. A câmera digital, conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviava as imagens para um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.9 ZEISS, Jena, Alemanha). Foram selecionadas aleatoriamente 3 áreas de cada lâmina para a contagem das células. (FIGURA 7). O número de macrófagos e linfócitos encontrados em cada animal foram somados e divididos por 5 na 1ª e 2ª fase, para a obtenção da média por grupo, de acordo com a região anatômica. (ANEXO 3).

Figura 7 - Células inflamatórias no tecido conjuntivo

Para as medidas da camada de queratina, utilizou-se a régua do programa de computador Adobe Photoshop CS3 escolhendo aleatoriamente 5 áreas de queratinização da mucosa jugal e língua de cada lâmina. As medidas encontradas (mm) em cada animal foram somadas e divididas por 5 na 1ª e 2ª fase do experimento para a obtenção da média por grupo e por região anatômica. As medições foram feitas perpendicularmente ao epitélio em todas as áreas escolhidas. (FIGURA 8)

Figura 8 - Espessura da camada de queratina

Os dados obtidos das amostras estudadas foram analisadas considerando – se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Para as variáveis qualitativas: graus de mucosite, lesões bucais desenvolvidas e regiões anatômicas acometidas, foi utilizado o Teste do Qui-Quadrado que analisou estatisticamente a comparação entre os grupos estudados nas fase 1 e 2 do experimento.

Entretanto, para as variáveis quantitativas como peso, número de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal, número de macrófagos e linfócitos em língua e queratinização em mucosa jugal e língua, utilizou-se o Teste de Variância e o Teste de Tukey analisando a comparação entre os grupos nas fases 1 e 2 do presente estudo.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Antes do início do experimento, os animais foram pesados e apresentavam a mesma média de peso: 300g. Uma nova pesagem foi realizada sete dias após a segunda quimioterapia e obtivemos a média por grupo. (tabela 1)

TABELA 1: Média de peso (g) por grupo (N=10)

GRUPOS	CAIXA	PESO (g) (média)
A	1	376
A	2	310
B	3	329
B	4	354
C	5	338
C	6	344
D	7	306
D	8	330
E	9	336
E	10	298

No dia do primeiro sacrifício, (doze dias após início da primeira quimioterapia) ,foi realizada a pesagem dos animais que iriam a óbito, ou seja, metade dos animais de cada grupo. (tabela 2).

TABELA 2: Média de peso (g) por grupo (N=5)

GRUPOS	CAIXA	PESO (g) (média)
A	1	366,14
B	3	331,04
C	5	288,02
D	7	334,02
E	9	296,72

O resultado estatístico, segundo ANOVA e o teste de Tukey apresentou diferenças significantes ($p=0,00$) entre os grupos, exceto entre os grupos B e D ($p=0,063$) para o peso dos animais que foram a óbito neste primeira fase do experimento.

A última pesagem dos animais restantes de cada grupo foi realizada após o término dos tratamentos, ou seja, dezessete dias após o início da primeira quimioterapia.(tabela 3).

TABELA 3: Média de peso (g) por grupo (N=5)

GRUPOS	CAIXA	PESO (g) (média)
A	2	327,4
B	4	362,8
C	6	364,8
D	8	353,5
E	10	280,6

Utilizando-se os mesmos testes, o peso dos animais nesta fase apresentou diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos. ($p=0,00$),apresentando o grupo E (controle) o menor peso.

Sete dias após a primeira quimioterapia, foram avaliados os graus de mucosite desenvolvidos em cada grupo. A partir deste momento, teve início a aplicação dos medicamentos propostos e a avaliação diária dos graus de mucosite durante todo o tratamento até o sacrifício dos animais.

5.1 Resultados Mucosite Fase 1

GRÁFICO 1: GRUPO A (GEL DE PLAQUETAS) (n=10)

GRÁFICO 2 :GRUPO B (GLUTAMINA TÓPICA) (n=10)

GRÁFICO 3 :GRUPO C (GLUTAMINA POR GAVAGEM) (n=10) **GRÁFICO 4: GRUPO D (GEL DE PLAQUETAS + GLUTAMINA) (n=10)**

GRÁFICO 5 : GRUPO E (CONTROLE) (n=10)

Para avaliação estatística dos graus de mucosite foi utilizado o teste do qui quadrado onde não houve resultados significantes. Entretanto observa-se uma diferença numérica importante entre os graus de mucosite desenvolvidos em cada grupo. A mucosite grau 2 foi a que mais predominou em todos os grupos ,durante a fase 1 do experimento.

5.2 Resultados Lesões Bucais Fase 1

Em 56% (n=28) dos animais, observou-se algum tipo de lesão desenvolvida durante a primeira fase do experimento. As regiões anatômicas mais acometidas foram a língua (38%), mucosa oftálmica (28%) e mucosa jugal (6%). Entre os grupos A e E houve diferenças estatísticas significantes .(p=0,010) em relação às lesões presentes na mucosa oftálmica, onde no grupo E houve um número maior de lesões. (tabela 4)

TABELA 4: Lesões bucais por região anatômica e por grupo (N=10)

GRUPO (N=10)	NÚMERO DE ANIMAIS COM LESÕES BUCAIS	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA LÍNGUA	MUCOSA JUGAL	MUCOSA OFTÁLMICA
A	7	7	0	0
B	4	2	1	2
C	4	5	0	2
D	5	2	0	3
E	8	4	2	7

5.3 Resultados Análise Histopatológica

Após cinco dias de tratamento, foram sacrificados cinco animais por grupo e realizadas as biópsias da mucosa jugal e língua para avaliação da quantidade de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos e também a quantidade de queratina presente nas regiões anatômicas citadas.

Para estas variáveis também se utilizou o teste ANOVA e o teste de Tukey. Como resultado importante, observaram-se diferenças estatísticas significantes entre os grupos B e D ($p=0,032$) para os linfócitos em mucosa jugal, onde B foi maior que D. Para os linfócitos em língua, o grupo A apresentou diferenças estatísticas significantes em relação a todos os grupos ($p=0,000$). Os macrófagos no grupo A, tanto em mucosa jugal como em língua, apresentaram um número ligeiramente maior que os demais grupos, apesar de não haver significância estatística. (tabela 5)

TABELA 5: Média de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal e língua (N=5)

GRUPO	A	B	C	D	E
Macrófagos (mucosa jugal)	24,4	21,00	17,40	23,40	14,40
Macrófagos (língua)	16,60	13,20	8,20	10,20	13,60
Linfócitos (mucosa jugal)	10,00	11,00	5,60	4,60	5,80
Linfócitos (língua)	16,00	4,80	2,60	5,00	1,80

A queratinização em mucosa jugal no grupo D apresentou resultados significantes quando comparada com a queratinização do grupo A ($p=0,001$); B ($p=0,002$); C ($p=0,001$) e E ($p=0,001$). Para a variável queratina em língua, o grupo D apresentou diferenças estatísticas significantes ($p=0,000$) quando comparado aos demais grupos. (tabela 11). Portanto, grupo D apresentou maior queratinização em relação aos demais grupos.

GRÁFICO 6: Média da espessura de queratina em mucosa jugal e língua (mm) (N=5)

5.4 Resultados Fase 2

5.4.1 Resultados Mucosite Fase 2

Nesta segunda fase, os animais restantes continuaram a se submeter aos tratamentos propostos para cada grupo e os graus de mucosite continuaram a serem avaliados diariamente.

GRÁFICO 7: GRUPO A (GEL DE PLAQUETAS) (N=5)

GRÁFICO 8: GRUPO B (GLUTAMINA) (N=5)

GRÁFICO 9 : GRUPO C (GLUTAMINA POR GAVAGEM) (N=5)

GRÁFICO 10: GRUPO D (GEL DE PLAQUETAS + GLUTAMINA) (N=4)

GRÁFICO 11: GRUPO E (CONTROLE) (N=5)

Para avaliação estatística dos graus de mucosite na fase 2, também foi utilizado o teste do qui quadrado onde não houve resultados significantes. Observou-se uma variação numérica predominante dos graus 1 e 2 de mucosite no início da fase 2 em todos os grupos. Ao término desta etapa, os animais não apresentavam lesões, caracterizando mucosite grau 0 em todos os grupos, com exceção do grupo C, onde no último dia de avaliação, 1 animal ainda apresentava mucosite grau 1.

5.4.2 Resultado Lesões Bucais Fase 2

Nesta segunda fase do experimento, as lesões foram mínimas, sendo a língua a região mais acometida. (tabela 6).

TABELA 6 : Lesões bucais por região anatômica e por grupo

GRUPO (N=10)	NÚMERO DE ANIMAIS COM LESÕES BUCAIS	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA		
		LÍNGUA	MUCOSA JUGAL	MUCOSA OFTÁLMICA
A	1	1	0	0
B	2	1	0	1
C	1	1	0	0
D	2	1	0	1
E	1	0	0	1

5.4.3 Resultados Análise Histopatológica Fase 2

Nesta segunda fase do experimento, os macrófagos da mucosa jugal do grupo A apresentaram resultados significantes quando comparados com os demais grupos: B ($p=0,012$), C ($p=0,010$), D ($p=0,022$) e E ($p=0,000$). Os macrófagos em língua tiveram resultados significantes entre os grupos A e C ($p=0,031$) e A e E ($p=0,006$), sendo que o grupo A apresentou maior número de macrófagos. (tabela 7)

TABELA 7: Média de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal e língua (N=5)

	A	B	C	D	E
Macrófagos (mucosa jugal)	39,40	19,40	18,80	20,80	11,40
Macrófagos (língua)	20,40	8,80	7,60	9,00	4,60
Linfócitos (mucosa jugal)	6,60	7,40	3,00	6,00	5,00
Linfócitos (língua)	5,80	4,00	3,80	3,00	1,80

Para a queratinização da mucosa jugal e língua na 2ª fase do presente estudo não se houve resultados estatisticamente significantes.

GRÁFICO 12: Média da espessura de queratina em mucosa jugal e língua (mm) (N=5)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O câncer é caracterizado pelo aumento da proliferação celular e apoptose diminuída. A proliferação de células atípicas tem capacidade invasiva, com a infiltração dos tecidos ou órgãos. Também por meio do sistema de circulação sanguínea e linfática promove a metástase. (CHAVELI –LOPÉZ, 2014)

Os tratamentos existentes para o câncer compreendem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia biológica ou imunológica e terapia hormonal. Apesar dos avanços no tratamento do câncer, a quimioterapia continua a ser uma das modalidades de tratamento mais amplamente utilizada, isoladamente ou em combinação com outros tipos de tratamentos. O grande inconveniente da quimioterapia é a falta de seletividade, uma vez que atua sobre as células tumorais e células normais desencadeando efeitos citotóxicos. (CHAVELI –LOPÉZ, 2014)

A mucosa bucal é muito suscetível aos efeitos tóxicos diretos e indiretos da quimioterapia. Isto é devido a diversos fatores, incluindo a taxa elevada de turnover celular da mesma, a microbiota complexa e diversa da cavidade bucal e trauma da mucosa que ocorre durante a mastigação e outras atividades normais. (CHAVELI –LOPÉZ, 2014)

A literatura nos mostra que existem diversos protocolos para quimioterapia e radioterapia utilizados para tratamento do câncer. Estes protocolos são utilizados isoladamente ou concomitantemente, dependendo do tipo do tumor.

No estudo de Patel et al, 2013, foi utilizado o quimioterápico Busulfano (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) na dosagem de 6 mg / kg, por via oral, durante 4 dias associado com a radioterapia (modelo 37360, Ugo Basile Srl, Comerio, VA, Itália), em ratos wistar onde se observou uma redução significativa do peso corporal dos animais.

Neste estudo, utilizamos a droga fluoruracila (5-FU) (LIBBS, São Paulo, Brasil) para o protocolo de quimioterapia, conforme descrito no materiais e métodos.

O 5-FU é uma droga antineoplásica amplamente prescrita, que tem desempenhado um importante papel no tratamento de diversos tipos de câncer,

como de mama e de cabeça e pescoço. (VAN KUILENBURG; MARING, 2013). Atualmente, o 5-FU é utilizado em combinação com outras drogas, sendo que essa combinação melhora a taxa de resposta antineoplásica. (ANGHINONI, 2013).

Em relação ao peso dos animais neste experimento, observou-se que logo após a quimioterapia houve um ligeiro aumento de peso nos grupos, com exceção do grupo E (controle). Entretanto, na última pesagem todos os grupos apresentaram aumento significativo de peso, inclusive com diferenças estatísticas importantes.

Atribuímos este aumento de peso à complementação nutricional que foi utilizada neste estudo (Aminomix Pet) e a modificação da estrutura física da ração (triturada), com a finalidade de facilitar a alimentação e prevenir a morbidade e mortalidade causada pela quimioterapia, fato observado no estudo piloto, onde havia 5 animais e 4 foram a óbito devido aos efeitos colaterais da quimioterapia, como diarreia, diminuição de peso e vômito.

As complicações bucais da quimioterapia são resultados da ação direta da droga sobre a mucosa bucal . As células da mucosa bucal tem uma taxa de rotação rápida, com um ciclo de 7-14 dias. Isto explica a susceptibilidade particular da mucosa bucal para os efeitos tóxicos de fármacos citostáticos. (CHAVELI –LOPÉZ, 2014).

A mucosite é um efeito colateral agudo importante na cavidade bucal em pacientes submetidos a quimioterapia e ou radioterapia, sendo considerada causa mais comum de morbidade e mortalidade. As lesões bucais podem levar a uma diminuição considerável da qualidade de vida nestes pacientes ocasionando dificuldade na alimentação, tanto com alimentos sólidos ou líquidos, com dor ou ardor ao engolir e má coordenação dos músculos da fala. Além disso, as lesões podem representar uma porta de entrada para infecções oportunistas.

O efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos na mucosa bucal é discreto durante os primeiros dias de tratamento, tornando-se gradualmente mais grave ao fim da primeira semana em diante (normalmente 7-10 dias), tendo seus efeitos diminuídos ao final de 15 dias. (CAMPOS CRUZ et al, 2014).

Em nosso experimento, na primeira fase, os graus de mucosite avaliados diariamente, a partir do sétimo dia após o início da quimioterapia, nos mostram que

houve uma variação numérica dos graus de mucosite desenvolvidos, com predominância dos graus 2 e 3 (numa escala de 0 a 4) em todos os grupos. Porém, em nenhum grupo houve a presença da mucosite grau 4, que é a mais severa. Este fato pode ser explicado por uma certa resistência em induzir a mucosite através do quimioterápico 5-FU. A literatura relata que entre os quimioterápicos utilizados para tratamento do câncer, o Busulfano combinado com radioterapia apresenta maior capacidade para o desenvolvimento da mucosite grave. (PATEL et al, 2013).

Outro fator importante é a alta queratinização da língua dos ratos o que leva à uma certa dificuldade em induzir úlceras mais graves nestes animais. (BOWEN; GIBSON; KEEFE, 2011). Portanto, o 5-FU, quimioterápico utilizado neste experimento não foi efetivo para a indução de úlceras mais severas.

Na segunda fase do experimento, (dezessete dias após a primeira quimioterapia), os graus de mucosite predominantes foram 1 e 2 e ao final, praticamente todos os grupos já não apresentavam alterações na mucosa bucal, condizendo com os dados da literatura que relata o fim da mucosite em quinze dias aproximadamente. (CAMPOS CRUZ et al., 2014).

Os medicamentos propostos para acelerar o processo cicatricial das lesões de mucosite neste experimento vão de encontro com a necessidade em reverter os efeitos da quimioterapia rapidamente e evitar que essas lesões sejam contaminadas por infecções oportunistas.

Diversos trabalhos na literatura relatam o uso de plasma rico em plaquetas em feridas, sejam elas em mucosa ou pele e também para a regeneração óssea. O plasma rico em plaquetas e o concentrado de plaquetas são fontes de diversos fatores de crescimento, com grande potencial terapêutico. Uma vez liberados dos grânulos alfa das plaquetas ativadas, esses fatores atuarão no sítio da lesão, estimulando a quimiotaxia, fibroplasia e angiogênese, melhorando assim a reparação tecidual. CARVALHO, 2002; (MANDELBAUM; DI SANTIS; MALDELBAUM, 2003; CROVETTI et al., 2004, CARTER; 2003).

SALAZAR-ÁLVAREZ; RIERA-DEL-MORA; GARCÍA-ARRANZ nos mostram em seu trabalho em 2014, que o uso de plasma rico em plaquetas em 11 pacientes

se mostrou eficaz na cicatrização com consequente redução do tamanho de úlceras crônicas de membros inferiores em 60% e uma completa cura em 5 pacientes.

Em nosso trabalho, o gel de plaquetas aplicado topicamente e puro não resultou em aceleração do processo cicatricial quando comparado com os outros grupos, ou seja, o tempo para melhora da mucosite foi semelhante entre todos os grupos.

Outro medicamento utilizado neste experimento foi a glutamina sob a forma tópica e por gavagem. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo e auxilia em minimizar a lesão da mucosa induzida pela radiação através da alteração da resposta inflamatória. A glutathione, um subproduto do metabolismo da glutamina protege contra a lesão oxidante e é um antagonista de prostaglandina. Chattopadhyay et al, 2014, demonstrou em seu estudo que a ingestão de glutamina oral previamente à quimioterapia atrasou o desenvolvimento da mucosite. O tempo médio de aparecimento da mucosite foi significativamente retardada em doentes que receberam a glutamina, com $P < 0,001$.

A glutamina parenteral suplementar tem sido investigada em pacientes que recebem quimioterapia. No entanto, não há atualmente nenhuma evidência científica que comprove o seu benefício na prevenção ou diminuição da gravidade da mucosite bucal. (CAMPOS CRUZ MI et al., 2014).

Em nosso experimento, não houve administração de glutamina prévia à quimioterapia. A glutamina foi utilizada sob 3 formas: pura, associada com gel de plaquetas e por gavagem. Ao analisarmos clinicamente o processo cicatricial das lesões de mucosite, ao final da primeira fase do experimento, o grupo B (glutamina tópica) e grupo D (glutamina + gel de plaquetas) não apresentou nenhum animal com mucosite grau 03. Entretanto quando comparamos os grupos A, B e D observamos um discreto aumento de animais com mucosite grau 2, ou seja, houve uma recuperação ligeiramente mais efetiva das lesões de mucosite, apesar de não haver diferenças estatísticas significantes.

Ao analisarmos as lesões bucais desenvolvidas em função da quimioterapia, na fase 1, o grupo E (n=10) apresentou 8 animais com lesões em língua, mucosa jugal e mucosa oftálmica. Este fato era esperado, pois o grupo E não sofreu nenhum

tratamento tópico ou sistêmico. Em todos os grupos, a língua foi a região anatômica mais acometida, provavelmente devido à sua função mastigatória e mobilidade.

Na análise histológica foi avaliada as quantidades de macrófagos, linfócitos e queratinização na mucosa jugal e língua. Obtivemos resultados estatisticamente significantes na primeira fase do experimento para os linfócitos em mucosa jugal entre os grupos B (11) e D (4,60) ($p=0,032$) e linfócitos em língua do grupo A (16) ($p=0,000$) sobre todos os demais grupos. Entretanto, ao analisarmos numericamente a quantidade de macrófagos e linfócitos em mucosa jugal e língua, observamos que os grupos A e B apresentaram números superiores ou próximos quando comparados aos outros grupos. Em contrapartida, o grupo E apresentou números menores de macrófagos e linfócitos quando comparado aos demais grupos. É sabido que o aumento dos números de linfócitos e macrófagos sinalizam uma maior reação inflamatória (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), sugerindo que tanto o gel de plaquetas (grupo A) como a glutamina tópica (grupo B) estariam atuando como quimiotáticos fato este responsável pela atração destas células no sítio das lesões.

Na segunda fase do experimento, o número de macrófagos da mucosa jugal do grupo A (39,40) foi maior e apresentou resultados significantes quando comparados com os demais grupos: B ($p=0,012$), C ($p=0,010$), D ($p=0,022$) e E ($p=0,000$). Os macrófagos em língua tiveram resultados significantes entre os grupos A e C ($p=0,031$) e A e E ($p=0,006$), sendo que no grupo A este número foi maior (20,40). Ao analisarmos numericamente os resultados obtidos nesta fase do experimento, observamos que os grupos A, B e D apresentaram números superiores quando comparados principalmente com o grupo E, com exceção dos linfócitos em mucosa jugal, onde grupo C foi ligeiramente menor. Contudo, levando-se em consideração que os macrófagos são células de limpeza, devido a sua atividade fagocítica, entre outras funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), a sua maior presença nos grupos A, B e D sugere que os biocurativos utilizados neste estudo propiciaram uma efetiva limpeza na área, atuando também na regeneração da mucosa em função da liberação de fatores de crescimento presentes nestas formulações.

De acordo com Junqueira e Carneiro, 2008, a queratinização epitelial é uma importante ferramenta de proteção do epitélio. Na fase 1 deste estudo, a queratinização em mucosa jugal no grupo D foi maior (7,63 mm) que todos os grupos apresentando resultados significantes quando comparado com a queratinização do grupo A ($p=0,001$); B ($p=0,002$); C ($p=0,001$) e E ($p=0,001$). A queratinização em língua no grupo D (6,38 mm) também foi maior e apresentou diferenças estatísticas significantes ($p=0,000$) quando comparada aos demais grupos.

Na segunda fase deste estudo, os grupos A e B apresentaram maior queratinização na mucosa jugal, enquanto que na língua essa maior queratinização foi no grupo D. Porém, não houve resultados estatísticos significantes, mas em ambos os casos nota-se um aumento de queratinização importante quando comparado com grupo E. Sob este aspecto, podemos considerar, nas duas fases do experimento, que houve uma reação dos epitélios da mucosa jugal e língua dos grupos A, B e D aos componentes das substâncias utilizadas na tentativa de acelerar o processo de cicatrização, enfatizando mais uma vez a ação quimiotática do gel de plaquetas e da glutamina.

Outro fator importante a salientar é o excesso de cuidados alimentares com os animais utilizados nesse estudo. A suplementação nutricional, associada com a administração de medicamentos preventivos para a êmese foi um fator determinante para a sobrevivência dos animais; uma vez que além do ganho de peso, os animais foram muito mais resistentes aos efeitos da quimioterapia e ao desenvolvimento da mucosite ficou aquém do esperado. Quando comparado ao estudo piloto, os animais sofreram os efeitos da quimioterapia, apresentando perda de peso, morbidade e mortalidade. Em 5 animais utilizados para o piloto, 4 foram a óbito. Portanto, a decisão em minimizar os efeitos da imunossupressão teve como objetivo a prevenção da morbidade e da mortalidade. Todavia, uma avaliação de resultados mais efetivos sobre a ação dos medicamentos propostos em mucosite grave não foi possível.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

7.1 Diante dos resultados encontrados, concluimos que os biocurativos utilizados neste estudo induziram uma maior reação inflamatória no conjuntivo, sugerindo uma ação estimuladora para indução do reparo. Efetivamente, notou-se também um estímulo para maior queratinização tanto em mucosa jugal como em língua. Entretanto, clinicamente, o tempo para regressão dos graus de mucosite foram semelhantes em todos os grupos, o que contribui para os riscos de contaminação em pacientes imunossuprimidos.

7.2 A dificuldade em induzir uma mucosite mais grave e os cuidados preventivos à morbidade e mortalidade não propiciou a avaliação dos biocurativos em lesões mais extensas, fato este importante para análise mais efetiva da ação dos biocurativos propostos para este estudo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Antoniades HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Annu Rev Med.* 1982;33:445-63.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.

Albertini S, Ruiz MA. Nutrição em transplante de medula óssea: a importância da terapia nutricional. *Arq Ciênc Saúde.* 2004;11(3):182-8.

Anghinoni M. Efeito da quimioterapia pré-operatória com 5-fluorouracil endovenoso na regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. Curitiba; 2013.104 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Augusto CMJ, Borra RC, Gaglioti SM. Avaliação do extrato de uncaria tomentosa na prevenção de mucosite oral induzida: estudo experimental em animais. *Rev. Odontol Bras Central.* 2010;18(48):57-61.

Arora NS et. al. Platelet-Rich Plasma: A Literature Review. *Implant Dentistry* 18, 4, p. 303-10, 2009

Azevedo W, Ribeiro MCC. Fontes de células tronco hematopoéticas para transplantes. *Medicina.* 2000;33:381-9.

Awidl A, Homsy V. Double blind, placebo-controlled cross-over study of oral pilocarpine for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patients with cancer. *Eur J Cancer.* 2001;37:2010-4.

Bai MX, Jiang ZM, Liu YW, Wang WT, Li DM, Wilmore DW. Effects of alanyl-glutamine on gut barrier function. *Nutrition.* 1996;12(11/12):793-6.

Barbieri CMO, Costa PI. Fator de crescimento derivado de plaquetas humanas obtidas por uma metodologia rápida e de baixo custo. *Rev Ciênc Farmac.* 2004;25(2):129-34.

Barber C, Powell R, Ellis A, Hewett J. Comparing pain control and ability to eat and drink with standard therapy vs Gelclair: a preliminary, double centre, randomised

controlled trial on patients with radiotherapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2007;15(4):427-40.

Barbosa ALT, Del Carlo RJ, Gomes HC, Oliveira AC, Monteiro BS, Del Carlo BN. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*. 2008;38(5):1335-40.

Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet activation. *Blood Rev*. 1995;9(3):143-56.

Borges VC, Duarte AJS, Waitzberg DL. Imunonutrição: uma perspectiva. In: Waitzberg DL. *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu;1995. Cap. 58.

Borowski B, Benhamou TL, Laplanche JP. Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomized controlled trial comparing two protocols of dental care. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994;30B:93-7.

Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DM. Animal models of mucositis: implications for therapy. *J. Support Oncol*. 2011;9:161-8.

Brasil CMV. Avaliação da eficácia do uso de fatores de crescimento em orabase e laserterapia no tratamento de mucosite oral em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas. Recife; 2014. Tese (Doutorado) – CCS - Pós graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco 2014.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment intrabony defects in humans. *J Period Res*. 2002;37(4):300-6.

Campos FG, Waitzberg DL, Logulo AF, Mucerino DR, Habr-Gama A. Importância da glutamina na prática clínica. *Arq Gastroenterol*. 1996;33(2):86-92.

Campos Cruz MI, Campos CN, Monteiro F, Vieira BJ. A mucosite oral no tratamento do câncer: história natural, prevenção e tratamento. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(3):337-40.

Caribé-Gomes F, Chimenos-Küstner E, López-López J, Finestres Zubeldia F, Guix-Melcior B. Manejo odontológico de las complicaciones de la radioterapia y quimioterapia en el cáncer oral. *Med Oral* 2003;8:178-87.

Carmona JU. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse. Barcelona; 2007. 91f. Tesis (Doctorado en Medicina y Sanidad Animales) - Universitat Autònoma de Barcelona.

Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet – rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*. 2003;74:244-55.

Carvalho MP. Antieméticos e quimioterapia antineoplásica. *Boletim*. 1992;159:17-22.

Carvalho PTC. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo.

Chattopadhyay S, Saha A, Azam M, Mukherjee A, Sur PK. Role of oral glutamine in alleviation and prevention of radiation-induced oral mucositis: a prospective randomized study. *South Asian J Cancer*. 2014;3(1):8-12.

Chaveli-López B. Toxicidade oral produzida por quimioterapia: uma revisão sistemática. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(1):e81-e90

Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci*. 2004;30:145-51.

Cruza VF, Petry ÈR, Tirapegui J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Rev. Bras Med Esporte*. 2009;15(5):392-7.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol*. 2005;204(2):392-401.

Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt PI Jr. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Bras J Med Biol Res*. 1999;32(1):15-21.

Dahlgren LA, Nixon AJ, Brower-Toland BD. Effects of β -aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. *Am J Vet Res*. 2001;62(10):1557-62.

Del Fante C, Perotti C, Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F. Platelet lysate mucoadhesive formulation to treat oral mucositis in graft versus host disease patients: a new therapeutic approach. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2011;12(3):893-9.

Dodd MJ, Dibble S, Miaskowski C, Paul S, Cho M, MacPhail L. A comparison of the affective state and quality of life of chemotherapy patients who do and do not develop chemotherapy-induced oral mucositis. *J Pain Symptom Manage*. 2001;21:498-505.

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006;38(2):174-87.

Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1. Application on tetracycline HCl conditioned root surfaces *J Clin Periodontol*. 1998;25(5):404-12.

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.

Górdon-Núñez MA, Silva FL Jr, Galvão H, Souza LB, Pinto LP. Neutropenia e mucosite oral: fatores de risco para candidíase em crianças com câncer. *Robrac*. 2010;19(48):51-6.

Gupta G. Clinical and radiographic evaluation of intra-bony defects in localized aggressive periodontitis patients with platelet rich plasma/hydroxyapatite graft: a comparative controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent*. 2014;5(4): 445-51.

Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Review*. 1993;7(1):52-62.

Houdijk AP, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RI, Weiss JK, McCamish MA, et al. Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infections morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet*. 1998;352:772-6

Jain P, Keservani RK, Dahima R. Caracterização in vivo de hidrogel para o tratamento de quimio-radioterapia mucosite induzida. *Pharmacol online*. 2010;1:1016-25.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido epitelial. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Cap.4. p. 74.

Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*. 1990;60:62-8.

Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complications chemotherapy and or radiotherapy: options for prevention and treatment. *CA Cancer J Clin.* 2001;51:290-315.

Kowanko I, Long L, Hodgkinson B, Evans D. The effectiveness of strategies for preventing and treating chemotherapy and radiation induced oral mucositis in patients with cancer: a systematic review. 1998. *JB I Library of Systematic Reviews.* 1998;1(2):57-124.

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;31:33-37.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am.* 2008;52:61-77.

Lima V, Vidal FD, Rocha FA, Brito GA, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol.* 2004;75:162-8.

Lim V, Korourian S, Todorova VK, Kaufmann Y, Klimberg VS. Glutamine prevents DMBA-induced squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(2):148-55.

Lynch SE, Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS. The effects of short-term application of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991;62:458-67.

López-Castaño F, Oñate-Sánchez RE, Roldán-Chicano R, Cabrerizo-Merino MC. Measurement of secondary mucositis to oncohematologic treatment by means of different scate. Review. *Med Oral Cir Bucal.* 2005;10:412-21.

Maia L. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e histopatológica. Viçosa; 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

Maia L, Souza MV. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. *Cienc Rural [online].* 2009;39(4):1267-74.

Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. *An Bras Dermatol.* 2003;78(4):393-410.

Marx RE, Garg AK. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. The sinus bone graft. Colorado: Quintessence Books, 1998. p.183-9.

Massambani EM, Bazotte EM. Importância da glutamina na terapia nutricional. Arq Ciênc Saude. 1998;2(3):295-8.

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. 2013;21(1):333-41.

Neffa Pinto JM, Pizani NS, Kang HC, Silva LA. Aplicação de plasma rico em plaquetas no tratamento de úlcera crônica da pele - relato de caso. An Bras Dermatol. 2014;89(4):638-40.

Negrin RS, Tolijanac JA. Oral toxicity associated with chemotherapy [online].

<http://www.uptodate.com/contents/oral-toxicity-associated-with-chemotherapy>. Acesso em: 14 set. 2012.

Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology. Case reports. Int J Periodontics Restorative Dent. 2000;20:486-97.

Padovese R, Lima MR, Martins AKA. Glutamina: um aminoácido “condicionalmente essencial”. Laes & Haes. 2000;21(124):124-38.

Pagliosa GM, Alves GES. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. Ciênc Rural. 2007;37(4):1202-5.

Patel A, Rajesh S, Chandrashekhar VM, Rathnam S, Shah K. A rat model against chemotherapy plus radiation-induced oral mucositis. Saudi Pharm J. 2013;21(4):399-403.

Pereira MA. Manual de transplante de órgãos e tecidos. 30ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.460-72.

Peterson DE, D'Ambrósio JA. Nonsurgical management of head and neck cancer patients. Dent Clin North Am. 1994;38(3):425-45.

Peterson DE, Ohn K, Bowen J, Flidner M, Lees J, Loprinzi C, et al. Systematic review of oral cryotherapy for management of oral mucositis caused by cancer therapy. *Cancer Care Suporte*. 2013;21:327-32.

Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucosite: sua ocorrência, consequências e tratamento no ambiente oncológico. *Oncologista*. 1998;3:446-51.

Pierce GF, Tarpley J, Yanagihara D. PDGF-BB, TGF- β 1 and basic FGF in dermal wound healing: neovessels and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol*. 1992;140:1375-88.

Porock D. Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2002;1:33-43.

Roopashri G, Jayanthi K. Radiotherapy and chemotherapy induced oral mucositis - prevention and current therapeutic modalities. *IJDA*. 2010;2:174-9.

Salazar-Álvarez AE, Riera-Del-Moral LF, Garcia-Arranz M. et al. Use of Platelet-Rich Plasma in the Healing of Chronic Ulcers of the Lower Extremity. *Actas Dermo-Sifiliográficas (Inglês Edition)*. Volume 105, Issue 6 , julho-agosto de 2014, Pages 597-604

Sanchez, AR. et al. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, Guildford, v.18, n.1, p.93-103, 2003

Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxfacial Surg*. 2002;31:469-84.

Schirmer EM, Ferrari A, Trintade CT. Oral mucositis evolution after nutritional intervention in cancer patients under palliative care. *Rev Dor*. 2012;13(2):141-6.

Silva, PSA. Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. 2007. 32f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

Silverman S. Diagnóstico e tratamento da mucosite oral. *J Suporte Oncol*. 2007;5:13-21.

Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:581-8.

Sonis ST, Tracey C, Shiklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* Volume 69, Issue 4, April 1990, Pages 437–443

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

Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20:11-5.

Sonis ST.(b) Efficacy of palifermin (keratinocyte growth factor-1) in the amelioration of oral mucositis. *Core Evid*. 2010;4:199-205.

Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis*. 2010;16:597-600.

Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, Cocks D, et al. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol*. 2004;40:170-6.

Steinmann D, Eilers V, Beynenson D, Buhck H, Fink MI. Effect of Traumeel S on pain and discomfort in radiation-induced oral mucositis: a preliminary observational study. *Altern Ther Health Med*. 2012;18:12-8.

Stubbe CE, Valero M. Complementary strategies for the management of radiation therapy side effects. *J Adv Pract Oncol*. 2013;4(4):219-31.

Torres J, Tresguerres I, Tamimi F, Clemente C, Niembro E, Blanco L. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22:563-8.

van der Hulst RR, van Kreel BK, von Meyenfeldt MF, Brummer RJ, Arends JW, Deutz NE. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet*. 1993;334:1363-5.

Van Kuilenburg AB, Maring JG. Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetic models and therapeutic drug monitoring in cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2013;14(7):799-811.

Vengelen TV. The Manual. 12. ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1996.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Surg.* 1997;55:1294-9.

Wilmore DW, Shabert JS. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition.* 1998;14:618-26.

Yeoh AS, Gibson RJ, Yeoh EE, Bowen JM, Stringer AM, Giam KA, et al. A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor-kappaB, COX-1, and COX-2. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(8):2319-27.

Yoshida K, Yoshioka M, Okamura H, Moriyama S, Kawazoe K, Grenier D, et al. Preventive effect of Daiokanzoto (TJ-84) on 5-fluorouracil-induced human gingival cell death through the inhibition of reactive oxygen species production. *PLoS One.* 2014;9(11): e112689.

ANEXOS

ANEXO 1: COMITÊ DE ÉTICA

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 039/2013

Bauru, 27 de novembro de 2013.

Senhor Professor,

Informamos Vossa Senhoria que, tendo sido atendida a solicitação dessa Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o projeto de pesquisa **Análise da ação do gel de plaquetas e glutamina em mucosite causada por quimioterapia induzida em ratos**, de autoria de Regina Haddad Barrach, sob sua orientação, foi novamente enviado a um relator para avaliação e considerado **APROVADO ad referendum** desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
Docente do Departamento de Estomatologia

ANEXO 2 .PLANILHAS GRAUS DE MUCOSITE**2.1. GRAUS DE MUCOSITE (FASE 1)**

GRAUS DE MUCOSITE DESENVOLVIDOS NA 1ªFASE DO EXPERIEMENTO POR GRUPO					N= 10 EM CADA GRUPO	
		MUCOSITE 0	MUCOSITE 1	MUCOSITE 2	MUCOSITE 3	MUCOSITE 4
GRUPO A	GEL DE PLAQUETAS					
12/05/2014		0	2	4	4	0
13/05/2014		0	2	4	4	0
14/05/2014		0	1	2	7	0
15/05/2014		0	1	6	3	0
16/05/2014		0	1	7	2	0
GRUPO B	GLUTAMINA					
12/05/2014		0	4	4	2	0
13/05/2014		0	2	4	4	0
14/05/2014		0	2	4	4	0
15/05/2014		0	2	8	0	0
16/05/2014		0	2	8	0	0
GRUPO C	GLUTAMINA GAVAGEM					
12/05/2014		0	1	7	2	0
13/05/2014		0	1	6	3	0
14/05/2014		0	1	5	4	0
15/05/2014		0	1	5	4	0
16/05/2014		0	2	5	3	0
GRUPO D	GEL DE PLAQUETAS + GLUTAMINA					
12/05/2014		0	4	6	0	0
13/05/2014		0	1	7	2	0
14/05/2014		0	1	7	2	0
15/05/2014		0	1	8	1	0
16/05/2014		0	1	9	0	0
GRUPO E	CONTROLE					
12/05/2014		0	0	8	2	0
13/05/2014		0	0	6	4	0
14/05/2014		0	0	6	4	0
15/05/2014		0	0	8	2	0
16/05/2014		0	0	8	2	0

2.2 GRAUS DE MUCOSITE (FASE 2)

GRAUS DE MUCOSITE DESENVOLVIDOS NA 2ª FASE DO EXPERIEMENTO			N= 5 ANIMAIS POR GRUPO			
		MUCOSITE 0	MUCOSITE 1	MUCOSITE 2	MUCOSITE 3	MUCOSITE 4
GRUPO A	GEL DE PLAQUETAS					
17/05/2015		0	0	4	1	0
18/05/2015		0	2	3	0	0
19/05/2015		0	2	3	0	0
20/05/2015		0	5	0	0	0
21/05/2015		3	2	0	0	0
22/05/2015		5	0	0	0	0
GRUPO B	GLUTAMINA					
17/05/2015		0	0	4	1	0
18/05/2015		0	0	5	0	0
19/05/2015		0	0	5	0	0
20/05/2015		0	3	2	0	0
21/05/2015		1	3	1	0	0
22/05/2015		5	0	0	0	0
GRUPO C	GLUTAMINA POR GAVAGEM					
17/05/2015		0	0	5	0	0
18/05/2015		0	3	2	0	0
19/05/2015		0	3	2	0	0
20/05/2015		0	4	1	0	0
21/05/2015		4	1	0	0	0
22/05/2015		4	1	0	0	0
GRUPO D	GEL DE PLAQUETAS + GLUTAMINA					
17/05/2015	ÓBITO DE 1 ANIMAL	0	0	3	1	0
18/05/2015		0	2	2	0	0
19/05/2015		0	2	2	0	0
20/05/2015		0	3	1	0	0
21/05/2015		4	0	0	0	0
22/05/2015		4	0	0	0	0
GRUPO E	CONTROLE					
17/05/2015		0	0	5	0	0
18/05/2015		0	3	2	0	0
19/05/2015		0	3	2	0	0
20/05/2015		0	5	0	0	0
21/05/2015		5	0	0	0	0
22/05/2015		5	0	0	0	0

ANEXO 3: PLANILHAS RESULTADO HISTOPATOLÓGICO**3.1 MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS (FASE 1)**

PLANILHA MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS EM MUCOSA JUGAL					1ª FASE DO EXPERIMENTO		
GRUPOS	MACRÓFAGOS	MÉDIA	LINFÓCITOS	MÉDIA	N= 5 ANIMAIS POR GRUPO		
A	122	24,4	50	10			
B	105	21	55	11			
C	87	17,4	64	12,8			
D	117	23,4	23	4,6			
E	72	14,4	29	5,8			
TOTAL	503		221				
PLANILHA MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS EM LÍNGUA					1ª FASE DO EXPERIMENTO		
GRUPOS	MACRÓFAGOS	MÉDIA	LINFÓCITOS	MÉDIA	N= 5 ANIMAIS POR GRUPO		
A	83	16,6	80	16			
B	66	13,2	24	4,8			
C	41	8,2	13	2,6			
D	51	10,2	25	5			
E	68	13,6	9	1,8			
TOTAL	309		151				

3.2 MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS (FASE 2)

PLANILHA MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS EM MUCOSA JUGAL 2ª FASE DO EXPERIMENTO					
GRUPOS	MACRÓFAGOS	MÉDIA	LINFÓCITOS	MÉDIA	N= 5 ANIMAIS POR GRUPO , EXCETO GRUPO D (ÓBITO DE 1 ANIMAL)
A	197	39,4	33	6,6	
B	97	19,4	37	7,4	
C	94	18,8	15	3	
D	104	26	30	7,5	
E	57	11,4	25	5	
TOTAL	549		140		
PLANILHA MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS EM LÍNGUA					2ª FASE DO EXPERIMENTO
GRUPOS	MACRÓFAGOS	MÉDIA	LINFÓCITOS	MÉDIA	N= 5 ANIMAIS POR GRUPO , EXCETO GRUPO D (ÓBITO DE 1 ANIMAL)
A	102	20,4	29	5,8	
B	44	8,8	20	4	
C	38	7,6	19	3,8	
D	45	11,2	15	3,75	
E	23	4,6	9	1,8	
TOTAL	252		92		