AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Comparação dos efeitos da terapia laser de baixa intensidade ($\lambda = 660$ nm
ou $\lambda = 780$ nm) no tratamento de mucosite oral induzida por radiação
ionizante em ratos**

Maíra Franco de Andrade

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2014**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Comparação dos efeitos da terapia laser de baixa intensidade ($\lambda = 660\text{ nm}$
ou $\lambda = 780\text{ nm}$) no tratamento de mucosite oral induzida por radiação
ionizante em ratos**

Maíra Franco de Andrade

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho a minha avó, Maria de Lourdes Moraes
Souza (in memorian), que me ensinou o valor da família, da
educação, do trabalho e da vida!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Doralice de Souza e Heitor Franco de Andrade Júnior, pelo incentivo e apoio em minha vida. As minhas irmãs, Ana Paula, Ainá e Virgínia, que desde sempre encheram minha vida com alegria, amizade e solidariedade, nos momentos difíceis, moderados e fáceis, sempre com muito amor e fraternidade.

Agradeço ao meu Grupo Espiritual, que deu sentido a minha vida e me ajudou a trilhar cada passo da minha estrada, em particular a Rogério Zimmermann (*in memoriam*) e Silvio Augusto Margarido.

Agradeço as minhas irmãs de outras mães e outros pais, Luciana Paes de Macedo Moura, Simone Veronica Slob Erkel, Letícia de Souza Campos, Elaine Cristina B. S. Koketsu, Leticia B. Sichieri e Carolina Benetti por todos os momentos que compartilhamos, toda a paciência, toda a ajuda e todos os abraços que precisei e recebi sem pedir.

Agradeço as minhas tias, Berenice, Lourice, Teresa e Rachel que sempre tiveram mais certeza que eu da minha capacidade e me inspiraram a seguir em busca dos meus objetivos.

Meus primos todos, em especial Paulo, Joyce e Emília, meus primeiros e eternos amigos!

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dra. Denise Maria Zezell, por confiar em mim e me conduzir por este trabalho, que mesmo com as dificuldades encontradas na fase experimental *in vivo*, nunca me deixou perder o foco e a motivação para a conclusão deste projeto.

Agradeço a Prof^a. Dra. Nanci Nascimento, que me acolheu e abriu as portas do Biotério e da minha mente para novos conhecimentos o que permitiu que a realidade deste mestrado fosse possível.

À Prof^a. Dra. Luciana Corrêa, que com *muita* paciência me ajudou a elaborar e compreender melhor todas as etapas desta pesquisa, lâmina por lâmina.

Agradeço a toda a equipe do IPEN, em especial a Neide Mascarenhas, que me ensinou a cuidar de animais de laboratório, em especial os ratinhos deste experimento, e aos amigos do CLA, Marcelo Noronha Veloso e Cássio Lima, por toda a ajuda durante a realização deste experimento e Cláudia

Zamataro, Anne Latrive, Thiago Martins Pereira, Pedro Arthur Augusto de Castro, Derly Augusto Dias, Tania Yoshimura, Caetano Sabino e Luis Suzuki.

Ao Sr. Luis Daniel Rosa, que sempre me recebeu com um sorriso e toda sua simpatia, mesmo aos finais de semana e feriados.

Aos engenheiros Carlos Gaia da Silveira e Elizabeth S. R. Somessari, do Centro de Tecnologia das Radiações, meu carinho especial, pois me ajudaram muito em um dos momentos mais delicados deste trabalho.

Ao Danilo Ferreira, que cedeu seu conhecimento e experiência nas fases iniciais de dosimetria.

A todos os pesquisadores do Centro de Lasers Aplicações, por contribuírem de diversas formas em várias etapas deste projeto;

Aos demais funcionários e técnicos do CLA;

Aos funcionários da SPG do IPEN;

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP/CEPID 05/51689-2, ao CNPq/INCT 573.916/2008-0 e CNPq/PQ 312397/2013-5 por financiarem os projetos de pesquisa associados a esse trabalho.

Comparação dos efeitos da terapia laser de baixa intensidade ($\lambda = 660$ nm ou $\lambda = 780$ nm) no tratamento de mucosite oral induzida por radiação ionizante em ratos

Maíra Franco de Andrade

RESUMO

A mucosite oral é um efeito colateral de quimioterapia e radioterapia de cabeça e pescoço e consiste de uma comorbidade severa com a presença de xerostomia, lesões ulcerativas, infecções secundárias e dor, passíveis de alterar e até interromper a terapia antineoplásica, diminuindo a possibilidade de controle da doença. A mucosite oral pode ser tratada com variados esquemas terapêuticos, incluindo a utilização de *laser* de baixa intensidade, que diferem em tipo de *laser*, densidade de energia, comprimento de onda utilizados, entre outros parâmetros de irradiação.

Este trabalho utilizou mesmos parâmetros de irradiação *laser* (30 mW, 7,5 J/cm², 0,04 mm diâmetro do feixe, 10 s por ponto, 3 pontos no dorso e 2 pontos no ventre da língua, com distância de 1 mm da superfície, 48/48 h por até 20 dias), diferindo apenas o comprimento de onda utilizado, $\lambda = 660$ nm e $\lambda = 780$ nm. Em seguida, os efeitos da irradiação foram comparados entre si e em relação ao grupo controle não tratado.

Foi feita a padronização de modelo animal de mucosite oral em ratos utilizando radiação gama de fonte panorâmica, em dose única de 20 Gy, para avaliação uniforme dos grupos. Para tanto, foi elaborado escore clínico detalhado ponto a ponto, com correlação estatística, que se mostrou eficiente na avaliação clínica desta comorbidade.

Após análise estatística dos dados coletados ($p < 0,05$), pode-se verificar que existem diferenças entre as terapias com *laser*, além de sua superioridade em relação ao grupo Controle. Os animais do grupo *laser* $\lambda = 660$ nm apresentaram maior produção de colágeno em mucosa e fechamento de feridas mais rapidamente nos dias 14 e 20 quando comparados ao grupo *laser* $\lambda = 780$ nm. Ambos os tratamentos foram superiores em relação ao grupo Controle. Os tratamentos *laser* também se mostraram superiores ao Controle na modulação da inflamação, formação de pseudomembrana e estimulação de angiogênese. Estes resultados indicam que os benefícios obtidos pelos dois comprimentos de onda, nas mesmas condições de irradiação, são diferentes, podendo ser utilizados de forma complementar em pacientes.

Palavras-chave: mucosite oral; laser de baixa intensidade; modelo animal; ratos; escore clínico, radioterapia.

Comparisson of the low level laser therapy effects ($\lambda = 660$ nm ou $\lambda = 780$ nm) in the threathment of ionizing radiation induced oral mucositis in rats

Maíra Franco de Andrade

ABSTRACT

A well-known side effect of head and neck chemotherapy and radiotherapy is oral mucositis. This severe comorbidity presents xerostomya, ulcers, secondary infections and pain that can alter and even force to interrupt tumor-targeted therapies. Various treatments currently exist such as in particular low-level laser therapies (LLT) with different parameters including laser type, energy density, or wavelength.

In the present study we propose to compare the effects of LLT at two different wavelengths, $\lambda = 660$ nm and $\lambda = 780$ nm, on an animal model. For this purpose we separated rats in three groups: one control group and one group for each wavelength. Apart from the wavelengths, the other laser irradiation parameters were identical: 30 mW, 7,5 J/cm², 0,04 mm diameter, 10 s per point, 3 points on the upper side and 2 points on the lower side of the tongue , 1 mm away from the surface, 48/48 h until 20 days.

An animal model of oral mucositis in rats was established by irradiation with a panoramic source of ⁶⁰Co, single dose of 20 Gy, to ensure uniform evaluation of the groups. In addition, I elaborated a novel clinical point-to-point score scheme with statistical correlation that is proven to be efficient for clinical evaluation of this comorbidity.

After statistical analysis using $p < 0,05$, we observed differences between each laser therapies and also in relation to the control group. The animals treated with $\lambda = 660$ nm presented a higher amount of collagen in the mucosal region and faster wound healing when compared to the animals treated with $\lambda = 780$ nm. Both laser treatments showed superior efficiency than the control group for collagen generation and wound healing speed, as well as in the inflammatory modulation, pseudomembrane production and angiogenesis stimulation.

These results indicate that both laser treatments are beneficial in the wound healing process, with complementary effects depending on the wavelength. This suggests that laser therapies at various wavelengths could be simultaneously used for oral mucositis treatment.

Key-words: oral mucositis, radiotherapy; laser; animal model; rats, clinical escore.

Sumário

1.	Introdução	12
2.	Objetivos.....	14
3.	Revisão de literatura.....	15
3.1	Mucosite Oral (MO).....	15
3.2	Indução da mucosite oral em modelos animais	17
3.3	Prevenção e tratamentos comumente utilizados para MO.....	18
3.4	Terapia com laser de baixa intensidade (TLBI).....	20
3.5	Comparação entre $\lambda = 660$ nm e $\lambda = 780$ nm, com mesmos parâmetros de irradiação.....	23
4.	Material e métodos	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Protocolo anestésico e finalização	26
4.3	Desenvolvimento do modelo animal de mucosite oral em ratos	26
4.2.1	Dosimetria da fonte panorâmica de ^{60}Co (radiação gama)	26
4.2.2	Dosimetria da radiação ionizante gama para indução de mucosite oral	28
4.4	Experimentação com TLBI	30
4.4.1	Parâmetros do <i>laser</i>	31
4.5	Avaliação clínica.....	33
4.6	Avaliação histológica.....	36
4.7	Avaliação estatística.....	39
5.	Resultados e Discussão.....	40
5.1	Dosimetria da fonte panorâmica de ^{60}Co (CTR-IPEN)	40
5.2	Dosimetria de irradiação ionizante para indução de MO em ratos	42
5.3	Experimentação com TLBI	46
5.3.1	Avaliação Clínica.....	46
5.3.2	Avaliação por escores de mucosite oral.....	49
5.3.2.1	Edema e eritema	49
5.3.2.2	Exsudato inflamatório	52

5.3.2.3	Infecção microbiana secundária	53
5.3.2.4	Pseudomembrana	55
5.3.2.5	Lesão ulcerativa	56
5.3.2.6	Contração da ferida	60
5.3.3	Avaliação histológica.....	64
5.3.3.1	Coloração com hematoxilina-eosina (HE)	64
5.3.3.2	Celularidade	75
5.3.3.3	Contagem de vasos sanguíneos	77
5.3.3.4	Coloração com Tricômico de Masson (período de 14 dias)	79
6.	Conclusão.....	82
7.	Produções obtidas.....	86
8.	Referências Bibliográficas	87

Lista de Figuras

Figura 1-Espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico: oxi e desoxiemoglobina, melanina, hidroxiapatita e água, mostrando entre as barras vermelhas a faixa terapêutica⁴⁷ 21

Figura 2 - (A) Penetração da luz no tecido mucoso, em milímetros, conforme o comprimento de onda do *laser* (400 nm a 2000 nm), note que o comprimento de onda 660 nm atinge região de lâmina própria e o comprimento de onda 780 nm atinge região de submucosa¹²; (B) Proporção de penetração da luz por profundidade da pele de humano (em ilustração adaptada)^{50,51}..... 22

Figura 3– Dosimetria da fonte panorâmica de ⁶⁰Co: A – eletrônico externo a sala da fonte panorâmica; B – dosímetro fixado em suporte, com esquema de 10 cm de chumbo. 28

Figura 4 - Esquema de seleção dos animais para os grupos experimentais. 31

Figura 5 – Exposição natural do ápice da língua do rato quando realizada abertura da boca com apoio nos dentes incisivos superiores e inferiores. Esta posição permite irradiação de 70% do dorso e 50% do ventre da língua, sem necessidade de manipulação direta do órgão. 32

Figura 6 - Esquema da disposição final dos blocos de chumbo para irradiação ionizante. 41

Figura 7 – A: irradiação com 30 Gy, possível notar exsudato purulento, ulceração de todas as estruturas da cavidade oral; B: irradiação com 25 Gy. Evidente exsudato purulento, edema de lábios, ulceração severa do dorso da língua; C: irradiação com 20 Gy: edema de lábios, ulceração multifocal do dorso da língua, pequena quantidade de exsudato inflamatório sero-sanguinolento. 43

Figura 8– Porcentagem de perda de massa corpórea dos animais nos diferentes grupos de irradiação gama (não tratados com *laser*). As barras representam o desvio padrão. 45

Figura 9 - Perda de massa corpórea grupo Controle (irradiado com gama, mas não tratado com *laser*). As barras representam o erro padrão. 46

Figura 10 - Perda de massa corpórea grupo 660 nm. As barras representam o erro padrão. 47

Figura 11 - Perda de massa corpórea grupo 780 nm. As barras representam o erro padrão.....	48
Figura 12 - Perda de massa corpórea média dos grupos Controle não tratado com <i>laser</i> , $\lambda = 780$ nm e $\lambda = 660$ nm, nos dias de avaliação. As barras representam o erro padrão.....	49
Figura 13 – Freqüência dos escores de edema e eritema dos grupos nos diferentes períodos do experimento: A – grupos aos 8 dias; B – grupos aos 14 dias e, C – grupos aos 20 dias. Letras iguais representam que não há diferença estatística. Letras diferentes representam diferença estatística com $p < 0,05$	51
Figura 14 - Freqüência dos escores de exsudato inflamatório presente nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.....	53
Figura 15- Freqüência dos escores de presença de secreção purulenta nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.....	54
Figura 16- Freqüência dos escores de presença de pseudo-membrana nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.....	56
Figura 17- Freqüência dos escores de presença de lesão ulcerativa nos grupos nos diferentes períodos do experimento.	57
Figura 18 – Avaliação estatística de Friedman ($p < 0,05$) para o escore de lesão ulcerativa para cada grupo, entre os períodos do experimento. As barras representam a dispersão até 99% dos dados.	59
Figura 19- Exemplo do grupo Controle. A: 8 dias – note lesão ulcerativa de grande extensão (seta), estendendo-se do ápice até 2/3 da superfície dorsal da língua; formação de pseudomembrana no ápice (pontilhado). B: 14 dias – as setas indicam lesão ulcerativa bilateral, de grande extensão, superficial, com evidente reepitelização de ápice da língua; C: 20 dias – a seta indica antigo local de lesão ulcerativa, completamente reepitelizada.....	60
Figura 20- Freqüência dos escores de presença de contração da ferida nos grupos nos diferentes períodos do experimento.....	62

Figura 21- Contração da ferida aos 20 dias. (A): animal tratado com <i>laser</i> 660 nm, a área pontilhada indica intensa contração da ferida, com deformidade do ápice da língua. Nota-se ausência de lesão ulcerativa; (B): animal tratado com <i>laser</i> 780 nm, a seta indica reepitelização incompleta com discreta contração da ferida.....	63
Figura 22 - Grupo Controle de 08 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A, B e C); aumento original de 400x (D, E e F).	65
Figura 23 - Grupo tratado com <i>laser</i> 660 nm de 08 dias, coloração HE (aumento original 50x).....	66
Figura 24 - Grupo tratado com <i>laser</i> 780 nm de 08 dias, coloração HE (aumento original 50x).....	67
Figura 25 - Grupo Controle de 14 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A, B, C e F); aumento original de 400x (D e E).	69
Figura 26 - Grupo tratado com <i>laser</i> 660 nm de 14 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A e E); aumento original de 400x (B, C e D).....	71
Figura 27 - Grupo tratado com <i>laser</i> 780 nm de 14 dias, coloração HE. Aumento de original 50x (A e E); aumento original de 400x (B, C e D).....	72
Figura 28 - Grupo Controle não tratado 20 dias, coloração HE (aumento original 50x).....	73
Figura 29 - Grupo tratado com <i>laser</i> 660 nm de 20 dias, coloração HE. Aumentos originais: A – 50x; B e C – 100x.	74
Figura 30 - Grupo tratado com <i>laser</i> 780 nm de 20 dias, coloração HE. Aumentos originais: A – 50x; B – 100x e C – 400x.	75
Figura 31 – Avaliação estatística da quantificação de porcentagem de área de núcleos celulares presente nos cortes histológicos entre os grupos, para os períodos de 8, 14 e 20 dias. Não houve diferença estatística em todos os períodos.....	77
Figura 32 - Avaliação estatística da quantificação de vasos sanguíneos presente nos cortes histológicos entre os grupos, para os períodos de 8, 14 e 20 dias. Não houve diferença estatística em todos os períodos.	78
Figura 33 - Porcentagem de fibras colágenas, aos 14 dias, em região de mucosa (teste ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$).	81

Lista de Tabelas

Tabela 1– Protocolos de fototerapia com <i>laser</i> para prevenção e/ou tratamento de mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia (modificado) ⁵²	24
Tabela 2 - Distribuição dos animais nos grupos de dosimetria, conforme dose total de radiação ionizante para indução de MO.	29
Tabela 3 - Escore clínico de mucosite oral na língua de ratos ⁶⁴	30
Tabela 4– Parâmetros de irradiação <i>laser</i>	31
Tabela 5 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais, de acordo com os dias de eutanásia e coleta de material para exame histológico.	33
Tabela 6 - Escores clínicos de mucosite oral na língua de ratos	35
Tabela 7 - Descrição de aquisição de imagens de campos histológicos para análise de morfometria.	37
Tabela 8 - Resultados da dosimetria da fonte Panorâmica de ⁶⁰ Co, do CTR/IPEN.....	40
Tabela 9 – Média de quantificação de celularidade (área de núcleos) presente nos cortes corados com HE (desvio padrão entre parêntesis).	76
Tabela 10 – Média da contagem de vasos sanguíneos nos cortes corados em HE (desvio padrão entre parêntesis).	78
Tabela 11 - Média percentual de fibras colágenas e tecido muscular nos cortes corados com Tricômico de Massom, amostras de 14 dias (desvio padrão entre parêntesis).	80

1. Introdução

A mucosite oral (MO) é uma das principais complicações dos tratamentos não cirúrgicos contra o câncer de cabeça e pescoço. Deste modo, limita a dose e a intensidade de tratamentos com agentes quimioterápicos e radioterapia destas regiões. Estudos demonstram que a toxicidade destes tratamentos levam a lesões agudas e muitas vezes severas da mucosa oral, afetando virtualmente todos os pacientes submetidos a quimioterapia e a radioterapia de cabeça e pescoço¹. Cerca de 60% dos pacientes submetidos ao uso combinado destas terapias sofrem de MO severa de graus III e IV².

A progressão da MO decorrente de radioterapia ou de terapias quimioterápicas pode ser descrita em estágios progressivos de inflamação, desde o dano direto ao DNA, promovendo quebra das fitas, à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), até ulceração do tecido. Com a geração de ROS ocorre uma cascata de eventos na lâmina própria e no epitélio. Dentre estes, ocorre a ativação de mediadores bioquímicos, proteínas de fase aguda inflamatória e ativação de genes de resposta ao estresse, levando à perda de renovação de células epiteliais, apoptose, atrofia e formação de úlceras. A formação de úlceras, juntamente com as demais alterações biológicas favorece a infecção microbiana secundária da cavidade oral, agravando o quadro clínico³.

Na MO induzida por radiação, a severidade desta comorbidade está relacionada com o volume do tecido irradiado e a dose diária e cumulativa de radiação a que este tecido foi submetido. Uma vez que as células da mucosa têm elevado índice proliferativo, o dano ao DNA das mesmas impede o processo de mitose, retardando a capacidade do tecido de regeneração e renovação, ocorrendo, geralmente, um pico de lesões entre os dias 5 e 7 após a administração de radioterapia. As superfícies não queratinizadas são as mais severamente afetadas, tais como mucosa labial e bucal, assoalho da boca, superfície ventral da língua e palato mole⁴.

As lesões características da MO, por serem muito dolorosas, fazem com que o paciente diminua a ingestão de alimento, com conseqüente perda de peso e agravamento do quadro sistêmico, ocasionando a necessidade de internação nos casos mais severos, aumentando o custo do tratamento contra

o câncer. Além disso, terapias invasivas, como hospitalização para alimentação enteral, ou o uso de narcóticos pode levar a uma desistência do tratamento antineoplásico⁵.

Atualmente existe uma grande quantidade de terapias disponíveis para profilaxia e tratamento da MO, como enxaguantes bucais, fatores de crescimento de queratinócitos, assim como variados protocolos utilizando fototerapia, com uso de *LED* e diferentes padrões de irradiação *laser*⁶.

Dado o grande número de terapias disponíveis para o tratamento da MO, múltiplos estudos têm sido realizados na tentativa de determinar a prevenção e o tratamentos mais eficazes para esta comorbidade.

Com base nos estudos realizados com animais de laboratório e pesquisas clínicas em humanos, demonstrou-se que a TLBI tem efeito sobre a diminuição da dor nos pacientes, da severidade das lesões da mucosite e na diminuição do período de reparo dessas lesões⁷.

O uso clínico da TLBI, apesar de se mostrar benéfico na prevenção e tratamento da MO, varia em relação ao protocolo de irradiação devido a disponibilidade do tipo e modelo do aparelho utilizado na prática. Parâmetros como comprimento de onda do feixe *laser*, diâmetro do feixe, densidade de energia, potência e tipo de irradiação (ponto a ponto ou por varredura) não são consensuais entre os estudos disponíveis na literatura, tornando inconclusiva uma padronização do uso deste recurso terapêutico. Um trabalho *in vivo* com hamsters⁸ e três trabalhos clínicos⁹⁻¹¹ já foram desenvolvidos no Laboratório de Biofotônica, do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN – CNEN/SP todos em colaboração com a Faculdade de Odontologia da USP. Das terapias mais utilizadas (faixa que abrange de $\lambda = 600$ nm até $\lambda = 1150$ nm)¹², ainda são necessários mais estudos para auxiliar na determinação de quais condições de irradiação *laser* e tempo de tratamento são mais eficazes na atenuação e tratamento desta comorbidade.

2. Objetivos

Geral

Comparar os efeitos da irradiação com *laser* de comprimentos de onda $\lambda = 660$ nm e $\lambda = 780$ nm na reparação da mucosite oral induzida por radiação gama em ratos, com mesmos parâmetros de irradiação *laser*, quanto as diferenças clínicas e histopatológicas.

Específicos

1. Padronizar um modelo de mucosite oral em ratos induzida por radiação ionizante gama;
2. Desenvolver escores detalhados para avaliação clínica do desenvolvimento de mucosite oral em ratos;
3. Avaliar as diferenças clínicas e histopatológicas de mucosite oral, nos diferentes períodos de análise.

3. Revisão de literatura

3.1 Mucosite Oral (MO)

As lesões em mucosa após tratamento com quimioterapia e radioterapia de cabeça e pescoço consistem de lesões citotóxicas indesejáveis, dolorosas e dispendiosas no tratamento antineoplásico, seja com quimioterapia, radioterapia de cabeça e pescoço ou ainda na associação dos dois tratamentos. A mucosite oral, como é denominada, gera diversas complicações no decorrer da terapia anti-câncer, tanto para a equipe médica quanto para os pacientes, podendo levar a desistências ao tratamento ou interferir negativamente em sua eficácia¹³.

Por gerar desconforto ao paciente decorrente da dor causada pela inflamação da mucosa, lesões ulcerativas e infecções microbianas secundárias, a MO pode limitar a dose, frequência e intensidade de tratamentos com agentes quimioterápicos e radioterapia de cabeça e pescoço¹⁴⁻¹⁶. Estudos demonstram que a toxicidade destes tratamentos levam a lesões agudas e muitas vezes severas da mucosa oral, afetando virtualmente todos os pacientes submetidos a estes tratamentos⁴. De fato, cerca de 60% dos pacientes submetidos ao uso combinado destas terapias sofrem de MO aguda e severa^{13,17-24}.

A MO é resultado de um complexo processo de dano celular, não tendo apenas um fator determinante de sua instalação. A progressão da MO decorrente de radioterapia ou de terapias quimioterápicas ocorre em estágios progressivos de inflamação²⁵. Inicialmente ocorrem danos diretos a dupla fita de DNA, promovendo quebras das fitas e resultando em morte de células basais do epitélio, juntamente com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A quebra da fita de DNA e as ROS gerados na irradiação da mucosa estimulam a pronta ativação de fatores de transcrição como NF-kB, Wnt e P53. A via do NF-kB está associada a produção de moléculas com conhecida atividade patogênica na MO, incluindo citocinas e moduladores de citocinas, enzimas de resposta ao estresse celular, como a COX-2, e moléculas de adesão celular. Além disso, o NF-kB participa do processo de apoptose de células normais¹³. Em estudo mais recente sobre MO, foi

confirmada a complexidade da patogenia desta comorbidade, além da implicação de lesões microvasculares, citocinas pró-inflamatórias, interações da microbiota natural com o processo inflamatório e alterações na matriz extra celular²⁵.

Apesar de os efeitos moleculares da radioterapia ocorrerem instantaneamente após sua aplicação, existe um tempo de latência entre a ocorrência destes efeitos e suas conseqüentes manifestações clínicas¹³. Nesta fase do dano causado pela radiação é necessário considerar a dose aplicada, frequência, volume de tecido irradiado e sua localização (estruturas anatômicas envolvidas)^{1,2,18,22}.

Em seguida a fase aguda, a cascata inicial de eventos moleculares, a interação dos *feedbacks* positivo e negativo das citocinas impede os processos reparadores das células, culminando com a perda de renovação de células epiteliais, apoptose, atrofia e progressão da ulceração do epitélio¹³.

As ulcerações de mucosa são profundas e podem ser colonizadas por bactérias oportunistas, fungos e, em menor frequência, vírus²⁶, gerando infecção secundária e riscos de complicações sistêmicas, como a sepse¹³.

A resolução da lesão ulcerativa é resultado de um processo biológico ativo no qual a matriz extra-celular da submucosa sinaliza a proliferação, migração e diferenciação das bordas epiteliais da úlcera¹³.

Uma vez que as células da mucosa têm elevado índice proliferativo, o dano ao DNA das mesmas impede o processo de mitose, com geração de úlceras severas e agudas no epitélio^{18,21,27,28}, geralmente ocorrendo um pico de lesões entre os dias 5 e 7 após a administração de radioterapia^{1,18}. As superfícies não queratinizadas da cavidade oral são as mais severamente afetadas, tais como mucosa labial e bucal, assoalho da boca, superfície ventral da língua e palato mole²².

As lesões características da MO, por serem muito dolorosas, fazem com que o paciente diminua a ingestão de alimento, com conseqüente perda de peso e agravamento do quadro sistêmico, além do desenvolvimentos de infecções secundárias, ocasionando a necessidade de internação nos casos mais severos, aumentando o custo do tratamento contra o câncer. Além disso,

terapias invasivas, como hospitalização para alimentação enteral, ou o uso de narcóticos pode levar a uma desistência do tratamento^{18,21}.

Atualmente existe uma grande quantidade de terapias disponíveis para profilaxia e tratamento da MO, com enxaguantes bucais (Triclosan®²⁹ e Biotene®³⁰), fatores de crescimento de queratinócitos (Palifermin)³¹, antimicrobianos tópicos, fitoterapia, antibióticos sistêmicos³², assim como variados protocolos utilizando fototerapia, com uso de *LED*¹¹ e diferentes padrões de irradiação *laser*^{14,15,33,34}.

Dado o grande número de terapias disponíveis para o tratamento da MO, múltiplos estudos têm sido realizados na tentativa de determinar a prevenção e o tratamentos mais eficazes para esta comorbidade.

3.2 Indução da mucosite oral em modelos animais

O uso de modelos animais é uma importante ferramenta utilizada como método auxiliar na compreensão das causas e patologia da MO, assim como estudos de terapias disponíveis para combate a esta comorbidade.

A pesquisa realizada em animais no Brasil, atualmente, é regulamentada pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), vinculado ao Ministério de Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, que não somente se baseia nos conceitos internacionais de ética em experimentação animal, como também se apóia nas determinações do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e boas práticas de manejo e utilização dos animais envolvidos na pesquisa.

As principais espécies animais utilizadas no estudo da MO são os camundongos, hamsters e ratos, por apresentarem semelhanças biológicas com o homem, serem animais pequenos e de fácil acesso e manuseio.

A metodologia da indução de MO nesses animais precisa reproduzir o mais próximo possível as terapias utilizadas na clínica para que os dados obtidos possam ser aproveitados tanto em medicina humana quanto veterinária.

Em um estudo realizado utilizando hamster^{35,36}, foi realizada simulação de quimioterapia utilizando a droga 5-FU, na dose de 60 mg/kg, administrado

por via intraperitoneal no dia 0, seguida de nova administração, utilizando 40 mg/kg pela mesma via, no dia 2. A mucosa jugal foi raspada pelo mesmo operador nos dias 3 e 4, usando a ponta de agulha estéril duas vezes em movimento linear ao longo da mucosa evertida da bochecha. Este protocolo estabeleceu MO no dia seguinte a segunda sessão de raspagem. Em outro trabalho simulando quimioterapia em ratos³⁷, os animais receberam 5-Fluoracil por via intraperitoneal no dia 0 com dose de 100 mg/kg, tendo a administração repetida pela mesma via no dia 3, com dose de 65 mg/kg. A escoriação com agulha ocorreu do mesmo modo nos dias 3 e 5, sendo considerado MO as lesões ulcerativas decorrentes.

Já em um trabalho realizado simulando radioterapia em camundongos^{38,39}, foi utilizado um aparelho DARPAC 150-MC (Forward Raytech Ltd, Reino Unido), operado em 25 kV com corrente de 20 mA, usado para irradiação local do epitélio da lingual. O filtro do raio era de 0,3 mm, com distância focal de 15 cm e taxa de dose de 3,78 Gy/min. Os camundongos foram imobilizados com administração por via intraperitoneal de pentobarbital sódico, com dose de 60 mg/kg e mantidos em bloco de alumínio aquecida a 35 °C, a língua dos animais foi guiada por um furo de 3 mm de diâmetro no topo do bloco com uso de fórceps e o dorso da língua foi fixado com fita adesiva. A área irradiada foi delimitada por uma janela de 3 x 3 mm² de placa de alumínio, posicionada na porção central do ventre da língua.

Como demonstrado por estes trabalhos, o modelo animal e método de indução de mucosite oral, seja por quimioterapia ou radioterapia, são importantes no desenvolvimento da pesquisa.

3.3 Prevenção e tratamentos comumente utilizados para MO

A mucosite oral, por ser uma comorbidade importante que pode comprometer a eficiência da oncoterapia, é amplamente estudada e dispõe de diversos trabalhos na literatura. Recentes estudos de meta-análise foram desenvolvidos com o intuito de fornecer uma diretriz sobre os melhores tratamentos existentes.

No levantamento realizado por Figueiredo e colaboradores em 2013⁴⁰, 12 estudos foram incluídos na revisão sistemática baseados nos critérios de toxicidade preconizados pelo *National Cancer Institute* (NCI)⁴¹, que estabelece grau 0 na ausência de MO; grau 1 quando há úlceras indolores, eritema ou dor leve na ausência de úlceras; grau 2 na presença de eritema doloroso, edema ou úlceras, mas alimentar-se ou deglutir é possível; grau 3 na presença de eritema doloroso, edema, ou úlceras com necessidade de nutrição parenteral; grau 4 quando há ulceração grave ou necessidade de nutrição parenteral ou entubação profilática; e grau 5 em caso de morte relacionada à toxicidade.

Nos pacientes da amostra, a frequência geral de portadores de neoplasias de cabeça e pescoço foi de 47%, enquanto 53% da amostra estavam submetidos a tratamento para doenças hematológicas. Após análise sob os critérios de estudo, os autores concluíram que os dados obtidos demonstraram efeito profilático significativo de MO grau > 3 nos pacientes submetidos à TLBI⁴⁰.

Na revisão realizada por Migliorati e colaboradores em 2013¹⁵, foi feita avaliação de 632 artigos e 24 testes clínicos das principais terapias com *laser* de baixa intensidade utilizadas na prevenção e tratamento de mucosite oral.

Este levantamento constatou que, para mucosite oral induzida por radioterapia para câncer de cabeça e pescoço, sem quimioterapia concomitante, foi possível identificar a prevenção de mucosite oral utilizando TLBI com $\lambda = 632,8$ nm. Em pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas, preparados com altas doses de quimioterapia, com ou sem irradiação do corpo, houve benefício do *laser* de $\lambda = 650$ nm, 40 mW e 2 J/cm² por ponto para prevenção de mucosite oral.

Na atualização realizada em 2014 por Lalla e colaboradores⁴², 570 artigos se classificaram para análise, sendo possível extrair 32 diretrizes para a prevenção e tratamento de mucosite, sendo 22 para mucosite oral e 10 para mucosite gastrointestinal. Os protocolos foram divididos em 3 critérios finais, como recomendação, sugestão ou diretriz não determinada.

Houve evidências a favor do uso de protocolos de higiene oral, como escovação dos dentes, uso de enxaguantes bucais e fio dental, entretanto, o uso de solução salina ou bicarbonato de sódio não obteve bons resultados. O

uso de fatores de crescimento de queratinócitos, como o Palifermin⁴³, também se mostrou benéfico. O uso da TLBI em pacientes tratados com radioterapia de cabeça e pescoço ou doenças hematológicas foi novamente recomendado pelos autores⁴².

3.4 Terapia com laser de baixa intensidade (TLBI)

A TLBI é uma fototerapia não térmica utilizada em diversas aplicações médicas, incluindo tratamento de feridas, redução da dor e melhora de mucosite oral⁴⁴ em diversos países¹⁵ e no Brasil³².

A fototerapia em baixa intensidade consiste na exposição de tecidos ou células a fontes luminosas, que podem ser coerentes ou não, em baixas densidades de energia e potência, de forma que a interação entre luz e tecido não promova efeito térmico⁴⁵. Em 1971, Mester e colaboradores demonstraram benefícios da irradiação *laser* de He-Ne na cicatrização de feridas⁴⁶ poucos anos após a invenção dos primeiros lasers de rubi e He-Ne (início década de 1960).

As aplicações da TLBI se concentram em poucas grandes áreas, como a modulação da inflamação; reparação tecidual; manejo da dor e tratamento de algumas desordens neurológicas⁴⁵.

Atualmente, não há mais dúvidas quanto a existência de efeitos biológicos promovidos pela interação com a luz, entretanto, o entendimento de como a energia de *lasers* terapêuticos e *LEDs* (*light emitting diodes*) atuam nos níveis celulares do organismo e quais são os parâmetros ótimos de irradiação para as diferentes aplicações da luz⁴⁷.

Em nível celular, evidências sugerem que a TLBI atue em cromóforos presentes na membrana da mitocôndria, promovendo aumento da síntese de ATP (trifosfato de adenosina)⁴⁸, e conseqüente elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS atuam como sinalizadores intracelulares capazes de regular a atividade de diversas enzimas, como fosfatases e quinases, e de promover a transcrição gênica⁴⁹.

As propriedades ópticas dos tecidos são fundamentais para a determinação da banda de absorção mais adequada para determinada

fototerapia. Tanto a absorção quanto o espalhamento da luz são dependentes do comprimento de onda e os principais cromóforos do tecido (hemoglobina e melanina) que possuem alta banda de absorção em $\lambda < 600$ nm e a água começa absorver a luz em $\lambda > 1150$ nm. É neste intervalo que se dá a faixa terapêutica Figura 1, na qual a penetração da luz efetiva é maximizada, favorecendo uso de luz vermelha e infra-vermelha (600 nm – 950 nm)^{12,47}.

Figura 1-Espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico: oxi e desoxiemoglobina, melanina, hidroxiapatita e água, mostrando entre as barras vermelhas a faixa terapêutica⁴⁷

Além da absorção da luz pelos cromóforos presentes nos tecidos, a eficiência da TLBI depende da propagação dos fótons e distribuição da taxa de fluência nos tecidos irradiados, a Figura 2 mostra a capacidade de penetração da luz em mucosa em milímetros de acordo com o comprimento de onda avaliado (400 nm a 2000 nm)¹².

Figura 2 - (A) Penetração da luz no tecido mucoso, em milímetros, conforme o comprimento de onda do *laser* (400 nm a 2000 nm), note que o comprimento de onda 660 nm atinge região de lâmina própria e o comprimento de onda 780 nm atinge região de submucosa¹²; (B) Proporção de penetração da luz por profundidade da pele de humano (em ilustração adaptada)^{50,51}.

Compreensão da luz e seus parâmetros, como diâmetro do feixe, comprimento de onda, área a ser irradiada, dose desejada, tempo de exposição e finalidade, assim como mecanismos prováveis da interação luz

tecido formam a base para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos adequados e eficazes para cada situação clínica.

Um trabalho *in vivo* com hamsters e três trabalhos clínicos já foram desenvolvidos no Laboratório de Biofotônica, do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN – CNEN/SP todos em colaboração com a Faculdade de Odontologia da USP. Das terapias mais utilizadas (faixa que abrange de $\lambda = 640$ nm até $\lambda = 780$ nm ainda são necessários mais estudos para auxiliar na determinação de quais condições de irradiação *laser* e tempo de tratamento são mais eficazes na atenuação desta enfermidade.

3.5 Comparação entre $\lambda = 660$ nm e $\lambda = 780$ nm, com mesmos parâmetros de irradiação

O tratamento de mucosite oral utilizando TLBI é amplamente estudado, com diversos trabalhos publicados. Entretanto, como mostrado na Tabela 1⁵², estes trabalhos diferem quanto ao tipo de *laser* utilizado, dose, potência, tempo e outros parâmetros de irradiação. Esta abrangência de protocolos, apesar de comprovadamente benéficos no tratamento desta morbidade, impossibilita a determinação dos parâmetros de irradiação com *laser* que promovem maior eficácia de prevenção e atenuação a serem utilizados.

Tabela 1– Protocolos de fototerapia com *laser* para prevenção e/ou tratamento de mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia (modificado)⁵²

Autores	Protocolo Laser	Duração da Terapia
Barash, et al ⁵³	He-Ne, 632,8 nm, 25 mW, 1,0 J/cm ²	40 s por ponto por 5 dias consecutivos (2 dias antes irradiação)
Cowen, et al ⁵⁴	He-Ne, 632,8 nm, 60 mW, 1,5 J/cm ²	10 s por ponto, uma vez ao dia por 5 dias consecutivos
Bensadoun, et al ⁵⁵	He-Ne, 632,8 nm, 60 mW ou 25 mW, 2 J/cm ²	33 s ou 80 s em 9 pontos, por 5 dias consecutivos, iniciando 7 semanas antes da radioterapia
Wong e Wilder-Smith ⁵⁶	NIS, 45-50 mW, dose total 50-60 J (0,7 ou 0,8 J/cm ²)	Semanalmente, por 15-20 min, 24 h antes do final do tratamento, ou remissão das lesões
Migliorati, et al ⁵⁷	GaAlAs, 780 nm, 60 mW, 2 J/cm ²	35 min diariamente do dia -5 ao+5
Bensadoun e Ciais ⁵⁸	He-Ne, 632,8 nm, 60 mW, 2 J/cm ²	5 dias consecutivos durante 7 semanas de radioterapia
Sandoval, et al ⁵⁹	NIS, 660 nm, 30 mW, 2 J/cm ²	Diariamente até remissão das lesões
Arun Maya, et al ⁶⁰	He-Ne, 632,8 nm, 10 mW	Diariamente, 3 min por 5 dias em uma semana
Corti, et al ⁶¹	LED, 645 nm, 7,8 mW, 0,99 J/cm ²	5 min, 3 vezes ao dia, por 7 dias consecutivos
Cruz, et al ⁶²	NIF, 780 nm, 60 mW, 4 J/cm ²	5 dias consecutivos após quimioterapia
Antunes, et al ⁶³	InGaAlP, 660 nm, 50 mW, 4 J/cm ²	16,7 s em cada ponto, do dia 7 até recuperação
Schubert, et al ³³	GaAlAs, 650-780 nm, 40-60 mW, 2 J/cm ²	Diariamente, por 7-13 dias (D -7 a D +2)

Estudos específicos de TLBI, comparando parâmetros semelhantes de irradiação, como o proposto no presente trabalho, foi realizado por Usume e colaboradores³⁷, que comparou a eficiência de 4 comprimentos de onda *laser* (660 nm, 810 nm, 980 nm e 1064 nm) usados em TLBI no tratamento de mucosite oral induzida por 5-Fluoracil, avaliando a influência dos tratamentos

na expressão do fator de crescimento platelete-derivado (PDGF) fator beta de crescimento transformado ($\text{TGF-}\beta$) e fator de crescimento de fibroblasto derivado do sangue (bFGF). Este trabalho mostrou que a irradiação com 980 nm acelerou o processo de reparo das lesões ao alterar a expressão do PDGF e bFGF, genes responsáveis pela estimulação da proliferação celular e crescimento de fibroblastos. Entretanto, a disponibilidade deste tipo de trabalho ainda é escassa.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-IPEN), protocolo 94/11/CEUA-IPEN/SP, foram utilizados 20 ratos machos Wistar com massa corpórea aproximada de 250 g para os grupos de dosimetria da dose de radiação ionizante e 61 ratos machos Wistar com massa corpórea aproximada de 350 g para os grupos experimentais, totalizando 81 animais, provenientes do Biotério do IPEN. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo até 03 animais cada, recebendo água e ração comercial peletizada da Nubivac® à vontade, com ciclos de luz/escuro de 12 horas.

4.2 Protocolo anestésico e finalização

Para a realização da contenção dos animais durante este experimento foi utilizada anestesia química, por via intraperitoneal, com a associação dos fármacos quetamina (DCB 01937), dose de 75 mg/kg e xilazina (DCB 09207), dose de 10 mg/kg.

Na primeira fase do experimento, de dosimetria da irradiação ionizante gama, a anestesia foi realizada diariamente e, posteriormente, para a TLBI, a cada dois dias.

No dia de eutanásia, foi realizada sobredose dos anestésicos por via intraperitoneal com posterior finalização com mistura de gases O₂ e CO₂ em câmara própria no Biotério do IPEN. As carcaças foram acondicionadas em sacos brancos identificados, congeladas e destinadas pelo Biotério.

4.3 Desenvolvimento do modelo animal de mucosite oral em ratos

4.2.1 Dosimetria da fonte panorâmica de ⁶⁰Co (radiação gama)

Anterior ao início do experimento em ratos, realizou-se dosimetria da fonte panorâmica de ⁶⁰Co do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-

IPEN/SP) para obtenção da taxa de dose e quantidade necessária de blindagem de chumbo.

Foi utilizado dosímetro *online* de fotodiodo de silício da marca FSH-260. O dosímetro foi posicionado diante da fonte, sobre a mesa, com ajuda de suporte, e associado a um eletrônico exterior a câmara de radiação. A taxa de dose no ar, a uma distância de 20 cm da fonte foi utilizada para calibração do dosímetro, sendo em seguida, testadas diferentes alturas do dosímetro em relação à mesa de irradiação e a quantidade de chumbo necessária para blindagem da radiação gama.

Para simular uma irradiação localizada, como ocorre nos tratamentos com radioterapia de tumores de cabeça e pescoço, esta fase do experimento teve como objetivo precisar a dose de radiação gama recebida por um rato durante a exposição a fonte de ^{60}Co . Foi estipulado que a altura de 17 cm em relação a mesa era ideal para avaliar a porção exposta de cabeça e pescoço de um rato Wistar adulto durante a irradiação, quando posicionado na vertical, e a altura de 7 cm seria equivalente a porção do corpo do rato (que deveria ser blindada para radiação ionizante), como mostrado na Figura 3.

Os blocos de chumbo utilizados mediam 5 cm de largura, 10 cm de comprimento e 10 cm de altura, cada.

Figura 3– Dosimetria da fonte panorâmica de ^{60}Co : A – eletrônico externo a sala da fonte panorâmica; B – dosímetro fixado em suporte, com esquema de 10 cm de chumbo.

Para as duas alturas pesquisadas, foram testados três modelos de blindagem: quatro blocos de chumbo, sem espaçamento entre eles (vertical) e 2 blocos de chumbo na horizontal sobre estes, ocupando toda a distancia entre a fonte de ^{60}Co e o dosímetro; 2 blocos de chumbo (vertical) associados a 1 bloco (horizontal) sobre estes, a 10 cm de distância da fonte de ^{60}Co e, por fim, 1 bloco de chumbo (vertical) com 1 bloco (horizontal), a 15 cm de distância da fonte.

4.2.2 Dosimetria da radiação ionizante gama para indução de mucosite oral

Esta fase consistiu na dosimetria da radiação ionizante necessária para induzir mucosite oral em ratos, seguindo o protocolo de Galletta⁸, com pequenas adaptações conforme trabalhos da literatura. Todos os grupos deste experimento foram imobilizados com suporte apropriado (posicionando os animais na posição vertical) juntamente com anestesia geral com a associação

de xilazina 10 mg/kg e quetamina 75 mg/kg por via intraperitoneal. Os animais foram dispostos radialmente à fonte, com distância focal de 20 cm, o corpo foi protegido da irradiação com uso de 02 blocos chumbo de 5 cm de espessura na vertical e um bloco de chumbo na horizontal sobre estes, deixando exposta somente a região de cabeça e pescoço dos animais. A irradiação foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN/SP), com irradiador panorâmico de fonte de ^{60}Co (Tabela 2).

Os animais foram anestesiados diariamente para pesagem e avaliação clínica, juntamente com documentação fotográfica. Foi elaborado um suporte horizontal, utilizando tubo de PVC serrado ao meio com abas laterais para melhor conter os animais durante a avaliação e documentação fotográfica, permitindo que os animais permanecessem sempre na mesma posição, agilizando o processo e evitando interferência de posicionamento e manuseio.

Tabela 2 - Distribuição dos animais nos grupos de dosimetria, conforme dose total de radiação ionizante para indução de MO.

Dose/Grupo	Nº Animais	Taxa Dose	Distância da Fonte	Dieta
30 Gy	05	0,56 Gy/min	20 cm	Comercial
25 Gy	05	0,57 Gy/min	20 cm	Comercial
20 Gy	05	0,60 Gy/min	20 cm	Comercial
20 Gy	05	0,61 Gy/min	20 cm	Pastosa
Total	20			

Para esta fase do experimento, utilizou-se um escore adaptado de Sonis⁶⁴ para identificação e acompanhamento da evolução de mucosite oral na língua dos ratos, variando os graus de 0 (nenhum sinal clínico) a 5 (erosão completa da superfície da língua), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Escore clínico de mucosite oral na língua de ratos⁶⁴

Gradação	Descrição Clínica
0	Nenhuma alteração clínica. Ausência de erosão ou vaso dilatação
1	Eritema, xerostomia, sem evidência de erosão de mucosa
2	Eritema severo, vaso dilatação, erosão superficial
3	Formação de úlceras em um ou mais locais, sem ultrapassar 25% da área de superfície da língua. Eritema severo e vaso dilatação
4	Úlceras acumulativas abrangendo 50% da superfície da língua
5	Virtualmente erosão completa da superfície da língua. Infecção secundária presente.

4.4 Experimentação com TLBI

Os animais foram submetidos a irradiação ionizante com 20 Gy, e divididos aleatoriamente em três grupos, sendo dois de tratamento, utilizando o *laser* nos dois comprimentos de onda $\lambda = 780$ nm e $\lambda = 660$ nm, com 07 animais por grupo para cada período de experimento e um grupo controle, contendo 04 animais, para os mesmos períodos.

A fonte panorâmica de ⁶⁰Co, permitia somente a irradiação de 05 animais por sessão, desta forma, para cada evento de irradiação, foram selecionados, aleatoriamente, 02 animais para o grupo tratamento com $\lambda = 660$ nm, 02 animais para o grupo tratamento com $\lambda = 780$ nm e 01 animal para o grupo Controle não tratado Figura 4.

Figura 4 - Esquema de seleção dos animais para os grupos experimentais.

O grupo Controle, que recebeu irradiação indutora de mucosite oral, mas não recebeu nenhum tratamento adicional, foi submetido à mesma manipulação e procedimentos dos grupos tratados com *laser*. Para estes animais, foi mimetizada contenção química, suporte de irradiação, tipo de ração e alojamento, além de contato com a peça de entrega do *laser* pelo mesmo período de 10 s por ponto.

4.4.1 Parâmetros do *laser*

Foi utilizado para a TLBI o *laser* de GaAlAs da MMOptics®, nos seguintes parâmetros de irradiação Tabela 4.

Tabela 4— Parâmetros de irradiação *laser*.

	$\lambda = 660 \text{ nm}$	$\lambda = 780 \text{ nm}$
Potência (mW)	30	30
Diâmetro do feixe (mm)	0,04	0,04
Tempo por ponto (s)	10	10
Densidade de energia (J/cm^2)	7,5	7,5
Periodicidade	48/48h	48/48h

Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 5. Os animais foram pesados, anestesiados e acondicionados em suporte horizontal adequado, especialmente desenvolvido para este projeto, submetidos à avaliação clínica e documentação fotográfica, seguida de irradiação com *laser* de diodo de GaAlAs da língua a cada dois dias, sem interrupção do tratamento, até o final do experimento. Optou-se por três pontos de irradiação no dorso e dois pontos de irradiação no ventre da língua, de forma a cobrir toda a superfície exposta do órgão, com distância de 1 mm da peça de entrega da superfície do órgão, de forma a não induzir trauma iatrogênico (Figura 5). Os animais foram eutanasiados nos dias 0, 8, 14 e 20 após a irradiação ionizante.

Figura 5 – Exposição natural do ápice da língua do rato quando realizada abertura da boca com apoio nos dentes incisivos superiores e inferiores. Esta posição permite irradiação de 70% do dorso e 50% do ventre da língua, sem necessidade de manipulação direta do órgão.

Tabela 5 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais, de acordo com os dias de eutanásia e coleta de material para exame histológico.

Grupos	Dia 0	Dia 8	Dia 14	Dia 20	Total de Animais
$\lambda = 780 \text{ nm}$	--	07	07	07	21
$\lambda = 660 \text{ nm}$	--	07	07	07	21
Controle (Radiação ionizante gama, não tratados com <i>laser</i>)	07	04	04	04	19
Total	07	08	18	18	61

4.5 Avaliação clínica

Para o acompanhamento clínico dos animais, foram observados os valores de massa corpórea nos dias de irradiação *laser* e evolução de mucosite oral. Inicialmente, foi utilizada um escore adaptado de Sonis⁶⁴ (Tabela 3), variando de grau 0 (nenhum sinal clínico) até grau 5 (ulcerações severas). Este escore se mostrou ineficiente para a diferenciação entre os grupos, sendo então, optado por avaliação ponto a ponto, ou seja, para cada característica clínica apresentada pelos animais, foi elaborado um escore independente. As características observadas foram:

- Edema e eritema;
- Ausência de salivação;
- Exudato inflamatório;
- Presença de infecção microbiana secundária;
- Presença e características das lesões ulcerativas, desde erosões pequenas e localizadas até erosões severas acima de 50 % da superfície da língua;
- Formação de pseudomembrana e,

- Contração tecidual (reepitelização e deformidade da língua).

A avaliação clínica dos animais seguiu dois métodos independentes. Na ocasião da irradiação com *laser*, cada animal foi avaliado e todas as informações cabíveis foram anotadas detalhadamente, levando em consideração não somente os sinais clínicos de mucosite oral na língua, como também as características das demais estruturas da cavidade oral, escore corporal, qualidade dos pêlos dos animais e atividade na gaiola anterior ao manuseio. Em seguida a contenção química, foram obtidas imagens padronizadas da língua, sempre com a mesma iluminação, utilização de aumento de foco de 2x, mesma distância da mesa e posição do animal no suporte de irradiação *laser*. Cada animal foi fotografado 3x, sendo a melhor imagem escolhida para arquivo e posterior análise.

As imagens obtidas foram revistas por dois avaliadores em teste duplo-cego, após realização de teste *kappa*, obtendo-se 100% de concordância entre eles. Para a calibração dos avaliadores foi realizado sorteio de imagens aleatórias, com diferentes graus de mucosite oral e sem identificação do grupo ou período nas imagens. Os avaliadores foram questionados quanto ao seu entendimento teórico dos escores (sinais clínicos) selecionados e, em seguida, solicitados a avaliar as imagens utilizando os escores. Este processo foi repetido três vezes, sendo a terceira avaliação submetida ao teste *kappa* de concordância. A descrição dos escores segue como na tabela de escores (Tabela 6).

Tabela 6 - Escores clínicos de mucosite oral na língua de ratos

GRAU	EDEMA / ERITEMA
0	ausente
1	discreto
2	leve
3	moderado
4	severo
GRAU	DIMINUIÇÃO DE SALIVAÇÃO
0	ausente
1	leve (diminuição em relação a imagem anterior)
2	moderada (diminuição da salivação)
3	severa (boca totalmente seca)
GRAU	EXUDATO INFLAMATÓRIO
0	ausente
1	discreto (confunde com salivação)
2	leve (translúcido)
3	moderado (sanguinolento)
4	severo (sanguinolento e profuso)
GRAU	INFECÇÃO SECUNDÁRIA
0	ausente
1	leve (celularidade em secreção inflamatória)
2	moderada (pus visível em pequena quantidade)
3	severa (pus com sangue e odor fétido)
GRAU	LESÃO ULCERATIVA
0	ausente
1	Ulcerativa focal
2	ulcerativa multifocal pequena
3	ulcerativa multifocal grande
4	ulcerativa severa até 30% da superfície da língua
5	ulcerativa severa de 31 a 50% da superfície da língua
6	ulcerativa severa acima de 50% da superfície da língua
GRAU	PSEUDO-MEMBRANA
0	ausente
1	discreta (início)
2	leve (recobre até 20 % das lesões)
3	moderada (recobre até 50 % das lesões)
4	intensa (recobre >50 % das lesões)
GRAU	CONTRAÇÃO DA FERIDA
0	ausente
1	leve (discreto)
2	moderada (contração da ferida próxima da lesão)
3	severa (contração da ferida com deformidade da língua)

4.6 Avaliação histológica

Após a eutanásia dos animais irradiados, nos dias 0, 8, 14 e 20, a língua destes foi seccionada em sua base com auxílio de lâmina de bisturi cirúrgico, lavada em solução fisiológica e fixada com solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas, lavadas e posteriormente conservadas em álcool 70%. Todo o material foi enviado para técnico terceirizado para preparação de blocos parafinados e posterior corte e elaboração de lâminas histológicas, corada com hematoxilina eosina (HE) e, em adição, as amostras referentes aos grupos 14 dias também foram coradas com Tricômico de Masson (TM). As carcaças dos animais foram congeladas e destinadas pelo biotério do IPEN.

Após corte e coloração com HE, as lâminas foram analisadas quantitativamente no laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP).

Para estes cortes, foram calculadas a porcentagem da área de núcleos celulares presentes, de forma indiscriminada, determinando a celularidade dos cortes.

Este material também foi analisado qualitativa e descritivamente, de forma a identificar lesões e tipos celulares presentes nos campos.

Os campos histológicos foram digitalizados utilizando-se microscópio Leica DM2500 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) com câmera acoplada Leica DFC 295 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e programa de aquisição e morfometria LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A mesma intensidade de luz foi utilizada em todas as digitalizações. As imagens digitalizadas foram mantidas com formato RGB, resolução 2048 X 1536 *pixels* e extensão *.jpg*. A Tabela 7 resume a quantidade de campos, a localização destes e o aumento utilizado.

Tabela 7 - Descrição de aquisição de imagens de campos histológicos para análise de morfometria.

Coloração	Número de campos	Localização	Aumento original
HE (celularidade)	10	Imediatamente abaixo do epitélio, não sobrepostos, em sentido do ápice a base da língua, próximo aos locais de lesão (quando presentes)	400X
HE (contagem de vasos)	10	Mesmas imagens utilizadas para quantificação de celularidade	400X
TM (relação entre tecido conjuntivo e muscular)	08	Região de mucosa, imediatamente abaixo do epitélio, não sobrepostos, em sentido do ápice a base da língua, próximo aos locais de lesão (quando presentes)	400X
TM (relação entre tecido conjuntivo e muscular)	10	Região de submucosa, no centro do corte, não sobrepostos, dentro do 1º terço do ápice da língua	400X

Para a obtenção das imagens, a identificação das lâminas foi bloqueada com papel pardo e numerada de 1 a 60 (HE) e de 1 a 18 (TM), em formato duplo-cego, de forma a evitar viés na avaliação. Somente após a obtenção dos dados foi removido o papel pardo e os dados foram organizados em seus respectivos grupos.

Para a avaliação de celularidade, as imagens digitalizadas obtidas dos campos foram trabalhadas utilizando programa *ImageJ*. Para tal, as imagens foram submetidas ao processo de deconvolução da cor utilizando *plugin* (*Colour deconvolution*). O método foi criado por Ruifrok e Johnston (2008) para cortes histológicos e disponibilizado como *plugin* para o *ImageJ* por Landini (2010). Este método consiste na separação matemática de cores do espectro RGB (*red, green, blue*) em imagens com combinações de até 3 cores diferentes, como acontece na coloração HE e TM. O *plugin* oferece o modo de

separação “HE”, para a separação da eosina e da hematoxilina, mas ainda não tem especificação para a coloração “TM”, sendo assim, o *plugin* “Aussian Blue”, que melhor identifica e separa os tons de azul, foi utilizado por recomendação dos autores, para a deconvolução desta coloração.

Para a quantificação dos núcleos celulares (celularidade) das lâminas coradas em HE, seguiu-se o método de deconvolução de cor descrito anteriormente. Os campos foram aleatoriamente selecionados a partir de 4 cortes de cada língua e digitalizados de forma padronizada (Tabela 7). Essas imagens foram abertas no software ImageJ e, a partir da escolha do método de separação “HE” no item “Deconvolução de cor”, foram geradas duas imagens diferentes, uma equivalente à coloração da hematoxilina e outra, da eosina. A imagem da hematoxilina foi utilizada para quantificação. Por intermédio do histograma (*Thresholding*), o intervalo de tons definidor dos núcleos celulares foi selecionado. Esse intervalo foi utilizado para todos os cortes. A área então desses núcleos foi normalizada pela área total examinada, obtendo-se a porcentagem de núcleos selecionados para cada amostra.

Para a quantificação da relação entre tecido conjuntivo e tecido muscular das lâminas coradas em TM, seguiu-se o método de deconvolução de cor descrito anteriormente. Os campos também foram selecionados aleatoriamente, a partir de 02 a 04 cortes de cada língua e digitalizados de forma padronizada, com mesma intensidade de luz (Tabela 7). As imagens foram abertas no programa ImageJ e, a partir da escolha do método de separação “Aussian Blue” no item “Deconvolução de cor”, foram geradas duas imagens diferentes, uma equivalente ao tecido conjuntivo (azul) e outra ao tecido muscular (vermelho). Ambas as imagens foram utilizadas para quantificação. Por intermédio do histograma (*Thresholding*), que variou de 0 a 50, foi feita comparação entre imagem original e a imagem com deconvolução de cor até se obter imagens semelhantes para quantificação, impossibilitando a utilização de valor fixo de histograma. As áreas obtidas em cada imagem foram normalizadas pela área total examinada, obtendo-se a porcentagem de tecido conjuntivo e muscular para cada amostra.

Como em todas as medições realizadas foram obtidos de 08 a 10 valores em cada situação (dependendo da coloração) para cada língua, ao final, foi calculada a média destes valores, que foi utilizada para fins estatísticos.

As imagens obtidas a partir da coloração HE utilizadas para quantificação de celularidade também foram submetidas a contagem de vasos sanguíneos para avaliar angiogênese. Uma vez que a cor vermelha pode ser confundida pelo programa entre as diferentes estruturas do tecido, optou-se por fazer contagem manual das luzes vasculares encontrados em cada campo. Para evitar que um mesmo vaso fosse contado duas vezes, o programa ImageJ foi utilizado na função de contagem celular (*cellcounter*), onde cada *clic* feito pelo analisador era identificado na tela e somado ao resultado final. Uma vez que os cortes não eram sobrepostos, ao invés de média dos valores foi realizada a soma dos vasos obtidos por campo. O valor total de cada língua também foi compilado em planilha do Microsoft Excel 2007® e em seguida submetidas a avaliação estatística.

4.7 Avaliação estatística

Na análise estatística dos resultados o valor de cada amostra foi representado pela média das suas múltiplas leituras. Para a comparação entre os grupos, foi avaliada a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk com significância de 0,05. Como os dados não possuíam as condições de normalidade exigidas, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguindo do teste Dunn's, ambos com 0,05 de significância. Os itens avaliados foram:

- Massa corpórea;
- Celularidade (área de núcleos por campo histológico);
- Contagem de vasos sanguíneos e,
- Avaliação das características clínicas dos animais de acordo com os escores.

Na avaliação do escore clínico de lesão ulcerativa os dados foram analisados, também, de forma pareada, utilizando o teste não paramétrico de Friedman e o pós-teste de Dunn's, ambos com 0,05 de significância.

Os dados obtidos pela coloração de Tricômico de Massom, como a porcentagem de área de tecido conjuntivo em região de mucosa e porcentagem de área de tecido conjuntivo e muscular em região de submucosa passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilkcom, sendo analisados utilizando ANOVA e a comparação entre os grupos com o pós-teste de Tukey, ambos com 0,05 de significância.

Foi utilizado o programa GraphPadPrism 5[®].

5. Resultados e Discussão

5.1 Dosimetria da fonte panorâmica de ⁶⁰Co (CTR-IPEN)

Os resultados descritos na Tabela 8 foram obtidos com a dosimetria da fonte panorâmica de ⁶⁰Co com o fotodiodo.

Tabela 8 - Resultados da dosimetria da fonte Panorâmica de ⁶⁰Co, do CTR/IPEN

Altura do diodo (cm)	Distância da fonte (cm)	Espessura de Chumbo (cm)	Taxa de dose (Gy/min)
7	20	0	0,94
7	20	20	0,4
17	20	20	0
7	20	10	0
17	20	10	0,60
7	20	5	0,03
17	20	5	0,66

Esta configuração permitiu simular um tratamento com radioterapia de cabeça e pescoço uma vez que, ao blindar o corpo do animal, fez com que a radiação atingisse somente a região corporal de interesse para a presente pesquisa. Com a taxa de dose de 0,60 Gy/min, o tempo inicial de exposição foi de 50 min para dose total de 30 Gy. Como a associação medicamentosa

utilizada neste estudo promove efeito anestésico dos animais de até 01 hora, pode-se garantir que os animais estivessem sob efeito narcótico durante todo o processo de irradiação, evitando alteração no posicionamento dos mesmos, além de diminuição do estresse de contenção.

No total, para cada animal irradiado, foram utilizados três blocos de chumbo de 5 cm de espessura dispostos conforme mostra a Figura 6.

Por uma questão de espaço, tanto para os suportes como para a blindagem, cada sessão de irradiação permitia a exposição de até 05 animais dispostos radialmente a fonte.

Figura 6 - Esquema da disposição final dos blocos de chumbo para irradiação ionizante.

Em trabalhos descritos na literatura com camundongos³⁴ e com hamsters⁶⁴, a irradiação ionizante indutora de MO era realizada com Raios-X, com irradiador focal direcionado ao órgão de interesse (língua e bolsa jugal, respectivamente). A blindagem do corpo era feita de forma preventiva, com manta de chumbo.

5.2 Dosimetria de irradiação ionizante para indução de MO em ratos

O grupo em cuja linha de pesquisa este trabalho está inserido, realizou estudos anteriores com irradiação na mesma fonte de ^{60}Co em hamsters, com dose total de 30 Gy⁸. Em outro trabalho publicado com camundongos⁶⁵ também foi utilizada esta dose de radiação. Desta forma, optou-se pela irradiação inicial dos animais com 30 Gy para verificação dos sinais clínicos de mucosite oral nos ratos. Como a mucosa jugal da bolsa alimentar dos hamsters é abundante, esta parte anatômica é comumente utilizada para avaliação de sinais de mucosite oral nesta espécie¹⁹. Já em ratos, pela ausência de bolsa jugal fez-se necessária a avaliação clínica geral de todas as estruturas da boca do animal para identificação e acompanhamento de sinais clínicos de mucosite oral e determinação de qual a melhor estrutura a ser utilizada para comparação. Os ratos que receberam dose de 30 Gy apresentaram MO grau 5 no escore proposto por Sonis⁶⁴ após 03 dias da irradiação gama, com considerável perda de massa corpórea, diminuição da ingestão de alimento, desidratação severa, sangramentos, presença de infecção secundária com secreção purulenta e ceratite ulcerativa com conseqüente cegueira. Estes animais foram eutanasiados prematuramente após 07 dias, indicando que esta dose, administrada de forma única em ratos, é excessiva e compromete de forma irreversível o animal como um todo (Figura 7-A), inviabilizando seu uso para este estudo.

Figura 7 – A: irradiação com 30 Gy, possível notar exsudato purulento, ulceração de todas as estruturas da cavidade oral; B: irradiação com 25 Gy. Evidente exsudato purulento, edema de lábios, ulceração severa do dorso da língua; C: irradiação com 20 Gy: edema de lábios, ulceração multifocal do dorso da língua, pequena quantidade de exsudato inflamatório sero-sanguinolento.

O grupo irradiado com 25 Gy (Figura 7-B) apresentou os mesmos sintomas e grau de MO do grupo anterior, com exceção da ceratite ulcerativa, sendo os animais eutanasiados prematuramente no dia 11, indicando que esta dose também não é eficiente para utilização em ratos como modelo animal para este estudo.

Os animais dos grupos irradiados com 20 Gy, que receberam ração comercial (Figura 7-C) desenvolveram MO em grau severo (grau 5), porém com alterações clínicas sistêmicas menos intensas, suportando a fase aguda (08 dias após irradiação ionizante) e, eventualmente, apresentando melhora espontânea do quadro após 15 dias. No último grupo avaliado, cujos animais foram irradiados com 20 Gy e receberam alimentação pastosa, os mesmos rejeitaram a dieta. Três animais deste grupo apresentaram infecção microbiana secundária oral severa, sendo que um destes animais desenvolveu mucosite gastrointestinal, evidenciada pela diminuição da motilidade intestinal e timpanismo, evoluindo a óbito no sétimo dia.

Como a mucosite oral é uma doença debilitante que causa desconforto e muita dor devido à diminuição de salivação, inflamação e ulceração de parte ou de toda a superfície das estruturas orais, a perda ou ganho de massa corpórea dos animais a partir do início do experimento foram mensurados, como método auxiliar na avaliação clínica. O grupo que apresentou menor porcentagem de perda de massa corpórea foi o de 20 Gy, com máxima média de 8 % de perda, contra 12 % e 20 % de perda de massa corpórea, observada nos grupos irradiados com 25 Gy e 30 Gy, respectivamente (Figura 8).

O protocolo de anestesia geral diária dos animais influenciou negativamente no experimento, por provocar mal estar e apatia prolongada (retorno anestésico) e, conseqüentemente, inibir ingestão espontânea de água e alimento.

Com base nos resultados obtidos nesta fase do experimento, optou-se pela utilização de irradiação gama com dose única de 20 Gy com alimentação comercial peletizada para a realização da segunda fase do estudo, juntamente com mudança na frequência de anestesia geral e avaliação dos animais, com intervalo de 02 dias, permitindo-lhes maior tempo de recuperação. A estrutura oral que proporcionou maior facilidade de acesso, manipulação e avaliação foi a língua, sendo esta escolhida como base para este estudo.

Figura 8– Porcentagem de perda de massa corpórea dos animais nos diferentes grupos de irradiação gama (não tratados com *laser*). As barras representam o desvio padrão.

Trabalhos descritos na literatura se orientam na avaliação clínica dos animais pelo escore de mucosite oral obtido durante a experimentação^{19,64}. Entretanto, como se pode observar durante este estudo de dosimetria de indução da mucosite oral, a mensuração de perda ou ganho percentual de massa corpórea dos animais se mostrou uma ferramenta auxiliar eficiente e de fácil obtenção na avaliação clínica dos animais, uma vez que a perda de massa é esperada ao longo da progressão da MO, devido ao desconforto e dor ocorridos nesta comorbidade¹⁹. Quando se avalia massa corpórea, as pesagens obtidas do grupo Controle não tratado com TLBI, como mostrado na (Figura 9), ilustra de forma quantitativa a progressão esperada desta comorbidade em ratos - desde o animal saudável (mucosite grau 0) no dia da irradiação; dia 8, com média crítica de severidade de MO, até a estabilização do quadro e eventual cura espontânea observada a partir do dia 14. Isso permite realizar um paralelo entre massa corpórea dos animais e progressão de MO, comprovando a eficiência dessa medida auxiliar na avaliação clínica dos animais.

Figura 9 - Perda de massa corpórea grupo Controle (irradiado com gama, mas não tratado com *laser*). As barras representam o erro padrão.

5.3 Experimentação com TLBI

5.3.1 Avaliação Clínica

A avaliação clínica dos animais, realizada a cada dois dias, consistiu em pesagem, determinação do escore de mucosite oral na língua, como descrito anteriormente, e documentação fotográfica.

Na intenção de diminuir o desconforto promovido pela MO e facilitar a ingestão de alimento pelos animais foi oferecida dieta pastosa na primeira fase deste experimento. A dieta pastosa foi rejeitada pelos animais, que na condição de roedores, com crescimento contínuo dos dentes incisivos superiores e inferiores, não se adaptaram a dieta cremosa, preferindo ração peletizada comercial, fornecida para todos os animais da segunda fase do experimento.

Como demonstrado anteriormente, a perda ou ganho de massa corpórea mostrou-se correspondente as fases de evolução da mucosite oral em ratos, fornecendo informação auxiliar na avaliação clínica dos animais. Assim como no grupo controle, os animais do grupo tratado com *laser* 660 nm, apresentaram ganho de massa corpórea em relação ao dia inicial de irradiação (Figura 10), já os animais do grupo *laser* 780 nm, persistiram com massa corpórea abaixo do valor inicial (Figura 11).

Figura 10 - Perda de massa corpórea grupo 660 nm. As barras representam o erro padrão.

Ao submeter os valores médios de massa corpórea a avaliação estatística, não foi detectada diferença entre os grupos nos diferentes períodos estudados (Figura 12).

Ao final do experimento, período de 20 dias, o baixo número de animais do grupo Controle pode ter interferido negativamente na análise estatística, uma vez que dos 03 animais avaliados, 01 animal apresentou valor de massa corpórea inferior a medida inicial e somente 01 animal apresentou ganho significativo ao final do experimento, indicando capacidade individual de recuperação. Os animais do grupo 660 nm apresentaram ganho geral de massa corpórea em relação ao grupo tratado com *laser* 780 nm, demonstrando tendência desse comprimento de onda em promover recuperação mais rápida da ingestão espontânea de água e alimento.

Figura 11 - Perda de massa corpórea grupo 780 nm. As barras representam o erro padrão.

A evolução da MO ocorreu conforme descrito em outros trabalhos publicados na literatura^{42,66-69}, onde os animais iniciaram quadro de xerostomia (devido irradiação ionizante das glândulas salivares) e eritema (primeiros sinais clínicos de MO) por volta do dia 03 após irradiação ionizante. A diminuição da produção de saliva promove desconforto acelerando o processo de erosão da superfície da língua e, juntamente com a inflamação local, diminuição acentuada da ingestão de água e alimento. Pode-se observar início de erosão do epitélio a partir do sexto dia após irradiação gama. O ápice dorsal da língua foi o primeiro local onde as ulcerações puderam ser observadas. Acredita-se que isto se deva pelo contato direto do ápice da língua com os dentes incisivos, responsáveis pela roedura dos *pellets* de ração, gerando atrito direto e constante, na tentativa de apreensão do alimento. A maior severidade da mucosite ocorreu entre os dias 08 e 12, com perda virtualmente total do epitélio de revestimento do dorso da língua em todos os grupos. O início do processo de recuperação tecidual deu-se com a formação de pseudomembrana, que é uma película formada por superfície necrótica e fibrina, que propicia proteção física e prevenção de ressecamento do tecido ulcerado, auxiliando os processos de reepitelização da língua.

Figura 12 - Perda de massa corpórea média dos grupos Controle não tratado com *laser*, $\lambda = 780$ nm e $\lambda = 660$ nm, nos dias de avaliação. As barras representam o erro padrão.

5.3.2 Avaliação por escores de mucosite oral

Após a calibração de dos avaliadores, as imagens obtidas durante o experimento foram analisadas nos dia 8, 14 e 20, para cada grupo estudado. Para melhor identificar possíveis diferenças entre os grupos, os sinais clínicos de MO foram analisados separadamente, em escores criados para este trabalho (Tabela 6).

A diminuição da salivação, por ocorrer principalmente entre os dias 02 e 04 após irradiação ionizante indutora de MO, foi excluída da avaliação clínica, por não estar presente nos dias estudados.

5.3.2.1 Edema e eritema

A inflamação pode ser identificada e avaliada pela presença de edema e eritema nas estruturas e, em alguns casos, estes sinais clínicos foram observados nos animais a partir do dia 02 após irradiação gama.

No dia 8, todos os animais do grupo Controle apresentaram a maior severidade do escore edema ou eritema (escore 4), estando estes sinais ainda

presentes com escore 1 em 66% dos animais ao final do experimento. O grupo tratado com *laser* 660 nm apresentou 100% dos animais com escore 3, já o grupo tratado com *laser* 780 nm apresentou escores 3 e 2, menos severos, em sua maioria, correspondentes a 70% e 30% dos animais, respectivamente, no mesmo período Figura 13- A).

Aos 14 dias, os grupos *laser* já apresentavam animais sem estes sinais clínicos (35% no grupo 660 nm e 25% no grupo 780 nm), contrastando com o grupo Controle, onde estes sinais persistiram em graus severos em todos os animais (Figura 13 – B).

Os grupos *laser* evoluíram para escore 1, com eritema restrito aos bordos de lesões ainda presentes em menos de 40% no grupo 660 nm e 26%, no grupo 780 nm, no dia 20 Figura 13 - C). A diferença estatística entre os grupos tratados com *laser* e o grupo Controle não tratado com TLBI pode ser comprovada nos dias 8 e 14, indicando que o tratamento é eficiente no controle do processo inflamatório.

Figura 13 – Frequência dos escores de edema e eritema dos grupos nos diferentes períodos do experimento: A – grupos aos 8 dias; B – grupos aos 14 dias e, C – grupos aos 20 dias. Letras iguais representam que não há diferença estatística. Letras diferentes representam diferença estatística com $p < 0,05$.

No trabalho de Sabino⁷⁰, realizado com inoculação de carragenina em membro anterior esquerdo de camundongos para indução de edema local, foi demonstrado com uso de *laser* de HeNe (hélio-neônio), com $\lambda = 632,8 \text{ nm}$,

que quanto maior o edema e infiltrado inflamatório, maior o espalhamento do *laser* no tecido, o que demonstra que nas fases de mucosite com maior escore de edema e eritema, 8 e 14 dias, ocorreu maior espalhamento do *laser*.

5.3.2.2 Exsudato inflamatório

Exsudato inflamatório, caracterizado pela presença de líquido inflamatório seroso ou sero-sanguinolento esteve presente em todos os grupos, com maior intensidade no dia 8, auge da erosão do epitélio da língua. Neste período, os grupos Controle (escore 3 – 36%, escore 2 – 64%) e *laser* 660 nm (escore 3 – 31,7%, escore 2 – 57,8%, escore 1 – 10,8%) não apresentaram diferença estatística, apesar de menor severidade do quadro no grupo *laser* Figura 14 –A). Em contraste, houve diferença estatística significativa entre o grupo *laser* 780 nm e os demais grupos (Figura 14–B). Com a maioria dos animais (55%) com escore 1, no período de maior severidade da MO, a eficiência do *laser* 780 nm na modulação da inflamação mostrou-se superior em relação aos demais grupos, associando também com a menor gravidade de edema e eritema obtidos por este tratamento.

No dia 14, fase de reepitilezação acentuada, ambos os tratamentos *lasers* (86% cada, sem presença de exsudato) obtiveram diferença estatística significativa em relação ao Controle (exsudato presente em todos os animais). Ao final do experimento, no dia 20, nenhum grupo apresentou este sinal clínico.

Figura 14 - Frequência dos escores de exsudato inflamatório presente nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.

5.3.2.3 Infecção microbiana secundária

Devido à complexidade do processo inflamatório e sua modulação, eventos como a presença de sangue (exsudato sero-sanguinolento) e descontinuidade do epitélio podem facilitar o desenvolvimento de infecção microbiana secundária. A contagem de unidades formadoras de colônia permite avaliar tanto a taxa de infecção como a identificação das espécies infectantes. Este trabalho, entretanto, avaliou somente as características clínicas de infecção, de forma subjetiva, identificando a presença e intensidade de secreção purulenta.

O dano causado à mucosa durante o tratamento do câncer leva a colonização patológica por bactérias, fungos e, em menor frequência, vírus. Além disso, a redução da produção de saliva (que contém a imunoglobulina IgA) e auxilia na remoção mecânica de debris celulares e bactérias, pode modificar a flora microbiana normal presente na cavidade oral⁷¹.

No dia 8, novamente o grupo tratado com *laser* 780 nm apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos, sendo que nenhum dos animais apresentou indício de secreção purulenta, sugerindo que a menor

presença de edema, eritema e exsudato inflamatório apresentada por este grupo, influenciou negativamente a capacidade de multiplicação microbiana (Figura 15– A). Não houve diferença entre os grupos Controle e *laser* 660 nm, com presença de secreção purulenta escore 2 em 37% e 23,6%, respectivamente, neste período.

Na avaliação do dia 14, apesar de ainda presente nos grupos Controle (escore 1 – 50%) e *laser* 660 nm (escore 3 – 7,1%) e, tardiamente em 02 animais do grupo *laser* 780 nm, não houve diferença estatística entre os grupos. No final do experimento, nenhum animal apresentou secreção purulenta (Figura 15– B).

Figura 15- Frequência dos escores de presença de secreção purulenta nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.

O *laser* 780 nm apresentou indício de inibição de crescimento microbianos avaliado pela presença de secreção purulenta. Este achado também foi demonstrado no trabalho de Dória⁷², entretanto, é necessário estudo posterior para contagem de unidades formadoras de colônia para se obter resultados mais precisos da diferença entre os comprimentos de onda estudados.

5.3.2.4 Pseudomembrana

A formação de pseudomembrana, que pode ser observada a partir do dia 8, caracterizou o início da fase de recuperação tecidual e é formada por crostas epiteliais e exsudato fibrinoso, promovendo proteção ao tecido erodido da língua. Mais evidente no dia 8, quando a erosão tecidual foi mais intensa, foi observado que o grupo com maior extensão e espessura de pseudomembrana promoveu diminuição da área de erosão mais rapidamente. O grupo tratado com *laser* 660 nm destacou-se nesse escore de avaliação (escore 4 – 56,2%, escore 3 – 47,4%), contra os valores obtido pelos grupos Controle e *laser* 780 nm, com 64% e 65%, em escore 3, respectivamente. Para este período, pode ser comprovada a diferença estatística entre o grupo *laser* 660 nm e o grupo Controle, não havendo diferença entre os grupos *lasers* Figura 16– A).

Em contrapartida, no dia 14, com o processo de reepitelização bem instituído, a presença de pseudomembrana indica um retardo na capacidade de reepitelização da mucosa, juntamente com a presença de lesões ainda severas. Neste contexto, o grupo Controle, com pseudomembrana presente em 87% dos animais obteve diferença estatística em relação aos grupos tratados com *laser*, nos quais 85,8% (660 nm) e 78,7% (780 nm) dos animais já não possuíam pseudomembrana Figura 16– B).

Figura 16- Frequência dos escores de presença de pseudo-membrana nos grupos dos dias 08 e 14. Este escore foi ausente em todos os grupos no período de 20 dias.

5.3.2.5 Lesão ulcerativa

A lesão ulcerativa, ou erosão epitelial, foi a característica mais evidente observada na avaliação clínica dos animais. A dose de 20 Gy de radiação gama, fornecida em dose única, promoveu reação inflamatória e mucosite oral severa em todos os grupos e, mesmo avaliando detalhadamente a extensão da erosão, profundidade e local, ao submeter os dados obtidos dos grupos à análise estatística, não houve diferença entre eles, em nenhuma fase do experimento.

No dia 8, o escore 6, associado a maior severidade de MO, com virtualmente erosão total da superfície da língua foi observado em 54,4% dos animais do grupo Controle, contra 30% do grupo *laser* 780 nm e apenas 10,5% dos animais do grupo *laser* 660 nm. Já o escore 3 (menor escore obtido no dia 8), foi observado em 10% dos animais dos grupos *lasers* e não foi observado no grupo Controle (Figura 17– A). Já neste período, considerando-se somente a avaliação clínica da língua dos animais, pode-se notar benefício

da TLBI e ainda uma tendência do $\lambda = 660$ nm em promover reepitelização mais rápida da mucosa.

Figura 17- Frequência dos escores de presença de lesão ulcerativa nos grupos nos diferentes períodos do experimento.

No dia 14, o comportamento dos grupos se manteve com escores variando de 4 a ausente, sendo o grupo *laser* 660nm (7,1%) e o grupo Controle (25%) ainda apresentando escore 4, e o grupo *laser* 780 nm com a

maioria dos animais (64,4%) com escore 3. Os grupos *lasers* já apresentavam animais com reepitelização completa neste período, sendo que o grupo 660 nm, apresentou 25,5% de completa reepitelização e o grupo 780 nm, apenas 7,1% dos animais (Figura 17– B).

A tendência do *laser* 660 nm em acelerar o fechamento de lesões ulceradas em mucosa pode ser percebida, também, nos dados do período de 20 dias, onde este grupo obteve 80% dos animais com reepitelização completa, contra 57,3% dos animais do grupo *laser* 780 nm e 01 animal do grupo Controle (33,3%) (Figura 17– C).

O escore de lesão ulcerativa, por ser mais complexo na diferenciação dos grupos, foi analisado também com teste estatístico de Friedman. Esta intra-análise promoveu melhor entendimento do comportamento dos grupos ao longo do desenvolvimento e evolução da MO.

O grupo Controle obteve diferença entre os dias 8 (pico de lesão) e 20 (cura esperada), confirmando o caráter auto limitante desta comorbidade, descrito em múltiplas publicações da área^{5,15,41,73} (Figura 18– A). A evolução natural desta comorbidade está demonstrado na Figura 19 com um mesmo animal do grupo Controle. O grupo *laser* 660 nm, também apresentou diferença estatística entre os dias 8 e 20 (Figura 18– B).

O grupo *laser* 780 nm, em contrapartida, apresentou diferença na comparação entre os dias 8 e 14, e entre os dias 8 e 20, não apresentando diferença entre os dias 14 e 20 (Figura 18– C). Isso indica que, apesar de ainda apresentar 42,7% de lesão visível ao final do experimento, este comprimento de onda promoveu diminuição acentuada dos escores entre os dias de máxima lesão erosiva (8 dias) e fase de grande atividade de recuperação tecidual (14 dias), comportando-se normalmente entre os dias 14 e 20. Isso pode ser explicado pela maior capacidade de penetração tecidual da luz laser de $\lambda = 780\text{nm}$, fazendo com que os fótons sejam absorvidos em camadas mais profundas do tecido (Figura 2). O estímulo pró-inflamatório iniciado em camadas profundas requer maior tempo de ação para chegar em camadas superficiais. Já o *laser* de $\lambda = 660\text{ nm}$ é absorvido principalmente em camadas superficiais do epitélio, atuando na resolução da úlcera, como resultado de um processo biológico ativo no qual a matriz extra-celular da

submucosa sinaliza a proliferação, migração e diferenciação das bordas epiteliais da úlcera¹³. Vale ressaltar que as lesões apresentadas no final do experimento eram pequenas e circunscritas, no dorso do ápice da língua.

Figura 18 – Avaliação estatística de Friedman ($p < 0,05$) para o escore de lesão ulcerativa para cada grupo, entre os períodos do experimento. As barras representam a dispersão até 99% dos dados.

Figura 19- Exemplar do grupo Controle. A: 8 dias – note lesão ulcerativa de grande extensão (seta), estendendo-se do ápice até 2/3 da superfície dorsal da língua; formação de pseudomembrana no ápice (pontilhado). B: 14 dias – as setas indicam lesão ulcerativa bilateral, de grande extensão, superficial, com evidente reepitelização de ápice da língua; C: 20 dias – a seta indica antigo local de lesão ulcerativa, completamente reepitelizada.

5.3.2.6 Contração da ferida

O último item clínico avaliado por escore foi a contração da ferida, presente principalmente nos dias de recuperação tecidual (dia 14) e reepitelização total (20 dias), caracterizando a fase final de cura esperada de MO. No dia 8, fase crítica das lesões erosivas em epitélio, a contração da ferida foi pouco presente nos grupos, sendo localizada, principalmente, nos bordos das lesões (Figura 20– A).

No dia 14, os grupos tratados com *laser* apresentaram maior presença de contração da ferida em relação ao grupo Controle, sugerindo influência positiva da TLBI neste fator (Figura 20– B). Esta diferença pode ser comprovada com análise estatística.

A contração dos bordos de lesão ulcerativa indica intensa atividade de recuperação do epitélio, fato desejado na recuperação de MO. Os grupos *lasers* tiveram diferença estatística entre si no dia 20 (Figura 20– C). Os animais do grupo *laser* 660 nm apresentaram contração intensa da ferida, sendo 40% deles com deformidade de toda a língua e 60% com deformidade próxima aos antigos locais de lesão (escore 2). O grupo *laser* 780 nm, apresentou 42,8% (escore 2) e 57,2% (sem contração) e o grupo Controle apresentou todos os animais com escore 2.

(C) Contração da Ferida - 20 dias

Figura 20- Frequência dos escores de presença de contração da ferida nos grupos nos diferentes períodos do experimento.

A intensa deformação das línguas no grupo 660 nm, juntamente com os dados obtidos no escore de pseudomembrana e lesão ulcerativa, indicam uma tendência deste tratamento em promover o fechamento da ferida mais rapidamente que os demais grupos, mesmo que de forma aparentemente mais desorganizada (Figura 21).

Em contrapartida, o tratamento com *laser* 780 nm, quando analisado nos mesmos parâmetros, sugere uma tendência de melhor organização da reepitelização, evidenciada pela ausência de deformidade do órgão ao final do experimento, porém em processo mais lento que o 660 nm.

Figura 21- Contração da ferida aos 20 dias. (A): animal tratado com *laser* 660 nm, a área pontilhada indica intensa contração da ferida, com deformidade do ápice da língua. Nota-se ausência de lesão ulcerativa; (B): animal tratado com *laser* 780 nm, a seta indica reepitelização incompleta com discreta contração da ferida.

No tratamento de MO é necessária reepitelização o mais rápido possível, pois a descontinuidade do epitélio promove dor e facilita o desenvolvimento de infecção microbiana secundária, gerando complicações e até desistência aos tratamentos de câncer de cabeça e pescoço, seja com radioterapia ou quimioterapia^{15,40,74}. Sendo assim, o uso do *laser* de $\lambda = 660$ nm apresentou uma tendência em promover maiores benefícios no tratamento desta comorbidade¹⁵.

Para melhor esclarecer os dados clínicos foi realizada comparação com os cortes histológicos.

5.3.3 Avaliação histológica

5.3.3.1 Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas coradas em HE foram utilizadas para múltiplas análises. Este material foi avaliada qualitativamente por examinador patologista experiente na área de MO^{5,10,44,52,68,69,75} e, em seguida, foi realizada contagem de celularidade (núcleos celulares) presente e número de vasos sanguíneos.

5.3.3.1.1 Descrição morfológica dos grupos para o período de 8 dias

Nas lâminas avaliadas do grupo Controle de 8 dias (Figura 22), observou-se fragmentos de mucosa lingual exibindo intensa atrofia epitelial, tanto na face dorsal (A) quanto na face ventral (B), com área focal de ulceração na transição na região do ápice lingual (C). O epitélio exibe queratinócitos com intenso pleomorfismo, corpos apoptóticos, núcleos picnóticos e cariólise (D), bem como hiperqueratose (A e B). Na base da úlcera, nota-se tecido de granulação com vasos sanguíneos hiperêmicos, grande quantidade de células fibroblásticas e matriz extracelular fibrilar (D). A superfície ulcerada exibe extensa área de necrose, com presença de colonização microbiana e de infiltrado composto por células polimorfonucleares. Na submucosa nota-se tecido muscular esquelético exibindo miofibras necróticas e feixes em regeneração, estes compostos por fibras exibindo núcleo centralizado e matriz colagênica em proliferação (F).

As lâminas avaliadas do grupo *laser* 660 nm de 8 dias (Figura 23) apresentaram aspecto histológico semelhante ao observado no grupo Controle do mesmo período. O epitélio exibe atrofia e área focal ulcerada na região do ápice lingual. Nota-se, contudo que, aparentemente, a área de luzes vasculares é maior (A), bem como a quantidade da matriz colagênica no tecido de granulação (B), em que se nota grande celularidade, principalmente de células mesenquimais. Na submucosa, as fibras musculares exibem intensa atividade regenerativa (C), à semelhança do grupo controle.

Figura 22 - Grupo Controle de 08 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A, B e C); aumento original de 400x (D, E e F).

Figura 23 - Grupo tratado com laser 660 nm de 08 dias, coloração HE (aumento original 50x).

As lâminas avaliadas do grupo *laser* 780 nm de 8 dias (Figura 24) apresentaram aspecto histológico semelhante ao dos grupos controle e *laser* 660 nm do mesmo período, com a diferença de aparentemente haver menor quantidade de luzes vasculares hiperêmicas (A) quando comparado ao grupo *laser* 660 nm. Na submucosa, as fibras musculares em regeneração estão circundadas por grande quantidade de tecido conjuntivo bem celularizado (B), a semelhança do observado para o *laser* 660 nm.

Figura 24 - Grupo tratado com *laser* 780 nm de 08 dias, coloração HE (aumento original 50x).

5.3.3.1.2 Descrição morfológica dos grupos para o período de 14 dias

As lâminas avaliadas do grupo Controle de 14 dias (Figura 25) apresentaram aspecto histológico geral com evidencia de amplo processo de regeneração da mucosa lingual como um todo. O tecido epitelial, tanto da face dorsal (A) quanto da face ventral (B), exibe espessura compatível com a normalidade, sem sinal de apoptose e necrose de queratinócitos. Nota-se duplicação da camada basal e hipercromatismo nuclear no epitélio, indicando intensa proliferação (A e B). Em área focal, nota-se ainda área ulcerada (C), porém com dimensões menores, intensa atividade de reepitelização (D) e menor quantidade de tecido necrótico na superfície. Na base da úlcera, nota-se tecido de granulação maduro, com brotos vasculares nítidos, matriz extracelular colagênica e grande celularidade (E). Grande quantidade de mioblastos se faz presente nessa região. Na submucosa, as fibras musculares exibem processo de remodelamento avançado, em que a recuperação da morfologia original está quase completa (F).

Figura 25 - Grupo Controle de 14 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A, B, C e F); aumento original de 400x (D e E).

Nas lâminas avaliadas do grupo *laser* 660 nm de 14 dias (Figura 26) os cortes histológicos revelam, em geral, processo reparativo avançado da mucosa lingual, em que se observa área ulcerada mais discreta (A), cuja base exhibe tecido de granulação maduro (B). Não se observa atrofia do tecido epitelial, nem sinais de morte de queratinócitos. A intensidade de reepitelização (C) e de regeneração muscular é semelhante à observada no grupo controle. A matriz colagênica, contudo, parece ser mais homogênea e mais exuberante (D). Não se nota mais a presença de amplas luzes vasculares congestionadas, e sim brotos capilares em formação (B). A submucosa exhibe fibras musculares ainda em regeneração, com estroma composto por fibras colágenas delicadas e edema intersticial residual (E).

Nas lâminas avaliadas do grupo *laser* 780 nm de 14 dias (Figura 27) o aspecto histológico é bastante semelhante ao observado no grupo *laser* 660 nm e grupo controle. Nota-se presença de úlcera com área reduzida (A) e intensa reepitelização (B), superfície necrótica discreta e tecido de granulação maduro na base da língua (C). Intensa deposição colagênica se faz presente nessa região (D), assim como proliferação de brotos capilares. Na submucosa notam-se fibras musculares em regeneração, com estroma composto por fibras colágenas delicadas e edema intersticial residual.

Figura 26 - Grupo tratado com laser 660 nm de 14 dias, coloração HE. Aumento original de 50x (A e E); aumento original de 400x (B, C e D).

Figura 27 - Grupo tratado com laser 780 nm de 14 dias, coloração HE. Aumento de original 50x (A e E); aumento original de 400x (B, C e D).

5.3.3.1.3 Descrição morfológica dos grupos para o período de 20 dias

Nas lâminas avaliadas do grupo Controle de 20 dias (Figura 28), a mucosa lingual encontra-se com características de normalidade. Há completa ausência de área ulcerada e de tecido de granulação na lâmina própria (A). Não há sinal de remodelamento nem do tecido conjuntivo, nem do tecido epitelial (B), indicando processo reparativo avançado. A submucosa exhibe também características de normalidade, com regeneração completa e remodelamento das fibras musculares (A).

Figura 28 - Grupo Controle não tratado 20 dias, coloração HE (aumento original 50x).

Nas lâminas avaliadas do grupo *laser* 660 nm de 20 dias (Figura 29), o aspecto histológico da mucosa é semelhante ao observado para o grupo Controle, com completa regeneração epitelial e conjuntiva. Na submucosa parece haver maior deposição colagênica por entre as fibras musculares em comparação ao grupo Controle (B e C).

Figura 29 - Grupo tratado com laser 660 nm de 20 dias, coloração HE. Aumentos originais: A – 50x; B e C – 100x.

Nas lâminas avaliadas do grupo *laser* 780 nm de 20 dias (Figura 30), o aspecto histológico é semelhante ao grupo Controle e 660 nm na região da mucosa lingual, exibindo completa regeneração do epitélio e da lâmina própria (A). A submucosa, contudo, parece exibir maior quantidade de colágeno por entre as fibras musculares se comparado ao Controle (B), sendo semelhante ao grupo *laser* 660 nm. Também se fazem presentes em alguns espécimes fibras musculares em fase de remodelamento inicial, com grande quantidade de endomísio nos feixes (C).

Figura 30 - Grupo tratado com laser 780 nm de 20 dias, coloração HE. Aumentos originais: A – 50x; B – 100x e C – 400x.

5.3.3.2 Celularidade

A quantificação de área de núcleos celulares presente nos campos histológicos verificou aumento acentuado entre os dias 8 e 14, compatível com a instalação de infiltrado inflamatório, necessário para recuperação tecidual. Entre os dias 14 e 20, fase correspondente a diminuição da inflamação, reepitelização e cura, houve decréscimo (esperado) no valor da celularidade em todos os grupos (Tabela 9).

Não foi detectada diferença estatística entre os grupos nos diferentes períodos de avaliação, provavelmente pela limitação ética do número de animais que podem ser utilizados em experimentação (Figura 31).

Tabela 9 – Média de quantificação de celularidade (área de núcleos) presente nos cortes corados com HE (desvio padrão entre parêntesis).

	8 dias		14 dias		20 dias	
	Área (μm^2)	Área (%)	Área (μm^2)	Área (%)	Área (μm^2)	Área (%)
Controle	899 (305)	1,03 (0,35)	3018 (2365)	3,48 (2,72)	1375 (669)	1,58 (0,77)
$\lambda = 660 \text{ nm}$	1341 (667)	1,54 (0,77)	2576 (2090)	2,97 (2,41)	525 (178)	0,60 (0,20)
$\lambda = 780 \text{ nm}$	924 (375)	1,06 (0,43)	1421 (529)	1,63 (0,60)	1109 (591)	1,27 (0,68)

Figura 31 – Avaliação estatística da quantificação de porcentagem de área de núcleos celulares presente nos cortes histológicos entre os grupos, para os períodos de 8, 14 e 20 dias. Não houve diferença estatística em todos os períodos.

5.3.3.3 Contagem de vasos sanguíneos

Como a TLBI estimula o processo de angiogênese¹⁹ a contagem de vasos sanguíneos poderia ser útil na identificação de prováveis diferenças histológicas entre os grupos. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 10, e esses dados mostram que houve aumento geral do número de vasos sanguíneos entre os dias 08 e 14 em todos os grupos. Entretanto, a contagem de vasos do grupo Controle apresentou pouca variação entre os dias 08, 14 e 20, indicando uma limitação da promoção da neo-vascularização natural. Já nos grupos tratados com *laser*, o valor inicial da contagem de vasos foi superior ao do grupo Controle. Além disso, o processo de angiogênese persistiu entre os dias 14 e 20, com aumento progressivo do número de vasos.

Apesar da angiogênese progressiva observada na TLBI, ao submeter os dados a análise estatística, não foi possível verificar diferença entre os grupos. Uma vez que a obtenção dos dados foi subjetiva, a identificação de vasos menores ou capilares pode ter sido sub-mensurada tornando-se necessária a realização de estudos posteriores com maior sensibilidade (Figura 32).

Tabela 10 – Média da contagem de vasos sanguíneos nos cortes corados em HE (desvio padrão entre parêntesis).

	8 dias	14 dias	20 dias
Controle	88 (9)	97 (34)	95 (27)
$\lambda = 660 \text{ nm}$	125 (14)	139 (27)	153 (9)
$\lambda = 780 \text{ nm}$	149 (21)	132 (22)	164 (36)

Figura 32 - Avaliação estatística da quantificação de vasos sanguíneos presente nos cortes histológicos entre os grupos, para os períodos de 8, 14 e 20 dias. Não houve diferença estatística em todos os períodos.

O uso de teste de imunohistoquímica para maior sensibilidade na detecção de vasos sanguíneos foi utilizado no trabalho de França e colaboradores¹⁹, nos cortes histológicos das lesões detectadas de MO com acompanhamento dos animais aos 9 dias. Neste trabalho, os animais receberam TLBI somente com *laser* 660 nm, 30 mW, 10 s por ponto, porém com 2 mm de diâmetro do feixe e dose de 1,2 J/cm². Após análise estatística, foi encontrado maior número de vasos sanguíneos no grupo controle do que no grupo tratado com *laser*, diferentemente do observado no presente experimento. A diferença de dose entregue por ponto de irradiação (7,5 J/cm² e 1,2 J/cm²) pode ser um dos motivos que expliquem essa disparidade nos resultados obtidos na contagem de luzes vasculares. Deve-se ressaltar a necessidade de técnicas mais sensíveis para detecção e quantificação de vasos sanguíneos.

5.3.3.4 Coloração com Tricômico de Masson (período de 14 dias)

Tendo-se por base a conhecida modulação da TLBI no processo inflamatório e recuperação tecidual³⁴, a comparação entre área de tecido conjuntivo e tecido muscular entre os grupos tratados e o grupo Controle podem ajudar a identificar possíveis diferenças entre os tratamentos. Tais diferenciações podem ser detectadas com relação a formação de fibras colágenas, caracterização e recuperação de fibras musculares em região de mucosa e de sub-mucosa no ápice da língua, além de fornecer informações adicionais sobre os efeitos teciduais do *laser* no processo de recuperação. A coloração com Tricômico de Masson permite a separação entre fibras colágenas (coradas em azul) e fibras musculares, citoplasma e queratina (corados em vermelho). Os dados obtidos dos grupos aos 14 dias constam na Tabela 11 e mostram que, em região de mucosa, o grupo tratado com 660 nm apresentou a maior concentração de fibras colágenas. Este comprimento de onda, assim como já discutido na avaliação clínica e em outros trabalhos publicados na literatura⁴⁴, tem grande influência na estimulação da capacidade dos fibroblastos em produzir colágeno e, assim, acelerar o processo de contração e recuperação do epitélio. Quando comparado ao grupo Controle, o

grupo tratado com 780 nm também apresentou alta concentração de colágeno, apesar de menos intensa que a obtida no grupo 660 nm.

A relação entre colágeno e tecido muscular presente na região de submucosa foi constante e com pouca diferença entre os grupos.

Tabela 11 - Média percentual de fibras colágenas e tecido muscular nos cortes corados com Tricômico de Massom, amostras de 14 dias (desvio padrão entre parêntesis).

	Mucosa	Sub-Mucosa	
	Colágeno (%)	Colágeno (%)	Tec. Muscular (%)
Controle	16,93 (5)	16,81 (8)	47,89 (11)
$\lambda = 660 \text{ nm}$	35,69 (8)	17,46 (8)	52,95 (6)
$\lambda = 780 \text{ nm}$	28,13 (5)	15,3 (9)	53,62 (7)

Ao submeter os dados obtidos de região de mucosa a análise estatística foi identificada diferença entre os grupos tratados com *laser* e o grupo Controle, não havendo diferença entre os comprimentos de onda estudados. Contudo, a diferença obtida entre o grupo 660 nm e o Controle obteve maior significância do que a diferença entre o grupo 780 nm e o grupo Controle (Figura 33), favorecendo a interpretação de que o *laser* de 660 nm promove maior produção de colágeno e contração da ferida mais rápida no tratamento de MO. Não houve diferença estatística entre os grupos para a região de submucosa.

Figura 33 - Porcentagem de fibras colágenas, aos 14 dias, em região de mucosa (teste ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$).

Após a realização desse trabalho e análise dos dados obtidos, pode-se observar que há diferenças clínicas entre os comprimentos de onda *laser* utilizados, entretanto essas diferenças são sutis, como a capacidade do *laser* $\lambda = 780$ nm em inibir crescimento microbiano na fase crítica de lesão ulcerativa, ou a eficiência do *laser* $\lambda = 660$ nm em promover contração da ferida dessas lesões mais rapidamente. Observou-se, então, que as terapias têm efeitos complementares. Dessa forma, sugere-se estudo aprofundado da utilização dos dois comprimentos de onda, de forma alternada, inicialmente com $\lambda = 780$ nm, por atingir camadas mais profundas do tecido, seguido de $\lambda = 660$ nm em mesma sessão de radiação, para agregar os benefícios de ambos e promover prevenção significativa e/ou melhora da mucosite oral.

6. Conclusão

Foi obtido um modelo animal padronizado em ratos para estudo de mucosite oral induzida por radiação ionizante por fonte panorâmica de ^{60}Co , utilizando a dose única de 20 Gy e observando os animais por 20 dias.

Foram elaborados escores detalhados de avaliação clínica de evolução de mucosite oral, possibilitando diferenciação entre os tratamentos estudados.

Utilizando os mesmos parâmetros de irradiação *laser*, este trabalho mostrou que o tratamento com *laser* $\lambda = 660$ nm, promoveu fechamento das lesões ulcerativas mais rapidamente, com maior quantidade de colágeno em região de mucosa nos dias 14 e 20, quando comparado ao tratamento com *laser* $\lambda = 780$ nm, sendo que ambos os tratamentos foram superiores ao grupo Controle não irradiado com *laser*.

Estes resultados indicam que os benefícios obtidos pelos dois comprimentos de onda, nas mesmas condições de irradiação são diferentes, podendo ser utilizados de forma complementar em pacientes.

7. Produções obtidas

Publicação de trabalho completo em *proceedings*

Andrade, M.F.; Benetti, C.; Correa, L.; Zezell, D.M.- “USE OF ^{60}Co PANORAMIC SOURCE IN THE INDUCTION OF ORAL MUCOSITIS IN RATS” - International Nuclear Atlantic Conference 2013, 24 e 29 de novembro, Recife-PE.

Proceeding of INAC, *Associação Brasileira de Energia Nuclear – ABEN-Rio de Janeiro*- ISBN: 978-85-99141-05-2, pg 1-7, 2013.

Outras coautorias não relacionadas a este trabalho

Silva, M. N.; Sicchieri, L.B.; Silva, F.R.O. ; Andrade, M.F.; Courrol, L.C.- “LIQUID BIOPSY OF ATHEROSCLEROSIS USING PROTOPORPHYRIN IX AS A BIOMARKER”, *Analyst*, 139 (6), 1383-88, 2014.

8. Referências Bibliográficas

1. Rosenthal, D. I. & Trotti, A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **19**, 29–34 (2009).
2. ZEZELL, D. M., ROSSI, W. & BACHMANN, L. in *Fundam. Odontol. lasers em Odontol.* p. 1–17 (Guanabara Koogan, 2010).
3. Garcez, A. ., Ribeiro, M. S. & Núñez, S. . in *Laser baixa potência princípios básicos e Apl. clínicas na Odontol.* 14–27 (2012).
4. Bjordal, J. M. *et al.* A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support. Care Cancer* **19**, 1069–77 (2011).
5. Bezinelli, L. M. *et al.* Cost-effectiveness of the introduction of specialized oral care with laser therapy in hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol. Oncol.* **32**, 31–9 (2014).
6. Barasch, A., Elad, S., Altman, A., Damato, K. & Epstein, J. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis. *Support. Care Cancer* **14**, 528–32 (2006).
7. Saadeh, C. E. Chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: review of preventive strategies and treatment. *Pharmacotherapy* **25**, 540–54 (2005).
8. GALLETTA, V. C. Desenvolvimento de modelo de indução de mucosite oral por radiação em hamsters. Prevenção e tratamento por laser de baixa potência. (2006).
9. Schubert, M. M. *et al.* A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support. Care Cancer* **15**, 1145–54 (2007).
10. Cunha, C. B. *et al.* Effect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis: a pilot study with patients undergoing chemotherapy with 5-FU. *Lasers Med. Sci.* **27**, 1233–40 (2012).
11. BICUDO, L. L., ZECELL, D. M. Utilização de LEDs na prevenção de mucosite oral em paciente com linfoma de Hodgkin clássico – estudo de caso. (2004).
12. Bashkatov, a N., Genina, E. a, Kochubey, V. I. & Tuchin, V. V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the

- wavelength range from 400 to 2000 nm. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **38**, 2543–2555 (2005).
13. Sonis, S. T. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis.* **16**, 597–600 (2010).
 14. Simões, A. *et al.* Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg. Med.* **41**, 264–70 (2009).
 15. Migliorati, C. *et al.* Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support. Care Cancer* **21**, 333–41 (2013).
 16. Gouvêa de Lima, A. *et al.* Oral Mucositis Prevention By Low-Level Laser Therapy in Head-and-Neck Cancer Patients Undergoing Concurrent Chemoradiotherapy: A Phase III Randomized Study. *Int. J. Radiat. Oncol.* **82**, 270–275 (2012).
 17. Alterio, D. *et al.* Cancer Treatment-induced Oral Mucositis. **1126**, 1105–1125 (2007).
 18. Bensadoun, R. J., Magné, N., Marcy, P. Y. & Demard, F. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **258**, 481–7 (2001).
 19. França, C. M. *et al.* Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J. Photochem. Photobiol. B.* **94**, 25–31 (2009).
 20. Nemetala, R., Neves, E. & Melo, S. De. Laser and Dexamethasone Therapies on Oral Mucositis Induced by Fluorouracil in Rats. *Oral Health Prev. Dent.* **5**, 63–72 (2007).
 21. Parulekar, W., Mackenzie, R., Bjarnason, G. & Jordan, R. C. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol.* **34**, 63–71 (1998).
 22. Adelstein, D. J. *et al.* Concurrent radiation therapy and chemotherapy for locally unresectable squamous cell head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group pilot study. *J. Clin. Oncol.* **11**, 2136–42 (1993).
 23. BOURHIS, J. *et al.* Very accelerated radiation therapy: Preliminary results in locally unresectable head and neck carcinomas. *Int. J. Radiat. Oncol.* **32**, 747–752 (1995).

24. Brizel, D., Albers, M. & Fisher, S. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N E J. Med.* v. **338**(25), p. 1798–1804 (1998).
25. Al-Dasooqi, N. *et al.* Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support. Care Cancer* **21**, 2075–83 (2013).
26. Stokman, M. A. *et al.* Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy- induced oral mucositis: results of meta-analyses. Authors failed to acknowledge the Cochrane review on this topic. *J. Dent. Res.* **85**, 690–700 (2006).
27. Elting, L. S. *et al.* Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer* **113**, 2704–13 (2008).
28. Dória, M., Lino, C., Maria, L. & Ramalho, P. Laser Phototherapy as a Treatment for Radiotherapy-Induced Oral Mucositis. *Culture* **22**, 162–165 (2011).
29. Satheeshkumar, P. S. *et al.* Effectiveness of triclosan in the management of radiation-induced oral mucositis: a randomized clinical trial. *J. Cancer Res. Ther.* **6**, 466–72 (2010).
30. Sullivan, B. O., Tew-george, E., Waldron, J. & Liu, F. A phase II study of Biotene in the treatment of postradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *Support. Care Cancer* v. **08**, 203–208 (2000).
31. Sonis, S. T. Efficacy of palifermin (keratinocyte growth factor-1) in the amelioration of oral mucositis. *Core Evid.* **4**, 199–205 (2010).
32. ALBUQUERQUE, A. C. L., SOARES, M. S. M. & SILVA, D. F. Mucosite oral: patobiologia , prevenção e tratamento. *Com. Ciências Saúde* **21** (2), 133–138 (2010).
33. Schubert, M. M. *et al.* A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support. Care Cancer* **15**, 1145–1154 (2007).
34. Albert, M., Schmidt, M., Cordes, N. & Dörr, W. Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by selective inhibition of $\beta 1$ integrin. *Radiother. Oncol.* **104**, 230–4 (2012).
35. Lopez, T. C. C. *et al.* Effect of laser phototherapy in the prevention and treatment of chemo-induced mucositis in hamsters. *Braz. Oral Res.* **27**, 342–8 (2013).

36. Sonis, S. T., Tracey, C., Shklar, G., Jenson, J. & Florine, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* **69**, 437–443 (1990).
37. Usumez, A. *et al.* Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med. Sci.* (2013). doi:10.1007/s10103-013-1336-z
38. Dörr, W., Spekl, K. & Martin, M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. *Cell Prolif.* **35 Suppl 1**, 60–7 (2002).
39. Dörr, W., Brankovic, K. & Hartmann, B. Repopulation in mouse oral mucosa: changes in the effect of dose fractionation. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 383–90 (2000).
40. Figueiredo, A. L. P., Lins, L., Cattony, A. C. & Falcão, A. F. P. Laser therapy in the control of oral mucositis: a meta-analysis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **59**, 467–74 (2013).
41. SONIS, S. T. *et al.* Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. *Cancer* **85**, 2103–2113 (1999).
42. Lalla, R. V *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* **120**, 1453–61 (2014).
43. Stiff, P. J. *et al.* Palifermin reduces patient-reported mouth and throat soreness and improves patient functioning in the hematopoietic stem-cell transplantation setting. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5186–93 (2006).
44. Sperandio, F. F. *et al.* Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. *J. Biophotonics* **6**, 839–47 (2013).
45. Chung, H. *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 516–33 (2012).
46. Mester, E., Spiry, T., Szende, B. & Tota, J. G. Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.* **122**, 532–535 (1971).
47. Garcez, A. S., Ribeiro, M. S. & Núñez, S. C. in *Laser baixa potência princípios básico se Apl. clínicas na Odontol.* 27–43 (2012).
48. Karu, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* **49**, 1–17 (1999).

49. Leonarduzzi, G., Sottero, B., Gabriella Testa, G., Biasi, F. & Poli, G. New Insights into Redox-Modulated Cell Signaling. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3994–4006 (2011).
50. URBACH, R. *The biologic effects of ultraviolet radiation*. (Pergamon Press, 1969).
51. WALDRON, H. . *Safety with Lasers and Other Optical Sources—A Comprehensive Handbook*. 307–308 (British Journal of Industrial Medicine, 1981).
52. Eduardo, F. D. P. *et al.* Severity of Oral Mucositis in Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplantation and an Oral Laser Phototherapy Protocol: A Survey of 30 Patients. *Photomed. Laser Surg.* **27**, 137–144 (2009).
53. Barasch, A., Peterson, D. E. & Tanzer, J. M. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer* **76**, 2550–2556 (1995).
54. Cowen, D. *et al.* Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: Results of a double blind randomized trial. *Int. J. Radiat. Oncol.* **38**, 697–703 (1997).
55. Franquin, R. J. B. J. C. *et al.* Low-energy He / Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. 244–252 (1999). doi:10.1007/s005209900034
56. Wong, S.-F. & Wilder-Smith, P. Pilot Study of Laser Effects on Oral Mucositis in Patients Receiving Chemotherapy. *Cancer J.* **8**, 247–254 (2002).
57. MIGLIORATI, C. *et al.* Low-energy laser therapy in oral mucositis. *Oral Laser Appl.* **1**, 97–101 (2001).
58. Bensadoun, R. J., Franquin, J. C. & Ciais, G. Low- energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in pa- tients with head and neck cancer. *Support Care Cancer* **7**, 244–252 (1999).
59. Sandoval, R. L., Koga, D. H., Buloto, L. S., Suzuki, R. & Dib, L. L. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy laser: initial results of A.C. Camargo Hospital. *J. Appl. Oral Sci.* **11**, (2003).
60. Arun Maiya, G., Sagar, M. S. & Fernandes, D. Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention & treatment of radiation

- induced mucositis in head & neck cancer patients. *Indian J. Med. Res.* **124**, 399–402 (2006).
61. Corti, L. *et al.* Treatment of chemotherapy-induced oral mucositis with light-emitting diode. *Photomed. Laser Surg.* **24**, 207–13 (2006).
 62. Cruz, L. B. *et al.* Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr. Blood Cancer* **48**, 435–40 (2007).
 63. Antunes, H. S. *et al.* Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood* **109**, 2250–5 (2007).
 64. Sonis, S. T. *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol.* **36**, 373–81 (2000).
 65. Burdelya, L. G. *et al.* Toll-like Receptor 5 Agonist Protects Mice from Dermatitis and Oral Mucositis Caused by Local Radiation: Implications for Head-and-Neck Cancer Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2011). doi:10.1016/j.ijrobp.2011.05.055
 66. Sonis, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.* **34**, 39–43 (1998).
 67. Dörr, W., Spekl, K. & Farrell, C. L. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. *Cell Prolif.* **35 Suppl 1**, 86–92 (2002).
 68. Cunha, C. B. *et al.* Effect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis: a pilot study with patients undergoing chemotherapy with 5-FU. *Lasers Med. Sci.* **27**, 1233–40 (2012).
 69. EDUARDO, F. *et al.* The influence of dental care associated with laser therapy on oral mucositis during allogeneic hematopoietic cell transplant: retrospective study. *Einstein* **9**, 201–206 (2011).
 70. Sabino, C. P. *et al.* <title>Red laser attenuation in biological tissues: study of the inflammatory process and pigmentation influence</title>. **8211**, 821105–821105–7 (2012).
 71. Allison, R. R. *et al.* Multi-institutional, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess the efficacy of a mucoadhesive hydrogel (MuGard) in mitigating oral mucositis symptoms in patients being treated with chemoradiation therapy for cancers of the head and neck. *Cancer* **120**, 1433–1440 (2014).

72. Lino, M. D. M. da C. *et al.* Laser phototherapy as a treatment for radiotherapy-induced oral mucositis. *Braz. Dent. J.* **22**, 162–5 (2011).
73. Lalla, R. V, Schubert, M. M., Bensadoun, R.-J. & Keefe, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. *Support. Care Cancer* **14**, 558–65 (2006).
74. Lara, R. N., da Guerra, E. N. S. & de Melo, N. S. Macroscopic and microscopic effects of GaAlAs diode laser and dexamethasone therapies on oral mucositis induced by fluorouracil in rats. *Oral Health Prev. Dent.* **5**, 63–71 (2007).
75. Eduardo, F. D. P. *et al.* Oral care in Brazilian bone marrow transplant centers. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **33**, 15–20 (2011).