

CLAUDIA CARRARA COTOMACIO

Reparo de lesões orais induzidas ou não por 5-fluorouracil em *hamsters* e tratadas com diferentes protocolos de terapia de fotobiomodulação

São Paulo

2020

CLAUDIA CARRARA COTOMACIO

Reparo de lesões orais induzidas ou não por 5-fluorouracil em *hamsters* e tratadas com diferentes protocolos de terapia de fotobiomodulação

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biologia Oral), para obter o título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves

São Paulo

2020

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

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

Cotomacio, Claudia Carrara.

Reparo de lesões orais induzidas ou não por 5-fluorouracil em *hamsters* e tratadas com diferentes protocolos de terapia de fotobiomodulação / Claudia Carrara Cotomacio; orientadora Alyne Simões Gonçalves. -- São Paulo, 2020.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

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

Cotomacio CC. Reparo de lesões orais induzidas ou não por 5-fluorouracil em *hamsters* e tratadas com diferentes protocolos de terapia de fotobiomodulação. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 28/05/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a) Élcio Magdalena Giovani

Instituição: FOUNIP _____ Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Fábio de Abreu Alves

Instituição: FOUSP _____ Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Victor Elias Arana Chavez

Instituição: FOUSP _____ Julgamento: Aprovada

A **Deus** pela minha vida, por todas as bênçãos recebidas e por poder desfrutá-las com saúde ao lado de minha família.

Aos meus pais, **Flavio e Carla**, meus alicerces. São as pessoas mais íntegras e batalhadoras que eu conheço. Obrigada por me ensinarem o verdadeiro valor das coisas e por me tornarem o que eu sou hoje. Jamais teria conseguido sem o apoio de vocês. Obrigada por sempre terem uma boa palavra e por terem o colo mais gostoso do mundo. Amo vocês.

Ao meu irmão mais velho, **André**, por ter compartilhado todas as fases da minha vida, desde minha infância até hoje. Obrigada por ser um ótimo irmão mais velho, um exemplo de determinação pessoal e profissional e por ter me ensinado tanto nesses anos. Também a minha cunhada querida, **Bianca**, que sempre tem um sorriso doce, um abraço e uma palavra de conforto para os momentos difíceis.

Às minhas tias e tios, principalmente à minha tia **Carolina**, minha madrinha na vida e na profissão e que me proporcionou o meu início de carreira clínica. Obrigada pela parceria.

Aos meus amados avós, **Teresinha, Giuseppe, Ivany e Zezo**. Que saudade! Estão sempre presentes em meus pensamentos e nas doces lembranças da minha infância.

Ao meu parceiro de vida, **Fred**. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, me incentivando, dando colo, amor e carinho. Como é gostoso e leve caminhar pela vida ao seu lado!

À minha sogra querida **Regina** e ao meu sogro **Paulo** por todo carinho e apoio de sempre.

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

Aos grandes amigos que estão sempre por perto para cuidar e olhar por nós, nos ajudando a enfrentar os dragões do dia a dia, com empatia, esclarecimento e equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. **Dra. Alyne Simões Gonçalves**. Obrigada pela parceria e apoio durante grande parte da minha vivência na área científica, pelos ensinamentos científicos, clínicos, acadêmicos e pessoais. Muito obrigada pela generosidade, por todas as grandes oportunidades e por proporcionar meu crescimento profissional na carreira acadêmica, além de todo incentivo, amizade, compreensão e confiança depositada. Cresci e sou a profissional de hoje graças a você.

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

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

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

À **Profa Dra Luana Campos**, que se tornou uma grande amiga, desde a época de iniciação científica. Admiro demais a profissional que você se tornou. Inspiro-me muito em você.

A todos os amigos do curso de Mestrado e Doutorado da Disciplina de Biologia Oral, a pós-doutora **Cintia**, às companhias de Laboratório, **Andressa, Simone, Tais e Juliana** e, e em especial para minhas queridas **Gabi** e **Lorraine**, pela amizade, companheirismo, cafés, por compartilhar bons e maus momentos, por toda a ajuda e por tornarem mais fácil o dia-a-dia na pós-graduação. Juntos somos mais fortes.

Aos alunos de iniciação científica, **Caio** e **Bianca**, que trabalharam comigo, e abrilhantaram ainda mais esse trabalho. Vocês são ótimos, continuem nesse caminho que vocês vão longe! Muito obrigada!

Aos técnicos dos Laboratórios de Bioquímica Oral e Biologia Oral, **Douglas e Elis**.
Obrigada por todo o apoio, ajuda e paciência.

Às secretárias do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral **Eli e Rosinha**, e
ao secretário do Departamento de Dentística, **David**, sempre prontos para nos
ajudar.

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

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

À **CAPES e CNPq**, pela bolsa de estudos.

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

À minha nova casa, **Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista
(UNIP)**, especialmente aos professores **Carlos, Élcio, Bruno e Gilberto** pela
oportunidade e confiança depositada.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

Cotomacio, CC. Reparo de lesões orais induzidas ou não por 5-FU em hamsters e tratadas com diferentes protocolos de terapia de fotobiomodulação. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

As lesões ulcerativas da cavidade bucal são desconfortáveis devido a dor provocada e a maior susceptibilidade a infecções, afetando o desempenho em atividades cotidianas das pessoas. A mucosite oral (MO) é uma classe desse tipo de lesões, causada pelo tratamento antineoplásico, podendo ser a causa da interrupção do tratamento oncológico, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes. O 5-Fluorouracil (5-FU) é um quimioterápico antimetabólico que impede a mitose celular, sendo um dos mais estomatotóxicos e causadores de MO. O uso da terapia fotobiomoduladora (do inglês *Photobiomodulation Therapy* - PBMT) com laser de baixa potência tem sido amplamente difundido para o tratamento e prevenção dessa lesão oral. No entanto, ainda não existe um consenso na literatura em relação ao melhor protocolo de irradiação, à capacidade de modulação inflamatória e à indução do reparo no tecido, tanto para feridas induzidas na presença do quimioterápico, quanto na ausência dele. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi analisar o processo de reparo de lesões orais, na presença ou ausência do 5-FU, e o efeito de diferentes protocolos da PBMT como tratamento dessas lesões. Para isso, foram utilizados 108 *hamsters*, os quais parte tiveram MO induzida pela administração do 5-FU seguida por ranhuras na mucosa e parte tiveram lesões orais induzidas apenas por ranhuras. Os animais foram divididos em nove grupos, como se segue: um grupo "C", o qual recebeu somente a anestesia e o veículo do quimioterápico; quatro grupos "R" (um controle e três grupos laser), que receberam anestesia, veículo do quimioterápico e ranhuras; e quatro grupos Q (um controle e quatro grupos laser) que receberam anestesia, ranhuras e quimioterápico 5-FU. Os grupos que receberam laser, tiveram os protocolos divididos da seguinte maneira: grupos R e Q LI receberam PBMT 6 J/cm²/0,24 J; grupos R e Q LII receberam PBMT 25 J/cm²/ 1 J; e os grupos R e Q LIII receberam PBMT 6 J/cm²/1,2J. O equipamento laser foi utilizado no comprimento de onda de 660 nm e com área de spot de 0,04 cm². Os animais

foram eutanasiados após 7 e 10 dias de experimento, sendo que a mucosa oral foi removida para análises histológicas (microscopia de luz com hematoxilina e eosina e marcação de colágeno com Tricrômico de Mallory), imunohistoquímica (NF-kB e TNF- α), e análises bioquímicas (TNF- α , NF-kB e hidroxiprolina). A influência mais evidente de ação da PBMT ocorreu entre os grupos que receberam indução de MO (quimioterápico + ranhura), principalmente no grupo QLI, de menor energia, que apresentou reparo mais acelerado e menores níveis dos indicadores inflamatórios quando comparado com seu controle Q. Entre os grupos R, o grupo de menor energia, RLI, também apresentou menores concentrações dos indicadores inflamatórios analisados. Dessa forma, a presença de quimioterápico evidencia o efeito da PBMT, na reparação tecidual, e energias mais baixas parecem acelerar o reparo tecidual e modular a resposta inflamatória.

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

ABSTRACT

Cotomacio, CC. Wound healing process regarding different photobiomodulation therapy protocols to treat oral lesions induced or not by 5-FU in *hamsters* [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Oral lesions cause discomfort and increase the susceptibility to infections, impairing people quality of life. Oral mucositis (OM), a type of these lesions, is one of the most debilitating side effects of cancer treatment, and It can also be responsible for treatment interruption, which increases patient's morbidity and mortality. 5-Fluorouracil (5-FU) is an antimetabolic chemotherapy drug that inhibits cellular mitosis. It is one of the most stomatotoxic of its category, and it is able to cause OM. The Photobiomodulation Therapy (PBMT) with low-level laser has been widely used for the treatment and prevention of these oral lesions. However, there is no consensus in the literature about the best irradiation protocol, the inflammatory modulation process ability, and the tissue repair induction. Thus, the aim of this study was to analyze the repair process of oral lesions in either the presence or absence of 5-FU, as well as the PBMT effect, using different protocols in the treatment of those lesions. In order of that, 108 hamsters were used: some of them had OM induced by the combination of 5-FU and scratches, while others received just scratches. The animals were separated into nine groups: one group "C", which received just anesthesia and chemotherapeutic vehicle; four "S" groups (one control and three laser protocols), which received anesthesia, chemotherapeutic vehicle and oral mucosa superficial scratching; four "Ch" groups (one control and three laser protocols), which received anesthesia, oral mucosa superficial scratching and 5-FU. The groups which received laser were divided as follows: S and Ch LI groups received PBMT 6 J/cm²/0,24 J; S and Ch LII groups, received PBMT 25 J/cm²/1 J; and S and Ch LIII groups received PBMT 6 J/cm²/1,2 J. The laser equipment used had $\lambda = 660$ nm and 0.04 cm² of spot area. The animals were euthanized after 7 and 10 days of experiment, and their oral mucosa were removed for histological (light microscopy and collagen staining), immunohistochemical (NF-kB and TNF- α) and biochemical (TNF- α , NF-kB and hydroxyproline) analysis. The most evident influence of PMBT action occurred

between the groups that received OM induced by chemotherapy and scratches. In group ChLI (less energy) there were found accelerated repair rates and a lower concentration of inflammatory indicators comparing to group Ch. Regarding S groups, the group which received less energy also presented decreased inflammatory indicators. In that way, the presence of chemotherapeutic enhance the PBMT effect and less energy protocols seemed to accelerate tissue repair and modulate the inflammatory response.

Keywords: Oral Mucositis. Laser therapy. Low level laser therapy. Photobiomodulation Therapy. Dosimetry. Chemotherapy. Hamsters.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
A	Área
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatase
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
C	Controle
°C	Graus Celsius
CEC	Carcinoma de células escamosas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm ²	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAB	Diaminobenzidina
DE	Densidade de Energia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Energia
EAR	Estomatite aftosa recorrente
EO	Extra oral
EP	Energia por ponto
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Energia total
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O	Água
H&E	Hematoxilina e eosina
HeNe	Helio-Neônio
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalo de confiança

IκB	kB inibitória
IKK	IκB quinase
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IN	Infiltrado inflamatório
Inc.	Incorporation
InGaAlP	Índio Galio Alumínio e Fósforo
IO	Intraoral
ISOO	International Society of Ocular Oncology
IV	Infravermelho
J	Joule
kg	Quilograma
KGF	Fatores de crescimento de queratinócitos
LI	Laser I
LII	Laser II
LIII	Laser III
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
PBMT	Terapia Fotobiomoduladora
LED	Light Emitting Diode
LBO	Laboratório de Biologia Oral
m	Fibras musculares
M	Molar
MASCC	Multinational Association of Supportive Care in Cancer.
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MO	Mucosite oral
mW	Miliwatts
n	Número amostral
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Necrose
NF-κB	Fator nuclear κB

NF-κB1	Fator nuclear κB 1
NF-κB2	Fator nuclear κB 2
nm	nanômetros
O ₂	Oxigênio
NO	Óxido nítrico
P	Potência
p	Valor-p
PA	Pensilvânia
PBMT	Photobiomodulation Therapy
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDT	Terapia fotodinâmica
PGEs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
Q	Controle-Quimioterápico
QLI	Quimioterapia Laser I
QLII	Quimioterapia Laser II
QLIII	Quimioterapia Laser III
QT	Quimioterapia
R	Ranhura
RE	Regeneração epitelial
Redox	Reação oxirredução
RLI	Ranhura Laser I
RLII	Ranhura Laser II
RLIII	Ranhura Laser III
RNA	Ácido ribonucleico
RTCP	Radioterapia de cabeça e pescoço
s	Segundos
SP	São Paulo
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
t	Tempo
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TGF- β1	Fator de transformação do crescimento β1

TMO	Transplante de medula óssea.
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
USA	Estados Unidos Da América
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VS	Vasos sanguíneos
W	Watts
x	vezes
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
®	Marca registrada
<	Menor que
>	Maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
	2.1 Úlceras traumáticas, inflamação e o processo de reparo tecidual	25
	2.2 O tratamento oncológico e a mucosite oral.....	29
	2.3 Fotobiomodulação com laser de baixa potência (PBMT)	32
	2.4 PBMT e as lesões orais.....	35
3	PROPOSIÇÃO	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	65
	4.1 Animais	65
	4.2 Delineamento experimental.....	65
	4.3 Procedimentos clínicos.....	66
	4.4 Procedimentos laboratoriais	74
	4.5 Análise das imagens histológicas – Deconvolução de imagem	78
	4.6 Análises estatísticas	81
5	RESULTADOS	83
	5.1 Grupos R.....	83
	5.2 Grupos Q.....	99
	5.3 Comparação entre grupos R e Q.....	115
6	DISCUSSÃO	127
7	CONCLUSÃO	135
	REFERÊNCIAS	137
	ANEXO A	155

1 INTRODUÇÃO

As lesões ulcerativas da cavidade bucal são desconfortáveis e incômodas para a maioria das pessoas devido a dor provocada e a maior susceptibilidade a infecções, afetando o desempenho em atividades cotidianas, como fala, mastigação e deglutição (Antunes et al., 2007).

As úlceras orais agudas são um problema comum na prática clínica tendo como exemplos as úlceras traumáticas, a estomatite aftosa recorrente (EAR) e a estomatite recorrente do vírus do herpes simples intraoral. (Neville et al., 2016; Cui et al., 2016). Os tratamentos mais comuns dessas lesões orais envolvem o uso de anti-sépticos, agentes anti-inflamatórios, analgésicos, antibióticos, corticosteróides, ácido hialurônico e anestésicos tópicos (Suter et al., 2017). A dinâmica tecidual, associada à presença da saliva, propicia um alto potencial reparador para a mucosa oral que varia, em média, de 7 a 14 dias (Broughton et al., 2006).

Um outro grupo de lesões orais, a mucosite oral (MO), é ainda mais preocupante, pois é um efeito colateral da quimioterapia (QT) e radioterapia de cabeça e pescoço (RTCP) e pode durar ao longo de todo tratamento oncológico. Por ser um efeito colateral bem debilitante, reduz as funções orais cotidianas dos pacientes e pode estar relacionada a interrupção do tratamento oncológico, aumentando custos hospitalares, morbidade e mortalidade desses pacientes (Machado; Sawada, 2008; Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012).

O grande desconforto causado pelas lesões orais, seguidos pelos efeitos colaterais de outras terapias, como os corticoides, mostrou a necessidade de uma terapia de fácil aplicação e sem efeitos colaterais que fosse capaz de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, desde o desenvolvimento do primeiro laser por Maiman (1960), essa necessidade terapêutica ampliou a utilização do laser (acrônimo para: "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*") na medicina e na odontologia, com várias aplicações na oftalmologia, dermatologia, periodontia, estomatologia, cirurgia, endodontia, dentística e principalmente no manejo de lesões orais, como na mucosite oral dos pacientes submetidos aos tratamentos oncológicos.

Entretanto, a vasta disponibilidade de protocolos da terapia de fotobiomodulação (do inglês *Photobiomodulation therapy* – PBMT) na literatura ainda deixa dúvida de qual seriam os melhores parâmetros a serem utilizados, visando o melhor resultado terapêutico. Dessa forma, a partir de estudo realizado anteriormente (Cotomacio et al., 2017), percebeu-se a necessidade de avaliar o processo de reparação das lesões e o efeito da PBMT, na ausência e na presença do quimioterápico 5-FU, assim como a influência de diferentes protocolos de PBMT em cada uma dessas situações clínicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Úlceras traumáticas, inflamação e o processo de reparo tecidual

O trauma na mucosa oral pode ocorrer devido a alimentos cortantes, escovação excessiva ou mordidas acidentais. Dessa forma, ocorrem mais frequentemente em sítios sujeitos ao trauma: língua, lábios e mucosa jugal. Geralmente apresentam-se como lesões individuais com uma área eritematosa que circunda uma membrana removível, central, fibrinopurulenta e evoluem para o reparo assim que o trauma local é removido (Neville et al., 2016).

A inflamação do tecido, após um trauma, é o primeiro de vários processos sobrepostos que levarão à cura dessas feridas (Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007). Dentro de poucas horas após a lesão, os neutrófilos, ao serem ativados por citocinas pró inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), migram para o local lesionado através da parede celular endotelial dos capilares sanguíneos (Eming et al., 2007). Essa ativação leva também à expressão de várias classes de moléculas de adesão essenciais para o processo de diapedese de leucócitos (Eming et al., 2007).

Os neutrófilos recrutados removem o tecido desvitalizado e iniciam a fagocitose de agentes infecciosos. Para executar esta tarefa, eles liberam uma grande variedade de substâncias antimicrobianas altamente ativas (espécies reativas de oxigênio, peptídeos catiônicos, eicosanóides) e proteases (elastase, catepsina G, proteinase 3, ativador de plasminogênio) (Epstein; Weiss, 1989; Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que os neutrófilos atuantes no processo de reparo, podem modular o fenótipo e a expressão de citocinas de macrófagos, regulando assim a resposta imune inata durante o processo de reparo (Daley et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a presença diminuída de neutrófilos compromete a diferenciação de miofibroblastos e reduz a contração da ferida (Peters et al., 2005). Isso aconteceria devido à falta de estímulo para macrófagos secretarem TGF- β 1, um mediador chave da diferenciação de miofibroblastos (Eming et al., 2007; Peters et al., 2005).

A menos que os estímulos para o recrutamento de neutrófilos persistam no local da ferida, a infiltração de neutrófilos cessa após alguns dias. Os neutrófilos implicados no processo são fagocitados pelos macrófagos que estarão presentes na ferida em aproximadamente 2 dias (Eming et al., 2007) ou em um período de 48 a 96 horas após o surgimento da lesão (Broughton et al., 2006). Ao lado dos macrófagos residentes, a maior parte dos macrófagos no local da ferida é recrutada do sangue por uma série de fatores quimiotáticos, como citocinas pró inflamatórias e fatores de crescimento (Barrientos et al., 2008; Werner & Grose, 2003). Além de suas funções imunológicas, como células apresentadoras de antígenos e fagócitos, os macrófagos desempenhariam um papel integral no sucesso da resposta de cura através da síntese de inúmeros fatores de crescimento potentes que promovem a proliferação celular e a síntese de moléculas de matriz extracelular (DiPietro; Polverini, 1993).

Os macrófagos são importantes para a remodelação da matriz extracelular e migração celular (DiPietro; Polverini, 1993; Werner; Grose, 2003; Broughton et al., 2006). A reepitelização é então iniciada por macrófagos que estimulam fibroblastos com IL-1 e fator de crescimento de queratinócitos. Assim, fibroblastos provocam a proliferação e migração de queratinócitos para a área da ferida (Broughton et al., 2006). Após essa fase, os macrófagos iniciam a secreção de TNF e fator de crescimento derivado de plaquetas, estimulando fibroblastos da região a produzirem uma matriz provisória composta de colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina (Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007).

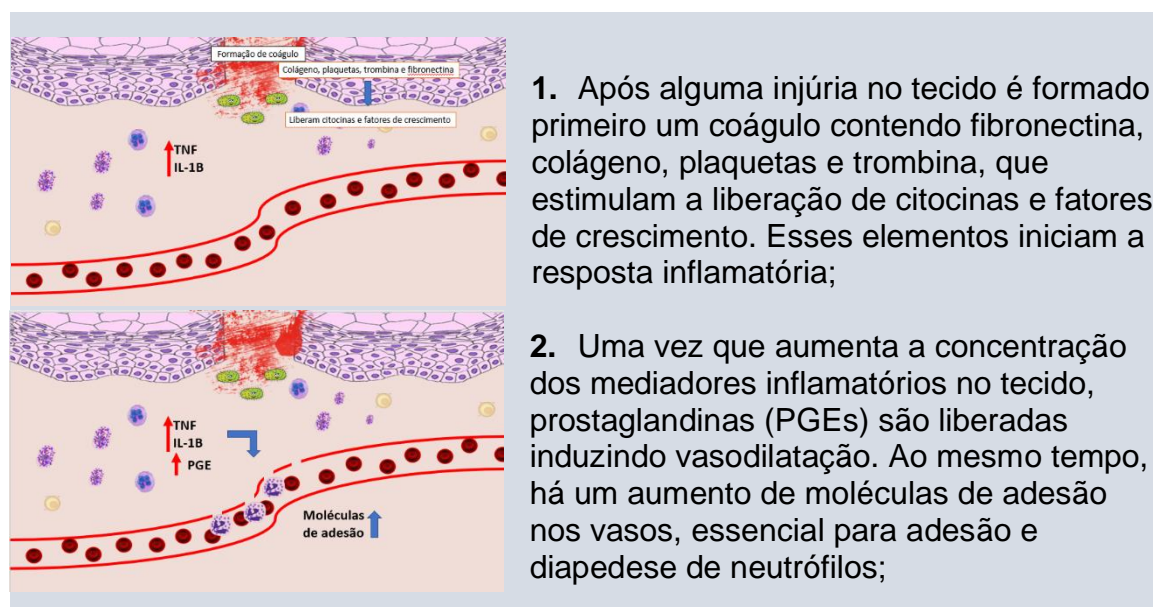
A progressão do processo de reparo do tecido envolve a regulação da concentração de vários fatores no tecido como diminuição de citocinas inflamatórias por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Eming et al., 2007) ou TGF- β 1 (Werner; Grose, 2003; Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007), aumento da concentração de moléculas anti-inflamatórias, como antagonistas do receptor de IL-1 ou de receptores de TNF (Eming et al., 2007). Braun et al. (2002) mostrou que a presença prolongada de IL-1 β e TNF- α prolonga o tempo de inflamação em feridas induzidas em pele de camundongos.

A partir disso, fibroblastos já localizados no local da ferida começam sintetizando colágeno e depois transformam-se em miofibroblastos para a contração da ferida (induzido pelo TGF- β ativo por macrófagos e fibroblastos) (Broughton et al., 2006). TGF- β e fator de crescimento derivado de plaquetas

estimulam os miofibroblastos a contrair, fechando a ferida (Broughton et al., 2006). O TGF- β também direciona a construção da matriz, em seus picos de concentração depois de 7 a 14 dias da indução da ferida. A matriz torna-se mais espessa e resistente, devido a substituição das proteoglicanas e fibronectina por colágeno tipo I (Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007). A molécula de colágeno é composta basicamente por uma sequência repetida de três aminoácidos, com cerca de 30% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina e 1% de hidroxilisina (Porfírio et al., 2016). A hidroxiprolina é um importante marcador e componente de estabilidade das fibras colágenas, pois os grupos hidroxila da hidroxiprolina ajudam a estabilizar a estrutura de tripla hélice do colágeno, formando ligações de hidrogênio (Burjanadze; Veis, 1997).

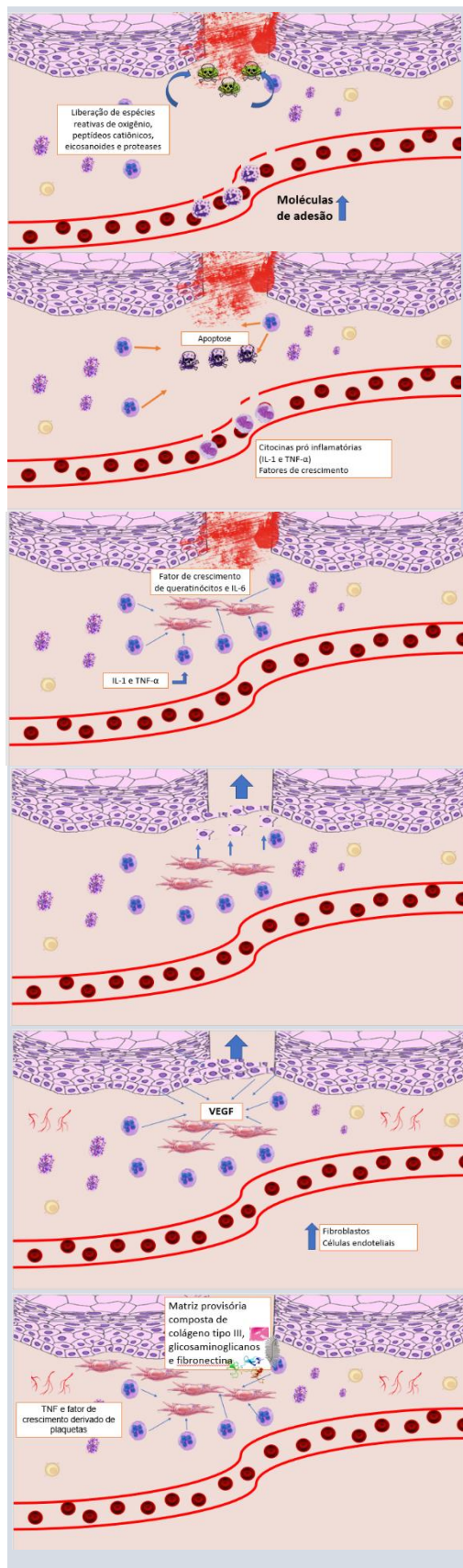
Nas fases seguintes do processo de reparo, macrófagos e fibroblastos estimulam queratinócitos a expressar fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor*), provocando a proliferação de células endoteliais e a formação de capilares (Broughton et al., 2006), dando início à angiogênese. Szpaderska et al. (2005) avaliaram a angiogênese em injúrias induzidas em mucosa oral e pele de camundongos. Nos dois tecidos o desenvolvimento de novos vasos ocorreu dentro dos 7 primeiros dias pós injúria, atingindo sua vascularização máxima no quinto dia pós indução da lesão. Abaixo, um resumo do processo inflamatório descrito:

Quadro 2.1 – Esquema explicativo do da resposta imune inata do processo inflamatório.



1. Após alguma injúria no tecido é formado primeiro um coágulo contendo fibronectina, colágeno, plaquetas e trombina, que estimulam a liberação de citocinas e fatores de crescimento. Esses elementos iniciam a resposta inflamatória;

2. Uma vez que aumenta a concentração dos mediadores inflamatórios no tecido, prostaglandinas (PGEs) são liberadas induzindo vasodilatação. Ao mesmo tempo, há um aumento de moléculas de adesão nos vasos, essencial para adesão e diapedese de neutrófilos;



3. Os neutrófilos recrutados dos vasos sanguíneos removem o tecido desvitalizado e fagocitam os agentes infecciosos. Para isso, os neutrófilos liberam uma grande variedade de substâncias antimicrobianas e proteases.

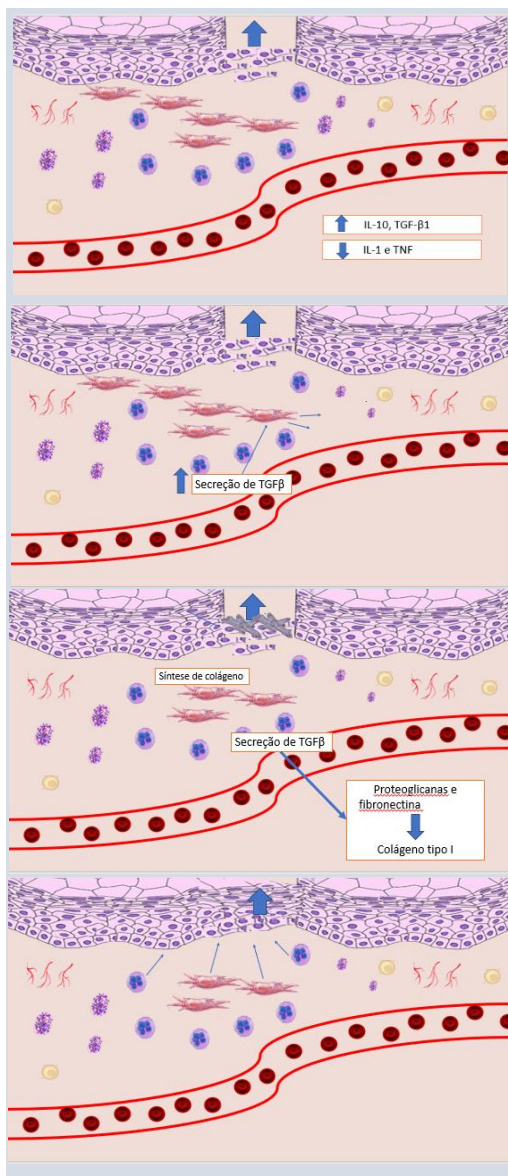
4. A menos que os recrutadores de neutrófilos persistam no local da lesão, a infiltração de neutrófilos é interrompida após alguns dias. Esses neutrófilos são fagocitados por macrófagos (residentes ou recrutados de vasos sanguíneos por citocinas inflamatórias e fatores de crescimento);

5. A reepitelização começa quando as citocinas IL-1 e TNF estimulam macrófagos a induzir fibroblastos a liberar IL-6 e fatores de crescimento de queratinócitos (KGF);

6. IL-6 e KGF estimulam os queratinócitos a migrarem para a região da lesão, onde proliferarão e se diferenciarão para formar as camadas do epitélio;

7. A liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) por macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais induz a proliferação de fibroblastos e mais células endoteliais, gerando novos tubos capilares.

8. Depois disso, os macrófagos secretam mais TNF e fatores de crescimento, estimulando a proliferação de fibroblastos na região e a produção de uma matriz provisória composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina;



9. A progressão do processo de cicatrização envolve a regulação de vários fatores. Uma delas é a regulação da concentração de citocinas: as citocinas pró-inflamatórias diminuem, enquanto as citocinas anti-inflamatórias aumentam.

10. Os macrófagos começam a secretar TGF-β que estimulam a transformação de fibroblastos em miofibroblastos.

11. Os miofibroblastos migram para a região da lesão, promovendo contração e fechamento da lesão. O TGF-β também estimula a substituição de uma matriz formada por proteoglicanos e fibronectina por uma matriz mais espessa e resistente, formada pelo colágeno tipo I.

12. Esse processo continua até o tecido recompor sua integridade.

Fonte: o autor.

2.2 O tratamento oncológico e a mucosite oral

Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (França, 2018), o câncer é uma doença com crescente incidência ao longo dos anos. Se somarmos as neoplasias de cabeça (lábio e cavidade oral) e pescoço (laringe, faringe, nasofaringe, esôfago e orofaringe), essa classe de neoplasias passa a ser a quinta mais frequente no mundo. De 2018 até 2040, é previsto um aumento de cerca de 50% de casos de neoplasia de lábio e cavidade oral. Para o Brasil, estimam-se 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres para cada ano de 2018 a 2020 (França, 2018).

O tratamento quimioterápico, assim como a radioterapia, baseia-se no bloqueio do ciclo celular, inibindo a mitose das células. Dessa forma, os fármacos quimioterápicos agem principalmente em células com alta divisão celular, o que não limita os seus efeitos citotóxicos apenas às células tumorais (Brunton et al., 2012; Chan et al., 2015). Células da mucosa bucal, trato gastrointestinal e medula óssea são exemplos de células que estão em constante mitose, tendo como consequência o comprometimento de sua integridade, causando efeitos colaterais debilitantes e aumento dos riscos de morbidade dos pacientes (Brunton et al., 2012; Chan et al., 2015).

Os quimioterápicos podem ser classificados com base no ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução. Dentre os tipos de quimioterápicos incluídos na classificação, encontramos os antimetabólicos, os agentes alquilantes, os antagonistas purínicos e os taxóis (Almeida et al., 2005; Brunton et al., 2012).

Os agentes antimetabólicos agem através do bloqueio bioquímico da síntese do DNA e são restritos à fase S do ciclo celular. Um exemplo de antimetabólico utilizado no tratamento do câncer é o Fluorouracil (5-Fluorouracil, 5-FU) (Almeida et al., 2005). O 5-FU promove severas alterações hematológicas e alterações no sistema gastrointestinal, incluindo danos importantes à cavidade oral, como mucosite oral (MO), aumento da susceptibilidade às infecções orais, hemorragia, alteração do paladar, disfagia, dor e hipofunção das glândulas salivares (Machado; Sawada, 2008).

Um dos efeitos mais debilitantes do tratamento oncológico é a MO. O paciente acometido com essa lesão tem uma diminuição em sua qualidade de vida, devido à dor severa e comprometimento das funções orais cotidianas, como fala, mastigação, gustação, deglutição e fonação (Machado; Sawada, 2008; Mazzeo et al., 2009; Mansano-Schlosser; Ceolim, 2012).

A etiopatologia da mucosite pode ser descrita em 5 fases (Sonis, 2011; Bowen et al., 2019). A primeira fase é chamada de “iniciação”, na qual o fármaco quimioterápico chega ao tecido por intermédio dos vasos sanguíneos (sistemicamente) e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando um estresse oxidativo. A radioterapia também causa estresse oxidativo, mas com ação local, diretamente na região do tecido que atinge. As EROs podem

levar a um dano letal da célula ou funcionar como ativador de fatores de transcrição. Dessa forma, na segunda fase, de “ativação”, as EROs ativam fatores de transcrição como NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) e STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), responsáveis por ativar genes associados a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Mesmo sem danos visíveis, há intensa atividade inflamatória que iniciará o dano ao tecido conjuntivo e endotélio, reduzindo a oxigenação e nutrição das células epiteliais, causando mais danos e morte celular (Sonis, 2011). A fase seguinte, de “amplificação de sinal”, promove um feedback positivo das citocinas inflamatórias: o NF- κ B é agora estimulado pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) a prosseguir sua atividade, amplificando o dano iniciado pela radiação ou agente quimioterápico. Segue então a fase úlceraiva, quando há perda da integridade da mucosa. Macrófagos, neutrófilos e mastócitos são observados em grande quantidade nessa fase, além de colonização bacteriana. Quando o estímulo nocivo provocado pelo tratamento oncológico cessa, o organismo progride para fase de cura, que corresponde à migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais, caracterizando a resolução das lesões na mucosa oral, quando o estímulo pelo quimioterápico ou radioterapia termina (Sonis, 2011).

O NF- κ B é o nome coletivo para um grupo de fatores de transcrição, que compreendem a família Rel, presente em quase todas as células. A família NF- κ B/Rel tem cinco membros: NF- κ B1 (p50/p105), o NF- κ B2 (p52/p100), p65 (Rel A), Rel 3 e C-rel (Sen; Baltimore, 1986; Huxford et al., 1999). Esse fator pode ser ativado por estresse oxidativo relacionado com os agentes antineoplásicos (cisplatina, taxóis, vincristina, vimblastina, entre outros) e outras drogas (fenobarbital, metanfetamina, tamoxifeno), mediadores apoptóticos, fatores de crescimento, hormônios e, como mencionado acima, citocinas inflamatórias (Siebenlist, 1997).

As duas vias mais bem descritas que conduzem a ativação de NF- κ B são as chamadas canônica e não-canônica, ou via clássica e alternativa, respectivamente. Em condições de repouso, os dímeros de NF- κ B estão ligados a proteínas I κ B inibitórias, que sequestram complexos NF- κ B inativos no citoplasma. Portanto, o passo regulador comum nestas duas vias é a ativação de um complexo de I κ B quinase (IKK) que provoca a fosforilação da parte inibitória do NF- κ B, o I κ B. Na via canônica, as proteínas fosforiladas são alvo da

ubiquitinação e degradação proteossômica, liberando os dímeros de NF-kB (p50 e p65) para que possam translocar para o núcleo (Gilmore, 2006; Okamoto et al., 2007). A via canônica é a via clássica do desenvolvimento da mucosite oral, que culmina principalmente na morte celular (apoptose). Além desse efeito, há influência na adesão celular, nas respostas imune inata e adaptativa, na resposta ao estresse celular, na inflamação e na remodelação tecidual (Gilmore, 2006; Oeckinghaus et al., 2011).

Após estímulo, o NF-kB pode também atuar como um estimulador de várias vias inflamatórias, como a das citocinas inflamatórias. Geralmente, picos de NF-kB precedem picos de citocinas pro-inflamatórias e assim permanece ativado até que o estímulo nocivo cesse (Al-Dasooqi et al., 2013).

As citocinas pro-inflamatórias mais associadas ao aparecimento de mucosite oral e ativadas pelo NF-kB são principalmente TNF α , IL - 1 β e IL - 6, excelentes marcadores da resposta inflamatória induzida pelo tratamento oncológico (Logan et al., 2008). Em outras lesões orais, como na estomatite aftosa recorrente e úlceras traumáticas, vários tipos de citocinas podem contribuir para o desenvolvimento da doença, como IL-2, IL-6 e TNF- α (Neville et al., 2016; Belenguer-Guallar et al., 2014) .

Apesar da destruição tecidual provocada pelo tratamento oncológico, foi detectado um aumento da expressão de citoqueratinas, principalmente as do tipo 1, 6 e 10, em mucosas afetadas pela MO em pacientes submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço, o que mostra uma tentativa do organismo em aumentar a resistência da mucosa oral durante o tratamento oncológico (Bonan et al., 2006). Entretanto, as altas doses de quimioterápicos ou radiação, durante o tratamento oncológico, acabam provocando destruição tecidual, um grande desafio para a qualidade de vida e recuperação de pacientes oncológicos (Bonan et al., 2006).

2.3 Fotobiomodulação com laser de baixa potência (PBMT)

Os equipamentos de laser são divididos na literatura em duas classes: lasers de alta e baixa potência. Os lasers de alta potência podem causar desidratação, coagulação, vaporização e ablação; sendo muitas vezes relacionados com efeito fototérmico no tecido irradiado. Por outro lado, os lasers de baixa potência geram reações fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas nas

células e no tecido, sendo seus três efeitos básicos: a modulação do processo inflamatório, analgesia e a reparação tecidual. Além disso, eles ainda podem ser subdivididos nos comprimentos de onda vermelho (λ 600-700 nm) e infravermelho (λ maiores de 780 nm), correspondendo à região com características energéticas e níveis de absorção e fotobiomodulação relevantes para a cadeia respiratória (Tunér et al., 2015; Cotomacio et al., 2017).

A excitação dos fotorreceptores de mitocôndria influencia o estado redox e a taxa do fluxo de elétrons para seu estado mais oxidado. Acredita-se que possam existir quatro reações primárias que explicariam os mecanismos celulares dessa fotobiomodulação. A primeira seria a aceleração de transferência eletrônica na cadeia respiratória, devido à mudança do estado redox, seguidos pela fotoexcitação de seus carreadores. A segunda seria a hipótese do óxido nítrico (NO), que regula a ativação da citocromo c-oxidase. Assim, com a luz laser e a ativação do fluxo de elétrons na molécula, a inibição parcial do NO seria revertida, aumentando a ligação por O_2 e as taxas de respiração (Emami et al., 1991; Karu, 2008). A terceira hipótese seria a de produção de pequenas quantidades de oxigênio singleto pelas porfirinas neutras ou os citocromos na célula (Karu et al., 1991; Lubart et al., 1992). A última seria a do ânion superóxido, na qual haveria aumento da produção desse ânion após estímulo pelo laser e ativação da cadeia respiratória (Karu et al., 1993). Esses mecanismos ocorrem simultaneamente, estimulando o estado redox da mitocôndria para seu estado mais oxidado. Após esses estímulos mitocondriais, haveria o aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP), de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), do potencial redox, do cálcio intracelular e aumento do pH, que sinalizariam estímulos ao núcleo celular, resultando nos efeitos biológicos de interesse terapêutico (Karu, 2008). Apesar da citocromo c-oxidase ser o cromóforo mais estudado como um dos principais fotorreceptores do laser nos tecidos estimulados pela luz vermelha, um estudo recente realizado por Lima et al. (2019) mostrou que linhagens sem a expressão de citocromo c-oxidase foram capazes de proliferar da mesma forma que àquelas que expressavam a molécula na mitocôndria após exposição à PBMT. Esses resultados sugerem a existência de outros fotorreceptores nas células capazes das mesmas funções de biomodulação, principalmente relacionados à proliferação celular.

Com relação ao estímulo dos fotorreceptores de membrana pela luz infravermelha, seria produzida uma mudança da relação Na^+/H^+ e um aumento da atividade de Na^+/K^+ ATPase. Isso provocaria um aumento no influxo de cálcio e conseqüentemente o aumento de sua concentração intracelular, o que induziria aos efeitos biomoduladores (Smith, 1991).

A excitação dos cromóforos celulares resultaria em um aumento da síntese de DNA e RNA e, assim, os principais efeitos da terapia de fotobiomodulação: proliferação celular (por exemplo, de fibroblastos e células epiteliais), o aumento da motilidade celular e a angiogênese. Esses efeitos biológicos estão diretamente relacionados à reparação tecidual, através da ativação de genes e da modulação da concentração de espécies reativas de oxigênio (Corazza et al., 2007; França et al., 2009). Além disso, há indícios que a PBMT favorece a síntese de colágeno, inibe apoptose e é capaz de modular citocinas e fatores nucleares relacionados à inflamação, propiciando modulação inflamatória e melhor organização tecidual para a reparação (Karu, 2008; Pandeshwar et al., 2016; Sonis et al., 2016; Tunér et al., 2015).

A fotobioestimulação, em seu comprimento de onda e energias adequados, teria também a capacidade de aumentar o limiar de dor dos pacientes ao impedir a propagação de potenciais de ação advindos de estímulos dolorosos e ao estimular a liberação de encefalina e endorfina, favorecendo a analgesia (Chow et al., 2007).

Quanto à ação anti-inflamatória, o efeito da fotobiomodulação nas citocinas inflamatórias tem mostrado diminuição da concentração de interleucinas e $\text{TNF-}\alpha$ (Simunović-Soskić et al., 2010), provavelmente associado a uma modulação da via COX, que levaria a uma diminuição da liberação de prostaglandinas (Wallace, 2006; Gao; Xing, 2009; Šimunović-Šoškić et al., 2010). Outras vias também parecem ser moduladas para diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a via do NF-KB (Gupta et al., 2015) o que poderia proporcionar a proliferação celular, deposição de colágeno e contração da ferida no processo de reparo (Simões et al., 2009; Gao; Xing, 2009; Gupta et al., 2014, 2015). Outros estudos também mostraram efeito positivo da PBMT na modulação de $\text{TNF}\alpha$, tanto para o tratamento de MO (Campos et al., 2016; Wagner et al., 2016) quanto em tratamento de úlceras orais não causadas por quimioterápico (Gupta et al., 2014, 2015). Essa resposta tecidual a ação da PBMT parece ser dependente da

quantidade de energia e protocolo utilizado (Lopes et al., 2010; Gupta et al., 2014; Cotomacio et al., 2017).

2.4 PBMT e as lesões orais

A maioria das lesões orais causa grande desconforto e pode estar associada a um trauma local, infecções ou doenças imuno-hematológicas. O controle delas depende de sua apresentação clínica, podendo incluir drogas imunossupressoras, corticosteroides tópicos e sistêmicos ou soluções anestésicas e antimicrobianas (Pereira et al., 2014; Suter et al., 2017). Entretanto, a maioria desses medicamentos envolve algum efeito colateral que pode comprometer a saúde dos pacientes.

A PBMT tem sido empregada para o tratamento de vários tipos de lesões orais, como úlceras traumáticas, estomatites aftosas recorrentes e mucosite oral, sendo uma alternativa não invasiva e que não provoca efeitos colaterais nos pacientes. Wagner et al. (2013) demonstraram os efeitos benéficos da PBMT, com comprimento de onda vermelho, em úlceras traumáticas orais em língua de rato, comparando energias de 0,16J por ponto ($4\text{J}/\text{cm}^2$ – total de 0,32J) e 0,8J por ponto ($20\text{J}/\text{cm}^2$ - total de 1,6J), com uma potência de 40mW e área do spot de $0,04\text{ cm}^2$. A PBMT com 0,16J de energia por ponto foi capaz de acelerar a reepitelização e o processo de reparo da mucosa, em comparação com a energia de 0,8J por ponto. Em outro estudo, Carvalho et al. (2015) analisaram úlceras induzidas com formocresol na gengiva de ratos, que foram tratadas com 0,19J por ponto, com PBMT 660 nm ($4,8\text{J}/\text{cm}^2$, 40 mW) e descreveram resultados positivos para o tempo de reparo da mucosa em relação ao grupo que não recebeu tratamento. Outros estudos em humanos demonstraram a capacidade da PBMT em diminuir a dor de pacientes com úlceras aftosas recorrentes (Lalabonova; Daskalov, 2014; Suter et al., 2017) e na síndrome de Beçet (Babu et al., 2016).

A PBMT para tratamento das úlceras traumáticas apresenta melhores resultados quando comparados ao grupo placebo ou aos tratamentos paliativos mais comuns (Suter et al., 2017), principalmente por não apresentar efeitos colaterais (infecções oportunistas, por exemplo) como ocorre com o uso de corticosteroides tópicos por período prolongado (Pereira et al., 2014; Suter et al., 2017).

Apesar disso, os efeitos da PBMT parecem ser mais evidentes em organismos e tecidos mais debilitados, ou seja, em células em estado redox diminuído (Yamamoto et al., 1996; Tunér et al., 2015). Tal fato é suportado pela quantidade de estudos e evidências que demonstram a capacidade da PBMT em prevenir ou tratar a mucosite oral - efeito colateral dos tratamentos de RTCP ou QT (Tabela 2.1).

Estudos clínicos demonstraram a eficácia do PBMT no tratamento da MO e no aumento do conforto dos pacientes oncológicos. Autores sugerem que o PBMT é eficaz na prevenção, redução da severidade das lesões de mucosite e na diminuição da dor (Tabela 2.1). Guedes et al. (2018) avaliaram, em dois grupos, duas energias diferentes de 0,25J e 1J para MO decorrente de RTCP, em 25 mW e 100mW respectivamente. Ambas energias foram capazes de controlar a frequência, duração e severidade da MO, mas a energia de 1J mostrou-se um pouco melhor.

Weissheimer et al., 2017 demonstraram que a energia de 0,24J com 100mW de potência em 33 pontos foi efetiva para prevenir MO. Schubert et al. (2007) usaram o comprimento de onda infravermelho e vermelho de laser de baixa potência, em 60 e 40 mW respectivamente, com 2J/cm² (0,08 J por ponto e total de 3,84 J de energia), em 70 pacientes que passaram por transplante de medula óssea. O grupo que recebeu o comprimento de onda vermelho apresentou melhores resultados que o grupo infravermelho, comparando a severidade da mucosite oral e dor.

Antunes et al. (2007) também testaram os efeitos do comprimento de onda vermelho em 38 pacientes que receberam transplante de medula, com dose de 4 J/cm² (0,78 J por ponto e total de 11,76 J de energia por região), verificando uma diminuição na incidência da MO. Quase dez anos mais tarde, o mesmo grupo (Antunes et al., 2016), ao utilizar a energia de 1J por ponto com PBMT no comprimento de onda vermelho, detectou menor morbidade entre os pacientes, com graus de MO entre 0 e 1 no grupo laser, enquanto o grupo placebo apresentou graus entre 2 e 3.

Antunes et al. (2017) verificaram que a PBMT pode melhorar a sobrevivência de pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com QT e RTCP. Outros trabalhos, em que a PBMT foi aplicada em doses menores (0,24 J) para o tratamento e prevenção de mucosite oral, também relataram menor tempo de

reparação das lesões e menor quantidade de uso de medicação analgésica (Campos et al., 2009; Simões et al., 2009).

Na literatura (Tabela 2.1), a principal indicação é a aplicação do PBMT em MO com laser de baixa potência no comprimento de onda vermelho em um número de pontos que cubram toda a cavidade oral, com possibilidade de associação com o laser infravermelho, quando necessidade de maior analgesia (Medeiros-Filho et al., 2017) ou quando o grau de MO é maior que 1 ou 2 (Amadori et al., 2016; Leite Cavalcanti et al., 2018; Soto et al., 2015).

As energias por ponto que mostraram melhores resultados quanto à diminuição da severidade da MO e analgesia em trabalhos clínicos variaram de 0,08 a 3J (Tabela 2.1). Entretanto, cerca de 70% dos trabalhos selecionados usaram energias de até 1J, todos evidenciando o potencial bioestimulador, anti-inflamatório e/ou analgésico da PBMT. Os trabalhos com energias mais altas em baixa potência ou com o laser de alta potência em modo desfocado (Gobbo et al., 2016; Simões et al., 2009), mostraram-se mais eficazes para analgesia do que para indução do reparo das lesões. O laser de alta potência ou altas energias devem ser utilizados com cautela, pois podem causar dano térmico e necrose tecidual (Campos et al., 2016). Dessa forma, parece ser melhor utilizar energias menores que 1J em uma maior quantidade de pontos (Simões et al., 2015).

Modelos animais também têm sido utilizados com sucesso para determinar o melhor protocolo de PBMT que mantenha MO em graus baixos e acelere a reparação. Seguindo o modelo de indução de MO em hamsters, proposto por Sonis et al. (1990), alguns estudos testaram os efeitos do PBMT na MO. Em 2009, França et al. (2009) observaram que o grupo que recebeu PBMT (660 nm, 30 mW, 1,2 J/cm² em quatro pontos de 0.4J de energia cada) em lesões de mucosite oral, apresentaram cicatrização mais rápida que o grupo que não recebeu tratamento. Outro estudo usou 96 hamsters divididos nos grupos Controle (sem tratamento) e em grupos experimentais (PBMT para prevenção de MO; PBMT para tratar MO e ambos), mostrando resultados positivos, reduzindo os níveis de MO quando a PBMT foi aplicada no protocolo terapêutico, em 40mW, 6,6 J/cm² e 0,24 J de energia por ponto, sendo 6 pontos de 6 segundos cada, em contato com o tecido (Lopez et al., 2013). Em 2015, Cruz et al. (2015) aplicaram uma maior dose de 120 J/cm², 40 mW e 4,4 J de energia na mucosa dos hamsters, que receberam o mesmo protocolo de indução de mucosite oral, mas perceberam a completa

cicatrização das lesões de MO apenas no 10^o dia de experimento. Esses resultados mostram que a PBMT promove a cicatrização da mucosite oral, mas a diferença no tempo de reparo pode estar relacionada com a energia aplicada na superfície do tecido, que não deve ser nem muito alta, nem muito baixa (Simões et al., 2015; Tunér et al., 2015). Mais recentemente, Cotomacio et al. (2017) demonstraram que energia mais baixa (0,24J em um ponto) e centralizada na região da lesão apresentaram melhores resultados na reparação das feridas, quando comparada com a aplicação de energias mais altas, distribuídas ou centralizadas em apenas um ponto (4 pontos ao redor da lesão de 0,24J e 1J em ponto centralizado). Assim, energias mais baixas parecem ter propriedades mais biomoduladoras, enquanto energias mais altas parecem ter propriedades mais relacionadas à analgesia.

O guia para manejo da MO publicado pela MASCC/ISOO de 2014 (Lalla et al., 2014) já assumiu a PBMT como uma técnica de intervenção no tratamento ou prevenção dessa lesão com trabalhos nível 3 de evidência científica, mas ainda sem trabalhos suficientes para determinar o melhor protocolo a ser utilizado. Em 2019 (Zadik et al., 2019), uma atualização do guia de manejo de pacientes oncológicos, mostrou a indicação da fotobiomodulação com nível de evidência científica 2 para prevenção de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com RTCP ou QT e RTCP. Dessa forma, já é de conhecimento que a PBMT traz benefícios para o manejo do paciente oncológico quanto à MO, mas ainda há bastante divergência quanto ao protocolo que gera os melhores efeitos de reparo nessa lesão e, além disso, os efeitos histológicos e clínicos de diferentes protocolos ainda não foram totalmente elucidados

Na literatura existem diversos protocolos, que variam desde o comprimento de onda utilizado até a energia aplicada, tanto em trabalhos com humano, quanto com animais, principalmente para o manejo da mucosite oral, induzida por QT ou RTCP (Tabela 2.1 e 2.2). Todos esses estudos demonstram algum efeito benéfico da PBMT, seja quanto à velocidade de reparo ou à diminuição da severidade, inflamação ou da dor. Entretanto ainda são escassas as evidências da influência da PBMT em lesões orais induzidas por quimioterápico ou principalmente de feridas traumáticas, desde o início do processo inflamatório até o término do reparo tecidual. Além disso, apesar da PBMT possuir diversos benefícios

terapêuticos, há ainda bastante divergência entre os protocolos utilizados e sua influência no processo inflamatório e na indução do reparo tecidual.

Como os trabalhos que abordam o tratamento da MO com PBMT são muito mais numerosos que os estudos sobre o tratamento de outros tipos de feridas clínicas em mucosa oral, as tabelas a seguir mostram um compilado de trabalhos clínicos (Tabela 2.1) e com animais (Tabela 2.2) com o uso de PBMT para tratar MO.

Tabela 2.1 - Trabalhos clínicos utilizando PBMT para o tratamento de mucosite oral #*

Autor	Tratamento e número de pacientes	Grupos	Comprimento de onda (nm)	Densidade de energia (J/cm²) e área[^] do spot (cm²)	Potência (mW) e tempo (s)	Energia por ponto (EP) e Energia total (ET)	Modo de aplicação (número de pontos, regiões irradiadas e número de sessões)	Desfecho
Legouté et al., 2019	51 QT, RTCP	Grupo Placebo Grupo tratamento	He-Ne 658 nm	4 J/cm ²	100 mW 40 s por sítio de 1 cm ²	4J	1 sessão por dia 5 dias consecutivos, com grau de MO > ou =2	Maior analgesia para o grupo que fez recebeu PBMT
Noirrit-Esclassan et al., 2019	22 QT	Estudo prospectivo, Comparou pré e pós tratamento	635 nm	4 J/cm ²	635 nm:150 mW (30 s por 2-cm ² de área) 808nm: 3850 mW (30 s por 30 cm ² area to 50 s para 50 cm ²)		Aplicação 3x/ dia em MO grau > 2; Aplicação extraoral foi realizado o escaneamento combinado com vermelho e infravermelho na região das bochechas e regiões submandibulares.	A PBMT com dois modos de aplicação (intra e extraoral) foi capaz de aliviar a dor oral; não houve evidência relacionada ao grau de MO.
Pinheiro et al., 2019	31 QT e/ou RTCP	G1: laser G2 laser + PDT	PBMT: 660 nm PDT: curcumina	142 J/cm ²	100 mW 40s	EP: 4J	61 pontos, 1 x por semana, por 4 semanas	PBMT ou associação com PDT: redução da MO;

			+ LED 468 nm					Associação PBMT + PDT acelerou o processo de reparo
Marín-Conde et al., 2019	26 RTCP e/ou QT	Grupo controle Grupo tratamento	940 nm	83.3 0.036 cm ²	0.5W 6 s	3J 180J	72 pontos em contato perpendicular	Diminuiu incidência e severidade da MO
Soares et al., 2018	42 (RTCP), sendo 16 com QT associada	Grupo vermelho e infravermelho G2 vermelho	Diodo 660 e 808 nm	300 J/cm ² 0,03 cm ²	100 mW 90 s	9J	Aplicação duas vezes na semana; Foi usado um ponto para cada 4 cm ² de lesão O laser foi aplicado extra oralmente em regiões inacessíveis	A combinação de vermelho e infravermelho diminuiu o grau de MO e prescrição de analgésicos.
Guedes et al., 2018	59 (RTCP)	G1: 0.25 J/ ponto G2: 1.0 J/ ponto	Diodo 660 nm	G1: 6.3J/cm ² e 0,04 cm ² G2: 33J/cm ² e 0,03cm ²	G1: 25 mW G2: 100 mW 10 s	EP: G1: 0,25J G2: 1 J ET: G1: 5J G2: 20J	Aplicações pelo menos 4 x/semana do primeiro dia da RTCP até a resolução das lesões de MO; 20 Pontos: em mucosas labiais, mucosas jugais, língua, assoalho da boca e orofaringe (3 pontos horizontais);	A PBMT com altas doses de energia (1,0 J versus 0,25 J) produz uma pequena vantagem na melhora e prevenção da MO induzida pela RTCP.

Leite Cavalcanti et al., 2018	52 (QT)	Preventivo: 660 nm Terapêutico (MO acima de 1): 808 nm	Diodo 660 ou 808 nm	3.3 J/cm ² 0,03 cm ²	100mW 10 s	EP: 1 J ET: 31J	Aplicações diárias de laser com comprimentos de onda de 660 nm e 808 nm 31 pontos: mucosas jugais, palato, lábios, dorso da língua, bordas laterais da língua e assoalho oral.	Preveniu e tratou as lesões de MO.
Brandão et al., 2018	152 (QT+ RTCP)	Estudo retrospectivo; pacientes que receberam PBMT	Diodo 660 nm	10 J/cm ² 0,04 cm ²	40 mW 10 s	EP: 0,4J ET: 11,2	5 dias consecutivos de aplicação, logo após RTCP; 28 pontos: Comissuras, mucosas labiais, mucosas jugais, língua, assoalho e palato mole	PBMT é segura para a prevenção da MO em pacientes com CEC, pois não alterou a recorrência de CEC na cavidade oral.
González-Arriagada et al., 2018	216 (RTCP)	G1: controle G2: PBMT	Diodo 660 nm	60 J/cm ² 0,016 cm ²	100mW 10s	EP: 1J ET: 27 J	PBMT começou no mesmo dia da RTCP, aplicada 3 vezes/semana, 30 minutos antes da sessão de RTCP 27 pontos: mucosas labiais, palato, mucosas jugais, língua, superfície ventral da língua, e assoalho evitando área de neoplasia.	Menor interrupção do tratamento oncológico e menor número de instalação de sondas em relação ao controle.

Weissheimer et al., 2017	99 (TMO)	G1: 3 sessões de PBMT/semana G2: PBMT sessões diárias	Diodo 660 nm	6 J/cm ² 0,04 cm ²	G1: 100 mW 2,4 s G2: 40 mW 6 s	EP: 0,24J ET: 7,92J	Sessões diárias (G2) ou 3 vezes/semana (G1); 33 pontos: lábios, comissuras labiais, mucosas jugais, língua e assoalho da boca.	PBMT foi efetiva em prevenir MO, mesmo apenas em 3x na semana
Antunes et al., 2017	94 (QT cisplatina + RTCP)	Grupo Laser Grupo placebo	Diodo 660 nm	4 J/cm ² 0,24 cm ²	100 mW 10 s	EP: 1J ET: 72J	A aplicação preventiva do laser foi realizada diariamente, de segunda a sexta-feira e antes da aplicação da RTCP; 72 pontos no total; Uma sessão por dia (em média 45,7 dias).	PBMT teve impacto positivo na resposta ao tratamento do câncer e na sobrevivência dos pacientes.
Salvador et al., 2017	51 (TMO + QT)	Grupo Controle: (orientações de higiene) Grupo PBMT	Diodo 660 nm	4 J/cm ² 0,04 cm ²	40 mW 4 s	EP: 0,16J ET: 12,8J	Receberam do primeiro dia de condicionamento até D+7; 80 pontos: mucosas labiais, jugais, língua e assoalho da boca, em contato com distância de 1 cm entre um ponto e outro;	PBMT: redução na gravidade da MO nos dias de maior severidade desse efeito citotóxico no epitélio oral.

Rodrigues et al., 2017	79 (TMO)	Estudo coorte	Diodo 660 nm	3,75 J/cm ² 0,04 cm ²	15 mW 10 s	EP: 0,15 J	Receberam laser do primeiro dia do condicionamento até o segundo D+2; Quatro sítios anatômicos da mucosa oral (lado direito e esquerdo da mucosa jugal, mucosas labiais, língua e assoalho da boca).	Controle da incidência e gravidade da MO.
Medeiros-Filho et al., 2017	18 (QT ou QT+RTCP)	Estudo "Split mouth" Um lado recebeu PDT (5 min de fotossensibilizante) + PBMT vermelho e outro só PBMT vermelho	PBMT: Diodo 808 nm para analgesia e 660 nm para biomodulação PDT: (azul de metileno 0,005% + 660 nm)		PBMT: 10 s PDT: 100 mW 90s	PBMT: EP: 4J ET: 8J PDT 9J	8 dias de aplicações PDT: aplicado a distância de 1 cm da superfície; PBMT: em contato, perpendicular: 2 pontos com 1 cm de distância, em uma mesma lesão escolhida em cada lado da boca.	PDT + PBMT demonstraram um efeito terapêutico maior em comparação com PBMT sozinho para redução da gravidade da MO.
Amadori et al., 2016	123 (TMO)	GA: grupo PBMT	Diodo 830 nm	4,5J/cm ² 1 cm ²	150 mW 30 s	EP: 4,5 J	Aplicações a partir do 1º dia de diagnóstico de MO e continuou por mais 3 dias;	Não houve diferença de reparo da MO entre os dois grupos,

		GB: grupo placebo					Pontos em mucosa bucal, mucosa labial, língua, assoalho da boca e palato mole.	apenas na redução da dor. GA teve menor dor que GB.
Antunes et al., 2016	94 (RTCP e/ou QT)	G1: grupo laser G2: grupo placebo	Diodo 660 nm	4 J/cm ² 0,24 cm ²	100 mW 10 s	EP: 1J ET: 9 J	A aplicação preventiva a laser foi realizada diariamente; 9 pontos de aplicação; Os pacientes receberam laser em uma media de 45 dias.	Menor morbidade; Graus de MO entre 0 e 1 no grupo laser, enquanto o grupo placebo apresentou graus entre 2 e 3.
Ferreira et al., 2016	35 (TMO)	Grupo Laser Grupo Placebo	Diodo 650 nm	70 J/cm ² 0,028 cm ²	100 mW 20 s	EP: 2J ET: 54J	- Aplicações do 1º ao 5º dia de condicionamento pre transplante - 27 pontos: mucosas labiais, mucosas jugais, língua, região retromolar, palato mole e assoalho bucal	Prevenção de lesões severas de MO e dor em relação ao placebo.
Bezinelli et al., 2016	69 (TMO)	69 pacientes	Diodo 660 nm	6 J/cm ² 0,04 cm ²	40 mW 6s	EP: 0,24J	-As aplicações eram realizadas até a pega da medula. -Pontos distribuídos por toda mucosa: mucosas jugais, mucosas labiais,	Melhora do escore de qualidade de vida ao longo do tempo

							língua, assoalho da boca e palato mole.	
Silva et al., 2015	39 (TMO)	Grupo controle Grupo laser	Diodo 660 nm	4J/cm ² 0,04cm ²	40 mW 4 s	EP: 0,16J ET: 12,8 J	- Aplicação feita do primeiro dia do condicionamento até 7 ^o dia após transplante - 80 pontos: mucosas labial, mucosas jugais, língua e assoalho bucal.	Redução da gravidade da MO
Soto et al., 2015	24 (TMO)	G1: grupo laser G2: grupo sem laser (grupo retrospectivo)	Diodo 685 nm intraoral (IO) e 830 nm extraoral (EO)	IO: fibra ótica de área 600um EO: fibra ótica de área 600µm	IO: 35 mW 10 s EO: 80 mW 30 s	EP IO: 0,35J EO: 2,4J ET IO: 6,65 EO: 14,4	Aplicações 4 x por semana, do 1 ^o dia de condicionamento até a cura total das lesões; IO: 19 pontos distribuídos na mucosa labial e bucal, a face ventral da língua e o assoalho da boca; EO: 6 pontos	Limitações menos severas na deglutição para o grupo laser; Aplicação EO foi realizada para tratar a região orofaríngea
Oton-Leite et al., 2015	30 (QT+RTCP)	G1: PBMT G2: placebo	Diodo 660 nm	6.2J/cm ² 0,04 cm ²	25 mW 10 s	EP: 0,25J ET: 15,25J	35 aplicações (3 vezes na semana por 7 semanas): 61 pontos: mucosa jugal (dez pontos de cada lado), mucosa labial (oito pontos), palato duro (três pontos), língua: lateral	Menores graus de MO nos dias no grupo laser em relação ao controle; Menor concentração de TNF-α e IL-

							(dez pontos cada lado), dorsal (três pontos), palato mole (três pontos), assoalho da boca (dois pontos) e na comissura labial (um ponto de cada lado).	6 no grupo laser (atenuação do processo inflamatório).
Gautam et al., 2015	46 (RTCP)	G1: PBMT G2: placebo	HeNe 632.8 nm	3 J/cm ² 1 cm ²	24 mW 125 s	EP: 3 J ET: 36J	5 sessões por semana; 12 pontos: lateral e ventral da língua, mucosa labial, mucosa jugal, assoalho da boca e palato.	Redução na incidência e duração da MO grave, dor severa e menor perda de peso no grupo laser
Silva et al., 2015	30 (TMO)	G1: PBMT G2: controle	Diodo 660 nm	4 J/cm ² 0.04 cm ²	40 mW 4 s	EP: 0,16J ET: 12,8J	80 pontos: mucosa dos lábios, mucosa bucal direita e esquerda, língua lateral direita e esquerda, e língua ventral e assoalho bucal, dando um total de dez pontos por região	Prevenção de graus 3-4 MO.
de Paula Eduardo et al., 2015	71 (TMO/ QT)	G1: crioterapia oral + PBMT G2: PBMT	Diodo 660 nm	6 J/cm ² 0,04 cm ²	40 mW 6 s	EP: 0,24J	A PBMT até enxerto de medula óssea; Aplicações em locais mais comuns de OM na mucosa oral (mucosa oral direita e esquerda,	A associação entre crioterapia e PBMT foi eficaz na redução da

							mucosa labial superior e inferior, borda lateral da língua, assoalho da boca e palato mole).	gravidade da MO.
Freitas et al., 2014	40 (QT)	G1: PBMT G2: LED	Diodo 660 nm LED: 630 nm	PBMT: 6 J/cm ² 0,04cm ² LED: 0.24J/cm ² 1cm ²	PBMT: 40 mW 6s LED: 80mW 3s	EP: 0.24 J ET: 21J	Aplicação em 10 dias consecutivos; 90 pontos no total: mucosas jugais mucosas labiais, palato duro e mole, língua, assoalho da boca e comissuras labiais.	LED e PBMT foram eficientes na prevenção de interrupções no tratamento antineoplásico, melhoraram qualidade de vida dos pacientes e redução do custo do tratamento período de hospitalização.
Bezinelli et al., 2014	167 (TMO)	G1: PBMT + cuidados higiene bucal (HB) G2: apenas cuidados HB	Diodo 660 nm	8J/ cm ² 0,04 cm ²	40 mW 8 s	EP: 0,32 J	Do primeiro dia do condicionamento até a pega da medula; Pontos em mucosa bucal bilateral, borda da língua, palato, assoalho da boca e mucosa labial e úvula quando tolerado pelo paciente.	A PBMT e os cuidados bucais contribuem para reduzir a morbidade resultante da MO e minimizam os cursos de internação.

de Castro et al., 2013	40 (QT)	Grupo A (GA) PBMT preventivo vermelho ou infravermelho; Grupo B (GB) PBMT após lesões de MO vermelho ou infravermelho	Diodo 660 e 808 nm	GA: 35 J/cm ² GB: 70 J/cm ² 0.028 cm ²	100 mW GA: 10 s GB: 20 s	EP: GA: 1J GB: 2J ET: GA: 19J	Grupo A: 5 dias consecutivos (preventivo) 19 pontos: mucosas jugais, mucosas labiais, assoalho da boca, língua, o palato mole e comissura labial. No palato mole, a aplicação do laser foi desfocada a uma distância de 1,5 cm Grupo B: Aplicado direto nas lesões de mucosite até sumirem as lesões Em contato, perpendicular e pontualmente	Os dois comprimentos de onda foram igualmente bons para prevenir e tratar lesões de MO
Oton-Leite et al., 2013	60 (RTCP)	Grupo PBMT Grupo placebo	Diodo 685 nm	30 J/cm ² 0,028 cm ²	35 mW 25 s	EP: 0,8J ET:47,2J	A 1ª sessão foi realizada uma semana antes do início da RTCP e as sessões seguintes ocorreram diariamente por 5 dias consecutivos antes de cada sessão de RTCP; 59 pontos: mucosas jugais, mucosas labiais, pregas palatinas, língua, palato mole, assoalho da boca e nas comissuras labiais.	Grupo laser apresentou menor severidade de MO, menor dor e maior fluxo salivar.

Antunes et al., 2013	47 (QT+RCTP)	Grupo PBMT Grupo placebo	Diodo 660 nm	4J/cm ² 0.24 cm ²	100mW 10 s	EP: 1 J ET: 54J	Diariamente por 5 dias consecutivos; 54 pontos: lábios, mucosa bucal direita e esquerda, borda lateral esquerda e direita da língua, assoalho bucal e língua ventral, totalizando nove pontos por região.	PBMT é eficaz na prevenção de graus 3-4 OM induzida pela QT + RTCP.
Arbabi-Kalati et al., 2013	48 (QT)	Grupo PBMT Grupo controle Grupo Placebo (L-)		5 J/cm ²	30 mW		2 pontos em cada mucosa jugal, 2 pontos na língua, 2 pontos no assoalho bucal, um no palato mole e um no palato duro.	Graus de MO e níveis de dor foram significativamente menores no grupo laser.
Gautam et al., 2012	121 (QT + RTCP)	Grupo PBMT Grupo Placebo	He-Ne 632.8 nm	3,5 J/cm ² 1 cm ²	24 mW 145s	EP: 3,5 J	Aplicações diárias, antes das sessões de RTCP, por 6,5 semanas; 6 áreas anatômicas: bordas da língua, assoalho da boca, Mucosa bucal, mucosa labial, palato mole e orofaringe.	Preveniu e tratou MO; Diminuiu incidência de dor, necessidade do uso de analgésico opióide e melhor funções orais no grupo laser.

Gouvêa de Lima et al., 2012	75 (RTCP + QT)	Grupo PBMT Grupo Placebo	Diodo 660 nm	2,5 J/cm ² 0,04 cm ²	10 mW 10 s	EP: 0,1 J	9 áreas anatômicas: lábios, mucosas jugais, dorso e ventre de língua, palatos duro e mole, gengiva e freio da lingual; Aplicações do 1º ao último dia da RTCP.	A PBMT não foi eficaz para reduzir graus 3 e 4 de OM, mas reduziu as interrupções da RTCP.
Carvalho et al., 2011	70 (RTCP + QT)	G1 e G2 com protocolos diferentes	Diodo 660 nm	G1: 3,8J/cm ² G2: 1,3 J/cm ² 0,04 cm ²	G1: 15 mW G2: 5 mW 10 s	EP: 0,15 J G1: 0,15 J G2: 0,05 J	8 áreas anatômicas; Aplicações em 5 dias consecutivos por semana do 1º ao último dia de RTCP.	PBMT (G1) controlou a intensidade da mucosite e dor.
Silva et al., 2011	42 (TMO)	Grupo PBMT Grupo Placebo	Diodo 660 nm	4J/cm ² 0,04 cm ²	40 mW 4 s	EP: 0,16 ET: 14,4	9 áreas anatômicas; 10 pontos por área anatômica; Aplicações D-4 até D+4.	A PBMT preventiva foi benéfica em reduzir o aparecimento e intensidade da MO
Zanin et al., 2010	72 (RTCP+QT)	Grupo PBMT Grupo Placebo	Diodo 660 nm	considerada 1 cm ²	30 mW 66s	EP: 2 ET:42	Aplicação 2 vezes por semana, por 7 semanas; 3 pontos em mucosa jugal, mucosa labial inferior e palato mole; 2 pontos em palato e carúnculas sublinguais; 5 pontos na língua.	Eficaz para prevenir e tratar MO, proporcionando o mais conforto e melhor qualidade de vida.

Lima et al., 2010	25 (RTCP+QT)	Grupo PBMT Grupo Placebo (com suspensão de hidróxido de alumínio)	Diodo 830 nm	12 J/cm ² 0,2 cm ²	15 mW 160s	EP: 2,4	12 áreas anatômicas; Aplicações do 1º ao último dia da RTCP.	O uso profilático dos dois tratamentos parece reduzir a incidência de lesões severas de MO, mas o PBMT foi mais eficaz em atrasar o aparecimento da MO
Kuhn et al., 2009	21 (QT ou TMO)	PBMT e placebo	Diodo 830 nm	4 J/cm ²	100 mW		Apenas lesões de MO eram irradiadas em 5 dias consecutivos.	PBMT reduziu a duração da MO induzida por QT.
Eduardo et al., 2009	30 (TMO)	Tratamento ou Prevenção de MO	Diodo 660 nm	4 J/cm ² (prevenção) e 6 J/cm ² (tratamento) 0,04 cm ²	40 mW 4 s (prevenção) ou 6 s (tratamento)	EP: 0,16 J (prevenção) ou 0,24 J (tratamento) ET: 14,08 J (prevenção) ou 21,12 J (Tratamento)	88 pontos na mucosa oral, 10 áreas anatômicas; Aplicações do primeiro dia de condicionamento até a recuperação neutrofílica ou reparo total das lesões.	PBMT manteve graus de MO entre os graus 1 e 2.

Simões et al., 2009	39 (RTCP)	G1: PBMT 3 vezes/semana G2: Associação do PBMT com alta potência 3 vezes/semana G3: PBMT 1 vez/semana	Diodo PBMT 660 nm e Diodo alta potência 808 nm	6 J/cm ² 0,04 cm ²	G1 e G3: 40 mW G2: 40 e 1000 mW 6 s	EP: 0,24 J ET: 21,6J	90 pontos em 19 áreas anatômicas 5 a 13 aplicações G1: PBMT 3 vezes/semana (40 mW); G2: Associação do PBMT com alta potência 3 vezes/semana (40 mW e 1W) G3: PBMT 1 vez/semana (40 mW)	PBMT com PBMT sozinho ou combinado com alta potência 3 vezes na semana manteve os graus de MO entre 1 e 2. Alta potência preveniu o aumento da dor.
Abramoff et al., 2008	13 (QT)	Grupo PBMT Grupo Placebo	Diodo 685 nm	72 J/cm ² 0,028 cm ²	35 mW 54 s	EP: 2 J ET: 50 J	25 pontos, 11 áreas anatômicas 3 aplicações ou mais	Menor desenvolvimento de MO, melhor recuperação e alívio da dor
Genot-Klastersky et al., 2008	26 (QT, com grau 2 MO) 36 (TMO)	2 estudos prospectivos	Combinação de lasers visíveis e infravermelho (IV)	2 J/cm ² 0,011 cm ²	100 mW (visível) e 50, 250 e 500 (IV) 33 s por sítio/6 min por sessão		11 áreas anatômicas 3 sessões por semana	PBMT foi eficaz e seguro em prevenir e tratar MO
Jaguar et al., 2007	49 (TMO)	Grupo PBMT	Diodo 660 nm	2,5 J/cm ² 0,04 cm ²	10 mW 10 s	EP: 0,1 J	8 áreas anatômicas;	PBMT promoveu

		Grupo Placebo					Do primeiro dia do condicionamento até D+2.	alívio da dor, reduziu severidade da MO e a administração de morfina.
Antunes et al., 2007	38 (TMO)	Grupo PBMT Grupo Placebo	Diodo 660 nm	4 J/cm ² 0,196 cm ²	46,7 mW 16,7 s	EP: 0,78 J ET: 128,7 J	165 pontos: 11 áreas anatômicas, 15 pontos por área; Aplicações no D-7 até recuperação neutrofílica;	Diminuiu a incidência de MO.
Cruz et al., 2007	60 (TMO/ QT)	G1: TMO G2: QT/ Irinotecan G3: MO em qualquer outro protocolo de QT	Diodo 780 nm	0,04 cm ²	60 mW		5 áreas anatômicas; Aplicações de 3 a 5 dias consecutivos a partir do início da QT.	Não significativa
Schubert et al., 2007	70 (TMO/ QT)	G1: PBMT 780 nm G2: PBMT 660 nm G3: placebo	Diodo 780 e 660 nm	2 J/cm ² 0,04 cm ²	G1: 60 mW G2: 40 mW 1 e 2 s respectivamente	EP G1: 0,06 J G2: 0,08 J ET G1: 2,88 J G2:	6 áreas anatômicas, 48 pontos; De 7 a 13 aplicações.	PBMT 660nm foi capaz de diminuir severidade da MO e dor

						3,84 J		
Arun Maiya et al., 2006	50 (RTCP)	Grupo PBMT (L+) Grupo Controle (L-)	HeNe 632,8 nm	1,8 J/cm ² 0,016 cm ²	10 mW 3 s	EP: 0,03 J	Terço posterior da mucosa jugal, palato mole e pilares tonsilares; 5 dias por semana até o término da RTCP.	Previne, trata MO e reduz dor
Bensadoun et al., 1999	30 (RTCP)	Grupo PBMT Grupo Controle	HeNe 632,8 nm	2 J/cm ² 1 cm ²	60 mW (1 paciente com 25mW) 33 s	EP: 2 J ET: 18 J	9 pontos: em área orofaríngea; 35 dias consecutivos com exceção dos finais de semana.	PBMT reduziu severidade e duração da MO e dor
Cowen et al., 1997	30 (TMO/ QT)	Grupo PBMT Grupo Controle	HeNe 632,8 nm	1,5 J/cm ² 0,4 cm ²	60 mW 10 s	EP: 0,6 J ET: 54 J	90 pontos: 6 sítios anatômicos, 15 pontos por sítio; Aplicações por 5 dias consecutivos (do D-5 até D-1).	Redução de severidade, duração da MO e dor (redução de administração de morfina)

#Estudos que apresentaram padrões incoerentes não foram incluídos.

*Parâmetros calculados com base nas informações de cada trabalho, a partir das fórmulas: $DE = \frac{P.t}{A}$ e $E = P.t$, na qual DE é densidade de energia (J/cm²), P é potência (W), t é tempo (segundos), A é a área (cm²) e E é energia (J).

^ Área deduzida pela marca do equipamento (lasers MMOptics tinham área de aproximadamente 0,04 cm²) (Simões et al., 2015).

Tabela 2.2 - Trabalhos em animais utilizando PBMT para o tratamento de mucosite oral #*

Autor	N	Modelo Experimental	Método Indução Mucosite	Grupos	λ (nm)	Potência (mW) e tempo (s)	DE (J/cm ²) e área do spot ^	Energia por ponto	Modo de aplicação	Resultados e efeitos
Vitória et al., 2018	8	<i>Hamsters</i>	5-FU + ranhura	-GI: controle -GII: PBMT no dia zero do estudo e a cada 48 horas até o sexto dia.	660	40 mW 60 s	2,4 J/cm ² 0,04 cm ²	0,096 J	Modo contínuo, em contato	Redução do grau de MO.
Bayer et al., 2017	24	Ratos Sprague-Dawley	5FU + ranhura	-Controle -Ozônio -Laser	940	1 W 20 s	7,14 J/cm ² 2,8 cm ²	20 J	2mm de distância (contato), modo contínuo	Laser mais eficaz que o ozônio no FGF e no PDGF.
Cotomacio et al., 2017	30	<i>Hamsters</i> Sírios	5FU + ranhura	Controle Controle QT PBMT 1 PBMT 2 PBMT 3	660	4 0mW Protocolo 1: 6 s Protocolo 2: 25 s Protocolo 3: 4 pontos de 6 s	6 J/cm ² 2,8 cm ²	PBMT 1: 0,24J, PBMT 2: 1 J PBMT 3: 4 pontos de 0,24J	Em contato, modo contínuo	Grupo que recebeu menor energia por ponto apresentou menores graus de MO

Campos et al., 2016	150	<i>Hamster Sírios</i>	5FU + ranhura	Controle Controle QT PBMT LED Alta Potência desfocado	660 (PBMT), 635 (LED) e 808 (alta potência)	40 mW; 120s e 1000s	6 J/cm ² 1,2 J/cm ² 10 J/cm ²	5 pontos de 0,24 (total: 1,2); 1 ponto de 1,2 J e Varredura (alta potência)	Contínuo, em contato; alta potência: desfocado em varredura	Os grupos PBMT e LED estimularam o declínio de TNF no dia 7 (p>0,05) e reparo total da MO no dia 10.
Bostanciklioglu et al., 2015	35	Ratos Wistar	5-FU + ranhura	G1: 1064 nm G2: 980 nm G3: 810 nm G4: 660 nm G5: controle	G1: 1064 G2: 980 G3: 810 G4: 660	G1: 0,25W, 9s G2: 0,1W, 10 s G3: 0,25W 9s G4: 0,1W, 60 s	G1: 8 J/cm ² , 0,28 cm ² G2: 8,3 J/cm ² 0,12 cm ² G3: 8 J/cm ² 0,28cm ² G4: 8 J/cm ² 0,75 cm ²	G1: 2,24J G2: 1J G3: 2,24 J G4: 6J	Modo pulsado e modo contínuo	Menores níveis de autofagia quando usados os lasers de 810 e 660 nm
Curra et al., 2015	96	<i>Hamsters machos</i>	5FU + ranhuras	Controle PBMT terapêutico PBMT preventivo PBMT combina- do.	660	40 mW 6s	6 J/cm ² 0,04 cm ²	0,24J 1.44 J	Modo contínuo	Controle: níveis mais baixos de NF-kB; Protocolos preventivo e combinado: maiores níveis de NF-kB no dia 5; Grupo terapêutico: níveis mais

										elevados nos dias 10 e 15.
Isman et al., 2015	45	Ratos machos	5-FU + ranhura	-G1: controle positivo -G2: 810 nm -G3: 980 nm -G4: 1064 nm -G5: 660 nm -G6: controle negativo	G2: 660 G3: 810 G4: 980 G5: 1064	G2: 0,25 mW 9s G3: 100mW 10 s G4: 0,25 W 9 s G5: 100 mW, 60 s	G2: 0,28 cm ² , 8 J/cm ² G3: 0,12 cm ² , 8,3 J/cm ² G4: 0,28 cm ² , 8 J/cm ² G5: 0,75 cm ² , 8 J/cm ²	G2: 2,24 J G3: 0,99J G4: 2,24J G5: 6J	4 aplicações modo contínuo ou pulsado	Reparo acelerado de feridas com diferentes comprimentos de onda.
Cruz et al., 2015	245	Hamsters fêmeas	5FU + ranhura	-Controle -Controle-Quimio -PBMT - PDT e -Apenas azul de metileno	660 (PBMT) 635 (LED)	40 mW 110 s	120 J/cm ² 0,04 cm ²	4,4 J	Modo contínuo, em contato	Grupo Laser apresentou reparo total da MO apenas no 10º dia, igual ao grupo C, controle-quimio, mas com MO menos severa.

Usumez et al., 2014	35	Ratos machos	5-FU + ranhura	G1; 810 nm G2; 980 nm Grupo 3: 1064 nm G4: 660 nm Grupo 5 (controle)	G1; 810 nm G2; 980 nm Grupo 3: 1064 nm G4: 660 nm	G1: 9s G2: 10S G3: 9 s potência média 0,25 W G4: 60 s 100 mW,	G1: 0,28 cm ² 8 J/cm ² G2: 0,12 cm ² . 8,3 J/cm ² G3: 0,28 cm ² , 8 J/cm ² G4: 0,75 cm ² 8 J/cm ²	G1: 2,24J G2: 0,99J G3: 2,24J G4: 6J	Tratamento diário da MO dos dias 1 a 4 (modo contínuo, apenas G3 foi pulsado)	-Fatores de crescimento: afetados por diferentes comprimentos de onda.
Freire et al., 2014	60	Hamsters	5-FU + ranhura	-Grupo preventivo -Grupo terapêutico	660	40 mW 30s	4,8 J/cm ² 0,04 cm ²		4 pontos em contato	Laser e LED estimularam o processo de reparo tecidual e também preveniram MO.
Lopez et al., 2013	96	Hamsters machos	5-FU + ranhura	G1 (controle) G2 (preventivo): PBMT D-5 até D+5 G3 (terapêutico): PBMT D+5 até D+15 G4 PBMT D-5 até D+15	660	40 mW 6s	6,6 J/cm ² 0,036 cm ²	0,24J	6 pontos em contato	Efeitos positivos para MO somente no protocolo terapêutico.

Lopes et al., 2010	72	<i>Hamsters</i> fêmeas	5-FU + ranhura	G1: laser 35mW G2: laser 100 mW G3: controle	660	G1: laser 35 mW 16 s G2: laser 100 mW 6s G3: controle		G1: 0,56 J G2: 0,6 J	5 pontos em contato	PBMT reduziu severidade da MO e infiltrado de neutrófilos; 35mW: aumento da organização de colágeno.
França et al., 2009	30	<i>Hamsters</i> fêmeas	5-FU + ranhura	G1: crioterapia preventiva G2: laser preventivo G3: laser terapêutic o G4: controle	660	30 mW 10s	1,2 J/cm ² 0,03cm ²	0,036 J Total: 0,144 J	4 pontos em contato	PBMT reduz severidade da MO e tem efeito mais pronunciado no tratamento da MO.
Lopes et al., 2009	72	<i>Hamsters</i> fêmeas	5-FU + ranhura	G1: PBMT 35mW G2: PBMT 100 mW G3: controle	660	G1: 35 mW 16 s G2: 100 mW 6s G3: controle		G1: 0,56 J G2: 0,6 J	5 pontos em contato	PBMT reduz severidade da MO e apresenta efeito antiinflamató- rio (diminuição de níveis de COX-2).

#Estudos que apresentaram padrões incoerentes não foram incluídos.

*Parâmetros calculados com base nas informações de cada trabalho, a partir das fórmulas: $DE = \frac{P.t}{A}$ e $E = P.t$, na qual DE é densidade de energia (J/cm²), P é potência (W), t é tempo (segundos), A é a área (cm²) e E é energia (J).

^ Área deduzida pela marca do equipamento (lasers MMOptics tinham área de aproximadamente 0,04 cm²)

3 PROPOSIÇÃO

Frente a esse desafio, os objetivos do trabalho são:

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito de diferentes protocolos da terapia de fotobiomodulação no processo de reparo de lesões orais induzidas em *hamsters*, na presença e ausência do quimioterápico 5-FU, sendo os protocolos variáveis na quantidade e no modo de entrega da energia.

3.2 Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do laser na ausência e presença do 5-FU, quanto:

- a. Analisar a evolução do processo de reparo tecidual, macroscopicamente;
- b. Analisar a evolução do processo de reparo tecidual, microscopicamente, através da análise do tecido por coloração com hematoxilina e eosina (H&E);
- c. Avaliação do processo inflamatório, através de análises bioquímicas e imunohistoquímicas de NF-kB e TNF α ;
- d. Avaliar a formação de colágeno no tecido através da coloração com Tricrômico de Mallory e da análise bioquímica de hidroxiprolina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a presente pesquisa foram selecionados 108 *hamsters* Sírios Dourados, machos, com 8 semanas de vida e massa corpórea aproximada de 150 g, mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP (LBO/FOUSP). Os animais foram separados em 1 por gaiola, com água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 010/2015) (Anexo A) e a pesquisa seguiu os princípios éticos de experimentação em animais, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.2 Delineamento experimental:

Os 108 *hamsters* foram separados aleatoriamente em nove grupos. Todos os grupos foram avaliados por 10 dias, sendo que no dia 1 e 3 foi injetado o quimioterápico ou o seu veículo, dependendo do grupo de estudo. Nos dias 4 e 5 foram realizadas ranhuras na mucosa oral e, a partir do dia 4, foram aplicados os protocolos de PBMT com laser de baixa potência (PBMT), como se segue:

- Grupo Controle (C): recebeu apenas injeção do anestésico e veículo do quimioterápico (hidróxido de amônia, 1M) (n=12);
- Grupo Ranhura (R): recebeu injeção do anestésico e ranhuras, sem tratamento com PBMT (n=12)
- Grupo Ranhura Laser I (RLI): recebeu doses anestésicas, ranhuras e protocolo 1 de PBMT: λ 660 nm, 6 J/cm²; 0,24 J em mucosa oral (n=12);
- Grupo Ranhura Laser II (RLII): recebeu doses anestésicas, ranhuras e protocolo 2 de PBMT: λ 660 nm, 25 J/cm²; 1 J em mucosa oral (n=12);

- Grupo Ranhura Laser III (RLIII): recebeu doses anestésicas, ranhuras e protocolo 3 de PBMT: λ 660 nm, 6 J/cm²; 1,2 J em mucosa oral (n=12);
- Grupo Controle-Quimioterápico (Q): recebeu injeção do anestésico, ranhuras e quimioterapia, sem tratamento com PBMT (n=12)
- Grupo Quimioterapia Laser I (QLI): recebeu doses anestésicas, ranhuras, quimioterapia e protocolo 1 de PBMT: λ 660 nm, 6 J/cm²; 0,24 J em mucosa oral (n=12);
- Grupo Quimioterapia Laser II (QLII): recebeu doses anestésicas, ranhuras, quimioterapia e protocolo 2 de PBMT: λ 660 nm, 25 J/cm²; 1 J em mucosa oral (n=12);
- Grupo Quimioterapia Laser III (QLIII): recebeu doses anestésicas, ranhuras, quimioterapia e protocolo 3 de PBMT: λ 660 nm, 6 J/cm²; 1,2 J em mucosa oral (n=12);

4.3 Procedimentos clínicos

Todo tratamento foi realizado no Laboratório de Biologia Oral LBO/FOUSP e teve duração de 10 dias. Nos dias 7 e 10, seis animais de cada grupo foram eutanasiados.

4.3.1 Tratamento com veículo ou quimioterápico

Nos dias 1 e 3 do estudo, os animais dos grupos C, R, RLI, RLII e RLIII receberam dose do veículo do quimioterápico (hidróxido de amônia, 1M e água) e os grupos Q, QLI, QLII e QLIII receberam dose do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), preparado em hidróxido de amônia e água. A dose aplicada intraperitonealmente no dia 1 foi de 100 mg/kg e no terceiro dia a dose complementar foi de 65 mg/kg, com intervalo de um dia entre as doses (dia 2) (Campos et al., 2016; Cotomacio et al., 2017).

4.3.2 Anestesia

Do dia 4 ao dia 10 os animais foram anestesiados com uma associação de Copazine (Xilazina) 13,8 mg/kg e Vetanarcol (Ketamina) 11,6 mg/kg (Figura 4.1).

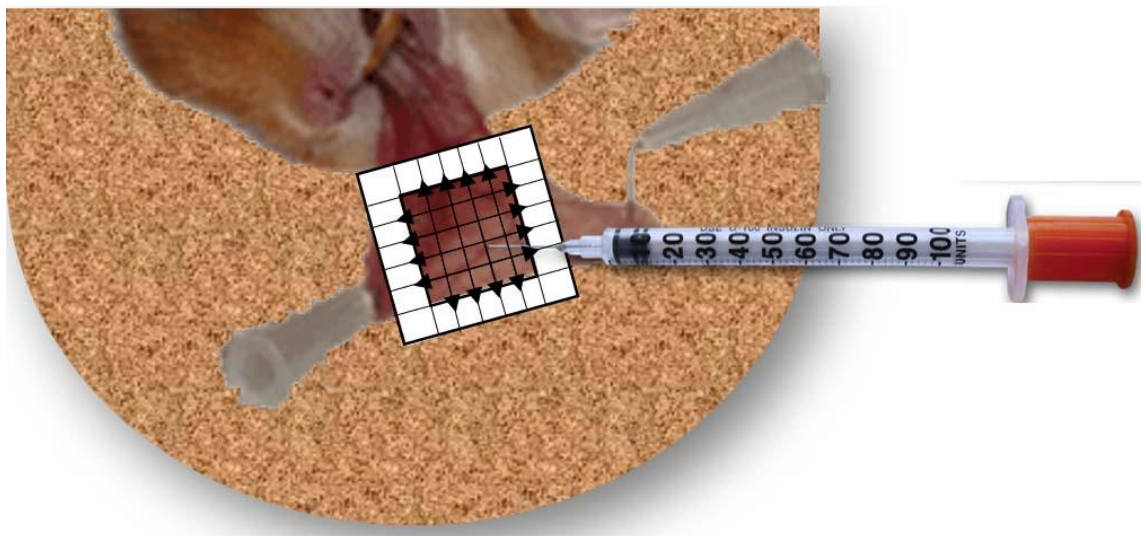
Figura 4.1 – Aplicação intraperitoneal anestésica



4.3.3 Ranhuras

Nos dias 4 e 5, as mucosas da bolsa grotal direita e esquerda de cada hamster foram arranhadas (com exceção do grupo C) com a ponta de uma agulha pelo mesmo operador, para indução da mucosite oral (grupos com quimioterápico) ou feridas orais (grupos sem quimioterápico). Tais ranhuras seguiram um padrão para todos os grupos, onde todas tiveram o mesmo tamanho inicial, garantido através do uso de uma moldura pré-fabricada, com 1cm² de área interna (Campos et al., 2016; Cotomacio et al., 2017).

Figura 4.2 – Representação esquemática da indução de ranhuras em uma moldura de 1 cm²



4.3.4 Análise macroscópica das lesões

A partir do dia 4, as mucosas orais direita e esquerda de cada animal foram expostas para classificação imediata da mucosite oral/lesão por um único operador

responsável pelo manejo diário dos animais. Foi estimado o tamanho e a severidade do eritema, com o auxílio de uma moldura quadriculada (Figura 4.2 e 4.1) (Campos et al., 2016; Cotomacio et al., 2017).

Além dessa classificação, nos dias 5, 7 e 10, as mucosas foram fotografadas para análise da evolução das lesões durante o período experimental, dentro da área demarcada de 1 cm², usando o programa *ImageJ*®. Para a realização das fotografias, foi utilizada uma máquina fotográfica acoplada a um suporte próprio. Após as fotos das mucosas serem adquiridas, como demonstrado na Figura 4.3, estas foram renomeadas aleatoriamente, utilizando o programa *Right Click Enhancer*®.

Depois disso, as imagens foram abertas no programa *ImageJ*®. O programa foi calibrado de acordo com a área de 1 cm² da foto e todas as áreas úlceradas foram demarcadas três vezes. A área registrada correspondeu à média entre essas três medidas (Figura 4.4).

Para os dois tipos de análise, imediata e cega, a classificação do eritema foi determinada da seguinte forma: “nenhuma alteração” correspondia à mucosa com coloração rósea (“nada”), eritema “não severo” correspondia à mucosa com cor vermelha claro e brilhante, e eritema “severo” foi de cor próxima ao vermelho escuro e roxo. As duas informações nos dois métodos foram então cruzadas para ser determinada a classificação das lesões, conforme quadro 4.1. As análises fotográficas foram realizadas pelo método cego por dois avaliadores.

Quadro 4.1 – Classificação adaptada para lesões orais, de acordo com Wilder-Smith et al. (2007)

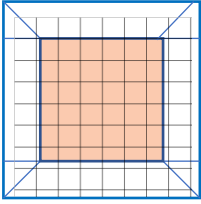
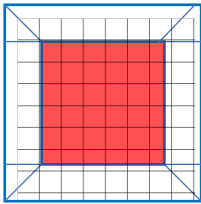
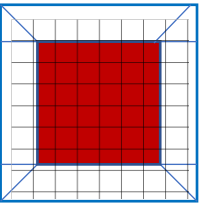
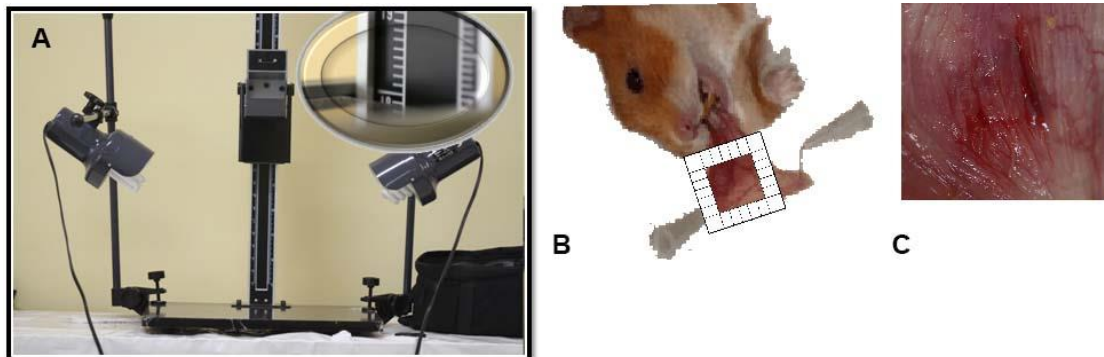
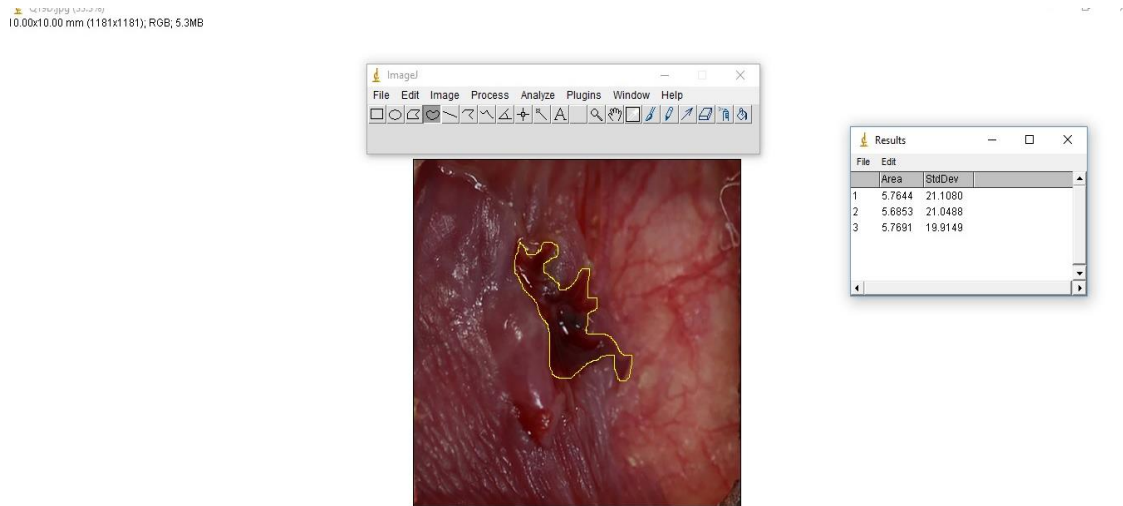
ÁREA DE ÚLCERAÇÃO		SEVERIDADE DO ERITEMA		
		Nada	Não severo	Severo
Nada	0	0	1	2
<4 mm ²	1	1	2	3
4-9 mm ²	2	2	3	4
> 9mm ²	3	3	4	5
				

Figura 4.3 – A. Suporte utilizado para as fotografias, a uma distância fixa da superfície; B. Esquema representativo das fotos tiradas com o tripé; C. Região analisada dentro da moldura de 1 cm²

Cada animal obteve uma classificação para cada mucosa, direita e esquerda. A classificação final de MO por animal foi determinada pela média entre as duas mucosas.

Figura 4.4 – Representação da demarcação da área da úlcera utilizando o programa *ImageJ*



4.3.5 Terapia de fotobiomodulação (PBMT)

A PBMT foi realizada com um laser do tipo InGaAlP da MMOPTICS Ltda (TWIN laser, São Carlos, SP, Brasil) com ponteiras de diodo com a área do spot de 0,04 cm². Para todos os grupos o equipamento foi programado no comprimento de onda vermelho (660 nm) com 40 mW de potência. Os protocolos foram definidos da seguinte forma: protocolo Laser I (LI), que dos protocolos utilizados representa uma energia mais baixa com um ponto central de 0,24 J; protocolo Laser II (LII), energia mais alta em um ponto central de 1J; protocolo Laser III (LIII), uma energia baixa por ponto de 0,24 J, mas mais alta no total (total de 1,2J), uma vez que os animais receberam 5 pontos de irradiação, sendo quatro ao redor da lesão e um central. Dessa forma, para os grupos RLI, RLIII, QLI, QLIII foi aplicado 6 J/cm² e energia de 0,24 J por ponto, onde para os grupos RLI e QLI apenas um ponto central foi realizado e para os grupos RLIII e QLIII, cinco pontos foram realizados na mucosa bucal, totalizando 1,2 J de energia total. Para os grupos RLII e QLII foi utilizado o mesmo equipamento, com 25 J/cm² e energia de 1 J em um ponto central.

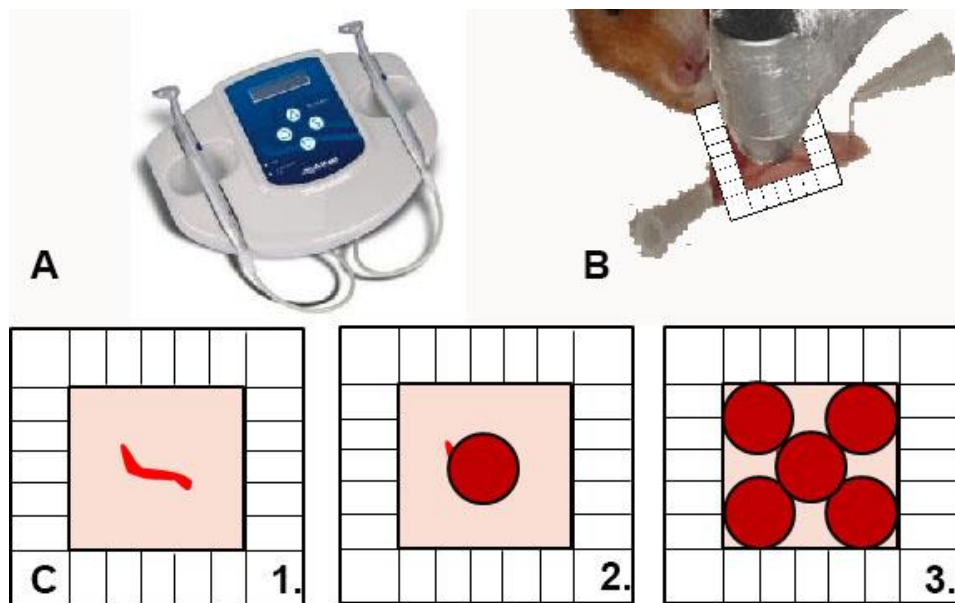
Para todas as técnicas a seguinte fórmula foi obedecida:

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

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

Todos os princípios de segurança foram seguidos: o investigador usou óculos de proteção específicos para o comprimento de onda emitido pelo aparelho, durante todo o tempo em que o aparelho estiver ligado. Além disso, o investigador usou luva de látex e a caneta do equipamento foi devidamente recoberta por filme de Policloreto de Vinila (PVC). Após cada utilização, as peças de mão e o corpo do equipamento foram desinfetados com lenços umedecidos em solução de álcool (70%) (Figura 4.5).

Figura 4.5 – A: Equipamento de Laser MMOptics utilizado (TWIN laser, São Carlos, SP, Brasil); B: Método de aplicação do Laser, perpendicular à superfície, em contato C: Esquema representativo dos métodos de aplicação do laser: 1- área representativa de ranhura induzida, 2- Modo de aplicação dos protocolos LI ($6\text{J}/\text{cm}^2$, 0,24J total em 6 segundos) e LII ($25\text{J}/\text{cm}^2$, 1J total em 25 segundos), 3- Modo de aplicação do protocolo LIII ($6\text{J}/\text{cm}^2$, 1,2 J total em 6 segundos cada ponto)



4.3.6 Obtenção das amostras para análises laboratoriais

Para as análises histológicas (microscopia de luz, tricrômico de Mallory e imunohistoquímica para NF-kB e TNF- α), após anestesia e eutanásia do animal, as amostras da mucosa bucal direita foram obtidas nos dias 7 e 10 do experimento, com o auxílio de uma tesoura e foram imediatamente fixadas (0,1% glutaraldeído + 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1M – pH 7,4). Os espécimes foram lavados em tampão fosfato e submetidos à desidratação em concentrações crescentes de etanol, seguido de xilol, infiltrados e incluídos em parafina (Electron Microscopy Sciences, PA, USA). Foram obtidos cortes de 4 μm em um micrótomo MICROM HM360 (Alemanha).

As lamínulas foram montadas com Entellan (Merck, Germany) e, finalmente, as lâminas foram analisadas e fotografadas em um microscópio de luz Olympus BX 60 (aumento 20 vezes e 40 vezes de acordo com a análise a ser realizada).

A mucosa esquerda foi também removida com o auxílio de uma tesoura e dividida em quatro porções iguais que foram e imediatamente congeladas a -80°C em eppendorfs até o momento das análises bioquímicas (ensaios imunoenzimáticos para $\text{TNF-}\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e hidroxiprolina), quando foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio monobásico 20mM, pH7,2, na proporção de 100mg de amostra para 1 ml de tampão. Na tabela 4.1, é possível observar o cronograma dos procedimentos realizados ao longo dos 10 dias:

Tabela 4.1- Cronograma sequencial do procedimento experimental

DIA	TRABALHO REALIZADO
1	Veículo do quimioterápico C, R, RLI, RLII RLIII Dose inicial de quimioterapia (100 mg/kg) para os grupos Q, QLI, QLII, QLIII
2	Acompanhamento dos animais, sem procedimentos clínicos
3	Veículo do quimioterápico C, R, RLI, RLII RLIII Dose complementar de quimioterapia (65 mg/Kg) para os grupos Q, QLI, QLII, QLIII
4	Anestesia grupo C; Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (grupos R, RLI, RLII, RLIII, Q, QLI, QLII, QLIII); PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII)
5	Anestesia grupo C Anestesia e ranhura em mucosa direita e esquerda (grupos R, RLI, RLII, RLIII, Q, QLI, QLII, QLIII) PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII)
6	Anestesia grupo C, R e Q Anestesia e PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII)
7	Anestesia grupo C, R e Q Anestesia e PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII) Eutanásia de seis animais por grupo (n=54)
8	Anestesia grupo C, R e Q Anestesia e PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII)
9	Anestesia grupo C, R e Q Anestesia e PBMT (grupos RL1, RL2, RL3, QL1, QL2, QL3)
10	Anestesia grupo C, R e Q Anestesia e PBMT (grupos RLI, RLII RLIII, QLI, QLII, QLIII) Eutanásia de seis animais por grupo (n=54)

4.4 Procedimentos laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais envolveram análises histológicas (microscopia de luz com hematoxilina e eosina e marcação de colágeno com Tricrômico de Mallory), imunohistoquímica (NF- κ B e TNF- α), e análises bioquímicas (TNF- α , NF- κ B e hidroxiprolina).

4.4.1 Para analisar a evolução do processo de reparo tecidual microscopicamente

- Hematoxilina e Eosina

Para as análises histológicas em microscópio de luz foram obtidos cortes de 4 μ m que foram corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram inicialmente desparafinizados em xilol a 60°C e tratados com álcool nas concentrações 100%, 95% e 70%, até a coloração com Hematoxilina e Eosina e posteriores lavagens e tratamentos finais em álcool e xilol para montagem das lâminulas.

4.4.2 Para avaliar a remodelação do tecido:

- Análise Histológica

- Expressão de colágeno

A concentração de colágeno foi determinada pela técnica de Tricrômico de Mallory. Após desparafinização em xilol e passagem em concentrações decrescentes de álcool, as lâminas são coradas com uma solução A e uma solução B para marcação de fibras colágenas.

- Análise Bioquímica

- Hidroxiprolina

A partir da proteína extraída, avaliou-se a concentração de hidroxiprolina com o kit QuickZyme Hydroxyproline Assay ELISA Kit (QuickZyme Biosciences,

Netherlands), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações foram calculadas em relação à quantidade de proteína total presente em cada amostra, calculada pelo método de Lowry et al. (1951) em absorbância de 660nm. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm.

4.4.3 Para avaliação do processo inflamatório:

Para cada tipo de anticorpo em imunohistoquímica foi utilizado um controle positivo (tecido sabidamente positivo – câncer de mama) (figuras 4.6 e 4.7) e um controle negativo. O controle negativo foi realizado através da abolição do anticorpo primário. A imunoexpressão foi avaliada por examinadores pré-calibrados em microscópio de luz com aumento de 20x. Foi realizada análise descritiva e semi-quantitativas de todos os cortes, através do método de deconvolução de imagem utilizando o programa *Image J*[®].

- Análises imunohistoquímicas

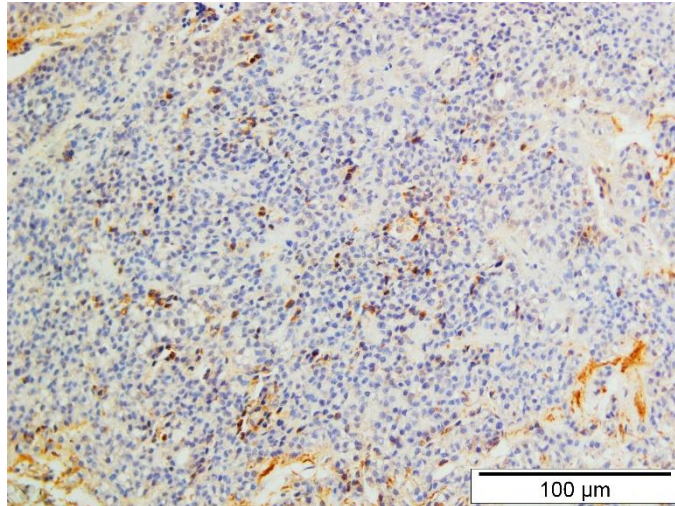
Para determinar a expressão de NF-kB e TNF- α na mucosa oral, foram utilizados cortes de 4 μ m de espessura dos blocos previamente incluídos em parafina, em lâminas silanizadas. Após o corte, as lâminas foram secas em placa quente por 2 horas e incubadas em estufa a 37°C overnight.

- NF-kB

Para o NF-kB, as amostras foram imersas em xilol a 60°C e a temperatura ambiente. Depois disso, as amostras foram lavadas em concentrações decrescentes de álcool até sua lavagem em álcool/NaOH e H₂O/etanol. Depois das subsequentes lavagens, as amostras foram incubadas com soro suíno por 1 hora e depois com anticorpo primário anti-NF-kB p65 fosforilado policlonal de coelho (1:500; BIOSS, Inc. Woburn, MA, EUA), diluído em PBS. Após a incubação com o anticorpo primário, seguem-se as lavagens e incubação com anticorpo secundário (Dako LSAB System-HRP). Após lavagem com tris-hidroximetilaminometano (TRIS), todos os espécimes foram imunomarcadas com solução de diaminobenzidina (DAB) (Dako) e contrastadas

com hematoxilina. Para teste do anticorpo, foi utilizado uma lâmina de câncer de mama como controle positivo (Figura 4.6).

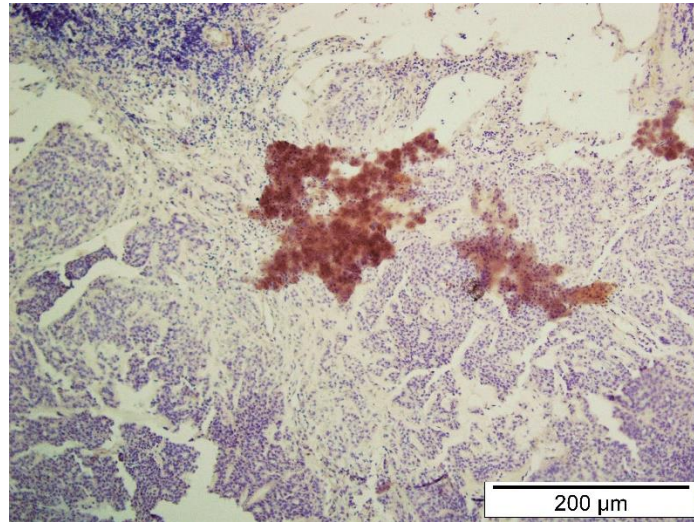
Figura 4.6- Controle positivo para NF- κ B – Marcação em câncer de mama



- TNF- α

Para a imuno marcação com TNF- α , as amostras foram lavadas em xilol e álcool e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a ação da peroxidase e o bloqueio de proteína, as amostras foram lavadas novamente com PBS e incubadas com anticorpo primário TNF- α . As amostras foram enxaguadas com PBS e incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário Histofine SimpleStainRat MAX-PO (Multi) (NichireiBiosciences, Inc., Tokyo, Japan). O anticorpo policlonal de Coelho anti-TNF- α (IHC world, LLC, Woodstock, MD) foram utilizados como anticorpo primário para detectar a imunoreatividade nos tecidos coletados da mucosa oral. Após lavagem com PBS, todos os espécimes foram imunomarcadas com DAB (Dako) e contrastadas com hematoxilina. Para teste do anticorpo, foi utilizado uma lâmina de câncer de mama como controlepositivo (Figura 4.7).

Figura 4.7- Controle positivo para TNF- α – Marcação em câncer de mama



- Análises Bioquímicas

As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises. No dia das análises, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio monobásico 20mM, pH7,2, e centrifugadas para a coleta e uso do sobrenadante.

- NF-kB

A partir da proteína extraída, avaliou-se a concentração de NF-kB com o kit Rat NF-kB p65 (Nuclear Factor Kappa B p65) ELISA Kit (Elabscience Houston, Texas), de acordo com as instruções do fabricante (Ali et al., 2018; Mittal et al., 2018; Štofilová et al., 2017), com leitura de absorbância em 570 nm. As concentrações foram calculadas em relação à quantidade de proteína total presente em cada amostra, calculada pelo método de Lowry et al. (1951) em absorbância de 660nm.

- TNF- α

A partir da proteína extraída, avaliou-se a concentração de TNF- α com o kit Legend Max Rat TNF-alpha ELISA kit (Biolegend. Inc, San Diego, California), de acordo com as instruções do fabricante, com leitura de absorbância em 570 nm

(Campos et al., 2016). As concentrações foram calculadas em relação à quantidade de proteína total presente em cada amostra, calculada pelo método de Lowry et al. (1951) em absorvância de 660nm.

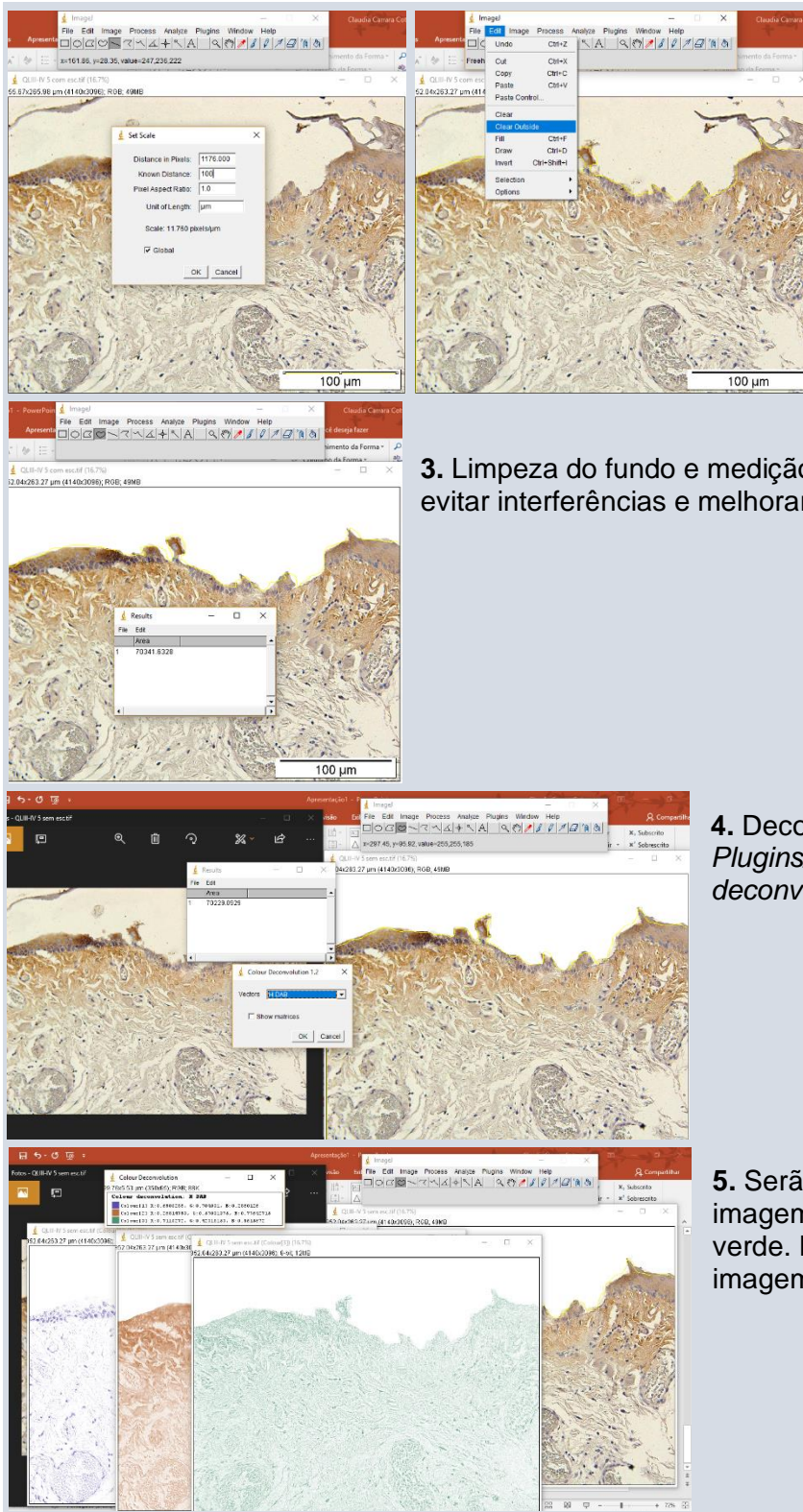
As concentrações foram calculadas em relação à quantidade de proteína total presente em cada amostra, calculada pelo método de Lowry et al. (1951) em absorvância de 660nm. A leitura da absorvância foi realizada em 450nm para a concentração de TNF e NF- κ B.

4.5 Análise das imagens histológicas – Deconvolução de Imagem

Após as fotomicrografias das lâminas serem adquiridas, estas foram renomeadas aleatoriamente, utilizando o programa *Right Click Enhancer*®, para análise cega das imagens. Para deconvolução de imagem, foi utilizada inicialmente uma imagem com escala para a calibração do programa. Dessa forma, todas as medidas realizadas foram fornecidas nos mesmos parâmetros. Depois disso, foi aberta a mesma imagem sem a marcação da escala, para o contorno da área total da lâmina a ser avaliada, excluindo o fundo. Após a medição da área da lâmina, foi escolhida a opção “*Colour deconvolution*”, com a opção “*HDAB*”. A imagem foi decomposta em três cores: verde, azul e marrom. Apenas a imagem marrom foi utilizada, correspondente à marcação imunohistoquímica pelo DAB. Opcionalmente, a imagem foi convertida para 8 bits (preto e branco) para melhor visualização das áreas de marcação. Depois disso, iniciou-se o processo de seleção do que é considerada marcação positiva. Para tanto, foi selecionado no programa *Image/Adjust/Threshold* e um intervalo *threshold* foi determinado. Comparando com a imagem original, foi estabelecida uma faixa de *threshold* para marcação com o DAB. Com a opção “*Analyze particles*” foi dada a área de marcação do DAB. Dessa forma, calculou-se a porcentagem dessa área em relação à área total da lâmina mensurada inicialmente (Castro, 2018).

Para a coloração com Tricrômico de Mallory, todos os passos foram semelhantes, com exceção da deconvolução que foi realizada a partir da opção “*Azan-Mallory*” e a imagem decomposta escolhida para o *threshold* foi a azul. O epitélio não foi contabilizado na área da marcação para a coloração de Tricrômico de Mallory. Na figura abaixo há o passo-a-passo da execução da deconvolução de imagem (Quadro 4.2).

Quadro 4.2- Passo-a-passo da técnica de deconvolução de imagem utilizando o programa *ImageJ*



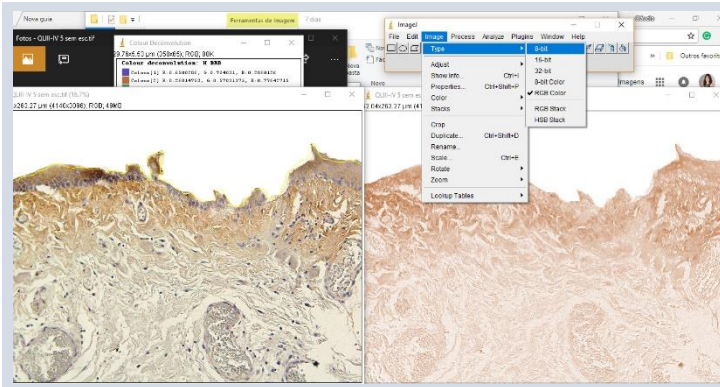
1. Calibração do programa a partir de uma imagem com escala;

2. Delimitação da área a ser analisada;

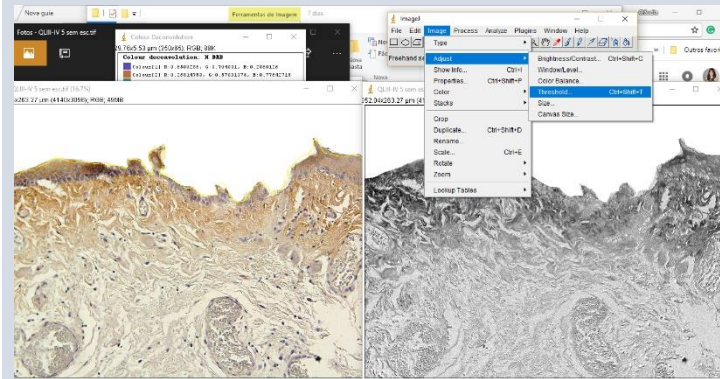
3. Limpeza do fundo e medição da área delimitada, para evitar interferências e melhorar visualização;

4. Deconvolução da cor: *Plugins/Colour functions/Colour deconvolution*; Em *Vectors*: H DAB.

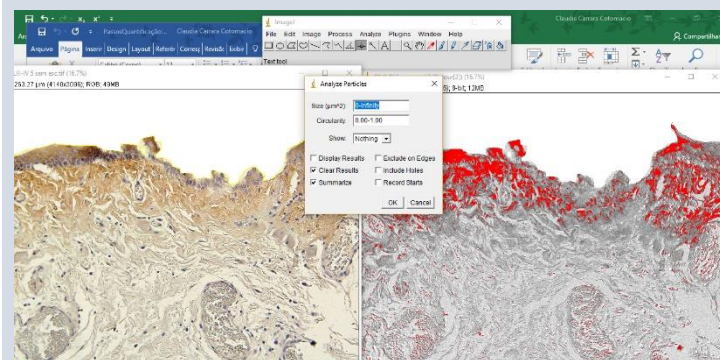
5. Serão geradas deconvolução da imagem nas cores marrom roxo e verde. Mantem-se somente a imagem em marrom;



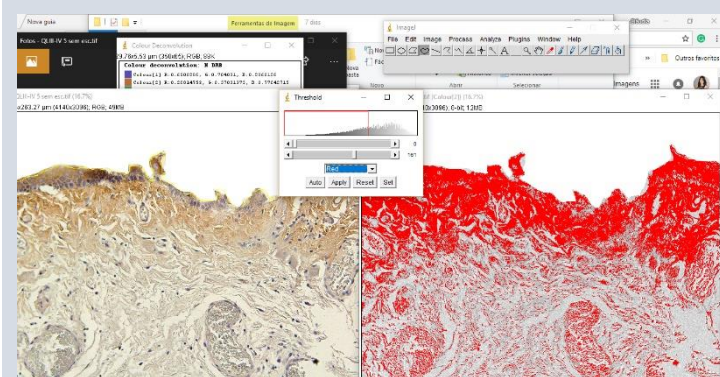
6. Opcionalmente, transformar a imagem em preto e branco (8bits);



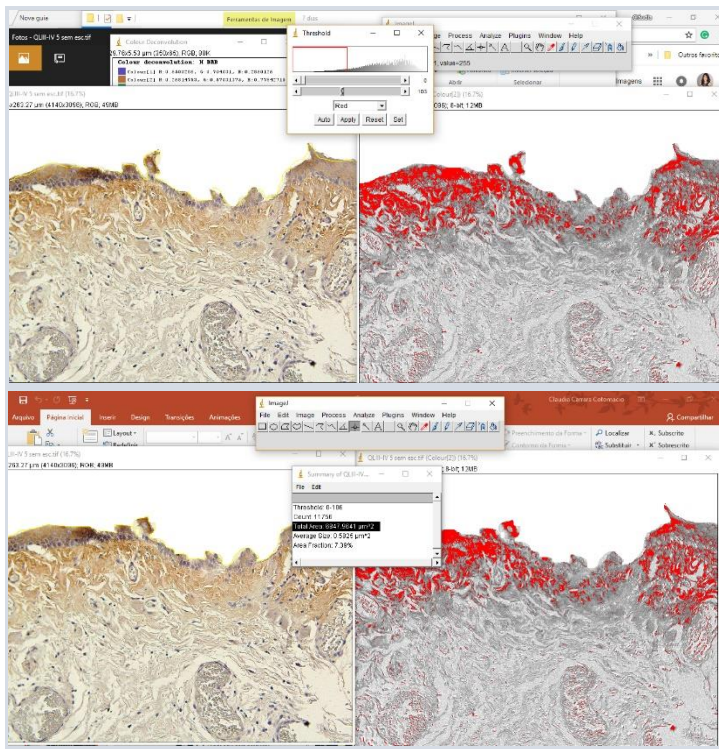
8. Processo de seleção do que é considerada marcação positiva. Esse passo é essencial para estabelecer o intervalo de tons que serão selecionados: *Image/Adjust/Threshold*;



9. Processo de seleção do que é considerada marcação positiva. Esse passo é essencial para estabelecer o intervalo de tons que serão selecionados: *Image/ Adjust/ Threshold*;



10. No *threshold*, a linha superior de ajuste refere-se aos tons mais escuros e a linha inferior, dos tons mais claros. Em geral, mexe-se somente nos tons mais claros, reduzindo ou ampliando a faixa de seleção conforme a interpretação do que é marcação positiva, comparando com a imagem original. À medida que se mexe nesse intervalo, haverá a seleção do tom na imagem (coloração vermelha que aparece na imagem);



11. Quantificar a seleção: *Analyze/Analyze Particles*.

12. “*Total area*” corresponde a área marcada em vermelho. Com a medida de área calculada inicialmente (total do tecido), é possível calcular a porcentagem de marcação.

Fonte: O autor

4.6 Análises estatísticas

O cálculo de tamanho de amostra foi baseado nos dados de estudo prévio (Cotomacio et al., 2017). Foram necessários 12 animais por grupo divididos nos dois tempos experimentais, para chance de aproximadamente 95% de detectar, com um nível de significância de 5%, uma diferença significativa entre os grupos com relação ao desfecho primário (grau de mucosite oral), conforme calculado no programa G*Power 3.1.9.2. Para análises clínicas de avaliação dos graus de classificação das lesões (dados discretos) foram utilizados testes estatísticos de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos e testes de Friedman para evolução de cada grupo ao longo dos tempos experimentais. Outros dados com distribuição não-normal e heterocedásticos foram avaliados com testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Wilcoxon. Os demais dados com distribuição normal foram avaliados através do teste de Fisher (ANOVA) e Teste T. Os dados coletados foram registrados em um banco de dados elaborado em programa Microsoft Excel® versão 2016 e as análises estatísticas foram realizadas no programa Minitab® 18.0. Foi utilizado um nível de significância α de 5% em todos os testes estatísticos. Para a elaboração de gráficos e tabelas, foi utilizado o software Minitab® 18.0 e Microsoft Office Excel® 2016.

5 RESULTADOS

Os resultados clínicos foram analisados pelo método cego por dois avaliadores, com fator kappa 0,83 (IC 0,52-0,98), entre os avaliadores. Foram realizadas análises intra-avaliador de forma cega e não cega com fator kappa de 0,90 (IC 0,88-0,97), mostrando a elegibilidade do método e baixa variação entre as classificações.

As análises para colágeno, NF-kB e TNF- α foram realizadas por dois métodos diferentes: análise imunohistoquímica ou de coloração específica (para colágeno), avaliada pelo método de deconvolução de imagem, e análise bioquímica.

5.1 GRUPOS R

Os resultados dos grupos R, com e sem os protocolos de PBMT foram avaliados de acordo com parâmetros macro e microscópicos.

5.1.1 Análise clínica e macroscópica das lesões

Análises qualitativas da distribuição das classificações das lesões em cada grupo (Gráfico 5.1):

- Grupo C:
 - Dia 5 ao dia 7: Todas as mucosas não apresentaram lesões (classificação 0 na escala utilizada);
- Grupo R (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p < 0,05$):
 - Dia 5: a distribuição das classificações das lesões manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;
 - Dia 7: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada entre os graus 1 e 2,5, com mediana e média próximas a 1,5;
 - Dia 10: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada nos graus 0 e 1, sendo mediana e média próximas a 1.

- Grupo RLI (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p < 0,05$):

Dia 5: a distribuição das classificações das lesões manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;

Dia 7: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada entre os graus 1 e 2,5, com mediana e média próximas a 2;

Dia 10: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada nos graus 0 e 1, sendo mediana e média próximas a 0,5.

- Grupo RLII (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p < 0,05$):

Dia 5: a distribuição das classificações das lesões manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;

Dia 7: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada entre os graus 1,5 e 2,5, com mediana e média próximas a 2;

Dia 10: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada nos graus 0 e 1,5, sendo mediana e média entre 0,5 e 1.

- Grupo RLIII (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p < 0,05$):

Dia 5: a distribuição das classificações das lesões manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;

Dia 7: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada entre os graus 1,5 e 2,5, com mediana e média próximas a 2;

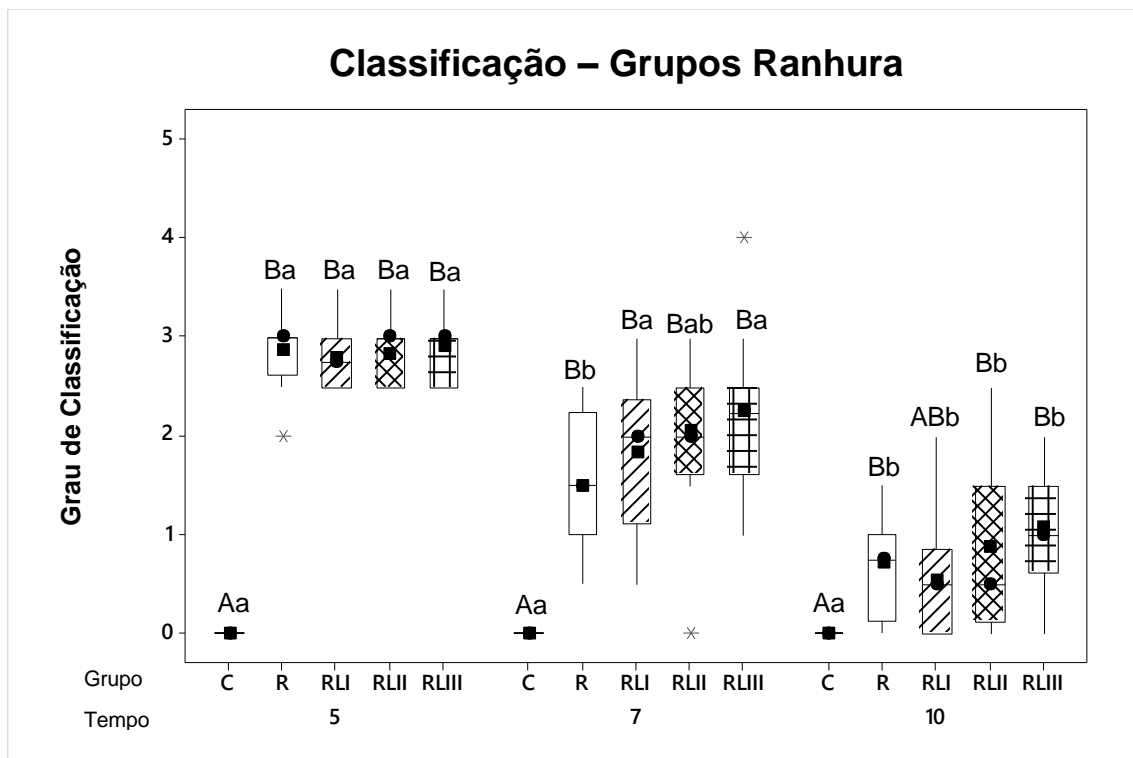
Dia 10: a distribuição das classificações das lesões ficou concentrada nos graus 0,5 e 1,5, sendo mediana e média próximas a 1.

Em relação à evolução das lesões orais intergrupo, em cada tempo experimental (Gráfico 5.1), no dia 5 todos os grupos (exceto o grupo C) apresentaram grau de mucosite semelhante, permanecendo entre grau 2 e 3 (média e mediana próximas do grau 3).

No dia 7, os quatro grupos que receberam ranhuras apresentaram semelhança entre si. Essa semelhança manteve-se no dia 10, entretanto o grupo RLI

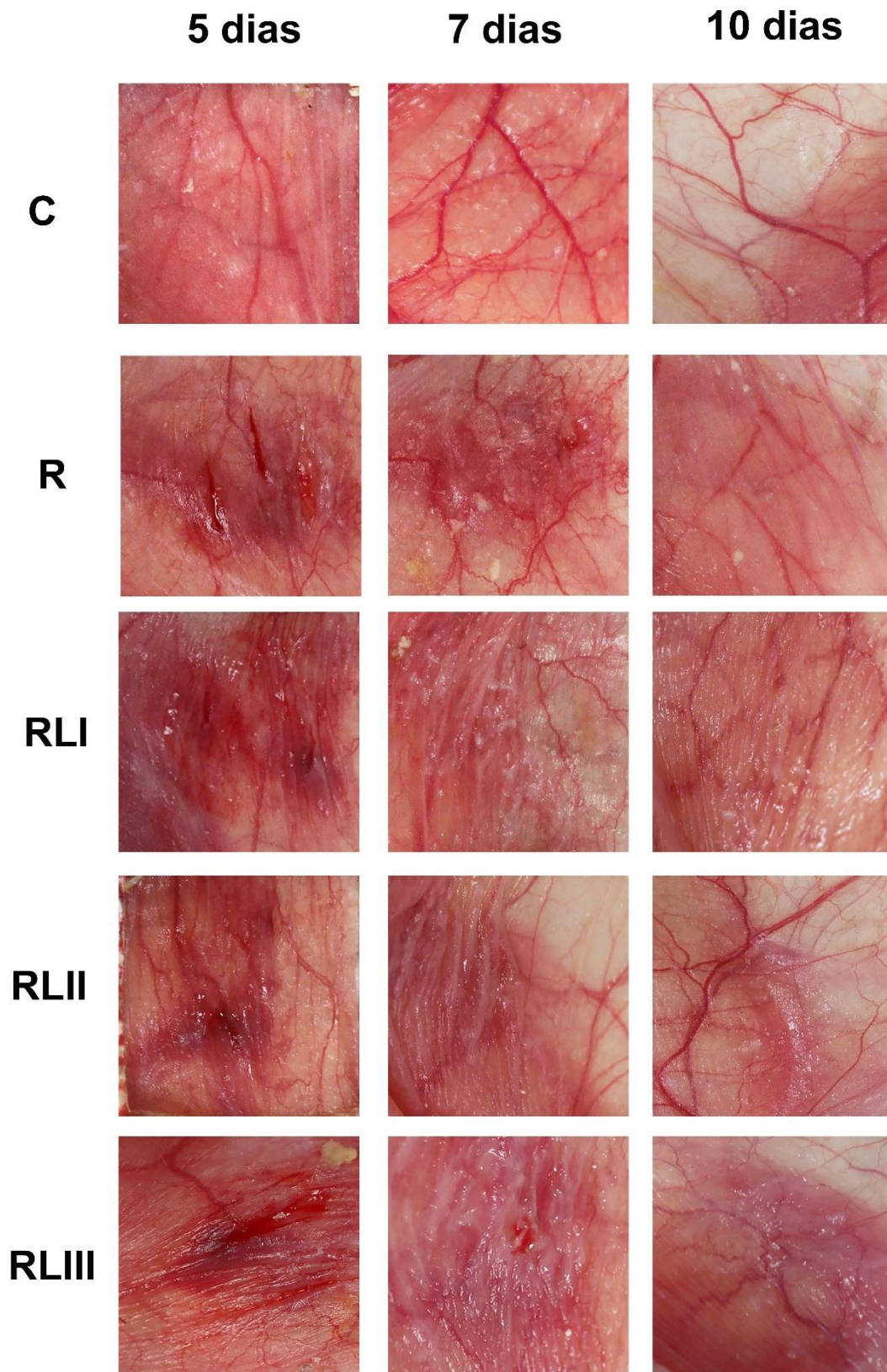
apresentou resultados mais próximos do grupo C (sem indução de ranhuras) (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Evolução da mucosite oral em cada grupo nos dias 5, 7 e 10, de acordo com a escala de Wilde-Smith et al. (2007) para MO. Letras maiúsculas diferentes indicam relevância estatística entre os grupos em cada tempo experimental e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística de cada grupo ao longo do tempo ($p < 0,05$); C, Controle; R, Ranhura; RLI, PBMT 6 J/cm²/0,24J – um ponto; RLII, PBMT 25J/cm²/1J – um ponto; RLIII, PBMT 6 J/cm²/1,2 J – cinco pontos de 0,24J; Quadrado: média; Círculo: mediana; Asteriscos: *outliers*. Teste de Kruskal-Wallis (teste intergrupo – letras maiúsculas) e Friedman (teste intragrupo – letras minúsculas)



Quanto à evolução clínica das lesões nos dias 5, 7 e 10, com exceção do grupo C, todos os grupos apresentaram aspecto semelhante das lesões no dia 5. No dia 7 o mesmo padrão é observado, com úlceras e eritema leve. No dia 10, o mesmo padrão de evolução de reparo é observado. Entretanto, os grupos RLII e RLIII apresentaram eritema um pouco mais severo ao ser comparado aos demais grupos (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Comparação clínica das mucosas dos *hamsters* de cada grupo, nos dias 5, 7 e 10. C, Controle; R, Controle-Ranhura; RLI, PBMT 6 J/cm²/0,24J – um ponto; RLII, PBMT 25J/cm²/1J – um ponto; RLIII, PBMT 6 J/cm²/1,2 J – cinco pontos de 0,24J



Fonte: O autor.

Não houve diferença estatisticamente significativa para as análises de perda de massa corpórea e de consumo de água e comida, ($p>0,05$) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Média e Mediana (entre parênteses) da massa corpórea perdida (g), água consumida (ml) e comida consumida (g). Não houve diferença estatística entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística em cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)

	Controle	R	RLI	RLII	RLIII
Massa corpóreas perdida (g)					
7 Dias	9,2 (9)	11,4 (12)	15 (15)	10,7 (9,5)	15,2 (16,5)
10 Dias	11,8 (10,5)	13,3 (12)	15 (15)	17,7 (16,5)	19,3 (21,5)
Água consumida (ml)					
7 Dias	73,3 (65)	74,3 (70)	78,3 (75)	71,7 (82,5)	54,2 (45)
10 Dias	123,3 (135)	78,3 (70)	110 (105)	89 (70)	108,3 (80)
Comida consumida (g)					
7 Dias	47,7 (38)	32,4 (35)	33,5 (26)	24,5 (27,5)	46,7 (20,5)
10 Dias	55,2 (44,5)	46,8 (46)	36,1 (21,5)	35,3 (34,5)	43,3 (39,5)

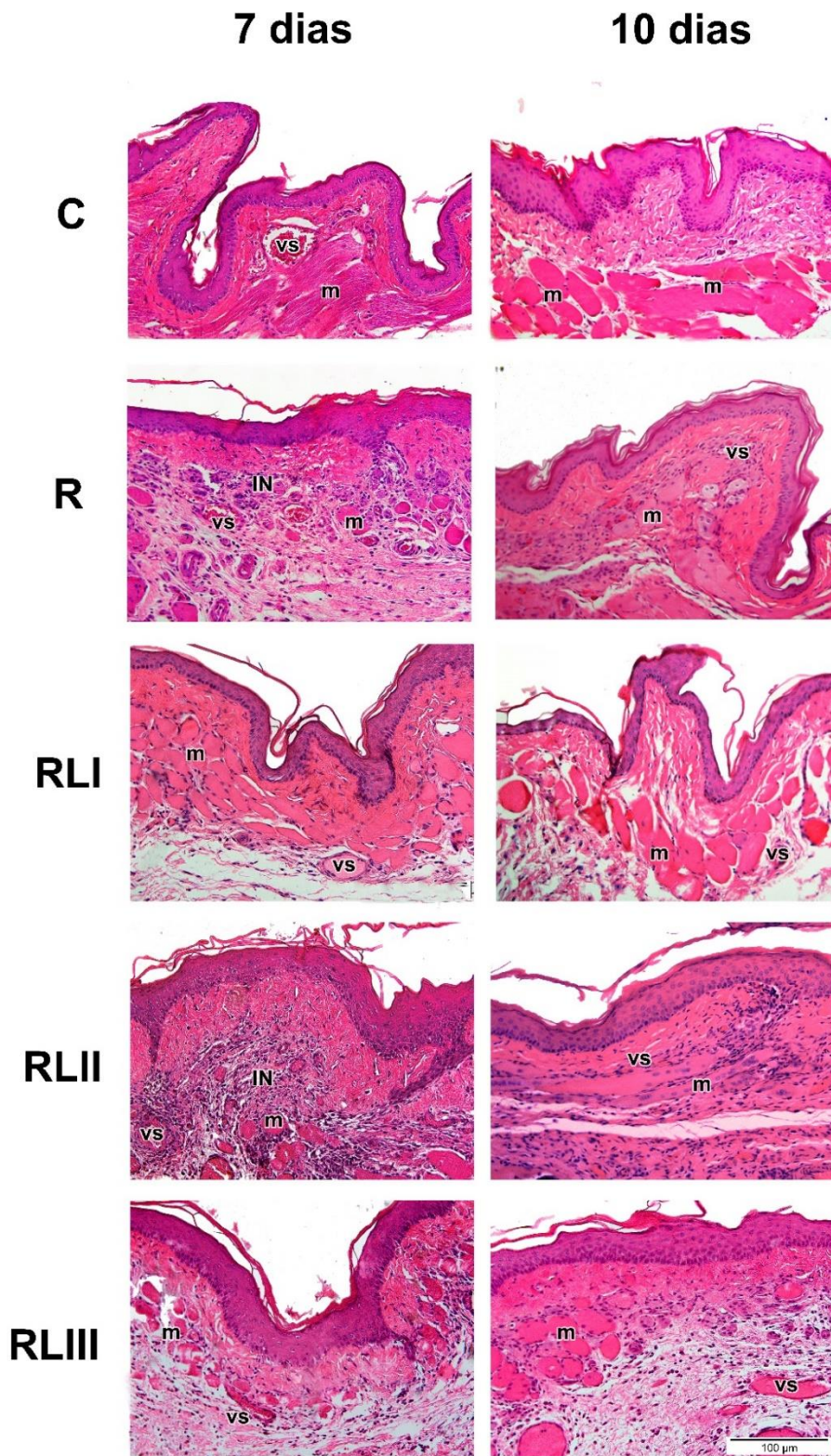
Fonte: O autor.

5.1.2 Análise da evolução do processo de reparo tecidual microscopicamente

Alguns aspectos histológicos foram observados nos grupos experimentais nos dias 7 e 10. O grupo C apresentou um exemplo de aspecto de tecido íntegro: epitélio contínuo e tecido conjuntivo da lâmina própria com presença de fibras musculares e vasos sanguíneos em ambos os dias (Figura 5.2). No dia 7, os grupos que receberam apenas a indução de ranhuras (R) ou ranhuras associadas a um dos protocolos de PBMT, apresentaram aspectos bastante semelhantes, com epitélio íntegro, algumas fibras musculares e vasos. O grupo R apresentou infiltrado inflamatório leve e o grupo RLII apresentou infiltrado inflamatório moderado no dia 7.

No dia 10, os quatro grupos R, RLI, RLII e RLIII apresentaram aspecto semelhante ao do grupo C, com um epitélio contínuo e mais organizado e ausência de células inflamatórias no tecido conjuntivo (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos grupos C, R, RLI, RLII e RLIII nos dias 7 e 10. Epitélio contínuo em todos os grupos. Infiltrado inflamatório leve (IN) no grupo R e moderado no grupo RLII no dia 7, não mais observado no dia 10. IN, infiltrado inflamatório; VS, vasos sanguíneos; m, fibras musculares. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 20x



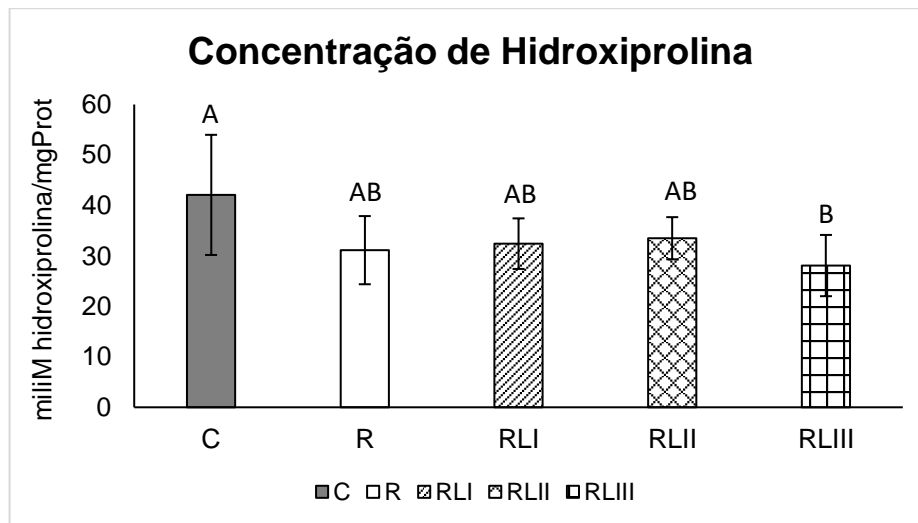
Fonte: O autor.

5.1.3 Avaliação da remodelação do tecido

A avaliação da remodelação do tecido envolveu análise bioquímica para concentração de hidroxiprolina e de marcação de colágeno pela técnica de Tricrômico de Mallory.

No dia 10, o grupo C apresentou maior concentração de hidroxiprolina, cerca de 33% maior que a encontrada no grupo RLIII, que recebeu o tratamento com maior quantidade de energia (4 pontos de 0,24J, com energia total de 1,2J) ($p < 0,05$) (Gráfico 5.2).

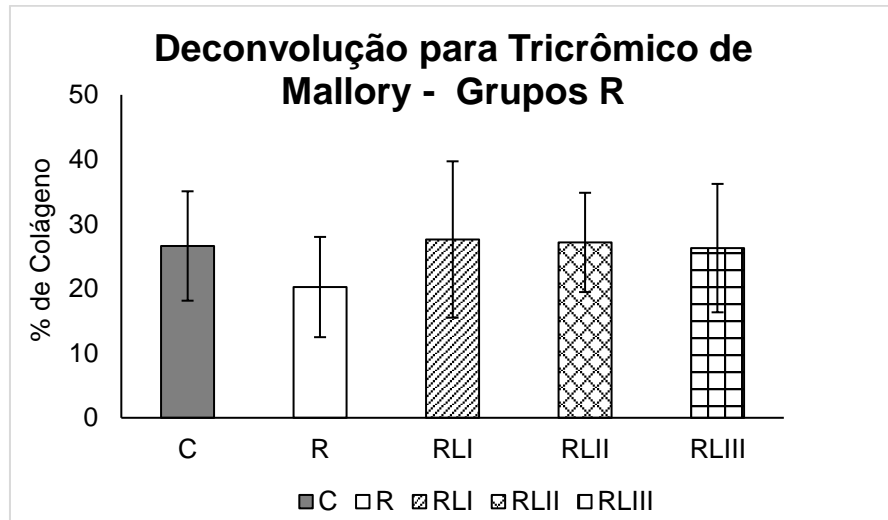
Gráfico 5.2 – Concentração de hidroxiprolina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais no dia 10 ($p < 0,05$). Teste de Fisher – Anova



Fonte: O autor.

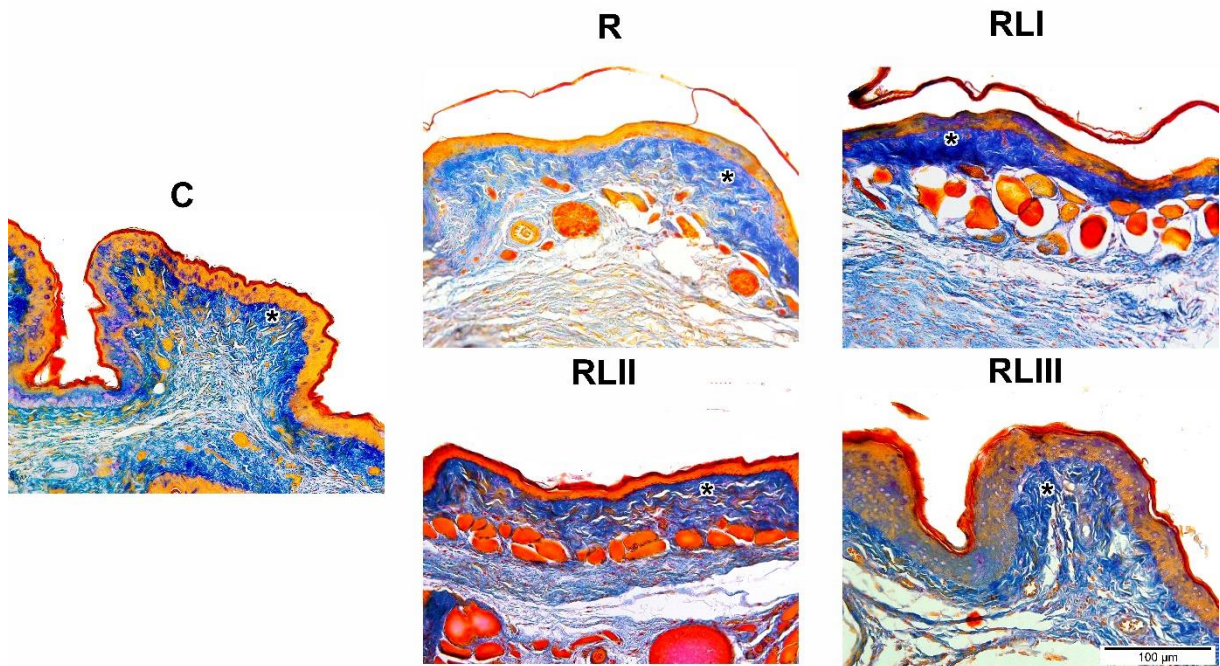
Com relação à deconvolução de imagem para marcação de colágeno pela técnica Tricrômico de Mallory (Gráfico 5.3), apesar de não ter sido possível detectar diferenças estatísticas ($p > 0,05$), houve ligeira tendência de menor porcentagem de marcação de colágeno para o grupo R em relação aos demais grupos (20%). O grupo C (26%) teve marcação semelhante ao grupo RLIII (26%) e aos grupos RLI e RLII (27%) (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 – Porcentagem de marcação para colágeno com a técnica de Tricrômico de Mallory. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no dia 10 ($p > 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis



Nas fotomicrografias é possível observar padrão bem semelhante entre os grupos que receberam a PBMT, com uma área de marcação em azul escuro próximo ao epitélio, evidenciando a presença de um colágeno mais denso, seguido de uma área colágeno mais frouxo em região submucosa. A marcação foi menos intensa para o grupo R, mostrando a presença de um colágeno menos denso em mucosa e submucosa em comparação aos demais grupos (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Fotomicrografias dos grupos experimentais no dia 10. A marcação em azul escuro representa áreas de colágeno mais denso. Asteriscos (*), área de colágeno mais denso. Técnica de Tricrômico de Mallory. Aumento de 20x



Fonte: O autor.

5.1.4 Avaliação do processo inflamatório

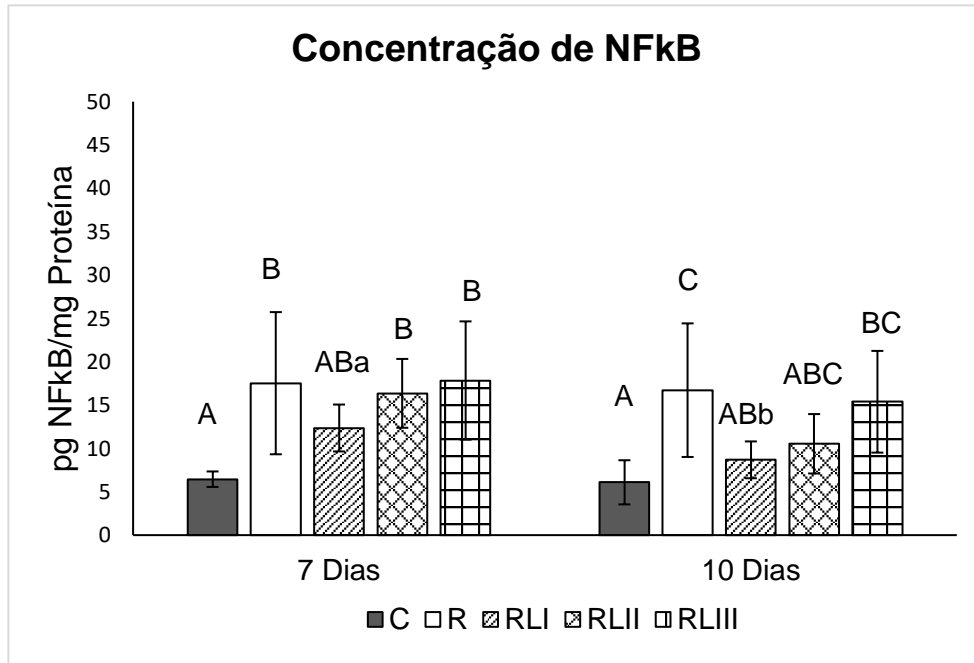
O processo inflamatório foi avaliado através de análises bioquímicas e imunohistoquímicas para NF-kB e TNF- α .

5.1.4.1 Análise de NF-kB

No dia 7, a concentração da proteína NF-kB manteve-se semelhante entre os grupos que receberam ranhura com ou sem PBMT, havendo aproximação entre as concentrações dos grupos C (sem intervenção) e RLI (PBMT um ponto de 0,24 J). No dia 10, houve maior aproximação entre os grupos C e RLI. O grupo RLI apresentou concentração dessa proteína aproximadamente 50% menor que o grupo R (apenas ranhura) ($p < 0,05$). O grupo RLII aproximou-se do grupo C e o grupo RLIII foi semelhante aos demais grupos que receberam laser, no entanto, dos três protocolos, o grupo RLIII foi o que mais ficou próximo do resultado do grupo R (Gráfico 5.4). Na comparação da evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais, foi

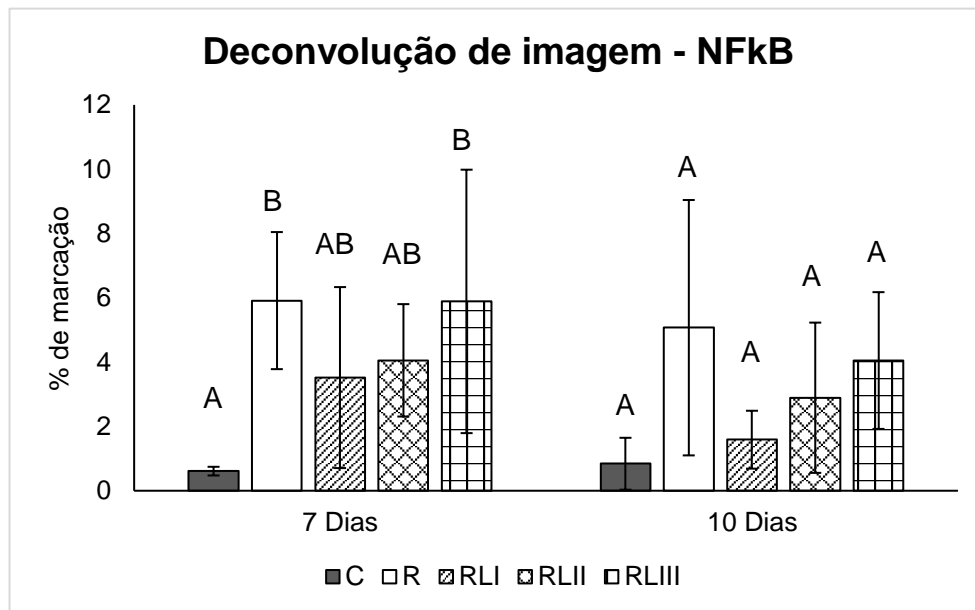
possível observar diminuição significativa ($p < 0,05$) apenas para o grupo RLI entre os dias 7 e 10 (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 – Concentração de NF-kB em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Fisher – Anova). Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste T pareado)



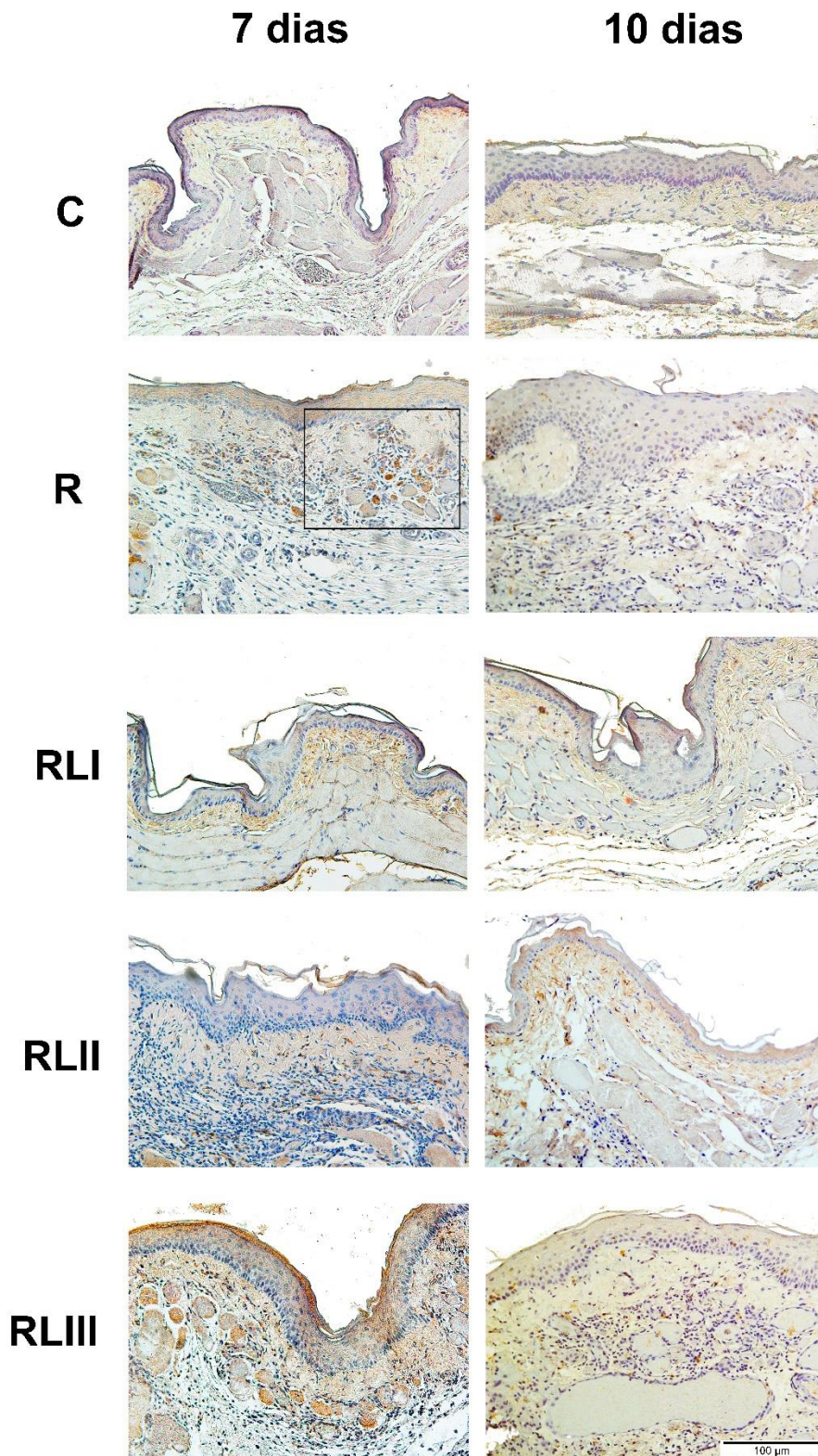
O método de deconvolução de imagem (Gráfico 5.5) das fotomicrografias de imunohistoquímica com marcação para NF-kB (Figura 5.4) apresentaram padrão semelhante ao método bioquímico. Nos dias 7 e 10, o grupo R apresentou maior marcação, seguido pelos grupos RLIII, RLII, RLI e C. Entretanto, houve diferença estatística apenas no dia 7 entre o grupo C e os demais grupos. Além disso, não houve diferença estatística em cada grupo entre os dois tempos experimentais analisados (7 e 10 dias) (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5 – Porcentagem de marcação em imunohistoquímica para NF-kB em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)



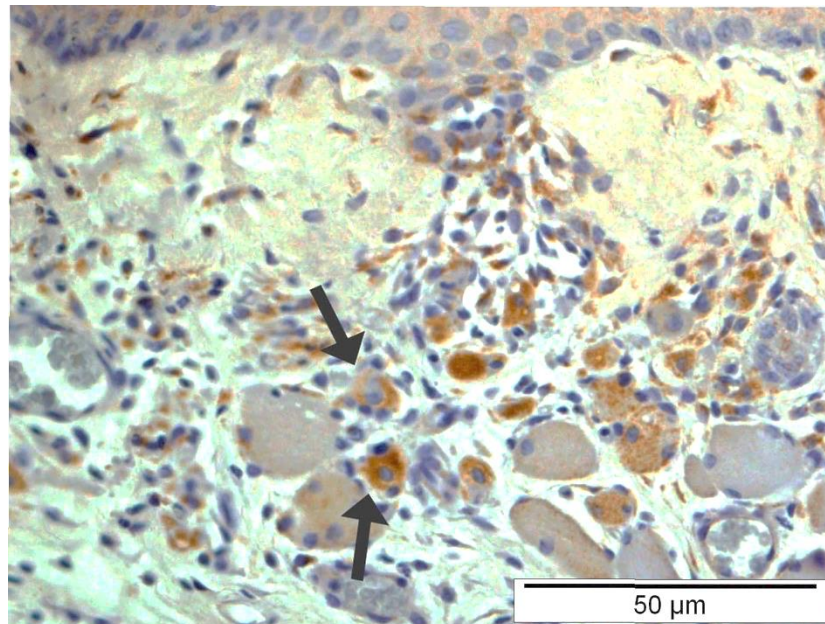
Nas fotomicrografias para NF-kB (Figura 5.4), o padrão de marcação para esses grupos foi pontual nas células, principalmente em citoplasma celular. No destaque do grupo R no dia 7 (Figura 5.5) pode ser observado citoplasma corado de macrófagos, indicados pelas setas. É possível observar as mesmas estruturas teciduais encontradas na análise por H&E (vasos, fibras musculares e infiltrado inflamatório discreto). Os grupos que receberam ranhura apresentaram mais marcação que o grupo C, mas não apresentaram diferenças expressivas entre si.

Figura 5.4 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais marcadas pelo anticorpo NF- κ B (em marrom). Imagens representativas dos grupos C, R, RLI, RLII e RLIII nos dias 7 e 10. O grupo C não apresentou marcação para o fator NF- κ B, enquanto os demais grupos apresentaram marcação semelhante entre si em 7 e 10 dias. Detalhe na fotomicrografia de R aos 7 dias será mostrada na figura 5.5. Contracoloração com Hematoxilina de Harris. Aumento de 20x



Fonte: O autor.

Figura 5.5 – Detalhe destacado da fotomicrografia do grupo R aos 7 dias mostrando marcação em marrom em citoplasma de macrófagos (setas)

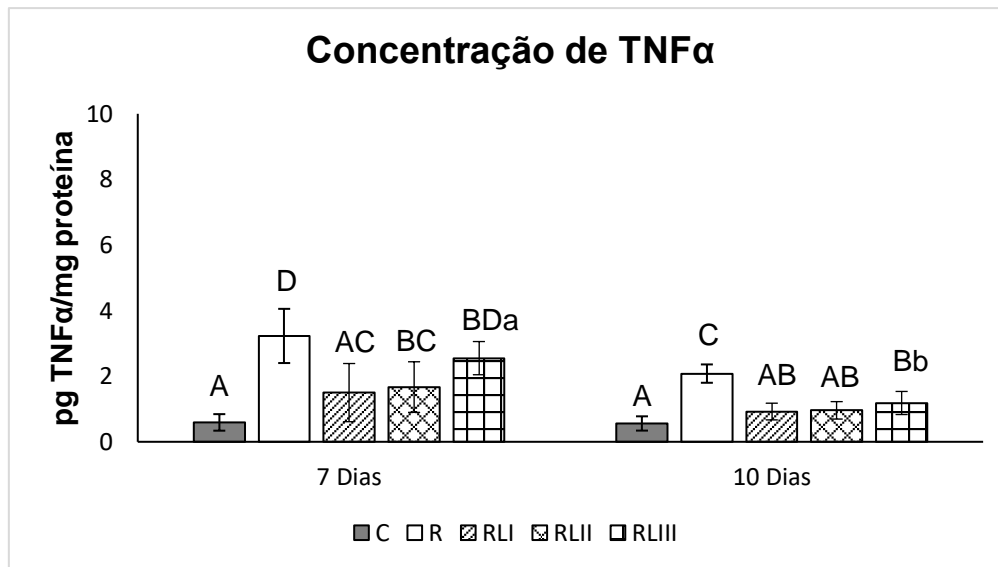


Fonte: O autor.

5.1.4.2 Análise de $TNF-\alpha$

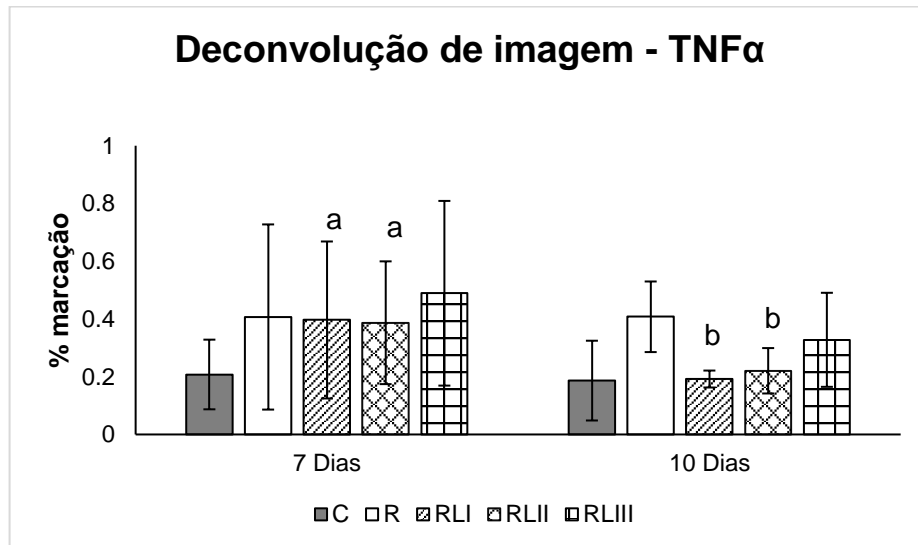
Para $TNF-\alpha$, no dia 7, os grupos RLI (1 ponto central de 0,24J) e RLII (1 ponto central de 1,0 J) apresentaram cerca de 53% menor concentração da proteína em relação ao grupo R (apenas ranhura) ($p < 0,05$), enquanto o grupo RLIII (5 pontos de 0,24J cada, 1,2J de energia total) obteve concentração semelhante ao grupo R ($p > 0,05$). O grupo RLI mostrou resultados semelhantes ao grupo C ($p > 0,05$). No dia 10, todos os grupos que receberam ranhura + PBMT (RLI, RLII e RLIII) apresentaram resultados semelhantes entre si e menores que o grupo R ($p < 0,05$), em cerca de 50%. Os grupos RLI e RLII apresentaram resultados mais próximos ao grupo C. Apenas a redução de concentração de $TNF-\alpha$ para o grupo RLIII entre os dias 7 e 10 foi estatisticamente significativa (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 – Concentração de TNF- α em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Fisher – Anova). Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste T pareado)



Na deconvolução de imagens (Gráfico 5.7) obtidas a partir das lâminas de imunohistoquímica marcadas com a proteína TNF- α (Figura 5.5), não houve diferença estatística na comparação entre os grupos em cada tempo experimental ($p > 0,05$). Ao compararmos a evolução de cada grupo entre os dias 7 e 10, os grupos RLI e RLII apresentaram redução da concentração de TNF- α ($p < 0,05$) (Gráfico 5.7).

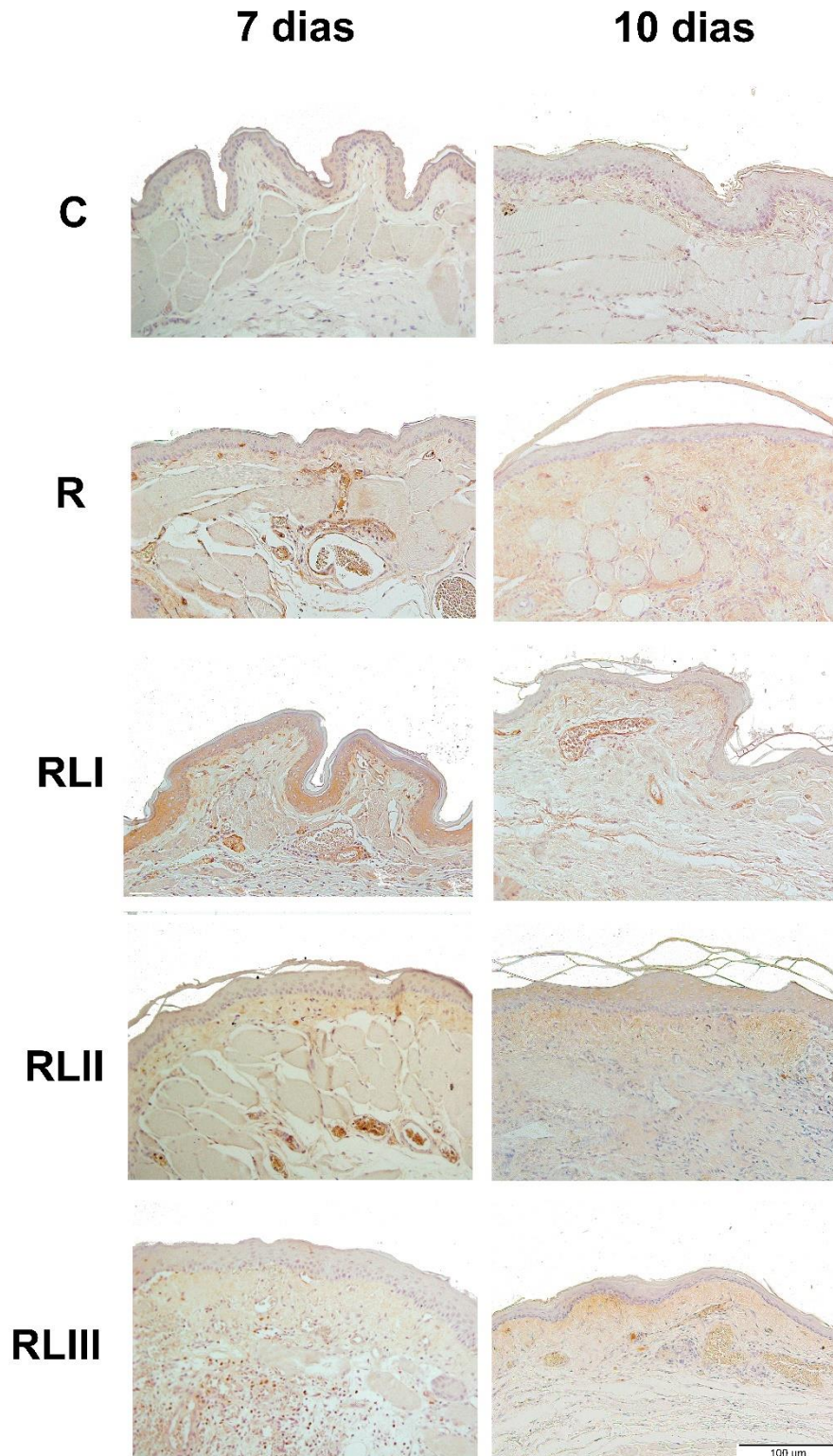
Gráfico 5.7 – Porcentagem de marcação das lâminas marcadas em imunohistoquímica para TNF- α . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Kruskal-Wallis). Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)



Fonte: O autor.

Para as fotomicrografias marcadas com TNF- α (Figura 5.6), o grupo C não apresentou marcação relevante, enquanto os demais grupos apresentaram marcação nos dias 7 e 10, podendo observar redução mais expressiva de marcação para os grupos RLI e RLII entre dias 7 e 10. No dia 7, o grupo RLIII apresentou marcação celular em submucosa. Os demais grupos apresentaram marcação discreta e difusa.

Figura 5.6 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais marcadas pelo anticorpo TNF α (em marrom). Imagens representativas dos grupos C, R, RLI, RLII e RLIII nos dias 7 e 10. O grupo C não apresentou marcação, enquanto os demais grupos apresentaram marcação nos dias 7 e 10, podendo observar redução mais expressiva de marcação para os grupos RLI e RLII entre dias 7 e 10. A marcação para os grupos foi discreta e difusa, exceto para o grupo RLIII no dia 7, que mostrou marcação celular em submucosa. Contracoloração com Hematoxilina de Mayer. Aumento de 20x



Fonte: O autor.

5.2 Grupos Q

Os resultados dos grupos Q foram avaliados de acordo com parâmetros macro e microscópicos.

5.2.1 Análise clínica e macroscópica das lesões

Análises qualitativas da distribuição das classificações da mucosite oral em cada grupo C e demais grupos com indução de MO (5-FU+ ranhura) (Gráfico 5.11):

- Grupo C
 - Dia 5 ao dia 7: Todas as mucosas não apresentaram MO (classificação 0 na escala utilizada);
- Grupo Q (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p > 0,05$):
 - Dia 5: a distribuição das classificações de MO manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;
 - Dia 7: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 3 e 4,5, com mediana e média próximas a 3,5;
 - Dia 10: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 3,5 e 4, sendo mediana e média próximas a 4.
- Grupo QLI (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p < 0,05$):
 - Dia 5: a distribuição das classificações de MO manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;
 - Dia 7: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 1,5 e 3, com mediana e média próximas a 2;
 - Dia 10: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada nos graus 0 e 2, sendo mediana e média próximas a 1.
- Grupo QLII (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p > 0,05$):
 - Dia 5: a distribuição das classificações de MO manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;

Dia 7: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 2 e 3,5, com mediana e média próximas a 3;

Dia 10: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada nos graus 1,5 e 4, sendo mediana e média próximas a 2.

- Grupo QLIII (Evolução clínica da lesão para o grupo do dia 5 ao dia 10 - $p > 0,05$):

Dia 5: a distribuição das classificações de MO manteve-se entre os graus 2,5 e 3, com mediana e média próximas a 3;

Dia 7: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 2 e 3,5, com mediana e média próximas a 3;

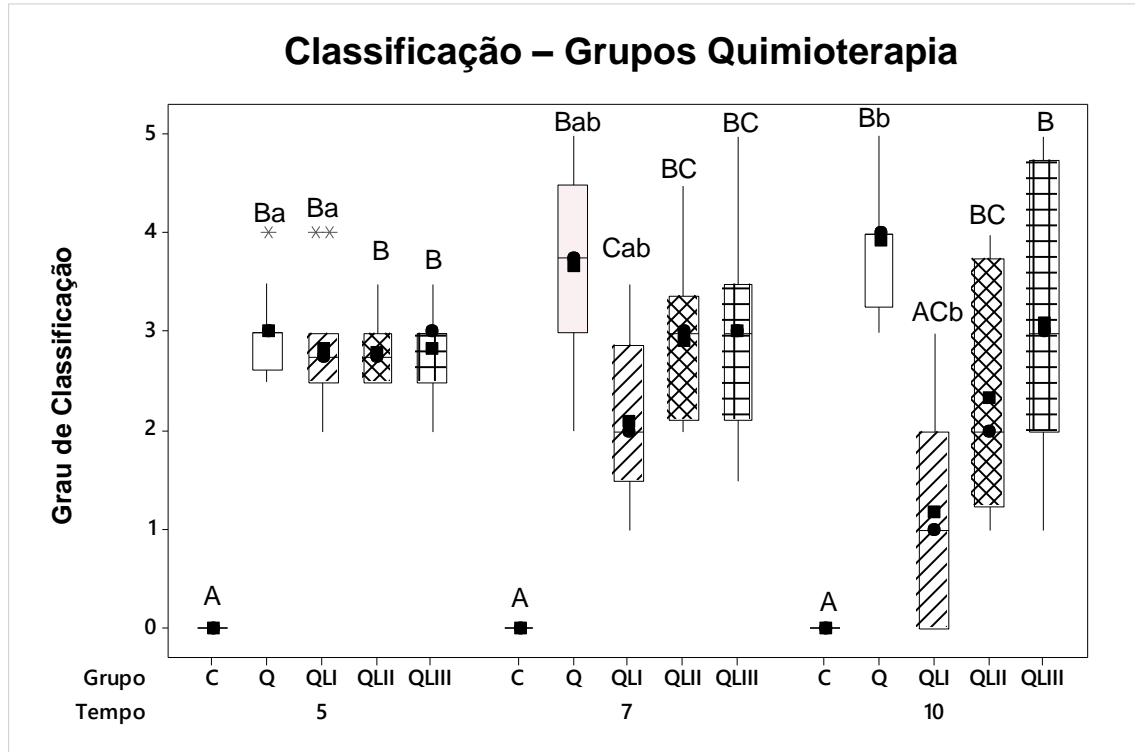
Dia 10: a distribuição das classificações de MO ficou concentrada nos graus 2 e 4,5, sendo mediana e média próximas a 3.

Em relação à evolução do grau de mucosite oral intergrupo, em cada tempo experimental (Gráfico 5.8), no dia 5 todos os grupos (exceto o grupo C) apresentaram grau de mucosite semelhante, permanecendo entre grau 2 e 3 (média e mediana próximas do grau 3).

No dia 7, o grupo QLI (média e mediana próximas a 2) apresentou graus menores de MO em comparação ao grupo Q, mas ainda semelhante aos grupos QLII e QLIII. Os grupos Q, QLII e QLIII não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Entretanto, a média e mediana do grupo Q foi mais próxima de 4 e a média dos grupos QLII e QLIII foi mais próxima de 3.

No dia 10, pudemos notar uma diferença mais evidente entre o grupo QLI e os demais. Enquanto o grau de MO no grupo continuou decaindo, com média e mediana chegando próximas ao grau 1, com aproximação ao grupo C, os outros grupos não apresentaram diferenças estatísticas relevantes (Q, QLII e QLIII). Entretanto, o grupo Q apresentou média e mediana próximas a 4, enquanto os grupos QLII e QLIII apresentaram valores próximos a 2 e 3 respectivamente (Gráfico 5.8).

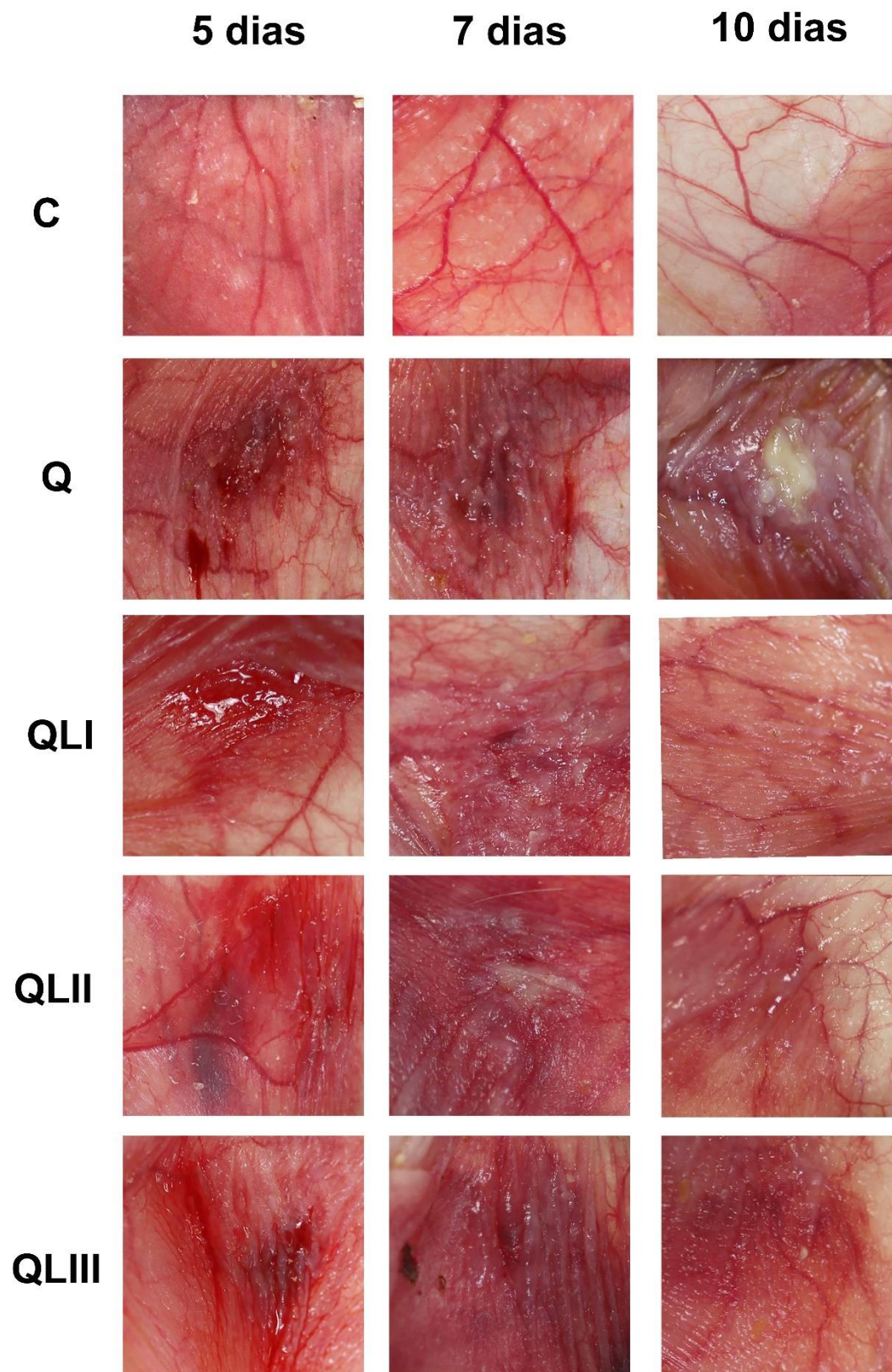
Gráfico 5.8 – Evolução da mucosite oral em cada grupo nos dias 5, 7 e 10, de acordo com a escala de W-Smith para MO. Letras maiúsculas diferentes indicam relevância estatística entre os grupos em cada tempo experimental e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística de cada grupo ao longo do tempo ($p < 0,05$); C, Controle; Q, Quimioterapia; QLI, PBMT 6 J/cm²/0,24J – um ponto; QLII, PBMT 25J/cm²/1J – um ponto; QLIII, PBMT 6 J/cm²/1,2 J – cinco pontos de 0,24J; Quadrado: média; Círculo: mediana; Asteriscos: *outliers*. Teste de Kruskal-Wallis (teste intergrupo – letras maiúsculas) e Friedman (teste intragrupo – letras minúsculas)



Fonte: O autor.

Em relação ao aspecto clínico da MO (Figura 5.7), podemos constatar que o grupo C manteve-se sem alterações, como esperado, com mucosa rósea e íntegra. O grupo Q apresentou ulceração com eritema leve a severo nos dias 5 e 7, que evoluiu para uma úlcera coberta por membrana fibrinopurulenta e eritema severo no dia 10. Quanto aos grupos que receberam os protocolos de PBMT, todos apresentaram úlcera central com eritema de leve a severo no dia 5. O grupo QLI, no dia 7, já apresentou indícios de progressão de reparo acelerado, com diminuição da área ulcerada e eritema. No dia 10, o grupo QLI apresentava mucosa totalmente reparada, com leve eritema. O grupo QLII apresentou úlcera central coberta por uma membrana fibrinopurulenta e eritema severo no dia 7. No dia 10 o grupo QLII ainda apresentou área de intenso eritema. O grupo QLIII apresentou eritema severo com úlcera central que começou a diminuir no dia 10, mas ainda com presença de eritema severo e pequenas áreas ulceradas (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Comparação clínica das mucosas dos *hamsters* de cada grupo, nos dias 5, 7 e 10. C, Controle; Q, Controle-Quimioterapia; QLI, PBMT 6 J/cm²/0,24J – um ponto; QLII, PBMT 25J/cm²/1J – um ponto; QLIII, PBMT 6 J/cm²/1,2 J – cinco pontos de 0,24J



Fonte: O autor.

A perda de massa corpórea foi menor para o grupo C em comparação com todos os grupos que receberam indução de MO (ranhura + 5-FU), nos dois tempos experimentais analisados (Tabela 5.2) ($p < 0,05$). Tal resultado pode estar relacionado aos efeitos colaterais do quimioterápico 5-FU, como diarreia e prostração. Outros efeitos também foram observados, como alopecia e secreção nos olhos. O grupo Q apresentou aumento de perda de massa corpórea estatisticamente significativa quando comparados os valores dos dias 7 e 10 ($p < 0,05$).

Para o consumo de água, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em cada tempo experimental. Entretanto, o grupo QLI apresentou aumento de consumo estatisticamente significativo de água do dia 7 ao dia 10 ($p < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas para o consumo de comida entre os grupos e tempos experimentais (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Média e Mediana (entre parênteses) da massa corpórea perdida (g), água consumida (ml) e comida consumida (g). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Kruskal-Wallis). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas em cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)

	Controle	Q	QLI	QLII	QLIII
Massa corpóreas perdida (g)					
7 Dias	9,2 (9) ^A	22 (21,5) ^{Ba}	22,2 (23) ^B	18,7 (18) ^B	22,5 (23,5) ^B
10 Dias	11,8 (10,5) ^A	34 (31) ^{Bb}	29 (29) ^B	25,5 (22,5) ^B	26,8 (29) ^B
Água consumida (ml)					
7 Dias	73,3 (65)	70 (70)	61,7 (55) ^a	70,8 (77,5)	53,3 (60)
10 Dias	123,3 (135)	113,3 (90)	121,7 (140) ^b	101,7 (110)	112,5 (110)
Comida consumida (g)					
7 Dias	47,7 (38)	22,8 (17,5)	40,3 (15)	46,8 (26,5)	21,2 (18)
10 Dias	55,2 (44,5)	24,2 (17)	46,3 (28)	21,8 (13)	39,5 (37)

Fonte: O autor

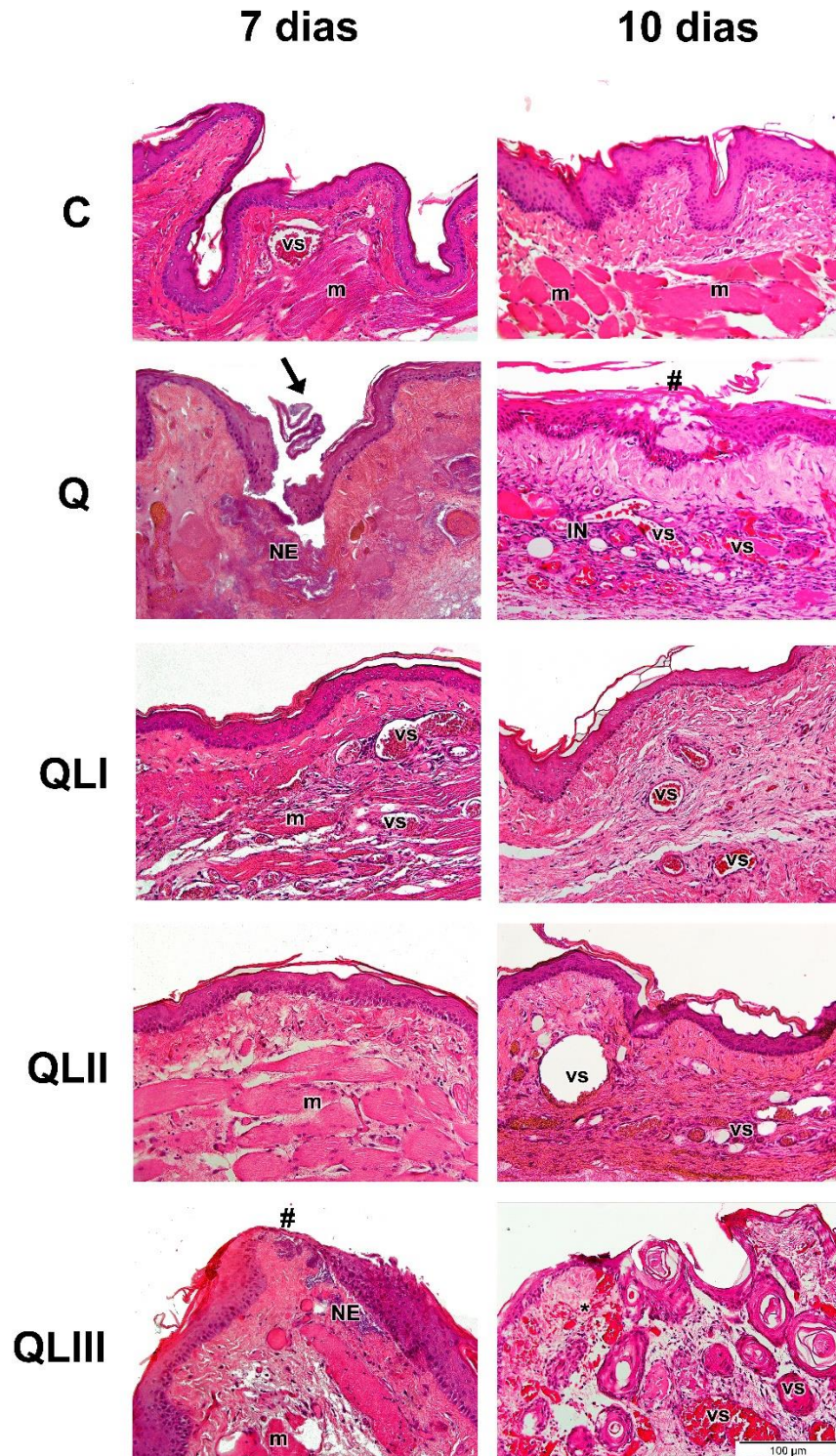
5.2.2 Análise da evolução do processo de reparo tecidual microscopicamente

O grupo C apresentou um exemplo de aspecto de tecido íntegro nos dias 7 e 10: epitélio contínuo e tecido conjuntivo da lâmina própria com presença de fibras musculares e vasos sanguíneos (Figura 5.8).

No dia 7, o grupo Q apresentou uma úlcera evidente e um epitélio descontínuo; o tecido conjuntivo subjacente apresentou desorganização e necrose abaixo da úlcera. O aspecto do grupo QLI foi semelhante ao do grupo C, com um epitélio contínuo e tecido conjuntivo organizado, com a presença de vasos e fibras musculares. O grupo QLII apresentou o mesmo padrão dos grupos C e QLI, com epitélio contínuo, tecido conjuntivo organizado e fibras musculares. O padrão do grupo QLIII parece ser um estágio intermediário entre o grupo Q e os grupos QLI e QLII, devido à aparência de regeneração epitelial na região de úlcera, na qual a camada basal parece estar se formando e o epitélio não está totalmente organizado; é também observado uma pequena região de necrose na lâmina própria.

No dia 10, é possível perceber aspectos ainda mais semelhantes entre os grupos QLI, QLII e C. Os grupos Q e QLIII ainda estão em processo de reparo tecidual, com desorganização do conjuntivo e regeneração epitelial. O grupo Q, além da presença de alguns vasos, ainda apresentou áreas de infiltrado inflamatório moderado. O Grupo QLIII apresentou alguns vasos e áreas de extravasamento sanguíneo (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais. Imagens representativas dos grupos C, Q, QLI, QLII e QLIII nos dias 7 e 10. Epitélio íntegro é observado em todos os grupos exceto no grupo Q, que apresenta úlcera (seta) e área de necrose adjacente (NE) no dia 7 e epitélio em processo de reparo (#) e área de infiltrado inflamatório de leve a moderado (IN) no dia 10. O grupo QLIII apresentou área de epitélio em processo de reparo (#) com necrose subjacente (NE) no dia 7 e área de extravasamento sanguíneo no dia 10 (*). Setas, úlceras; #, epitélio em formação; Asteriscos (*), extravasamento de células sanguíneas; IN, infiltrado inflamatório; VS, vasos sanguíneos; M, fibras musculares; NE, necrose. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 20x



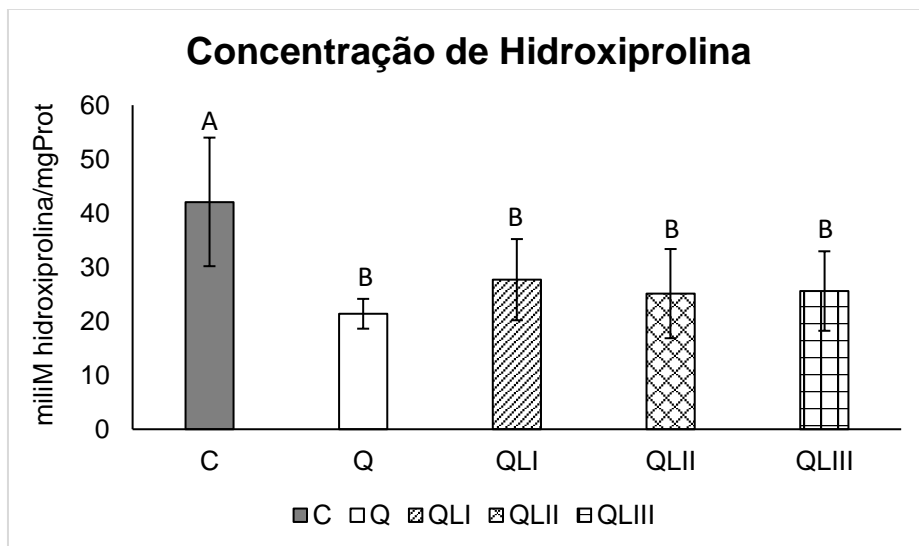
Fonte: O autor.

5.2.3 Avaliação da remodelação do tecido

A avaliação da remodelação do tecido envolveu análise bioquímica para concentração de hidroxiprolina e de marcação de colágeno pela técnica de Tricrômico de Mallory.

A concentração de hidroxiprolina no dia 10 não apresentou diferença estatística entre os grupos que receberam apenas indução da MO ou indução da MO + PBMT. Entretanto, o grupo C (sem intervenção) apresentou concentração dessa proteína cerca de 50% maior em relação aos outros grupos (Q, QLI, QLII e QLIII) (Gráfico 5.9).

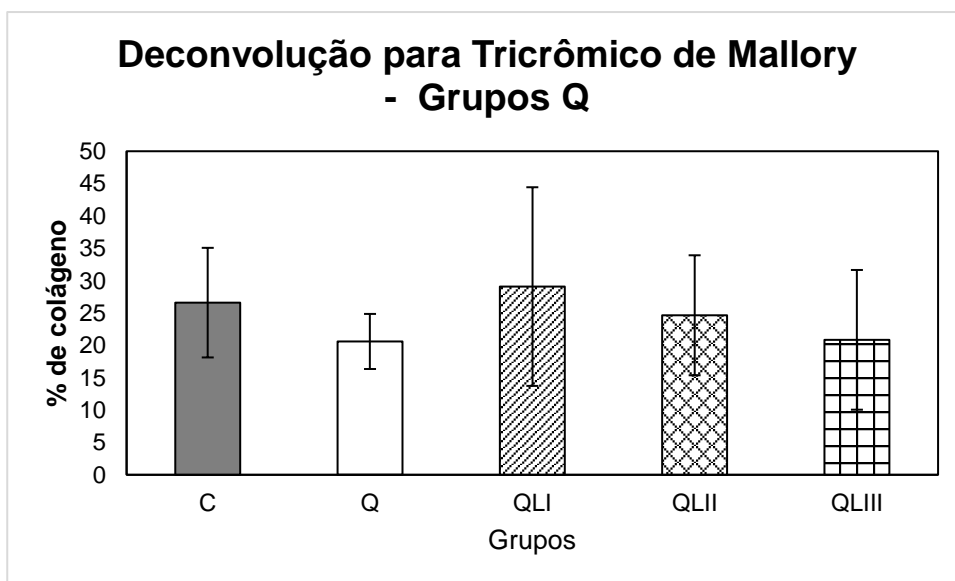
Gráfico 5.9 – Concentração de hidroxiprolina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais no dia 10 ($p < 0,05$). Teste de Fisher – Anova



Fonte: O autor.

O Gráfico 5.10 mostra os valores de porcentagem de área de marcação de colágeno com a técnica de Tricrômico de Mallory, através do método de deconvolução de imagem. Pode-se constatar que as concentrações de fibras colágenas em Q e QLIII foram menores em relação aos outros grupos, sendo próximas de 20%. O grupo QLII apresentou uma concentração próxima ao grupo C, com cerca de 26%. O grupo QLI, por sua vez, apresentou uma concentração discretamente superior, por volta de 29%. No entanto, as diferenças entre as médias não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Gráfico 5.10).

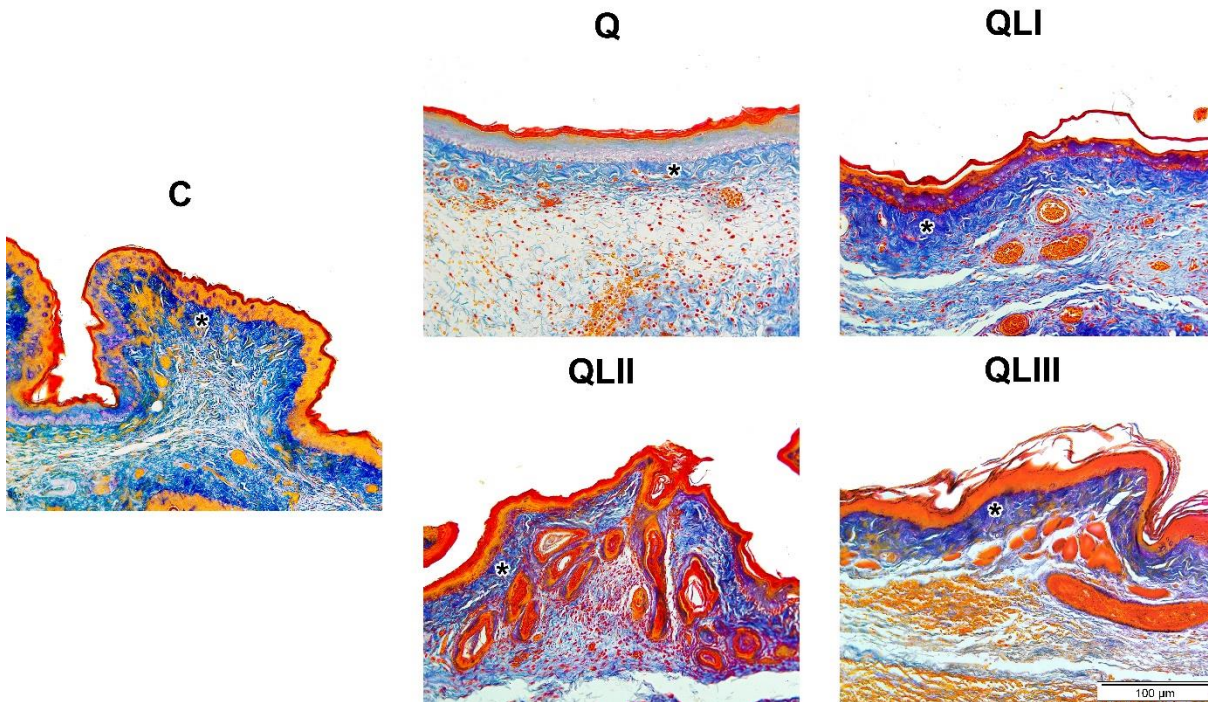
Gráfico 5.10 – Porcentagem de marcação para colágeno com a técnica de Tricrômico de Mallory. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais no dia 10 ($p > 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis



Fonte: O autor.

Nas fotomicrografias para marcação de Tricrômico de Mallory, o grupo Q apresentou área de colágeno menos densa em relação aos demais. Os outros grupos apresentaram uma área de colágeno mais densa próximo ao epitélio, seguido por uma área de colágeno mais frouxa (Figura 5.9).

Figura 5.9 – Fotomicrografias dos grupos experimentais no dia 10. A marcação em azul escuro representa áreas de colágeno mais denso. Asteriscos (*), área de colágeno mais denso. Técnica de Tricrômico de Mallory. Aumento de 20x



Fonte: O autor.

5.2.4 Avaliação do processo inflamatório

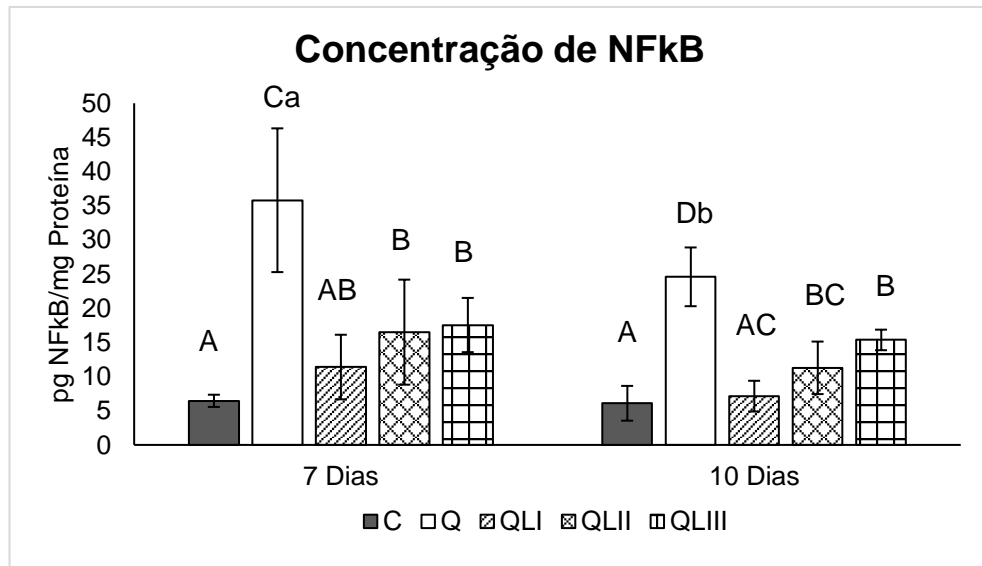
O processo inflamatório foi avaliado através de análises bioquímicas e imunohistoquímicas para NF-kB e TNF- α .

5.2.4.1 Análise de NF-kB

No dia 7, foi possível observar maior concentração do fator nuclear NF-kB no grupo Q, aproximadamente 60% maior que os grupos que receberam algum protocolo de PBMT ($p < 0,05$). Apesar dos grupos que receberam PBMT não apresentarem diferenças entre si, houve aproximação entre as concentrações dos grupos C (sem intervenção) e QLI (ranhura + PBMT um ponto de 0,24 J). No dia 10, a concentração de NF-kB diminuiu para todos os grupos, mas ainda foi maior para o grupo Q em 70% em relação ao grupo QLI, em 54% em relação ao grupo QLII e em 40% em relação ao grupo QLIII. Ainda no dia 10, houve maior aproximação entre os grupos C e QLI e a concentração de NF-kB para o grupo QLI foi cerca de 53% menor em relação ao grupo QLIII ($p < 0,05$) (Gráfico 5.11). Na comparação da evolução de cada grupo entre

os dois tempos experimentais (7 e 10 dias), foi possível observar diminuição significativa apenas para o grupo Q ($p < 0,05$).

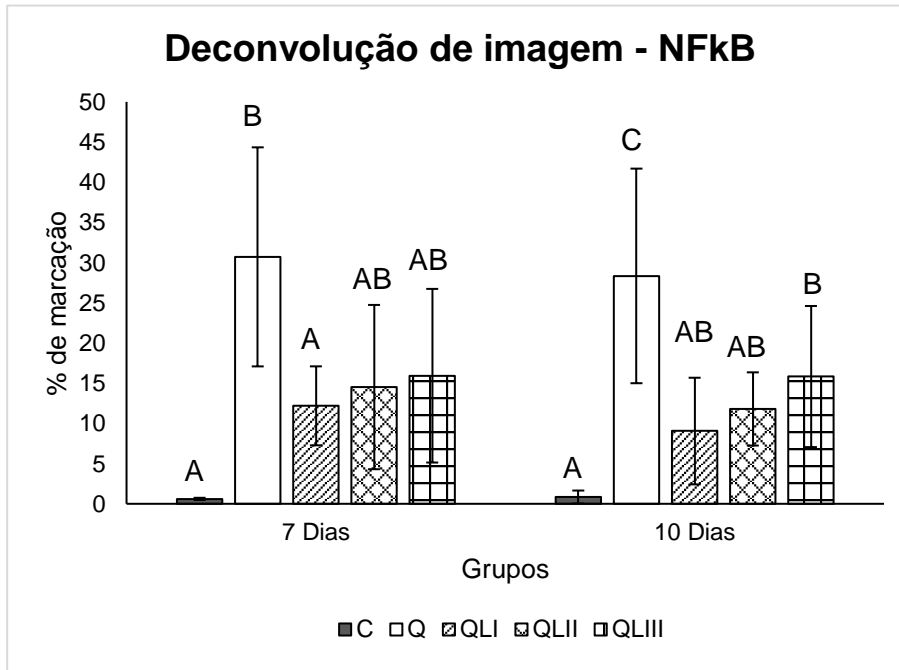
Gráfico 5.11 – Concentração de NF-kB em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Fisher – Anova). Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste T pareado)



Fonte: O autor.

O método de deconvolução de imagem (Gráfico 5.12) das fotomicrografias de imunohistoquímica com marcação para NF-kB (Figura 5.10) apresentaram o mesmo padrão de distribuição da concentração de proteína pelo método bioquímico. Nos dias 7 e 10 o grupo Q apresentou marcação cerca de 50% maior que os grupos que receberam ranhura + PBMT. No dia 7, os Grupos QLII e QLIII apresentaram proximidade tanto ao grupo C quanto ao grupo Q. Apenas os grupos C e QLI apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo Q: o grupo QLI apresentou resultado 60% menor e o grupo C apresentou marcação 97% menor, em relação ao grupo Q ($p < 0,05$). No dia 10, o grupo QLII também passou a apresentar diferenças estatísticas quando comparado ao grupo Q, com concentração de NF-kB aproximadamente 54% menor. Apenas o grupo QLIII permaneceu semelhante ao grupo Q ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística em cada grupo entre os dois tempos experimentais ($p > 0,05$) (Gráfico 5.12).

Gráfico 5.12 – Porcentagem de marcação das lâminas marcadas em imunohistoquímica para NF-kB em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada tempo experimental ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)

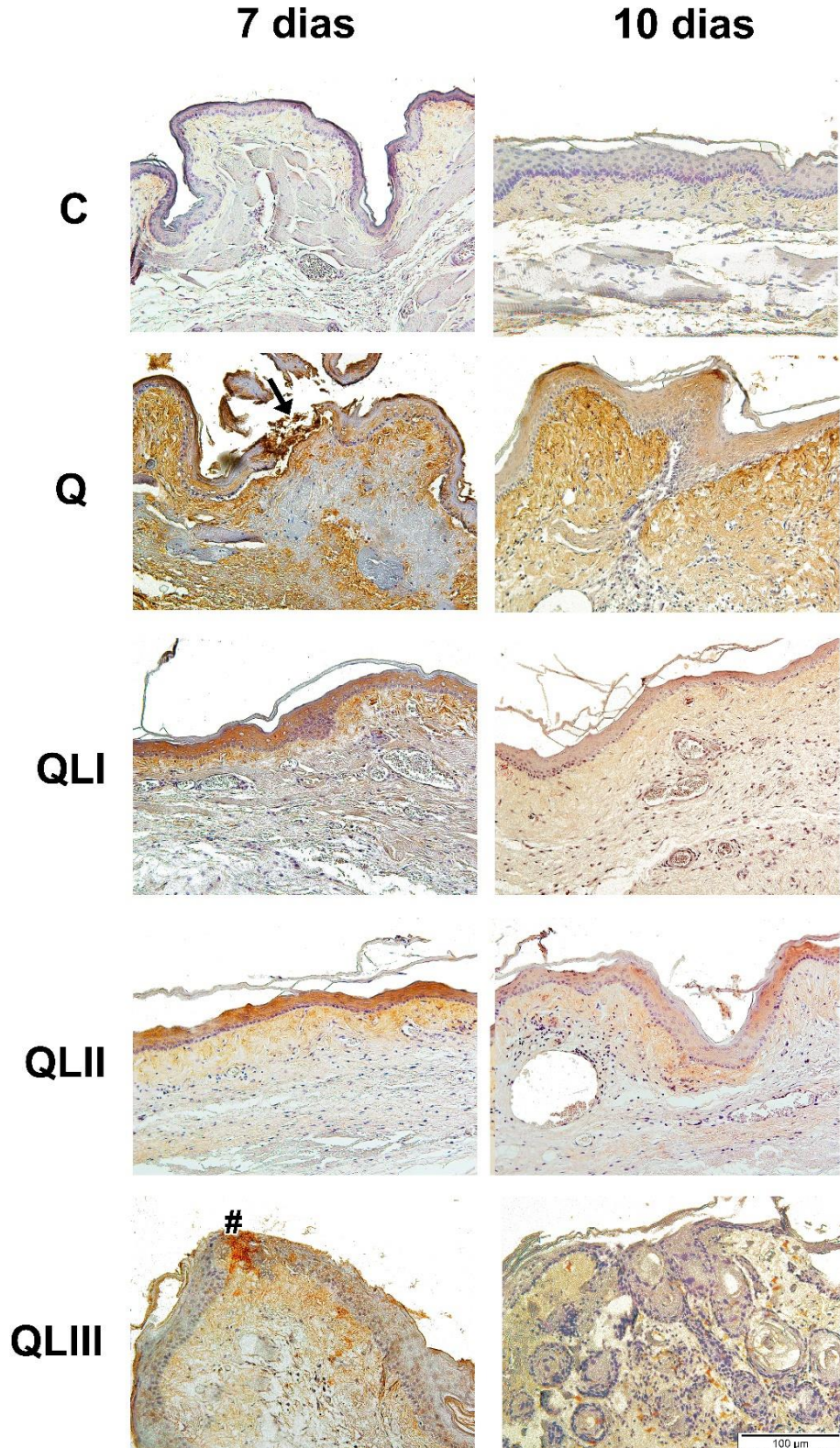


Fonte: O autor.

O padrão de marcação para NF-kB nos grupos que receberam quimioterápico foi difuso, marcando inclusive matriz extracelular. Nos grupos que receberam PBMT, a diminuição da marcação é evidente em comparação com o grupo Q, nos dias 7 e 10.

No dia 7, o grupo Q apresentou praticamente todo o conjuntivo marcado, com exceção da área necrótica. Os grupos QLI e QLII apresentam uma faixa de marcação logo abaixo do epitélio, que acompanhou toda a camada basal do epitélio. O grupo QLIII apresentou forte marcação em área de úlcera e em algumas regiões próximas à camada basal do epitélio. No dia 10, o grupo Q ainda apresentou marcação por quase toda a matriz extracelular, sendo mais forte próximo ao tecido epitelial. Os grupos QLI e QLII apresentaram marcações menos intensas que no dia 7 e também adjacentes ao tecido epitelial. O grupo QLIII apresentou marcação em meio ao tecido conjuntivo desorganizado. Além disso, é possível observar as mesmas estruturas teciduais encontradas na análise por H&E (úlcera, área epitelial em processo de reparo, necrose, vasos, fibras musculares e infiltrado inflamatório) (Figura 5.10).

Figura 5.10 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais marcadas pelo anticorpo NF- κ B (em marrom). Imagens representativas dos grupos C, Q, QLI, QLII e QLIII nos dias 7 e 10. O grupo C não apresentou marcação relevante para o fator NF- κ B, enquanto todos os outros grupos apresentaram marcação. A marcação foi mais intensa para o grupo Q nos dias 7 e 10 e menos intensa para os demais grupos. No geral, a marcação foi mais difusa na lâmina própria. Seta, Úlcera; #, epitélio em formação. Contracoloração com Hematoxilina de Harris. Aumento de 20x

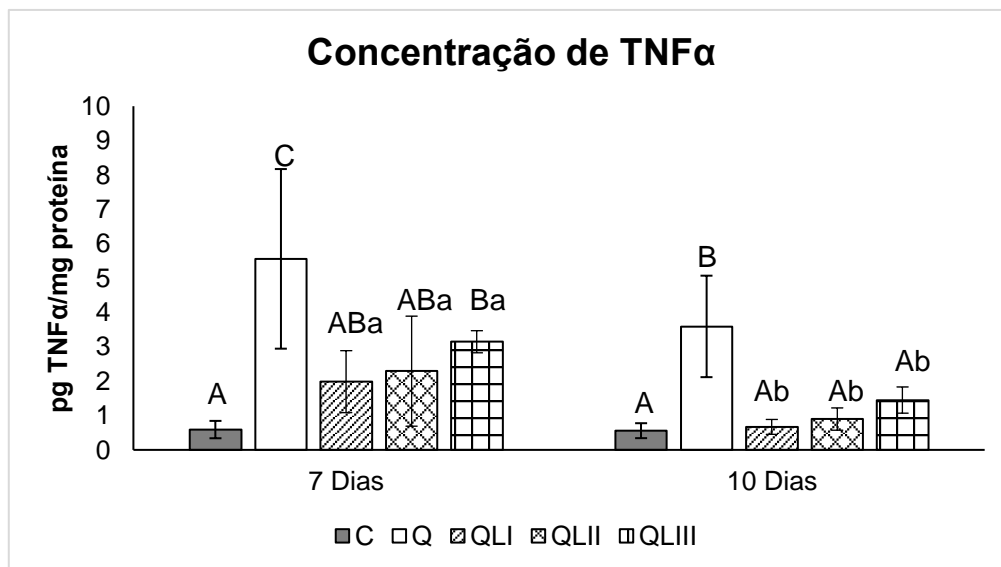


Fonte: O autor.

5.2.4.2 Análise de TNF- α

Para concentração de TNF- α , no dia 7, o grupo Q mostrou as maiores concentrações da citocina, sendo 89% maior que o grupo C, 64% maior que o grupo QLI, 59% maior que o grupo QLII e 44% maior que o grupo QLIII. Os grupos que receberam indução de MO + PBMT apresentaram valores semelhantes entre si. Dos grupos que receberam PBMT, apenas o grupo QLIII apresentou diferença estatística comparado ao grupo C, sendo cerca de 80% maior. No dia 10, todos os grupos que receberam indução de MO + PBMT apresentaram semelhança entre si e com o grupo C ($p > 0,05$). O grupo Q continuou apresentando a maior concentração, cerca de 84% maior que o grupo C e QLI, 75% maior que o grupo QLII e 60% maior que o grupo QLIII. Na comparação de cada grupo entre os dias 7 e 10, apenas os grupos Q, QLI, QLII e QLIII apresentaram diferenças estatísticas, com redução de concentração de TNF- α entre os dois tempos experimentais ($p < 0,05$) (Gráfico 5.13).

Gráfico 5.13 – Concentração de TNF- α em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Fisher – Anova). Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste T pareado)

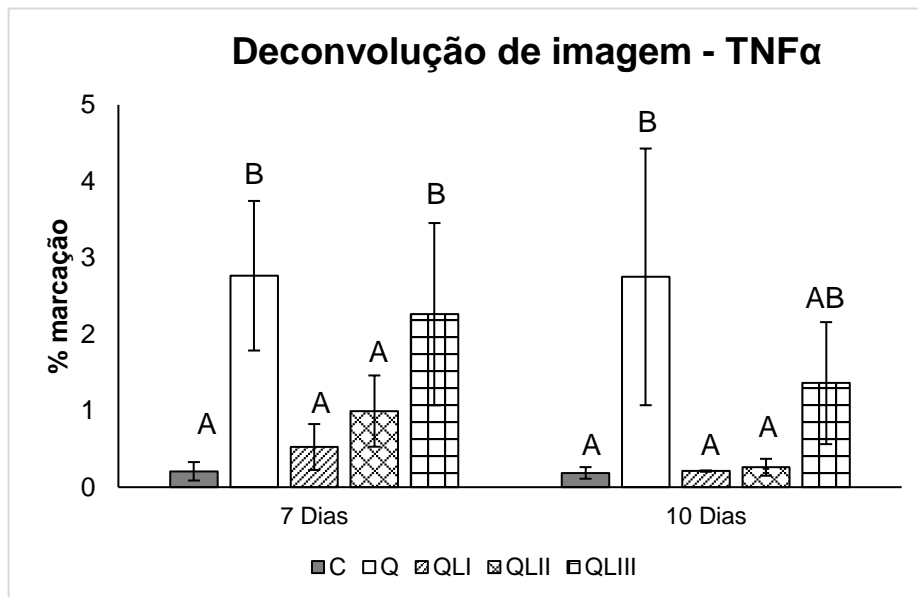


Fonte: O autor.

O método de deconvolução de imagem (Gráfico 5.14) das fotomicrografias de imunohistoquímica com marcação para TNF- α (Figura 5.11) mostrou o grupo C, como esperado, com marcação não relevante para TNF- α até o fim do experimento, próximo

a 0,2%. Os grupos QLI e QLII apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao grupo C tanto no dia 7 quanto no dia 10. O grupo Q, de maneira oposta, manteve uma marcação mais alta, próxima a 2,75% durante os dias 7 e 10, indicando a presença e permanência do quadro inflamatório. O grupo QLIII apresentou equivalência estatística ao grupo Q no dia 7 e se posicionou entre as médias dos grupos Q e C no dia 10, com uma concentração aproximada de 1,4% (Gráfico 5.14).

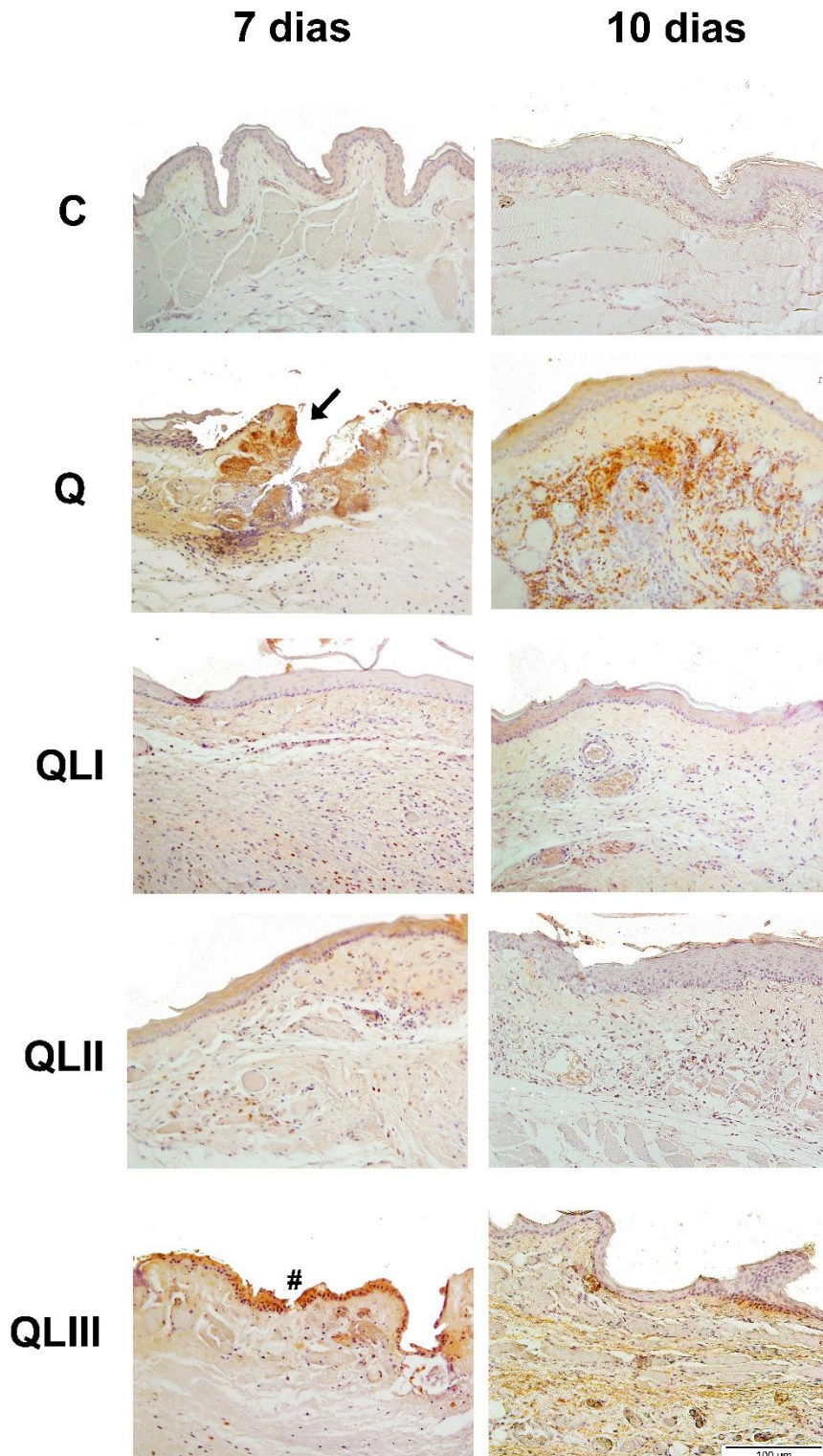
Gráfico 5.14 – Porcentagem de marcação das lâminas marcadas em imunohistoquímica para TNF- α em cada grupo experimental nos dias 7 e 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada tempo experimental (Teste de Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na evolução de cada grupo entre os dois tempos experimentais (Teste de Wilcoxon)



Fonte: O autor.

O padrão de marcação para os grupos que receberam quimioterápico foi difuso e em núcleo e citoplasma das células. Em 7 dias, o grupo Q apresentou maior marcação em região de úlcera, próximo à necrose. Os grupos QLI e QLII apresentaram marcações em submucosa. O grupo QLIII apresentou marcação em epitélio e em tecido conjuntivo próximo ao epitélio. No dia 10 o grupo Q apresentou forte marcação no tecido conjuntivo, no meio do infiltrado inflamatório. Os grupos QLI e QLII não apresentaram marcações expressivas, ficando próximo ao aspecto do grupo C. O grupo QLIII apresentou marcação do tecido conjuntivo. É possível observar as mesmas estruturas teciduais encontradas na análise por H&E (vasos, fibras musculares e infiltrado inflamatório, área em reparo tecidual, úlceras e necrose tecidual) (Figura 5.11).

Figura 5.11 – Fotomicrografias da mucosa oral dos animais dos diferentes grupos experimentais marcadas pelo anticorpo TNF α (em marrom). Imagens representativas dos grupos C, Q, QLI, QLII e QLIII nos dias 7 e 10. O grupo C não apresentou marcação nos dias 7 e 10, enquanto o grupo Q apresentou maior intensidade de marcação em área de úlcera no dia 7 e em área de infiltrado inflamatório moderado no dia 10. Os grupos QLI e QLII apresentaram pouca marcação em submucosa no dia 7, que não estava mais presente no dia 10. O grupo QLIII apresentou marcação mais intensa principalmente em epitélio no dia 7 e em mucosa e submucosa no dia 10. Seta, Úlcera; #, epitélio em formação. Contracoloração em Hematoxilina de Mayer. Aumento de 20x



Fonte: O autor.

5.3 Comparação entre grupos R e Q

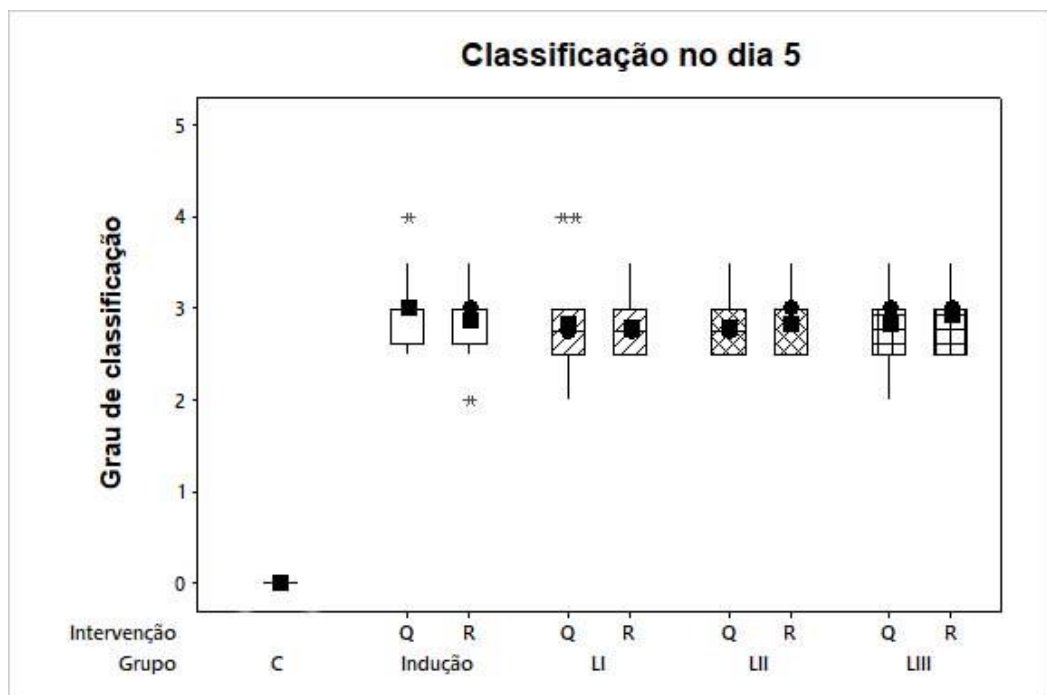
Os resultados dos grupos R e Q, com e sem os protocolos de PBMT foram avaliados de acordo com parâmetros macro e microscópicos.

5.3.1 Análise clínica e macroscópica das lesões

Dia 5 (Gráfico 5.15)

- Todos os grupos: apresentaram graus de mucosite com média e mediana próximas a 3, indicando indução mecânica semelhante entre os grupos ($p > 0,05$), com exceção do grupo C (controle) (Gráfico 5.15).

Gráfico 5.15 – Comparação do grau de classificação das lesões, segundo a intervenção (ranhura ou indução de mucosite oral) e grupo de tratamento, no dia 5, de acordo com a escala de W-Smith. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Q e R, em cada tipo de grupo tratamento. Quadrado: média; Círculo: mediana; Asteriscos: outliers. Teste de Mann-Whitney

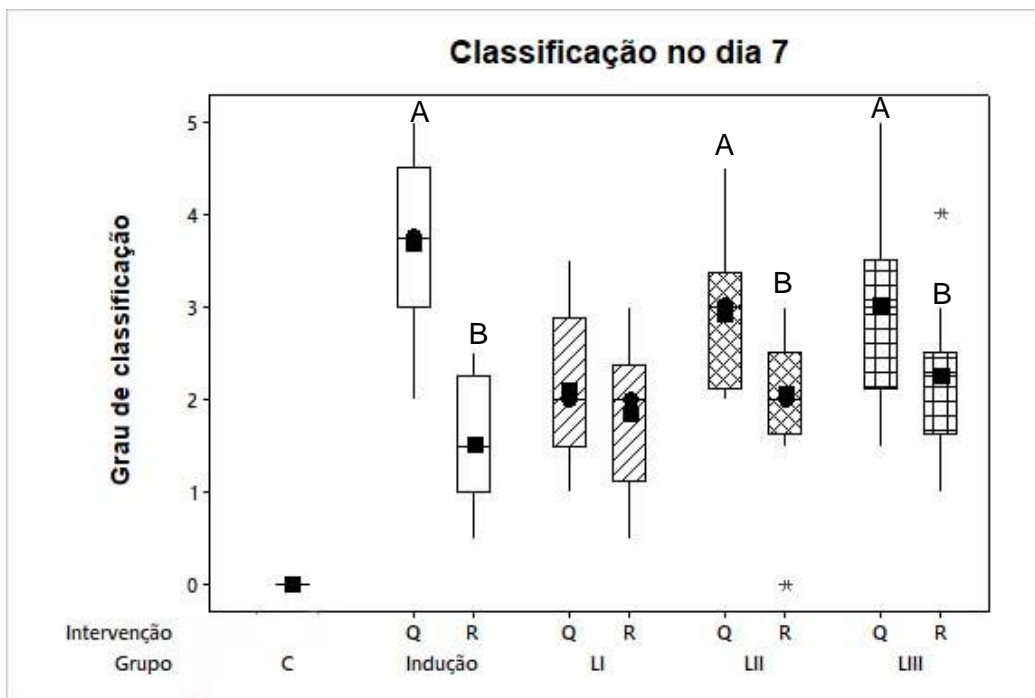


Fonte: O autor.

Dia 7 (Gráfico 5.16)

- Grupo C: Grau 0 de lesão
- Grupos Indução: a distribuição das classificações das lesões no grupo R ficou concentrada entre os graus 1 e 2,5, com mediana e média próximas a 1,5. No grupo Q, a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 2,5 e 4, com mediana e média próximas a 3,5 ($p < 0,05$);
- Grupos LI: Média e mediana dos grupos R e Q foram aproximadamente 2 ($p > 0,05$);
- Grupos LII: Média e mediana do grupo R foi 2, enquanto para o grupo Q foi aproximadamente 3 ($p < 0,05$);
- Grupos LIII: Média e mediana do grupo R foi 2, enquanto para o grupo Q foi aproximadamente 3 ($p < 0,05$);

Gráfico 5.16 – Comparação do grau de classificação das lesões, segundo a intervenção (ranhura ou indução de mucosite oral) e grupo de tratamento, no dia 7, de acordo com a escala de W-Smith. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Q e R, em cada tipo de grupo tratamento ($P < 0,05$). Quadrado: média; Círculo: mediana; Asteriscos: *outliers*. Teste de Mann-Whitney

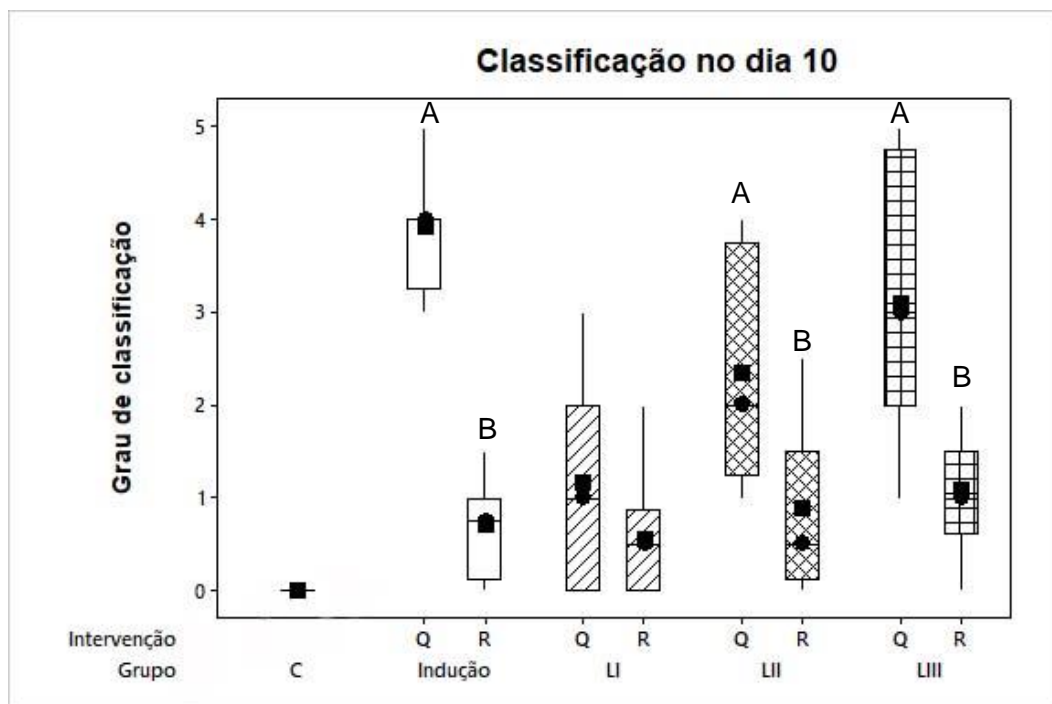


Fonte: O autor.

Dia 10 (Gráfico 5.17)

- Grupo C: Grau 0 de lesão
- Grupos Indução: a distribuição das classificações das lesões no grupo R ficou concentrada entre os graus 1 e 2,5, com mediana e média próximas a 1,5. No grupo Q, a distribuição das classificações de MO ficou concentrada entre os graus 2,5 e 4, com mediana e média próximas a 3,5;
- Grupos LI: O grupo Q apresentou média e mediana próximas a 1 e o grupo R apresentou média e medianas próximas a 0,5 ($p > 0,05$)
- Grupos LII: O grupo Q apresentou média e mediana próximas a 2 e o grupo R apresentou média e medianas entre 0,5 e 1,0 ($p < 0,05$)
- Grupos LIII: O grupo Q apresentou média e mediana próximas a 3 e o grupo R apresentou média e medianas próximas a 1,0 ($p < 0,05$)

Gráfico 5.17 – Comparação do grau de classificação das lesões, segundo a intervenção (ranhura ou indução de mucosite oral) e grupo de tratamento, no dia 10, de acordo com a escala de W-Smith. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Q e R, em cada tipo de grupo tratamento. Quadrado: média; Círculo: mediana; Asteriscos: outliers. Teste de Mann-Whitney



Fonte: O autor.

Em relação ao aspecto clínico das lesões, podemos constatar que o grupo C manteve-se sem alterações, como esperado, com mucosa rósea e íntegra. No dia 5, os demais grupos que receberam apenas ranhura, ou ranhura + QT apresentaram aspecto semelhante (Figura 5.1 e 5.7). O grupo Q que recebeu apenas indução apresentou úlceração com eritema leve a severo nos dias 5 e 7, que evoluiu para uma úlcera coberta por membrana fibrinopurulenta e eritema severo no dia 10 (Figura 5.7). O grupo R que recebeu apenas indução apresentou características de evolução de reparo já no dia 7, apresentando mucosa íntegra no dia 10 (Figura 5.1). Os grupos que receberam o protocolo LI (QLI e RLI) apresentaram evolução de reparo semelhante entre si, principalmente no dia 10. O grupo R que recebeu o protocolo LII apresentou melhor evolução que seu correspondente Q: no dia 7 é possível constatar grau de reparo maior para o grupo R do que para o grupo Q. O mesmo aconteceu para o protocolo LIII: o aspecto da mucosa do grupo R apresentava-se mais reparado que o do grupo Q, a partir do dia 7 (Figura 5.1 e Figura 5.7).

No geral, a perda de massa corpórea (Tabela 5.3) foi maior para todos os grupos que receberam quimioterápico do que para os grupos que receberam apenas ranhura. Entretanto, diferenças estatísticas ($p < 0,05$) só foram constatadas para os grupos R e Q que receberam apenas indução e para os grupos que receberam tratamento com o protocolo LI (um ponto central de 0,24J) nos dias 7 e 10. Os grupos R e Q, que foram tratados com o protocolo LII (um ponto central de 1J), apresentaram diferenças estatísticas apenas no dia 7. A maior perda de massa corpórea para os grupos que receberam quimioterapia está relacionada aos efeitos colaterais do quimioterápico 5-FU.

Para o consumo de água e comida (Tabela 5.3), não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 5.3 – Média e Mediana (entre parênteses) da massa corpórea perdida (g), água consumida (ml) e comida consumida (g). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, nos dias 7 e 10 (Teste de Mann-Whitney).

	Controle		Indução	LI	LII	LIII
Massa corpórea perdida (g)						
7 DIAS	9.2 (9)	Grupos Q	22 (21,5) ^A	22,2 (23) ^A	18,7 (18) ^A	22,5 (23,5)
		Grupos R	11,4 (12) ^B	15 (15) ^B	10,7 (9,5) ^B	15,2 (16,5)
10 DIAS	11.8 (10.5)	Grupos Q	34 (31) ^A	29 (29) ^A	25,5 (22,5)	26,8 (29)
		Grupos R	13,3 (12) ^B	15 (15) ^B	17,7 (16,5)	19,3 (21,5)
Água consumida (ml)						
7 DIAS	73.3 (65)	Grupos Q	70 (70)	61,7 (55)	70,8 (77,5)	53,3 (60)
		Grupos R	74,3 (70)	78,3 (75)	71,7 (82,5)	54,2 (45)
10 DIAS	123.3 (135)	Grupos Q	113,3 (90)	121,7 (140)	101,7 (110)	112,5 (110)
		Grupos R	78,3 (70)	110 (105)	89 (70)	108,3 (80)
Comida consumida (g)						
7 DIAS	47.7 (38)	Grupos Q	22,8 (17,5)	40,3 (15)	46,8 (26,5)	21,2 (18)
		Grupos R	32,4 (35)	33,5 (26)	24,5 (27,5)	46,7 (20,5)
10 DIAS	55.2 (44.5)	Grupos Q	24,2 (17)	46,3 (28)	21,8 (13)	39,5 (37)
		Grupos R	46,8 (46)	36,1 (21,5)	35,3 (34,5)	43,3 (39,5)

Fonte: O autor.

5.3.2 Avaliação da remodelação do tecido

Nas fotomicrografias para a técnica de coloração com H&E, o grupo C apresentou um exemplo de aspecto de tecido íntegro nos dias 7 e 10: epitélio contínuo e tecido conjuntivo da lâmina própria com presença de fibras musculares e vasos sanguíneos (Figura 5.2 e Figura 5.8).

No dia 7, o grupo Q apresentou uma úlcera evidente e um epitélio descontínuo; o tecido conjuntivo subjacente apresentou necrose abaixo da úlcera. O grupo R apresentou epitélio contínuo e leve infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo e a presença de alguns vasos sanguíneos e fibras musculares. No dia 10, o epitélio do grupo Q ainda não estava totalmente regenerado, com tecido conjuntivo desorganizado e áreas de infiltrado inflamatório leve a moderado, além da presença de alguns vasos e área hemorrágica. Já o grupo R, apresentou aspecto semelhante ao grupo C, com epitélio íntegro e tecido conjuntivo organizado, no qual também é possível observar algumas fibras musculares.

Os grupos QLI e RLI apresentaram aspectos bastante semelhantes ao grupo C, com epitélio íntegro, algumas fibras musculares e ausência de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo. O grupo QLI apresentou ainda algumas regiões com vasos sanguíneos. No dia 10, ambos se aproximaram ainda mais do aspecto do grupo C.

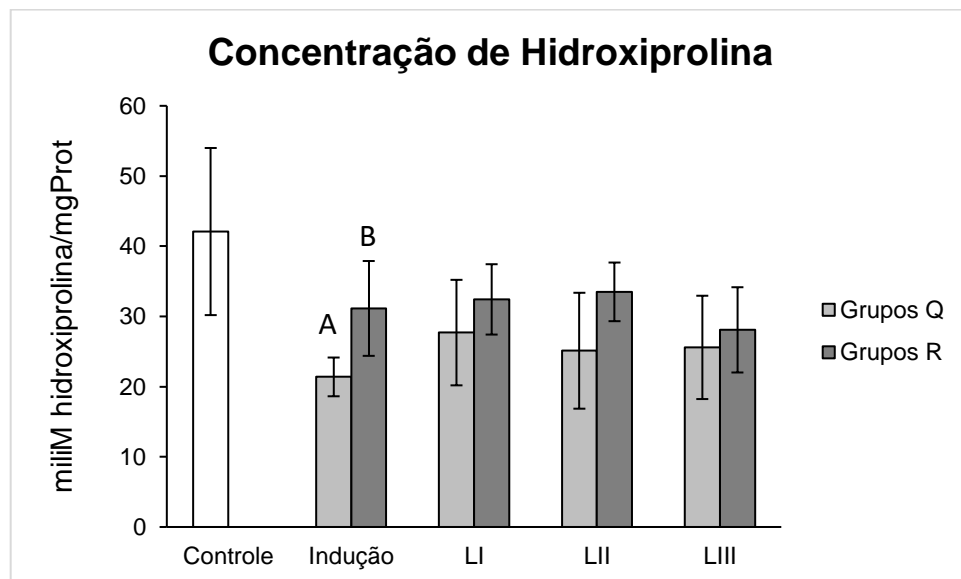
O grupo QLII apresentou o mesmo padrão dos grupos C e QLI, com epitélio contínuo e alguns vasos sanguíneos no tecido conjuntivo. O grupo RLII apresentou epitélio íntegro e infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo. No dia 10 é possível perceber aspecto mais semelhante entre os grupos C, QLI, RLI, QLII e RLII: aspecto completamente íntegro, com tecido conjuntivo subjacente mais organizado, com a presença de alguns vasos sanguíneos e fibras musculares.

No dia 7, o padrão do grupo QLIII parece ser um estágio intermediário entre o grupo Q e os grupos QLI e QLII, devido à aparência de regeneração epitelial na região de úlcera, na qual a camada basal parece estar se formando e o epitélio não está totalmente organizado; é também observado um extravasamento de células sanguíneas e uma pequena região de necrose na lâmina própria. O grupo RLIII apresenta estágio mais avançado de reparo, com epitélio totalmente íntegro e infiltrado inflamatório moderado no dia 7. No dia 10, o grupo QLIII ainda apresentou processo de reparo tecidual, com desorganização do conjuntivo e regeneração epitelial, enquanto o grupo RLIII já apresentou aspecto semelhante ao grupo C, com

epitélio íntegro e tecido conjuntivo com a presença de vasos sanguíneos e fibras musculares (Figura 5.2 e Figura 5.8).

Ao compararmos a concentração da proteína do colágeno, hidroxiprolina (Gráfico 5.18), observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos apenas indução de feridas R e Q, sendo que o grupo R apresentou maior concentração da proteína. Os demais grupos R e Q que receberam algum dos protocolos de PBMT não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$).

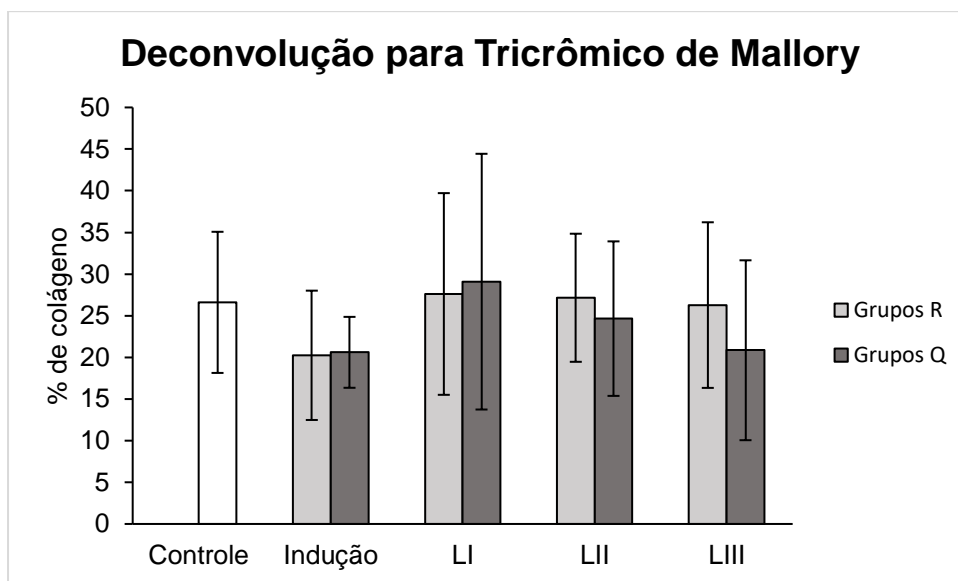
Gráfico 5.18 – Concentração de hidroxiprolina. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, no dia 10 ($p < 0,05$) (Teste T para duas amostras)



Fonte: O autor.

O Gráfico 5.19 mostra a porcentagem de área de marcação de colágeno com a técnica de Tricrômico de Mallory, através do método de deconvolução de imagem. Não foi possível detectar diferenças estatísticas para as comparações entre os grupos R e Q, segundo as intervenções: apenas indução de feridas e protocolos LI, LII e LIII de PBMT ($p > 0,05$).

Gráfico 5.19 – Porcentagem de marcação para colágeno com a técnica de Tricrômico de Mallory, Comparação entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, no dia 10 ($p>0,05$) (Teste de Mann-Whitney)



Fonte: O autor.

Nas fotomicrografias para marcação de Tricrômico de Mallory (Figura 5.3 e Figura 5.9), os grupos que receberam apenas indução de ferida com ranhura ou ranhura + quimioterápico (grupos R e Q, respectivamente) apresentaram menor área de colágeno denso em relação aos demais. Nas fotomicrografias é possível observar padrão bem semelhante entre os outros grupos, com uma área mais densa de marcação próximo ao epitélio, representando um tecido conjuntivo denso, seguido por uma área de colágeno mais frouxo.

5.3.3 Avaliação do processo inflamatório

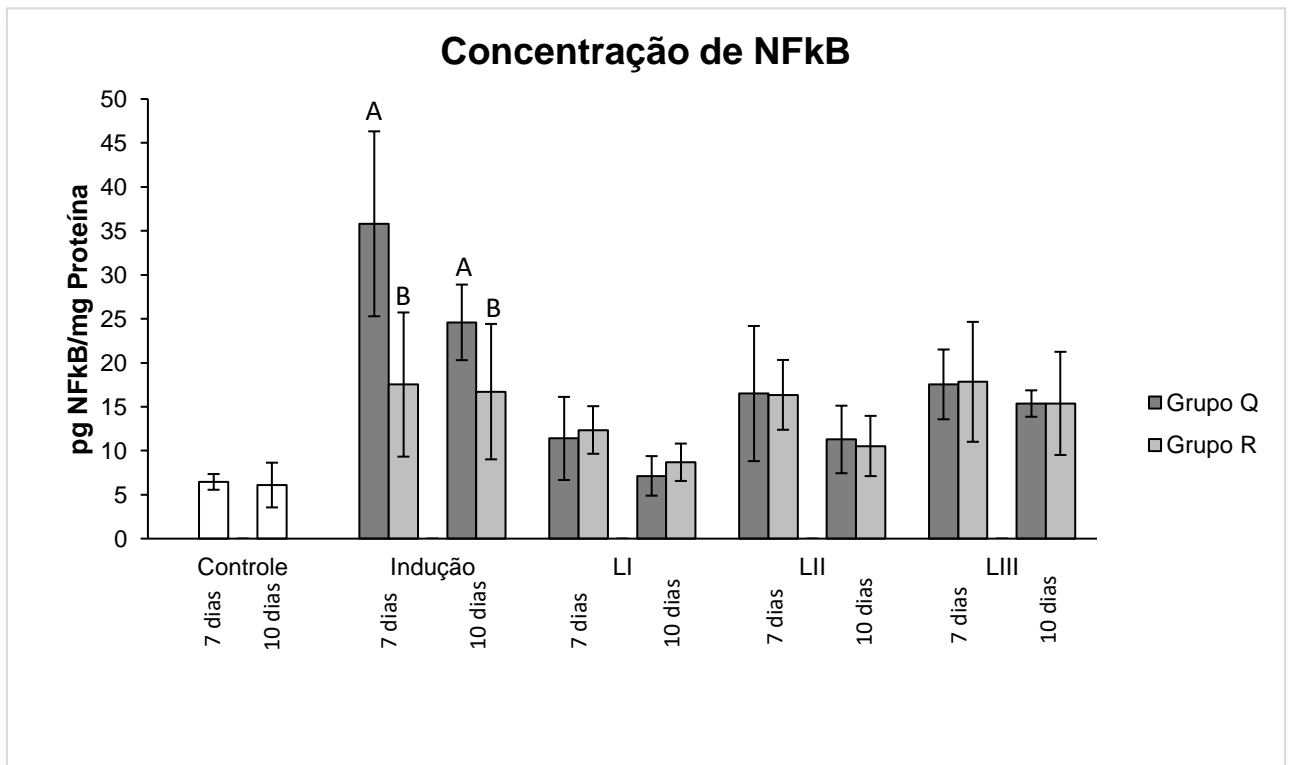
O processo inflamatório foi avaliado através de análises bioquímicas e imunohistoquímicas para NF- κ B e TNF- α e comparados entre os grupos Q e R para cada tipo de intervenção.

5.3.3.1 Análise de NF- κ B

O grupo que recebeu apenas indução de mucosite oral, grupo Q (5-FU + ranhura), apresentou maior concentração de NF- κ B quando comparado com o grupo

R (apenas indução da lesão com ranhura) nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$). Os demais grupos que receberam tratamento com algum dos protocolos de PBMT, apresentaram semelhança de valores de concentração da proteína entre os grupos R e Q para os dias 7 e 10 ($p > 0,05$) (Gráfico 5.20). Apesar disso, é possível observar que os grupos Q e R que receberam tratamento com o protocolo LI de PBMT (um ponto central de 0,24J) apresentaram as menores concentrações de NF- κ B, próximas ao grupo controle, seguidos pelos grupos que receberam protocolo LII de PBMT (um ponto central de 1J) e LIII (cinco pontos de 0,24J cada, com energia total de 1,2J).

Gráfico 5.20 – Concentração de NF- κ B. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$) (Teste T para duas amostras).

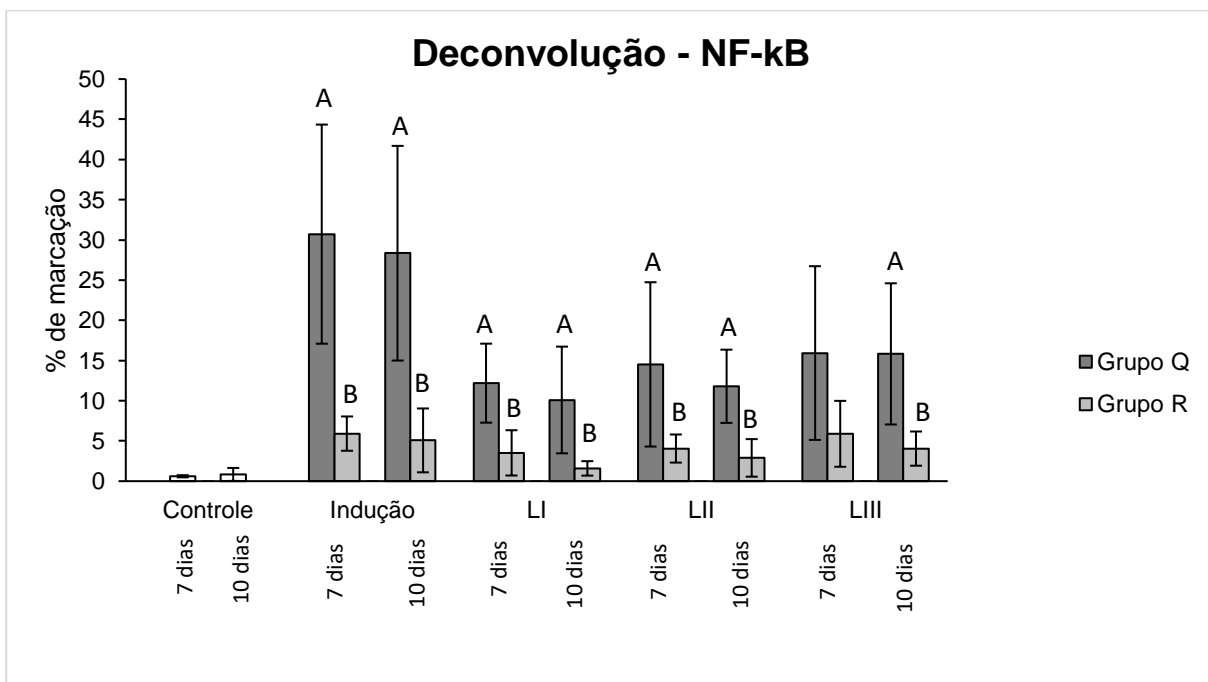


Fonte: O autor.

De acordo com a concentração de NF- κ B pelo método de deconvolução de imagem (Gráfico 5.21), o grupo que recebeu apenas indução de mucosite oral, grupo Q (quimioterapia + ranhura), apresentou maior marcação em imunohistoquímica para NF- κ B quando comparado com o grupo R (apenas indução da lesão com ranhura) nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$). O método de deconvolução de imagem também demonstrou diferenças significativas entre os grupos R e Q que receberam algum dos tratamentos

de PBMT. Os grupos R e Q que receberam os protocolos LI e LII de PBMT apresentaram diferenças estatísticas nos dias 7 e 10 de análise. Os grupos R e Q que receberam o protocolo LIII apresentaram diferenças estatísticas apenas no dia 10. No dia 7, apesar da diferença não ser significativa estatisticamente, o grupo Q que recebeu o protocolo LIII apresentou marcação para NF-kB cerca de 30% maior que o grupo R que recebeu o protocolo LIII.

Gráfico 5.21 – Porcentagem de marcação em imunohistoquímica para NF-kB. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$) (Teste de Mann-Whitney)



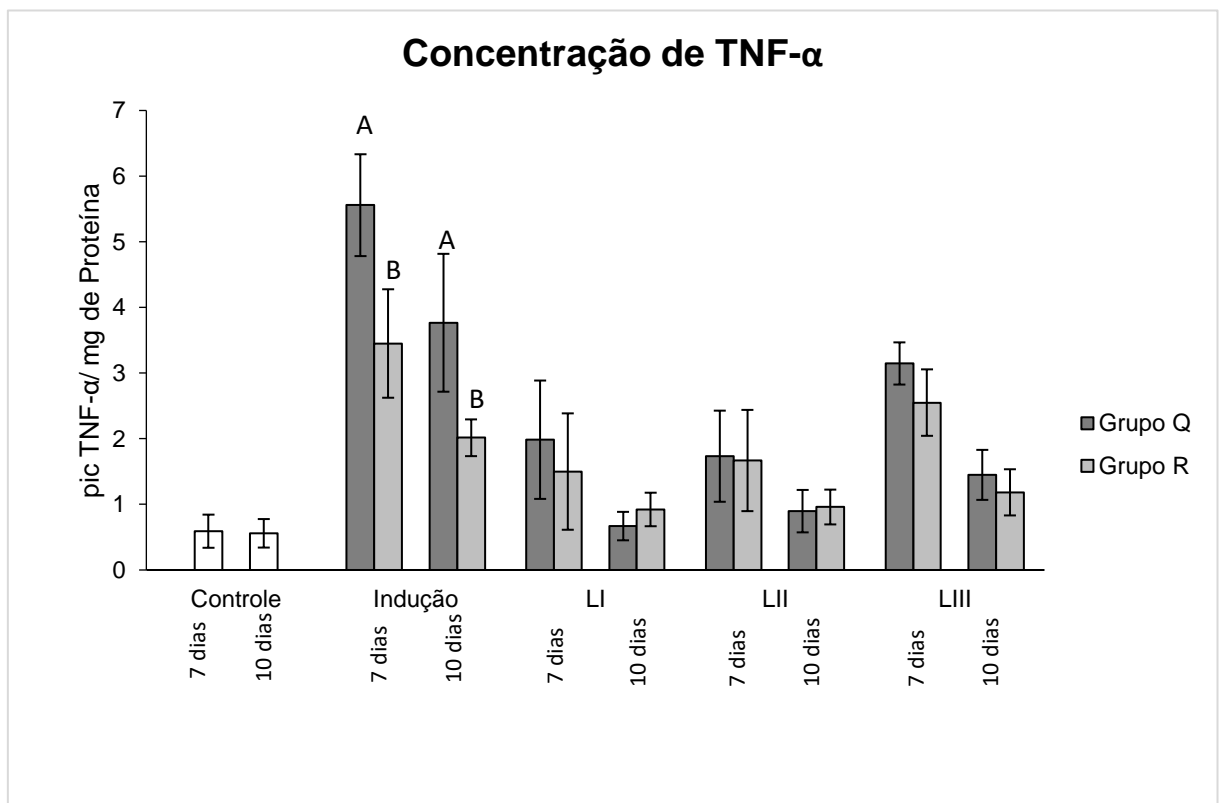
Fonte: O autor.

Para as fotomicrografias marcadas em imunohistoquímica com NF-kB (Figura 5.4 e Figura 5.10), é possível observar que o padrão de marcação para os grupos R ocorreu principalmente no citoplasma das células, enquanto os grupos Q apresentaram marcação mais difusa, marcando também matriz extracelular. Em detalhe mostrado na Figura 5.5 é possível observar marcação em citoplasma de macrófagos no grupo R. Dessa forma, devido a marcação de mais estruturas nos grupos Q para NF-KB, as fotomicrografias mostram marcações mais expressivas nos grupos Q (Q, QLI, QLII e QLIII) em relação aos seus correspondentes nos grupos R (R, RLI, RLII e RLIII), nos dias 7 e 10.

5.3.3.2 Análise de TNF- α

Para as concentrações de TNF pelo método bioquímico podemos observar que o grupo Q (ranhura + quimioterápico) apresentou maiores concentrações da proteína TNF- α nos dias 7 e 10, em comparação ao grupo R, que recebeu apenas ranhura ($p < 0,05$) (Gráfico 5.22).

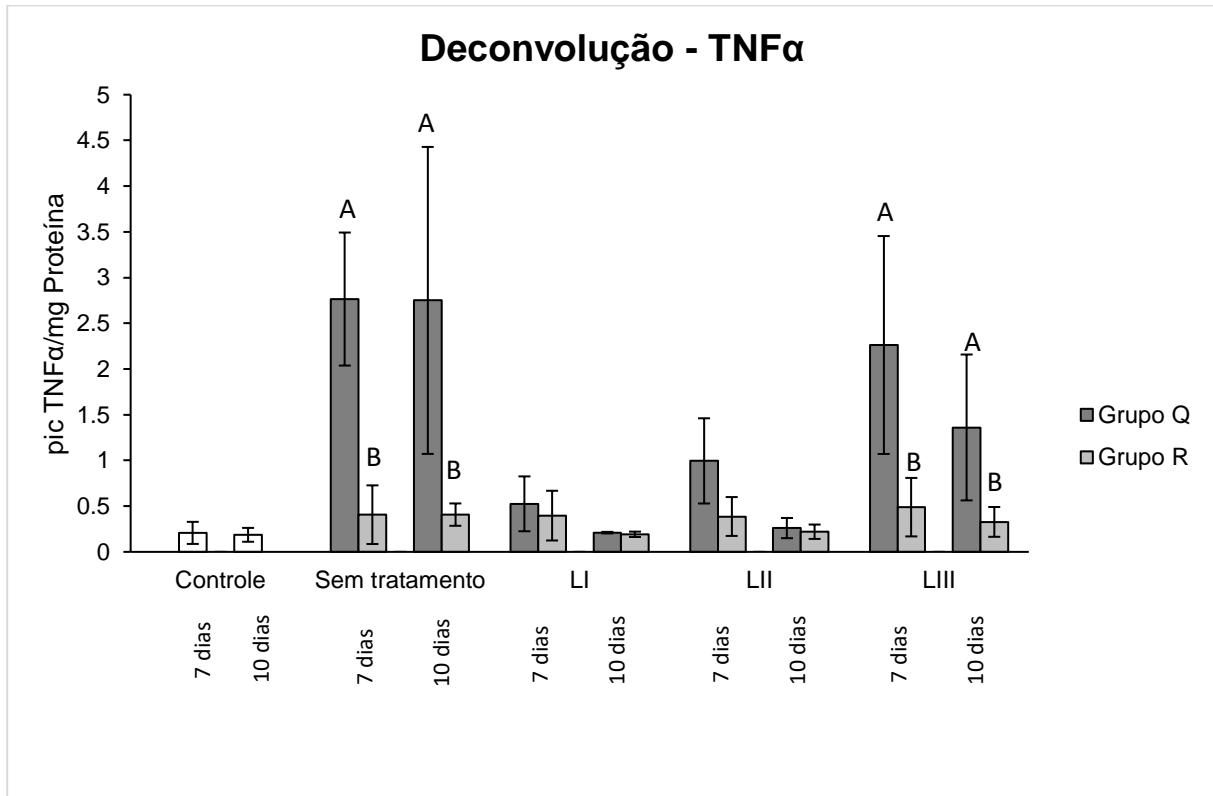
Gráfico 5.22 – Concentração de TNF- α . Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$) (Teste T para duas amostras)



Fonte: O autor.

Para deconvolução das fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF α , além das diferenças entre os grupos Q e R que receberam apenas indução da ferida ($p < 0,05$), foram constatadas diferenças entre os grupos Q e R que receberam o protocolo LIII de PBMT, que mostra um processo de reparo mais lento do grupo que recebeu indução de MO do que o grupo que recebeu apenas ranhura nos dias 7 e 10 (Gráfico 5.23) .

Gráfico 5.23 – Porcentagem de marcação em imunohistoquímica para TNF α Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam apenas ranhura e os grupos que receberam indução de MO, para cada tipo de intervenção: apenas indução de lesões e os três protocolos de PBMT, nos dias 7 e 10 ($p < 0,05$) (Teste de Mann-Whitney)



Fonte: O autor.

Nas fotomicrografias para marcação em TNF é possível observar a comparação entre os grupos Q e R para cada tipo de intervenção. Nos dias 7 e 10 é evidente a maior marcação para o grupo Q (ranhura + 5-FU) comparado ao grupo R (ranhura). Os grupos QLI, RLI e QLII e RLII apresentaram marcações semelhantes entre si nos dois tempos experimentais. Entretanto o grupo QLIII apresentou maior marcação que o seu correspondente, RLIII, nos dias 7 e 10 (Figura 5.6 e 5.11).

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos científicos, tanto clínicos, quanto com animais comprovaram que o efeito biológico da PBMT tem grande potencial no reparo tecidual e na redução da inflamação. De maneira geral, os grupos que receberam o quimioterápico 5-FU deixaram mais evidente o efeito da PBMT, quando comparados com os grupos que receberam indução da lesão apenas com ranhuras. Essa situação vai ao encontro com o conceito de que os efeitos da PBMT parecem ser mais evidentes em organismos e tecidos mais debilitados (Tunér et al., 2015; Yamamoto et al., 1996). Entretanto, não há na literatura trabalhos que comparem a evolução do reparo tecidual e aspectos inflamatórios em grupos que receberam protocolo de indução da lesão apenas com ranhura (grupos R) e que receberam indução de mucosite oral com ranhura associada ao quimioterápico 5-FU (grupos Q).

Com relação à massa corpórea perdida, é possível observar que todos os grupos que receberam indução de MO (ranhura + 5FU) apresentaram maior perda de massa corpórea em relação aos grupos que só receberam a ranhura. Tal fato já era esperado devido ao comprometimento sistêmico dos animais que receberam o 5-FU, evidentes nos sinais clínicos observados em todos os animais tratados e na maioria dos relatos da literatura (Tabela 2.2), tais como: diarreia, alopecia, presença de secreções e redução da ingestão de alimentos e água, com consequente perda de peso (Cruz et al., 2015; Sonis et al., 2016; Cotomacio et al., 2017)

Quanto ao aspecto clínico no dia 5, é possível observar que todos os grupos apresentaram o mesmo grau de classificação da lesão. A partir do dia 7, constataram-se as primeiras diferenças: os grupos que receberam o protocolo de menor energia, tanto o que recebeu indução de MO, quanto o que recebeu apenas ranhura, apresentaram graus semelhantes entre si, evidenciando que a PBMT com menor energia foi capaz de reduzir os graus da ferida apesar da presença do quimioterápico. O mesmo padrão manteve-se no dia 10.

Outros estudos que aplicaram energia semelhante à utilizada no grupo que recebeu apenas ranhura e menor quantidade de energia (0,24J) também mostraram efeitos parecidos. Gabriel et al. (2019) trataram úlceras induzidas em língua de ratos com laser vermelho e 0,16J por ponto, totalizando 0,32J. Os autores observaram reepitelização acelerada nos dias 3 e 5 em relação ao grupo que não recebeu

tratamento. Em modelo experimental semelhante, Wagner et al. (2013) utilizaram dois protocolos de PBMT com laser vermelho em baixa potência: um de 0,16 J e outro de 0,8 J. No dia 5, o grupo que recebeu menor energia de PBMT apresentou reepitelização total e tecido conjuntivo mais organizado, o que não aconteceu para os grupos controle sem tratamento e PBMT com 0,8 J. No presente estudo, uma vez que a indução de feridas foi superficial e as análises foram realizadas a partir do dia 7, não foi possível identificar alterações no processo de reparo tecidual, entre o grupo R (apenas ranhura) e os grupos R que receberam algum dos protocolos de PBMT. O processo de reparo da mucosa oral é muito rápido e eficiente, quando não há nenhum comprometimento sistêmico associado e, com isso, o efeito da PBMT fica menos evidente.

Além do comprometimento sistêmico, o tipo de tecido e de lesão induzida também influenciou nos resultados. Carvalho et al. (2015) compararam dois grupos experimentais: um grupo controle, com indução de úlceras causadas por formocresol em gengiva de ratos e outro grupo com a mesma indução de ferida, mas que recebeu tratamento com PBMT (660nm, 0,19J, 4,8 J/cm² e 40 mW). Para o grupo que recebeu a indução da lesão com formocresol + PBMT, o reparo tecidual foi mais rápido que o grupo controle a partir do dia 5, com completa reepitelização das lesões no 11^o dia. Entretanto, apesar do protocolo utilizado por esses autores ser semelhante ao do grupo RLI (660 nm, 0,24J, 6 J/cm² e 40 mW), no dia 7 os autores ainda observaram a presença de úlcera nas fotomicrografias de ambos grupos analisados, o que já não foi observado para os animais (somente ranhuras), do presente estudo, que apresentaram epitélio totalmente reparado nesse tempo experimental.

As diferenças de resultados entre os dois estudos devem-se principalmente à natureza da indução das lesões e à frequência de aplicação da PBMT. A indução por formocresol causa efeito cáustico e citotóxico (Ko et al., 2017), sendo mais agressivo do que as induções por ranhuras utilizando apenas a ponta de uma agulha, demandando, assim, mais tempo para o reparo total. Além disso, Carvalho et al. (2015) aplicaram o protocolo de PBMT com intervalo de 48 horas, enquanto o presente estudo realizou aplicações diárias. Apesar da mucosa oral ser muito dinâmica e reparar de 7 a 14 dias dependendo da gravidade da ferida (Broughton et al., 2006), a aplicação diária da PBMT parece ser mais eficaz para o reparo de lesões, principalmente quando o estresse oxidativo e a injúria ao tecido for maior (Tunér et al., 2015).

Os grupos que receberam indução de MO seguiram os resultados apresentados em trabalho prévio realizado (Cotomacio et al., 2017), no qual também foram analisados os efeitos de três protocolos de laser para tratar MO durante 7 dias de experimento. Foram utilizados três protocolos, semelhantes aos dos grupos que receberam 5-FU do presente estudo: o primeiro protocolo com 0,24 J em ponto central, o segundo com um ponto central de 1J e o terceiro de quatro pontos de 0,24 J cada, totalizando 0,96 J. Esse estudo sugeriu que a energia e o modo de aplicação com menor energia, centralizado na lesão foi o melhor protocolo para manter os graus de MO mais baixos e para acelerar o reparo tecidual. No presente estudo, os resultados seguiram a mesma tendência, a partir do dia 7 de observação: o grupo de menor energia em um ponto central (QLI) apresentou os melhores resultados, seguido pelos grupos QLII (um ponto central de 1J) e QLIII (5 pontos de 0,24J cada, totalizando 1,2J). Assim como no trabalho realizado anteriormente (Cotomacio et al., 2017), o grupo QLIII, que recebeu maior energia, mostrou tempo de reparo mais demorado.

Por outro lado, em outro estudo semelhante, mas que utilizou PBMT para reparo de lesões realizadas na pele de dorso de ratos sistemicamente debilitados devido a diabetes induzida (Castro, 2018), os autores observaram que 5 pontos de irradiação com uma energia de 0,28 J por ponto (energia total de 1,4 J) foi melhor para o reparo do que a irradiação com um único ponto de maior energia (1,4 J por ponto), ou com um ponto apenas, de energia mais baixa (0,28J). Tal fato traz para discussão a diferença de resposta de cada tipo de tecido e sua capacidade de absorver e dissipar as quantidades de energia. Enquanto que para a mucosa oral baixa energia parece ser benéfica, para a pele, mais pontos com energias baixas, totalizando uma energia mais alta, parece ser a melhor opção.

Em outro trabalho com indução de MO em mucosa de hamsters, Cruz et al. (2015), utilizaram protocolo de laser de baixa potência com uma energia maior, de 4,4J (120 J/cm², 40 mW) por ponto. Os autores relataram reparo da ferida apenas no dia 10, resultado que já havia sido constatado no grupo QLI do presente estudo no dia 7 de observação. Assim, a menor quantidade de energia aplicada, perpendicular e no centro da lesão demonstrou processo de reparo mais rápido, quando comparado com aqueles achados por Cruz et al. (2015). Vitória et al. (2018), utilizando o mesmo modelo experimental em hamster, mostraram que com uma energia por ponto ainda menor que a usada nesse estudo para o grupo QLI, de 0,096J, foi possível observar redução do grau de MO e melhor organização tecidual nos cortes histológicos com

apenas 3 aplicações de PBMT. Esses estudos mostram que há diversos parâmetros que podem interferir no efeito da PBMT na superfície do tecido irradiado. Portanto, o conceito de que altas energias teriam efeito inibitório, enquanto baixas energias provocariam efeito bioestimulador (Tunér et al., 2015; Cotomacio et al., 2017) é relativo para cada tecido e modo de aplicação, sendo necessária a definição de limites energéticos biomoduladores e inibitórios individualizados para cada tipo de tecido alvo.

Em relação aos achados histológicos, outros estudos com animais que receberam a indução de MO também mostraram resultados similares aos observados nesse presente estudo para os animais que receberam a indução de MO com 5-FU. França et al. (2009) demonstraram intenso infiltrado inflamatório e escasso tecido de granulação no grupo que recebeu apenas indução de MO, sem tratamento; e observaram organização de fibrilas colágenas, menor infiltrado inflamatório e expressiva angiogênese no grupo tratado com PBMT. Esses resultados foram confirmados por Lopes et al. (2010), que constataram que a PBMT induz produção e organização do colágeno, uma vez que regulam a inflamação, reduzindo o infiltrado de neutrófilos e as citocinas pro-inflamatórias.

Entretanto, Maligieri et al. (2017) avaliaram a concentração de colágeno após induzir queimaduras em pele de ratos e tratar com PBMT no comprimento de onda vermelho, com dois protocolos: o primeiro com quatro pontos de 0,09 J (total de 0,36J) e o segundo com quatro pontos de 0,18J (total de 0,72J). Os autores não constataram diferenças entre os grupos, como também foi demonstrado no presente estudo para os grupos R. Apesar disso, Maligieri et al. (2017) verificaram diferença entre os grupos com relação a marcadores inflamatórios, como a redução da proteína TGF- β 1 nos grupos tratados com laser que apresentaram estágio de reparo tecidual avançado em comparação aos grupos que não receberam tratamento.

Da mesma forma, o presente estudo apresentou maiores diferenças para os marcadores inflamatórios (NF-kB e TNF- α) do que para os marcadores de reparo, como colágeno e hidroxiprolina. As análises para NF-kB, pelo método bioquímico, mostraram que os grupos que receberam o protocolo de menor energia apresentaram melhores resultados que os grupos que não receberam tratamento, tanto entre os grupos R, que receberam apenas ranhura, quanto entre os grupos Q, que receberam ranhura e 5-FU. Gabriel et al. (2019) também avaliaram a concentração de NF-kB em úlceras induzidas em língua de ratos, tratadas ou não com PBMT. A energia total de

0,32J (semelhante ao protocolo do grupo RLI, de 0,24J) foi capaz de reduzir os níveis desse fator nuclear em relação ao grupo sem tratamento.

Apesar da análise de NF-kB, pelo método bioquímico, demonstrar níveis semelhantes de concentração entre os grupos que receberam 5-FU e PBMT com os respectivos grupos que receberam apenas ranhura e PBMT, o método de deconvolução de imagem mostrou resultados diferentes. Foi possível constatar maiores porcentagens de marcação para esse fator nuclear em todos os grupos que receberam indução da MO (ranhura + 5-FU), em relação aos grupos que receberam apenas ranhura. Essa diferença de resultados entre os dois métodos de análise, imunohistoquímico e bioquímico pode ser justificada, por exemplo, pelo tipo de NFkB analisado nos métodos. Para imunohistoquímica, a marcação do tecido foi realizada para NFkB p65 fosforilado. No método bioquímico, a quantificação foi realizada para NF-kB p65 total, sem especificidade para fosforilação. A fosforilação de p65, em seu domínio de transativação, aumenta dramaticamente a atividade transcricional do NF-kB e a ativação de vários genes, inclusive os pró-inflamatórios (Chen et al., 2005; Gilmore, 2006; Liu et al., 2017). Dessa forma, na comparação entre os grupos que receberam indução de MO e os grupos que receberam apenas ranhura, o método de deconvolução de imagem acusou maior porcentagem de áreas marcadas para os grupos que receberam a indução da MO (5FU + ranhura) devido ao estado inflamatório mais ativo, o que não foi constatado pelo método bioquímico.

Além disso, o padrão de marcação diferente para cada tipo de indução de lesão (com e sem quimioterápico), no método imunohistoquímico, pode também ser uma justificativa para os resultados apresentados. Nos grupos que receberam apenas ranhura, a marcação foi mais localizada, principalmente no citoplasma da célula, enquanto que, para os grupos que receberam quimioterápico, as marcações foram extravasadas para a matriz extracelular, o que causou maiores áreas de marcação com DAB e conseqüentemente maiores valores no método de deconvolução de imagem, que quantifica porcentagem de área marcada em marrom.

Gabriel et al. (2019) também demonstraram marcação nuclear e citoplasmática para NF-kB nos grupos analisados em um modelo de indução local de lesão em língua de ratos, semelhante às ranhuras realizadas nos grupos R. Entretanto, Justino et al. (2020) analisaram marcação para NF-kB (NF-kB p65 fosforilado - Santa Cruz Biotechnology) em jejuno e íleo de camundongos que receberam dose intraperitoneal única de 450 mg/kg de 5-FU e também observaram em suas fotomicrografias

marcação difusa e intensa da mucosa intestinal, semelhante ao padrão apresentado pelas mucosas orais dos grupos que também receberam 5-FU do presente estudo. Além disso, Logan et al. (2007), ao avaliarem a mucosa íntegra de pacientes tratados com diversos esquemas quimioterápicos, constataram marcação na camada basal e espinhosa do epitélio e em células adjacentes a camada basal, semelhante aos padrões encontrados no presente estudo. Todavia, não existem na literatura estudos que tenham realizado marcação imunohistoquímica para NF-kB p65 fosforilado em mucosite oral induzida por 5-FU, no local da lesão. Isso pode ser justificado pela dificuldade de determinação de marcação desse fator para esse tipo de tecido, em condições de estímulo inflamatório aumentado, como ocorre na mucosite oral.

Outro estudo também quantificou concentração de NF-kB em MO, utilizando *Western blot* com NF-kB p65 (Cell Signaling Technology). Curra et al. (2015) verificaram a eficácia do protocolo de PBMT de 1,44J divididos em seis pontos de 0,24J para tratar mucosite oral induzida em *hamsters*. Entretanto esses autores associaram o aumento dos níveis de concentração de NF-kB à níveis menos severos de MO e à ativação de reparo, enquanto a associação nesse presente estudo foi oposta: níveis mais baixos de concentração de NF-kB foram associados a graus menos severos de MO.

Os resultados do presente estudo podem ser explicados através da etiopatogenia da MO. Sonis (2011) associaram níveis mais altos de NF-kB ativo e citocinas pro-inflamatórias aos estágios de amplificação e ulceração do desenvolvimento da mucosite oral. A inflamação em seus estágios iniciais está relacionada principalmente à ativação da via canônica do fator nuclear NF-kB, na qual o complexo p50/p65 estaria ativo e em maiores concentrações (Chen et al., 2005; Gilmore, 2006), como detectado no presente estudo. Uma das funções do NF-kB é atuar como um estimulador de várias vias, como a via das citocinas inflamatórias. Geralmente, picos de NF-kB precedem picos de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α , que assim permanecem ativos até que o estímulo nocivo cesse (Al-Dasooqi et al., 2013).

Campos et al. (2016) também avaliaram a concentração de TNF- α e, ao utilizar o mesmo protocolo do grupo QLIII (0,24J por ponto, totalizando 1,2J), apresentaram média de concentração de TNF- α menor que o grupo que recebeu apenas indução de MO no dia 7, mas sem diferença estatisticamente significativa.

Para o presente estudo, as concentrações de TNF- α analisadas pelo método bioquímico foram menores para todos os grupos que receberam algum protocolo de PBMT, sendo que os protocolos de 0,24 J (QLI) e 1 J (QLII) apresentaram resultados mais próximos ao grupo que não recebeu indução de lesão (grupo C) já no dia 7 e o grupo que recebeu a mesma energia utilizada no estudo de Campos et al. (2016), só apresentou essa aproximação ao grupo C no dia 10. No método de análise de deconvolução de imagem das fotomicrografias marcadas com TNF- α , os resultados foram semelhantes aos encontrados no método bioquímico; apenas o grupo QLIII não apresentou diferenças estatísticas quando comparado com o grupo Q.

Da mesma forma, para os grupos que receberam apenas ranhura, os protocolos de energia de 0,24J (RLI) e 1J (RLII) apresentaram menores concentrações de TNF- α que o seu controle R, que recebeu apenas ranhura. No dia 10, o grupo RLIII também passou a apresentar menores níveis de concentração que o grupo R (apenas ranhura). Da mesma forma, Rodrigues et al. (2014) utilizaram 0,4J e 2J para avaliar o reparo muscular de crioferidas em pernas de ratos, 5 vezes por semana, durante 21 dias, e evidenciaram que o protocolo com energia mais baixa conseguiu diminuir a área de necrose da lesão e a expressão da COX-2, quando comparada ao grupo de 2J e ao grupo controle. Entretanto, Safavi et al. (2008) não detectaram diferenças na expressão dos genes de TNF- α ao irradiar feridas induzidas por bisturi em mucosa de ratos com um laser de He-Ne com uma energia ainda maior, de 5 J. Assim, a resposta tecidual à ação da PBMT parece ser dependente da quantidade de energia e protocolo utilizado (Lopes et al., 2010; Gupta et al., 2014). Seguindo a lei de Arndt-Schultz, para um mesmo tipo de tecido-alvo, energias mais baixas seriam mais bioestimuladoras, enquanto energias mais altas seriam inibitórias ou menos efetivas para o processo de reparo (Tunér et al., 2015; Cotomacio et al., 2017).

Além disso, quando os grupos “ranhura + 5-FU”, foram comparados aos seus correspondentes nos grupos “ranhura”, quanto à concentração de TNF- α pelo método bioquímico, apenas o grupo que recebeu “ranhura + 5-FU” sem PBMT (grupo Q) apresentou níveis mais altos que o grupo que não recebeu QT e PBMT (grupo R) nos dias 7 e 10. Esses resultados mostram que os protocolos de PBMT, principalmente o LI (0,24 J em um ponto central) e o LII (1,0J em um ponto central), foram capazes de manter os níveis de TNF- α dos grupos que receberam 5-FU próximos aos dos grupos que não receberam QT, independente do comprometimento sistêmico.

Trabalhos clínicos também evidenciam os resultados apresentados. Em tratamento de úlceras ocasionadas por pressão em humanos, Taradaj et al. (2018) utilizaram 0,4 J com os comprimentos de onda 940 nm, 808 nm e 658 nm e constataram que a cura das úlceras por pressão é relacionada à irradiação com laser no comprimento de onda vermelho de 658 nm, que foi capaz de inibir processos inflamatórios, estimular a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, com base na diminuição da concentração de interleucinas pró inflamatórias, como TNF- α e no aumento da atividade de VEGF. Dessa forma, o sucesso do tratamento parece também estar relacionado ao tipo de comprimento de onda escolhido, além da utilização de energias mais baixas.

Oton-Leite et al. (2015) compararam amostras de saliva de dois grupos de pacientes submetidos a QT e RTCP: um grupo que recebeu PBMT com 0,24J (mesma energia do grupo QLI) e outro grupo controle, sem PBMT. Os autores constataram que a redução em níveis IL-1, TNF- α e metaloproteinases da matriz estão relacionadas a maior velocidade de reparo. Dessa forma, níveis de concentração das citocinas pró-inflamatórias parecem ter relação com a severidade das lesões: quanto mais severas, maior o número de concentração dessas citocinas.

Com relação aos protocolos utilizados, houve tendência a melhores resultados dos grupos que receberam menor energia LI (0,24J um ponto central), seguidos pelos grupos LII (um ponto central de 1J) e LIII (cinco pontos de 0,24 totalizando 1,2J), principalmente entre os grupos Q. O protocolo QLIII poderia ter tido resultados semelhantes ao grupo QLI se os pontos utilizados tivessem sido aplicados com distância de 0,5 a 1,0 cm entre eles, para que não houvesse sobreposição das energias, como ocorreu para o grupo QLIII, que recebeu todos os pontos em uma área de 1 cm². Os resultados clínicos terapêuticos parecem ser melhores quando energias menores são aplicadas em maior número de pontos da mucosa oral, respeitando o distanciamento entre eles (Simões et al., 2015; Medeiros-Filho et al., 2017; Salvador et al., 2017).

Dessa forma, são necessários mais estudos dosimétricos que determinem a indicação de cada protocolo de PBMT individualizado para cada situação clínica, principalmente quanto às vantagens em tempo de reparo, analgesia e modulação da inflamação.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, dentro das limitações do presente estudo, podemos inferir que a presença de 5-FU prejudica o processo de reparação das lesões e deixa mais evidente o efeito da PBMT. Além disso, o efeito terapêutico da PBMT varia de acordo com o estado do tecido irradiado, a quantidade de energia e o modo de aplicação. Para mucosa, as aplicações com energia total mais baixa indicaram resultados melhores, principalmente quanto à diminuição de indicadores inflamatórios. Entretanto, são necessários mais estudos dosimétricos, com análise temporal, para correta indicação e individualização de protocolos para cada situação clínica.

REFERÊNCIAS¹

Abramoff MMF, Lopes NNF, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran E M, et al. Low-Level Laser Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis in Young Patients. *Photomed Laser Surg.* 2008 ago; 26(4): 393–400. doi: 10.1089/pho.2007.2144.

Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care in Cancer.* 2013; 21(11): 3233–41. doi: 10.1007/s00520-013-1900-x.

Ali RM, Al-Shorbagy MY, Helmy MW, El-Abhar HS. Role of Wnt4/ β -catenin, Ang II/TGF β , ACE2, NF- κ B, and IL-18 in attenuating renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats treated with Vit D and pioglitazone. *Eur J Pharmacol.* 2018; 831: 68–76. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.04.032.

Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova.* 2005; 28(1): 118–129. doi: 10.1590/S0100-40422005000100021.

Amadori F, Bardellini E, Conti G, Pedrini N, Schumacher RF, Majorana A. Low-level laser therapy for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in childhood: a randomized double-blind controlled study. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(6): 1231–36. doi: 10.1007/s10103-016-1975-y.

Antunes SH, Azevedo AM, Silva LFB, Adão CAE, Pinheiro CT, Mayhe R, et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood.* 2007; 109(5), 2250–55. doi: 10.1182/blood-2006-07-035022

Antunes SH., Herchenhorn D, Small IA, Araújo CMM, Viégas CMP, Cabral E, et al. Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiotherapy and Oncology.* 2013; 109(2), 297–302. doi: 10.1016/j.radonc.2013.08.010.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Antunes SH, Schluckebier LF, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CMM, Viégas CMP, et al. Cost-effectiveness of low-level laser therapy (LLLT) in head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation. *Oral Oncol.* 2016; 52, 85–90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.10.022.

Antunes SH, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CMM, Viégas CMP, Assis GR, et al. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. *Oral Oncology.* 2017; 71, 11–15. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.05.018.

Arbabi-Kalati F, Arbabi-Kalati F, Moridi T. Evaluation of the effect of low level laser on prevention of chemotherapy-induced mucositis. *Acta Medica Iranica.* 2013; 51(3), 157–62.

Arun Maiya G, Sagar MS, 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.* 2006; 124(4), 399–402.

Babu DBG, Chavva S, Waghray S, Allam NSJ, Kondaiah M. Low Level Laser Therapy to Reduce Recurrent Oral Ulcers in Behçet's Disease. *Case Rep Dent.* 2016; 4283986. doi: 10.1155/2016/4283986.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5), 585–601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.

Bayer S, Kazancioglu HO, Acar AH, Demirtas N, Kandas NO. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(3), 673–77. doi: 10.1007/s10103-017-2166-1.

Belenguer-Guallar I, Jiménez-Soriano Y, Claramunt-Lozano A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2014; 6(2), e168. doi: 10.4317/jced.51401.

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

- Bezinelli LM, Eduardo FP, Lopes RMG, Biazevic MGH, Eduardo CP, Correa L, et al. Cost-effectiveness of the introduction of specialized oral care with laser therapy in hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol*. 2014; 32(1), 31–9. doi: 10.1002/hon.2050
- Bezinelli LM, Eduardo FP, Neves VD, Correa L, Lopes RMG., Michel-Crosato E, et al. Quality of life related to oral mucositis of patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation and receiving specialised oral care with low-level laser therapy: a prospective observational study. *Eur J Cancer Care*. 2016; 25(4), 668–74. doi: 10.1111/ecc.12344
- Bonan PRF, Kaminagakura E, Pires FR , Vargas PA, Almeida OP. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod*. 2006; 101(2), 205–211. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.033.
- Bostanciklioglu M, Demiryürek Ş, Cengiz B, Demir T, Öztuzcu S, Aras MH, et al. Assessment of the effect of laser irradiations at different wavelengths (660, 810, 980, and 1064 nm) on autophagy in a rat model of mucositis. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(4), 1289–95. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1727-4>.
- Bowen J, Al-Dasooqi N, Bossi P, Wardill H, Van Sebille Y, Al-Azri AB, et al. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. *Support Care Cancer*. 2019; 27(10), 4023–33. doi: 10.1007/s00520-019-04893-z.
- Brandão TB, Morais-Faria K, Ribeiro ACP, Rivera C, Salvajoli JV, Lopes MA, et al. Locally advanced oral squamous cell carcinoma patients treated with photobiomodulation for prevention of oral mucositis: retrospective outcomes and safety analyses. *Support Care Cancer*. 2018; 26(7), 2417–23. doi: 10.1007/s00520-018-4046-z.
- Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, et al. Nrf2 Transcription Factor, a Novel Target of Keratinocyte Growth Factor Action Which Regulates Gene Expression and Inflammation in the Healing Skin Wound. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22(15), 5492–5505. doi: 10.1128/mcb.22.15.5492-5505.2002.
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117(7), 12S-34S. doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2.
- Brunton LL, Chabner BA, Björn C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2012. p.903-49

Burjanadze TV, Veis A. A thermodynamic analysis of the contribution of hydroxyproline to the structural stability of the collagen triple helix. In *Connective Tissue Research*. 1997; 36(4), 347–65. doi: 10.3109/03008209709160233

Campos L, Simões A, Sá PHRN, Eduardo CDP. Improvement in quality of life of an oncological patient by laser phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(2), 371–74. doi: 10.1089/pho.2008.2300

Campos L, Cruz ÉP, Pereira FS, Arana-Chavez VE, Simões A. Comparative study among three different phototherapy protocols to treat chemotherapy-induced oral mucositis in hamsters. *J Biophotonics*. 2016; 9(11–12), 1236–45. doi: 10.1002/jbio.201600014

Carvalho FB, Andrade AS, Rasquin LC, de Castro IV, Cangussu MCT, Pinheiro ALB, et al. Effect of laser (λ 660 nm) and LED (λ 630 nm) photobiomodulation on formocresol-induced oral ulcers: a clinical and histological study on rodents. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1), 389–96. doi:10.1007/s10103-014-1680-7.

Carvalho PAG, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD., Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: A double-blind randomized study in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2011; 47(12), 1176–81. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.021.

Castro JR. Estudo comparativo de diferentes protocolos de irradiação com laser de baixa potência para a reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018.

Chan KKW, Glenny AM, Weldon JC, Furness S, Worthington HV, Wakeford H. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: targeted therapy and immunotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 12, CD010341. doi: 10.1002/14651858.CD010341.pub2.

Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, et al. NF- κ B RelA Phosphorylation Regulates RelA Acetylation. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(18), 7966–75. doi: 10.1128/mcb.25.18.7966-7975.2005.

Chow RT, David MA, Armati PJ. 830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. *J Peripher Nerv Syst*. 2007; 12(1), 28–39. doi: 10.1111/j.1529-8027.2007.00114.x.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2), 102–106. doi: 10.1089/pho.2006.2011.

Cotomacio CC, Campos L., Nesadal DS, Arana-Chavez VE, Simões A. Dosimetric study of photobiomodulation therapy in 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *J Biomed Opt.* 2017; 22(1), 18003. doi: 10.1117/1.JBO.22.1.018003.

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

Cruz ÉP, Campos L, Pereira FS, Magliano GC, Benites BM, Arana-Chavez VE, et al. Clinical, biochemical and histological study of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12(2), 298–309. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.007.

Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LGN, Castro CG, Brunetto AL. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2007; 48(4), 435–40. doi: 10.1002/pbc.20943.

Cui RZ, Bruce AJ, Rogers RS. Recurrent aphthous stomatitis. *Clin Dermatol.* 2016; 34(4), 475–81. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.020

Curra M, Pelliccioli ACA, Filho NAK, Ochs G, Matte Ú, Filho MS, et al. Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF-kB. *J Biomed Opt.* 2015; 20(12), 125008. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.12.125008>.

Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Mastrofrancesco B, et al. Modulation of Macrophage Phenotype by Soluble Product(s) Released from Neutrophils. *J Immunol.* 2005; 174(4), 2265–2272. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.2265.

de Castro JFL, Abreu EGF, Correia AVL, Brasil CMV, Perez DEC, Pedrosa FPR. Low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31(12), 613–18. doi:10.1089/pho.2012.3327.

de Paula Eduardo F, Bezinelli LM, da Graça Lopes RM, Nascimento Sobrinho JJ, Hamerschlak N, Correa L. Efficacy of cryotherapy associated with laser therapy for decreasing severity of melphalan-induced oral mucositis during hematological stem-cell transplantation: a prospective clinical study. *Hematol Oncol*. 2015; 33(3), 152–8. doi: 10.1002/hon.2133.

DiPietro LA, Polverini PJ. Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt*. 1993; 92, 238–47.

Eduardo FP, Bezinelli L, Luiz AC, Correa L, Vogel C, Eduardo CP. Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(1), 137–44. doi:10.1089/pho.2007.2225.

Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Internat J Radi Oncol, Biol, Phys*. 1991; 21(1), 109–22.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007; 127 (3), 514–25. doi: 10.1038/sj.jid.5700701.

Epstein FH, Weiss SJ. Tissue Destruction by Neutrophils. *N Engl J Med*. 1989; 320 (6), 365–76. doi: 10.1056/NEJM198902093200606.

Ferreira B, Silveira FMM, Orange FA. Low-level laser therapy prevents severe oral mucositis in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation: a randomized clinical trial. *Support Care Cancer*. 2016; 24(3), 1035–42. doi: 10.1007/s00520-015-2881-8

França. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2018 Latest global cancer data – IARC [internet]. Lyon, FR: IARC; 2018. [citado 2020]. Disponível em: <https://www.iarc.fr/infographics/globocan-2018-latest-global-cancer-data/>

França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94(1), 25–31. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.09.006.

Freire MRS, Freitas R, Colombo F, Valença A., Marques AMC, Sarmiento CA. LED and laser photobiomodulation in the prevention and treatment of oral mucositis: experimental study in hamsters. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(3), 1005–13. doi: 10.1007/s00784-013-1058-4.

Freitas ACC, Campos L, Brandão TB, Cristófaró M, Eduardo FP, Luiz AC, et al. Chemotherapy-Induced Oral Mucositis: Effect of LED and Laser Phototherapy Treatment Protocols. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(2), 81–7. doi: 10.1089/pho.2013.3576.

Gabriel A, Wagner VP, Correa C, Webber LP, Pilar EFS, Curra M, et al. Photobiomodulation therapy modulates epigenetic events and NF- κ B expression in oral epithelial wound healing. *Lasers Med Sci*. 2019; 34(7), 1465–72. doi: 10.1007/s10103-019-02745-0

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009; 16(1), 4. doi: 10.1186/1423-0127-16-4.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Guddattu V. Low level laser therapy against radiation induced oral mucositis in elderly head and neck cancer patients-a randomized placebo controlled trial. *Journal of Photochem Photobiol B*. 2015; 144, 51–56. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.01.011.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhiraja BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - a triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol*. 2012; 104(3), 349–54. doi: 10.1016/j.radonc.2012.06.011.

Genot-Klastersky MT, Klastersky J, Awada F, Awada A, Crombez P, Martinez MD, et al. The use of low-energy laser (LEL) for the prevention of chemotherapy- and/or radiotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: results from two prospective studies. *Support Care Cancer*. 2008; 16(12), 1381–87. <https://doi.org/10.1007/s00520-008-0439-8>.

Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006; 25(51), 6680–4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954.

Gobbo M, Ottaviani G, Rupel K, Ciriello F, Beorchia A, Di Lenarda R, et al. Same strategy for pitfalls of radiotherapy in different anatomical districts. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(3), 471–9. doi: 10.1007/s10103-015-1857-8.

González-Arriagada WA, Ramos LMA, Andrade MAC, Lopes MA. Efficacy of low-level laser therapy as an auxiliary tool for management of acute side effects of head and neck radiotherapy. *J Cosmetic Laser Therapy*. 2018; 20(2), 117–22. doi: 10.1080/14764172.2017.1376097.

Gouvêa de Lima A, Villar RC, de Castro G, Antequera R, Gil E, Rosalmeida MC, 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 Biol Phys*. 2012; 82(1), 270–5. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.10.012.

Guedes CFV, de Freitas Filho SAJ, de Faria PR, Loyola AM, Sabino-Silva R, Cardoso SV. Variation of Energy in Photobiomodulation for the Control of Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: A Clinical Study in Head and Neck Cancer Patients. *IntJ Dent*. 2018; 4579279. doi: 10.1155/2018/4579279.

Gupta A, Dai T, Hamblin MR. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1), 257–65. doi: 10.1007/s10103-013-1319-0.

Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics*. 2015; 8(6), 489–501. doi: 10.1002/jbio.201400058.

Huxford T, Malek S, Ghosh G. Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1999; 64, 533–40.

Isman E, Aras MH, Cengiz B, Bayraktar R, Yolcu U, Topcuoglu T, et al. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1064 nm) on transient receptor potential melastatin channels in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(5), 1489–95. doi: 10.1007/s10103-015-1750-5.

Jaguar G, Prado J, Nishimoto I, Pinheiro M, de Castro D, da Cruz Perez D, et al. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis*. 2007; 13(6), 538–543. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01330.x.

Justino PFC, Franco AX, Pontier-Bres R, Monteiro CES, Barbosa ALR, Souza MH, et al. Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF-κB/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. *Cytokine*. 2020; 125, 154791. doi: 10.1016/J.CYTO.2019.154791.

Karu TI, Tiphlova OA, Matveyets YA, Yartsev AP, Letokhov VS. Comparison of the effects of visible femtosecond laser pulses and continuous wave laser radiation of low average intensity on the clonogenicity of *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*. 1991; 10(4), 339–44. doi: 10.1016/1011-1344(91)80019-E.

Karu TI, Andreichuk T, Ryabykh T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660–950 nm) irradiation: Effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers Surg Med*. 1993; 13(4), 453–62. doi: 10.1002/lsm.1900130410.

Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochem Photobiol*. 2008; 84(5), 1091–99. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x.

Ko H, Jeong Y, Kim M. Cytotoxicities and genotoxicities of cements based on calcium silicate and of dental formocresol. *Mutat Res*. 2017; 815, 28–34. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.01.001.

Kuhn A, Porto FA, Miraglia P, Brunetto AL. Low-level infrared laser therapy in chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized placebo-controlled trial in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009; 31(1), 33–7. doi: 10.1097/MPH.0b013e318192cb8e.

Lalabonova H, Daskalov H. Clinical assessment of the therapeutic effect of low-level laser therapy on chronic recurrent aphthous stomatitis. *Biotech, Biotechnol Equip*. 2014; 28(5), 929–33. doi: 10.1080/13102818.2014.966526

Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014; 120(10), 1453–61. doi: 10.1002/cncr.28592.

Legouté F, Bensadoun RJ, Seegers V, Pointreau Y, Caron D, Lang P, et al. Low-level laser therapy in treatment of chemoradiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer: Results of a randomised, triple blind, multicentre phase III trial. *Radiat Oncol*. 2019; 14(1). doi: 10.1186/s13014-019-1292-2.

Leite Cavalcanti A, Macêdo DJ, Dantas SBF, Menezes KS, Silva FBD, Alves de Melo Junior W, et al. Evaluation of Oral Mucositis Occurrence in Oncologic Patients under Antineoplastic Therapy Submitted to the Low-Level Laser Coadjuvant Therapy. *J Clini Med*. 2018; 7(5), 90. doi: 10.3390/jcm7050090.

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

Lima PLV, Pereira CV, Nissanka N, Arguello T, Gavini G, Maranduba CMC, et al. Photobiomodulation enhancement of cell proliferation at 660 nm does not require cytochrome c oxidase. *J Photochem Photobiol B.* 2019; 194, 71–5. doi: /10.1016/j.jphotobiol.2019.03.015.

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Targeted Ther.* 2017; 2, 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23

Logan RM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncology.* 2007; 43(4), 395–401. doi10.1016/j.oraloncology.2006.04.011

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

Lopes NNF, Plapler H, Chavantes MC, Lalla RV, Yoshimura EM, Alves MTS. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. *Suppor Care Cancer.* 2009; 17(11), 1409–15. doi: 10.1007/s00520-009-0603-9.

Lopes NNF, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MAB, Alves MTS. Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6), 546–52. doi: 10.1002/lsm.20920.

Lopez TCC, Martins MD, Pavesi VCS, Ferreira LS, Bussadori SK., Moreira MS, et al. Effect of laser phototherapy in the prevention and treatment of chemo-induced mucositis in hamsters. *BrazOral Res.* 2013; 27(4), 342–8. doi: 10.1590/S1806-83242013005000019.

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

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 12(3), 305–10. doi: 10.1016/1011-1344(92)85032-P.

Machado SM, Sawada NO. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. *Enfermagem*. 2008; 17(4), 750–7. doi: 10.1590/S0104-07072008000400017.

Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*. 1960; 187(4736), 493–4. doi: 10.1038/187493a0.

Maligieri LAO, Neves LMG, de Moraes DT, Domingues RF, de Aro AA, Pimentel ER, et al. Differing energy densities with laser 670 nm InGaP controls inflammation and collagen reorganization in burns. *Burns*. 2017; 43(7), 1524–31. doi: 10.1016/j.burns.2017.04.008.

Mansano-Schlosser TC, Ceolim MF. Qualidade de vida de pacientes com câncer no período de quimioterapia. *Enfermagem*. 2012; 21(3), 600–607. doi: 10.1590/S0104-07072012000300015.

Marín-Conde F, Castellanos-Cosano L, Pachón-Ibañez J, Serrera-Figallo MA, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Photobiomodulation with low-level laser therapy reduces oral mucositis caused by head and neck radio-chemotherapy: prospective randomized controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019; 48(7), 917–23. doi: 10.1016/j.ijom.2018.12.006.

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

Medeiros-Filho JB, Maia Filho EM, Ferreira MC. Laser and photochemotherapy for the treatment of oral mucositis in young patients: Randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 18, 39–45. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.004.

Mittal R, Kumar A, Singh, DP, Bishnoi M, Nag TC. Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF- κ B and COX signalling pathway. *Inflammopharmacology*. 2018; 26(3), 755–768. doi: 10.1007/s10787-017-0413-5.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi A. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

Noirrit-Esclassan E, Valera MC, Vignes E, Munzer C, Bonal S, Daries M, et al. Photobiomodulation with a combination of two wavelengths in the treatment of oral mucositis in children: The PEDIALASE feasibility study. *Arch Pediatr*. 2019; 26(5), 268–74. doi: 10.1016/j.arcped.2019.05.012.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunol*. 2011; 12(8), 695–708. doi: 10.1038/ni.2065.

Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(5), 447–62.

Oton-Leite AF, Elias LSA, Morais MO, Pinezi JCD, Leles CR, Silva MAGS, et al. Effect of low level laser therapy in the reduction of oral complications in patients with cancer of the head and neck submitted to radiotherapy. *Spec Care Dent*. 2013; 33(6), 294–300. doi: 10.1111/j.1754-4505.2012.00303.x.

Oton-Leite AF, Silva GBL, Morais MO, Silva TA, Leles CR, Valadares MC, et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med*. 2015; 47(4), 296–305. doi: 10.1002/lsm.22349

Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastry SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review. *J Invest Clinical Dent*. 2016; 7(2), 114–126. doi: 10.1111/jicd.12148.

Pereira SFT, Alves JFC, Gomes CC, Nascimento AR, Stoianoff MAR, Gomez RS. Kinetics of oral colonization by *Candida* spp. during topical corticotherapy for oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2014; 43(8), 570–5.

Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EAD, et al. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J*. 2005; 24(19), 3400–10. doi: 10.1038/sj.emboj.7600809.

Pinheiro SL, Bonadiman AC, Lemos AL, Annicchino BM, Segatti B, Pucca DS, et al. Photobiomodulation Therapy in Cancer Patients with Mucositis: A Clinical Evaluation. *Photobio Photomed Laser Surg*. 2019; 37(3), 142–150. doi: 10.1089/photob.2018.4526.

Porfírio E, Fanaro GB, Porfírio E, Fanaro GB. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. *Rev Bras Geriatr Geront.* 2016; 19(1), 153–64. doi: 10.1590/1809-9823.2016.14145.

Rodrigues GH, Jaguar GC, Alves FA, Guollo A, Camandoni VO, Damascena AS, et al. Variability of high-dose melphalan exposure on oral mucositis in patients undergoing prophylactic low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(5), 1089–95. doi: 10.1007/s10103-017-2211-0.

Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DCC, Fernandes K., Parizotto NA, Renno ACM. Morphological aspects and cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: An in vivo study. *Braz J Phys Ther.* 2014; 18(5), 395–401. doi: 10.1590/bjpt-rbf.2014.0057.

Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He–Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci.* 2008; 23(3), 331–5. doi: 10.1007/s10103-007-0491-5.

Salvador DRN, Soave DF, Sacono NT, de Castro EF, Silva GBL, Silva LP. Effect of photobiomodulation therapy on reducing the chemo-induced oral mucositis severity and on salivary levels of CXCL8/interleukin 8, nitrite, and myeloperoxidase in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(8), 1801–10. doi: 10.1007/s10103-017-2263-1

Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJJ, Migliorati CA, et al. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer.* 2007; 15(10), 1145–54. doi: 10.1007/s00520-007-0238-7.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986; 46(5), 705–716.

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

Silva GBL, Mendonça EF, Bariani C, Antunes HS, Silva MAG. The Prevention of Induced Oral Mucositis with Low-Level Laser Therapy in Bone Marrow Transplantation Patients: A Randomized Clinical Trial. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(1), 27–31. doi: 10.1089/pho.2009.2699.

Silva GBL, Sacono NT, Othon-Leite AF, Mendonça EF, Arantes AM, Bariani C, et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(1), 117–26. doi: 10.1007/s10103-014-1624-2.

Silva LC, Sacono NT, Freire MCM, Costa LR, Batista AC, Silva GBL. The Impact of Low-Level Laser Therapy on Oral Mucositis and Quality of Life in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using the Oral Health Impact Profile and the Functional Assessment of Cancer Therapy-Bone Marrow Transplantation Questionnaires. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33(7), 357–63. doi: 10.1089/pho.2015.3911.

Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PHRN, Cristófaró M, Marques MM, Eduardo CP. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med.* 2009; 41(4), 264–270. doi: 10.1002/lsm.20758.

Simões A, de Paula Eduardo F, Migliorati CA, Schubert M. Low level laser therapy in the prevention and treatment of oral mucositis. In *Lasers in Dentistry*. Nova Jersey: John Wiley & Sons; 2015. p. 321–330.

Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarić S, Brumini G, Glazar I, Grzić R, Miletić I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(2), 189–93. doi: 10.1089/pho.2008.2420.

Smith KC. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Ther.* 1991; 3(1), 19–24. doi: 10.5978/islm.91-OR-03.

Soares RG, Farias LC, da Silva Menezes AS, Silva CSA, Tabosa ATL, Chagas PVF, et al. Treatment of mucositis with combined 660- and 808-nm-wavelength low-level laser therapy reduced mucositis grade, pain, and use of analgesics: a parallel, single-blind, two-arm controlled study. *Lasers Med Sci.* 2018; 33(8), 1813–19. doi: 10.1007/s10103-018-2549-y.

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

Sonis ST. Oral mucositis. *Anti-Cancer Drugs.* 2011; 22(7), 607–612. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283462086.

Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2016; 54, 7–14. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.01.005.

Soto M, Lalla RV, Gouveia RV, Zecchin VG, Seber A, Lopes NNF. Pilot Study on the Efficacy of Combined Intraoral and Extraoral Low-Level Laser Therapy for Prevention of Oral Mucositis in Pediatric Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33(11), 540–46. doi: 10.1089/pho.2015.3954.

Štofilová J, Langerholc T, Botta C, Treven P, Gradišnik L, Salaj R, et al. Cytokine production in vitro and in rat model of colitis in response to *Lactobacillus plantarum* LS/07. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94, 1176–85. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.138.

Suter VGA, Sjölund S, Bornstein MM. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Lasers Med Sci,* 2017; 32(4), 953–63. doi: 10.1007/s10103-017-2184-z.

Szpaderska AM, Walsh CG, Steinberg MJ, DiPietro LA. Distinct Patterns of Angiogenesis in Oral and Skin Wounds. *Journal of Dental Research.* 2005; 84(4), 309–14. doi: 10.1177/154405910508400403.

Taradaj J, Shay B, Dymarek R, Sopol M, Walewicz K, Beeckman D, et al. Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. *International J Med Sci.* 2018; 15(11), 1105–12. doi: 10.7150/ijms.25651

Tunér J, Ribeiro MS, Simões A. Dosimetry. In *Lasers in Dentistry.* Nova Jersey, John Wiley & Sons; 2015. p. 48-55.

Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N. 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*; 2014; 29(6), 1807–13. doi: 10.1007/s10103-013-1336-z

Vitória LA, Machado RM, Oliveira CRB, Rodriguez TT, Cangussu MCT, Mathias CC, Ramalho LMP. Clinical and histological evaluation of laser therapy in the treatment of oral mucositis in an animal model. *Adv Laser Med*. 2018 abr; 10582, 13. doi: 10.1117/12.2315539.

Wagner VP, Curra M, Webber LP, Nör C, Matte U, Meurer L, Martins MD. Photobiomodulation regulates cytokine release and new blood vessel formation during oral wound healing in rats. *Lasers Med Sci*. 2016; 31 (4), 665-71. doi: 10.1007/s10103-016-1904-0.

Wagner VP, Meurer L, Martins MAT, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Optics*. 2013; doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128002.

Wallace JL. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. *Scie World J*. 2006; 6, 577–88. doi: 10.1100/tsw.2006.122.

Weissheimer C, Curra M, Gregianin LJ, Daudt LE, Wagner VP, Martins MAT, et al. New photobiomodulation protocol prevents oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation recipients—a retrospective study. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(9), 2013–21. doi: 10.1007/s10103-017-2314-7.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83(3), 835–70. doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835.

Wilder-Smith P, Hammer-Wilson MJ, Zhang J, Wang Q., Osann K., Chen Z, et al. In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(8), 2449–54. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2234.

Yamamoto Y, Kono T, Kotani H, Kasai S, Mito M. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Procollagen Synthesis in Human Fibroblasts. *J Clin Laser Med Surg*. 1996; 14(3), 129–32. doi: 10.1089/clm.1996.14.129.

Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019; 27, 3969–83. doi: 10.1007/s00520-019-04890-2.

Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, Castro PHS, Pacheco MT, Zanin ICJ, Brugnera A. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(2), 233–37. doi: 10.1089/pho.2008.2242.

ANEXO A – Certificado CEUA

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

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

Certificado

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

São Paulo, 15 de maio de 2015.



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