

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

## Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral induzida por radiação: avaliação imunohistoquímica com marcadores de citoqueratinas CK 10 e CK 14

## ARIANE VENZON DA NAIA SARDO

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

> Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

São Paulo 2022

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

# Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral induzida por radiação: avaliação imunohistoquímica com marcadores de citoqueratinas CK 10 e CK 14

Versão Corrigida Versão Original disponível no IPEN

## ARIANE VENZON DA NAIA SARDO

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

São Paulo 2022 Fonte de Financiamento: FAPESP CEPID 05/51689-2 e 17/50332-0, Sisfoton MCTI/CNPq 440228/2021-2, CNPq INCT 465763/2014-6 e PQ 314517/2021-9, CAPES PROCAD 88881.068505/2014-01 e Financiamento 001

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

Como citar:

SARDO, A. V. d. N. Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral induzida por radiação: avaliação imunohistoquímica com marcadores de citoqueratinas CK 10 e CK 14. 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <a href="http://repositorio.ipen.br/">http://repositorio.ipen.br/</a> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

```
Sardo, Ariane Venson da Naia
Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral
indusida por radiação: avaliação imunohistoquímica com
marcadores de citoqueratinas CK 10 e CK 14 / Ariane Venson da
Naia Sardo; orientadora Denise Maria Zesell. -- São Paulo,
2022.
77 f.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Muclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Mucleares, São Paulo, 2022.
1. Laser. 2. Mucosite oral. 3. Citoqueratina. 4.
Fotobiomodulação. 5. Radioterapia. I. Maria Zesell, Denise,
orient. II. Título.
```

Dedico este trabalho à professora que me ensinou a ler e a escrever: Marta Venzon.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela misericórdia, pelo perdão, pela bênção de poder dormir com sono, comer com fome, beber com sede e outros prazerosos e intensos milagres diários de uma vida normal. Agradeço verdadeiramente ainda pelas abençoadas surpresas da parte menos normal da minha vida.

À minha querida orientadora, Denise Maria Zezell, obrigada por reforçar o que Einstein disse: "coincidências são uma forma que Deus encontrou de ficar anônimo". Obrigada por me ensinar sobre luz em momentos escuros.

Agradeço à Prof. Dra. Luciana Correa pelo incentivo e por ceder os recursos laboratoriais, além de metodológicos, necessários à execução deste trabalho, e sua equipe, Anelisa e Flavia pela colaboração na etapa laboratorial da imunohistoquímica.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela infraestrutura e ao núcleo de secretaria e apoio do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear IPEN-USP.

Aos meus colegas do Laboratório de Biofotônica, em especial Nathália Zanini, Amanda Caramel, Matheus Del Valle e Pedro de Castro, pela ajuda e apoio.

Obrigada à ex-aluna Maíra, pelo árduo trabalho da fase experimental deste estudo e pela generosidade em compartilhar seu material.

Gostaria de demonstrar minha gratidão aos meus antepassados, pela fome que por vezes passaram, pelo conforto que não tinham, pelas saudades que sentiram, pelo medo que superaram, pelas lágrimas que derramaram e também pela esperança que tiveram em toda forma de trabalho digno e honesto. Em especial, agradeço, à minha avó Helena Bauer, por me ensinar a usar as mãos com o coração. À minha avó Neusa Simões, por me ensinar a juntar as mãos na oração.

Sou grata à minha mãe, Marta, por ter me alfabetizado e ensinado a importância do desapego, da doação e da empatia. Obrigada por todo incentivo e base. Agradeço ao meu pai, Alberto, por me ensinar que sangue não é água, e que você pode negociar preços, mas não valores. Ao meu irmão Marcelo,

agradeço por ter ainda quem me chame de "Tata": faz-me lembrar de bons tempos em dias estranhos.

Aos meus demais familiares, tias, tios, primas e primos, obrigada por estarem, do lado de lá ou de cá, de um bairro ou de uma cidade, de um continente ou de um oceano, fazendo parte da minha vida.

Ao meu amigo e namorado José Carlos Remondini, obrigada pela paciência, acolhimento, otimismo, escuta qualificada e amor.

Às minhas amigas Aryane, Bianca, Bruna, Lúcia (Lulu), Maine, e amigos, Carlos, Robson, Norberto e Glauco que, de um modo ou de outro, me fazem sorrir.

Ao meu eterno orientador, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, por ainda continuar me ensinando exatamente aquilo que eu preciso aprender.

"Não somos seres humanos vivendo uma experiência espiritual, somos seres espirituais vivendo uma experiência humana."

Wayne W. Dyer

## RESUMO

SARDO, A. V. N. S. Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral induzida por radiação: avaliação imunohistoquímica com marcador de citoqueratinas CK10 e CK14. 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

A mucosite oral (MO) é uma lesão freguente em pacientes oncológicos e que pode ser causada tanto por radioterapia em região de cabeça e pescoço ou por certos quimioterápicos. Podendo variar no grau clínico de sua manifestação, a MO quando causa ulcerações gera severo quando álgico, risco de infecção local e sistêmica e aumento de custo no tratamento, principalmente quando causada por radiação ionizante. Não há um consenso terapêutico quanto ao manejo da MO e, nas últimas décadas, há um destaque para a fotobiomodulação (PBM), com laser de baixa intensidade, nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho. Esta é uma opção não medicamentosa capaz de diminuir o desconforto e acelerar a cicatrização das feridas. Os mecanismos de ação da PBM na evolução do reparo da MO não são esclarecidos. Visando elucidar a atuação da PBM na evolução da maturidade epitelial em úlceras de MO induzidas por radiação ionizante, o presente estudo avaliou o efeito da PBM com comprimento de onda ( $\lambda$ ) vermelho, de 660 nanometros (nm) e infravermelho, de 780 nm em feridas de MO radioinduzidas, na língua de ratos, oito e vinte dias após irradiação, em tempo único, com 20 Gy, de fonte de raios gama. Avaliou-se, na área epitelial das lesões, a área percentual correspondente a marcação positiva para as proteínas citoqueratinas 10 (CK10) e 14 (CK14), por meio de técnica de imunohistoquímica (IHQ), após 8 e 20 dias da indução das lesões, e comparou-se com um grupo controle não tratado. A CK10 é uma proteína relacionada a células epiteliais de maior grau de maturidade e diferenciação, sendo capazes de colaborar com a resposta de defesa inata tecidual, e foi significativamente mais expressa no grupo tratado com PBM de 660 nm. A CK14, que é característica de células epiteliais de menor maturidade, menos diferenciadas, importante para o reparo e resistência mecânica epitelial e, normalmente, devendo estar restrita à camada basal de epitélios saudáveis, não apresentou diferenças quantitativas entre os grupos avaliados. No entanto, seu padrão de distribuição no epitélio das amostras do grupo controle no vigésimo dia, ainda se apresentava alterado, ao passo que nos grupos tratados com PBM, a CK14 já aparecia restrita à camada basal do epitélio, como esperado em epitélios saudáveis. O estudo permitiu concluir que a PBM foi capaz de melhorar indicadores de maturidade epitelial da ferida de MO reparada, o que potencialmente se traduz em um epitélio funcionalmente mais competente para um mesmo tempo clínico do grupo controle, na qual as lesões seguiram seu curso natural de cicatrização.

**Palavras chave:** mucosite oral; radioterapia; citoqueratina; fotobiomodulação com *laser*.

## ABSTRACT

SARDO, A. V. N. S. Low-level laser in the treatment of radiation-induced oral *mucositis: immunohistochemical evaluation with cytokeratin marker CK10* and CK14. 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Oral mucositis (OM) is a frequent lesion in cancer patients and can be caused either by radiotherapy in the head and neck region or by certain chemotherapy agents. It may vary in the clinical degree of its manifestation and, when OM causes ulcerations, it generates severe pain, risk of local and systemic infection and increased treatment cost, especially when caused by ionizing radiation. There is no therapeutic consensus regarding the management of OM and, in recent decades, there has been an emphasis on photobiomodulation (PBM), with lowlevel laser, in red and infrared wavelengths. This is a non-drug option capable of decreasing discomfort and accelerating wound healing. The mechanisms of action of PBM in the evolution of OM repair are unclear. Aiming to elucidate the role of PBM in the evolution of epithelial maturity in OM ulcers induced by ionizing radiation, the present study evaluated the effect of PBM with red ( $\lambda$ ) wavelength, of 660 nanometers (nm) and infrared, of 780 nm in radio-induced OM wounds on the tongue of rats, eight and twenty days after irradiation, in a single time, with 20 Gy, from a gamma ray source. The percentage area corresponding to positive staining for cytokeratin 10 (CK10) and 14 (CK14) proteins was evaluated in the epithelial area of the lesions, using an immunohistochemical technique (IHC), 8 and 20 days after the induction of lesions, and compared with an untreated control group. CK10 is a protein related to epithelial cells with a higher degree of maturity and differentiation, being able to collaborate with the innate tissue defense response, and was significantly more expressed in the group treated with 660 nm PBM. CK14, which is characteristic of less mature, less differentiated epithelial cells, important for epithelial repair and mechanical strength and, normally, should be restricted to the basal layer of healthy epithelia, did not show quantitative differences between the groups evaluated. However, its distribution pattern in the epithelium of the samples from the control group on the twentieth day was still altered, whereas in the groups treated with PBM, CK14 was already restricted to the basal layer of the epithelium, as expected in healthy epithelia. The study allowed us to conclude that PBM was able to improve indicators of epithelial maturity of the repaired OM wound, which potentially translates into a functionally more competent epithelium for the same clinical time of the control group, in which the lesions followed their natural course of healing.

Key words: mucositis; radiotherapy; cytokeratin; photobiomodulation with *laser* 

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO		
2.	OBJETIVO		
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		15
	3.1	Patogênese da MO	15
	3.2	РВМ	20
	3.3	MO e terapia de PBM	24
	3.4	Epitélio e Citoqueratinas	27
	3.5	Citoqueratinas e efeitos da PBM	30
4.	MA	ATERIAL E MÉTODOS	32
	4.1	Indução de MO e terapia de PBM	32
	4.2	Reação IHQ	34
	4.3	Quantificação da IHQ	35
	4.4	Tratamento estatístico	40
5.	RESULTADOS		
	5.1	Viabilidade do Material	43
	5.2	Porcentagem de área marcada com anti-CK 10	45
	5.3	Porcentagem de área marcada com anti-CK 14	47
6.	DIS	SCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÕES		59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		60
	APÊI	NDICE	74

## 1. INTRODUÇÃO

A mucosite oral (MO) é um importante efeito adverso que pode decorrer da terapia oncológica. Trata-se de uma lesão causada por radiação ionizante, quando esta incide em região cérvico-facial, mas também pode surgir quando utilizados certos quimioterápicos capazes de prejudicar a proliferação das células epiteliais. (SONIS, STEPHEN T., 2013) A expressão clínica da MO pode ocorrer em diversos graus, sendo caracterizada, nos graus mais leves, apenas por uma alteração cromática da mucosa acompanhada de ardência, mas podendo chegar até manifestações mais severas, com presença de ulceração na mucosa oral, caracterizada pela perda de recobrimento epitelial e exposição de tecido conjuntivo, podendo haver presença de sangramento e frequentemente acompanhada de severo quadro álgico. (VILLA; SONIS, 2015)

A exposição do tecido conjuntivo por meio das ulcerações aumenta a susceptibilidade clínica dos pacientes em tratamento oncológico a infecções secundárias, complicando ainda mais um quadro sistêmico que, por definição, já é complexo. A perda na capacidade de ingerir alimentos sólidos pode evoluir para a total incapacidade de ingestão de alimentos por via oral, que gera queda no estado de saúde geral e emocional do paciente. (RIBEIRO et al., 2017; SONIS, STEPHEN T., 2013) Uma vez que as complicações clínicas oriundas dos quadros ulcerados de MO tornam ainda mais complexo o manejo clínico destes indivíduos, as consequências da MO não se limitam aos danos físicos do paciente, mas também representam um fator para aumento de custos hospitalares. (RIBEIRO et al., 2017; SONIS, STEPHEN T., 2011, 2013; VILLA; SONIS, 2015) Na literatura, são relatados valores adicionais, que vão de US\$ 5.000 a mais de US\$ 42.000, por paciente que apresenta manifestações clínicas de MO, variando de acordo com a severidade dos sintomas. (ELTING et al., 2003; SONIS, STEPHEN T. et al., 2001)

A radioterapia em região de cabeça e pescoço mostra-se capaz de provocar MO em altos graus de manifestação clínica. (NISHII et al., 2020; SONIS, STEPHEN T., 2011) A ocorrência de MO causada por radioterapia varia em sua incidência e severidade em função da dose total do regime terapêutico. A literatura aponta que quase a totalidade dos pacientes submetidos a radioterapia em cabeça e pescoço desenvolverá algum grau de manifestação de MO. Ulcerações em humanos ocorrem com maior freqüência em pacientes submetidos a mais de 30 Gy (Gray) de dose total de irradiação. (HANDSCHEL J, 1999; SONIS, STEPHEN T., 2009, 2011; TREISTER; SONIS, 2007)

A conduta clínica frente a MO não é consensual, e envolve diversas estratégias. De modo paliativo, o controle de dor pode ser feito, por exemplo, com uso de colutórios contendo anestésico tópico e/ou por meios farmacológicos de acão como anti-inflamatórios е até mesmo antibióticos. sistêmica. Frequentemente, o paciente portador de úlceras de MO necessita de analgésico opióide e/ou antidepressivos tricíclicos para controlar os quadros severos de dor. O uso de antimicrobianos locais somente deve ser usado em caso de infecção ativa comprovada, não sendo recomendados protocolos profiláticos, uma vez que estes podem afetar negativamente ainda mais a microbiota oral residente normal do paciente irradiado. (LALLA et al., 2019; MCGUIRE et al., 2013; SAUNDERS et al., 2020) O manejo nutricional e o uso local ou sistêmico de anti-inflamatórios também são opções clínicas classicamente consideradas importantes para contornar as adversidades causadas pela MO. (KAWASHITA et al., 2019; RABER-DURLACHER et al., 2004)

А laserterapia de baixa intensidade. atualmente nomeada Fotobiomodulação (em inglês Photobiomodulation: PBM), vem sendo destaque no meio clínico quanto aos seus resultados de prevenção da ocorrência de graus severos de MO e também no tratamento de lesões severas já instaladas, quando não se é possível evitar sua ocorrência. Os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) vermelho e infravermelho são os mais utilizados nesta modalidade terapêutica, devido a sua penetração, absorção e características relacionadas a interação tecidual. A PBM é associada ao controle de dor, aceleração da cicatrização, quando utilizada de forma curativa, e também é associada à diminuição dos escores clínicos de manifestação de MO, quando aplicados protocolos preventivos de PBM, por meio da irradiação da mucosa oral antes das manifestações clínicas da MO. Outra vantagem apontada pela literatura é o fato da PBM ser uma terapia não medicamentosa, de uso local, o que consiste em uma vantagem do ponto de vista clínico, uma vez que o paciente oncológico já se contextualiza em um esquema terapêutico que pode conter a utilização de múltiplos fármacos. (CARVALHO et al., 2018; EDUARDO et al., 2015; EL BOUSAADANI et al., 2016; LOPES et al., 2009)

Os modelos de indução de MO utilizando radiação ionizante são mais dificilmente encontrados na literatura, quando comparados aos que utilizam quimioterápicos. (WARDILL et al., 2019) Ainda que a PBM no manejo clínico de MO seja frequentemente utilizada, a literatura carece de um protocolo consensual de parâmetros dosimétricos, tanto no que se refere à terapia preventiva quanto à curativa. Embora hajam publicações mostrando a evidência clínica de resultados preventivos e regenerativos da PBM em MO, os mecanismos de ação da PBM na MO não são totalmente esclarecidos. A ação a PBM nas lesões já instaladas de MO parece ir muito além da já conhecida aceleração de reparo clínico e diminuição da dor, entretanto, a literatura ainda não possui quantidade significativa de estudos que evidenciem as diferenças de atuação individual dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho no tecido afetado pela MO, não somente em relação aos resultados clínicos, mas principalmente em nível celular. (LALLA et al., 2019; ROBIJNS et al., 2017; ZADIK et al., 2019; ZECHA et al., 2016)

Os queratinócitos são o principal tipo celular que compõe o tecido epitelial. Em termos constitucionais internos, as citoqueratinas são um grupo protéico que constitui o citoesqueleto celular, sendo relacionadas à função mecânica do epitélio e à sinalização celular. Sabe-se que, em epitélios saudáveis, a proteína estrutural citoqueratina 14 (CK14) tem expressão restrita às células da camada basal, cujo comportamento celular é mais proliferativo e menos diferenciado. Enquanto isso, ainda falando sob condições de saúde tecidual, queratinócitos de camadas suprabasais expressam mais citoqueratina 10 (CK10), sendo esta uma proteína associada à maior maturidade epitelial, à células com maior grau de diferenciação. (COULOMBE; OMARY, 2002; MOLL et al., 1982; OUBAYOUN et al., 1985; SAWAF et al., 1991)

Ressaltando a carência de modelos de pesquisa de MO radioinduzida e a falta de trabalhos que evidenciem a ação da PBM em MO em nível celular, este trabalho visou descrever a variação da área epitelial expressando CK10 e CK14 em lesões de MO induzidas por radiação ionizante e tratadas com PBM, feita com comprimento de onda vermelho de 660 nm e infravermelho de 780 nm, em dois tempos experimentais, e comparados a um grupo controle não tratado. Para tanto, utilizou-se a reação imunohistoquímica (IHQ) como técnica de marcação das proteínas avaliadas, para que fossem mensuradas as áreas relativas de epitélio positivamente reagentes aos anticorpos correspondentes.

## 2. OBJETIVO

Descrever o efeito da fotobiomodulação por meio dos *laser*s emitindo  $\lambda$ =660 nm e  $\lambda$ =780 nm, no tratamento de úlceras de mucosite oral induzidas por radiação ionizante em modelo animal:

• Em relação à área epitelial correspondente a marcação positiva da reação imunohistoquímica para CK10 e CK14.

 Encontrar, na amostra do estudo, possível relação que contribua na compreensão do processo de evolução da maturidade epitelial com a fotobiomodulação.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Patogênese da MO

A MO é causada por um dano celular, que compromete o processo de renovação epitelial e/ou causa a morte celular, culminando com o desnudamento do tecido conjuntivo subjacente. (DE ALMEIDA, 2004) No início da década de 1980, a comunidade científica empenhou-se a entender mais a fundo este processo patológico que acomete indivíduos submetidos ao tratamento oncológico. A MO pode ser causada, tanto por determinados quimioterápicos, como pela radiação ionizante, se esta incidir diretamente na mucosa oral ou em proximidades anatômicas e ultrapassar um limiar de dose a partir do qual, iniciam-se os efeitos teciduais destrutivos. (LOCKHART; SONIS, 1981; SONIS, S.T, 1998; SONIS, STEPHEN T., 2009, 2011; TREISTER; SONIS, 2007; TROTTI et al., 2003) Classicamente, a literatura descreve que os pacientes submetidos a radioterapia na região de cabeça e pescoço manifestam ulcerações de MO quando a dose total do tratamento ultrapassa 30 Gy. (HANDSCHEL J, 1999; SONIS, STEPHEN T., 2009, 2011; TREISTER; SONIS, 2007)

A manifestação clínica da MO varia em intensidade ao longo do seu curso natural, iniciando com processos eritematosos, atróficos e culminando com ulcerações no tecido. (SHIH et al., 2003) Em 1979, a Organização Mundial da Saúde sugeriu uma escala numérica de 0 a 4, para classificar lesões de MO, baseadas na sua manifestação clínica. O grau zero corresponde a mucosas inalteradas e sem presença de nenhum tipo de manifestação sintomática, enquanto que o grau 1 é caracterizado por presença de manifestações nociceptivas, com ou sem alteração cromática da mucosa. A ulceração pode ser classificada como grau 2, 3 ou 4, dependendo da extensão da ulceração e capacidade de alimentação via oral. No grau 2, há presença de eritema, mas já há presença de exposição de tecido conjuntivo e o paciente ainda tolera alimentos de consistência normal ou amolecida. Em manifestações de grau 3, o paciente anão é mais possível, sendo estes dois últimos considerados graus severos de manifestação de MO. ("WHO Offset Publication", 1979)

Segundo Tao e seus colaboradores, entender mais a fundo os processos envolvidos na patogênese e desenvolvimento da MO significa ampliar a possibilidade de desenvolver protocolos terapêuticos mais específicos. (TAO et al., 2019) As pesquisas envolvendo a patogênese da MO permitem compreender que, principalmente quando induzida por radiação, a MO tem um comportamento clínico mais resistente às terapias, com manejo clínico mais complexo (LALLA et al., 2019; SONIS, S. T., 2010; SONIS, S. T. et al., 2002; SONIS, STEPHEN T., 2009)

Na patogênese da MO radioinduzida, a radiação ionizante é capaz de afetar diretamente a vascularização tecidual, comprometendo o endotélio vascular e, assim, o aporte sanguíneo e nutricional dos queratinócitos, como um dos mecanismos iniciais de dano a esse grupo de células. Sabe-se ainda que, logo após a irradiação tecidual, a radiação ionizante é capaz de provocar aumento de citocinas pró-inflamatórias e relacionadas aos processos de degradação tecidual e aumento expressivo de óxido nítrico sintase induzível. A radiação ionizante gera, assim, um escape de líquido para a região subendotelial de arteríolas, formando edema subendotelial e estase sanguínea, com claro prejuízo do aporte nutricional do epitélio. (DÖRR, 2009)

A literatura varia quanto ao consenso de dose cumulativa mínima para o desenvolvimento dos primeiros sinais clínicos de MO, como edema e eritema, colocando limiares de doses de 10 a 20 Gy para a ocorrência destes primeiros sinais. Os trabalhos são convergentes em colocar que o processo de desnudação do tecido conjuntivo mucoso, com a formação de úlceras clinicamente visíveis, dá-se quando a dose de radiação acumulada é de cerca de 30 Gy. Em pacientes oncológicos, o tratamento padrão lida com doses diárias de 0,160 a 0,200 Gy por dia, 5 dias da semana. (HANDSCHEL J, 1999; SONIS, STEPHEN T., 2009, 2011; TREISTER; SONIS, 2007) As lesões de MO cicatrizam espontaneamente dentro de duas a quatro semanas, a contar do início de sua manifestação clínica, sendo esta variação de tempo relacionada à intensidade dos sinais e capacidade de resposta tecidual do hospedeiro. (SONIS, STEPHEN T., 2009)

Não se relacionam com o desenvolvimento da MO apenas a dose de radiação (ou do regime quimioterápico) utilizado no tratamento do paciente. Em relação à OM induzida por radiação, uma revisão de literatura feita em 2020 coloca que, fatores genéticos, baixas contagens de hemoglobina e leucócitos,

associação da terapia radioativa com quimioterápicos, ser do sexo masculino, e ter um câncer localizado em região de ororfaringe e alimentação por via oral são fatores fortemente associados à maior probabilidade de desenvolver graus severos de MO. (KUSIAK et al., 2020)

Um modelo dividindo a patogênese da MO em cinco fases foi proposto por Sonis e colaboradores em 2004 e, desde então é adotado por diversos autores como um recurso para ilustrar, ainda que apenas de modo a compor uma divisão didática do processo, o complexo desenvolvimento desta lesão. (CURRA et al., 2015; LALLA et al., 2019; SONIS, STEPHEN T. et al., 2004) As fases propostas no modelo são: iniciação, dano primário celular, amplificação da resposta tecidual, ulceração e cicatrização. Essa divisão foi feita para explicar a MO, tanto radio como quimioinduzida, havendo uma diferença particular na fase inicial da patogênese quando a lesão é induzida por radiação ionizante. (SONIS, STEPHEN T. et al., 2004)

A fase de iniciação começa, quando causada por radiação ionizante, por meio da radiólise da água, que é a quebra da molécula de água pela radiação ionizante (LE CAËR, 2011), gerando espécies reativas de oxigênio no meio intra e extracelular. A ação tóxica destes radicais livres no material genético caracteriza o dano celular indireto causado pela radiação ionizante. O dano direto acontece quando um elétron livre ioniza diretamente o material genético celular, mas acontece em menor escala, quando comparado ao dano indireto. Há também o dano ao endotélio dos vasos sanguíneos que nutrem o local, causando o aumento da permeabilidade vascular e de óxido nítrico que, em altas concentrações, tem efeito citotóxico. Ocorre ainda um déficit circulatório por estase sanguínea, o que leva ao aparecimento clínico de eritema na mucosa, podendo ser clinicamente assintomático ou acompanhado de ardência. (DÖRR, 2009) O dano vascular associado à alta concentração intracelular de radicais livres de oxigênio ativam uma cascata de sinalização causadora do dano tecidual, sendo esta a fase de dano tecidual primário. Isso ocorre por meio da ativação de fatores nucleares, sendo um dos mais estudados na iniciação de MO o fator nuclear kappa B (NFκB). (LOGAN et al., 2007) Tal fator é responsável por iniciar o processo de transcrição de até duzentos genes que expressam citocinas associadas à destruição tecidual, sendo considerado pela literatura um dos componentes

nucleares mais relevantes no processo de destruição causado na MO. (HAHN et al., 2010; SONIS, S. T. et al., 2002; SONIS, STEPHEN T. et al., 2004)

Ocorre então, de modo concomitante, a fase de amplificação do sinal. Nesta fase são produzidas citocinas relacionadas à ativação de vias apoptóticas, aumento de fatores pró-inflamatórios e fatores de necrose celular, culminando com a morte das células e aumentando os sinais e sintomas clínicos, marcados pela manifestação de atrofia epitelial, eritema e relatos de ardência e desconforto por parte dos pacientes. (LALLA et al., 2019)

As citocinas pró inflamatórias como, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 – alfa (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina – 6 (IL-6), participam ativamente do processo de destruição tecidual. (DÖRR, 2009) Verificase, além disso, a ativação da via das cicloxigenase 2 (COX 2) e estímulo a vasodilatação e angiogênese. Durante essa fase, a ativação de macrófagos teciduais promove a liberação de metaloproteinases da matriz tecidual, podendo também estimular a liberação de mais TNF- $\alpha$ , o que acentua, ainda que de maneira indireta, o processo de destruição tecidual. (SONIS, STEPHEN T., 2009)

Inicia-se, então, a fase de ulceração, ocorrendo a migração das células polimorfonucleadas e também o recrutamento de células imunes localmente presentes no tecido, caracterizando-se, assim, pela abundante presença de neutrófilos, macrófagos e monócitos. Estas células liberam ainda mediadores químicos que dão continuidade ao aumento da destruição tecidual, iniciando com isso, o processo de destruição do recobrimento epitelial da mucosa e consequente exposição do tecido conjuntivo subjacente. (SONIS, STEPHEN T. et al., 2004)

Quando a MO é induzida em animais por meio de radiação ionizante, há diversos modelos usando dose única de irradiação (DE FREITAS CUBA et al., 2016; KIM et al., 2017; MARIA et al., 2016; WARDILL et al., 2019; WATANABE et al., 2014), sendo uma maneira de evitar que os animais sejam expostos repetidamente à anestesia geral. Assim como na prática clínica, em que os pacientes de radioterapia recebem doses, classicamente, de modo fracionado, a fase de ulceração nos modelos animais também pode se iniciar aproximadamente após sete dias da irradiação, sendo muito próximo do que ocorre em humanos. (DÖRR, 2009; MALLICK et al., 2016; NAKASHIMA et al., 2017) Nesta fase ulcerativa, a literatura indica que bactérias gram-negativas, gram-positivas e anaeróbias podem ter participação na perpetuação dos eventos envolvidos na MO. A presença destes microrganismos corrobora com o processo de destruição tecidual, por meio da exacerbação da resposta inata e de estímulo a produção de fatores de destruição tecidual. (SONIS, STEPHEN T., 2009) Em 2016, Vasconcelos e seus colaboradores colocam que a manifestação clínica da MO pode ser agravada por desequilíbrios da microbiota bucal e também ser um fator de risco para quadros de bacteremia e febre. Exemplos de microorganismos que foram associados a piora de MO induzida por radioterapia são *Candida spp., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter sp.e Klebsiella pneumonia.* Colocam ainda que, mesmo quando os quadros não são ulcerativos, a MO pode ser associada a quadros febris, por desencadear a produção de mediadores inflamatórios relacionados à indução da febre. (VASCONCELOS et al., 2016)

O significado clínico da fase ulcerativa é determinante no quadro de saúde geral do paciente oncológico. A perda da integridade epitelial decorrente da MO pode atingir grandes proporções, causar quadros álgicos severos que inviabilizam a alimentação por via oral, fazendo com que o paciente precise de sonda nasogástrica para receber dieta enteral. Além disso, o desnudamento do tecido conjuntivo pela destruição dos queratinócitos faz com que microorganismos penetrem mais facilmente na corrente sanguínea, o que deixa o paciente mais susceptível a desenvolver infecções sistêmicas. (ANTUNES et al., 2016; SONIS, STEPHEN T., 2009)

Na fase de reparo tecidual, os queratinócitos do epitélio pertencentes à borda da úlcera recebem sinalização para diferenciar e proliferar, iniciando o processo de cicatrização, que se traduz clinicamente, em um primeiro momento, na formação da pseudomembrana cicatricial. (SONIS, STEPHEN T. et al., 2004) Essa etapa é mediada por fatores oriundos da matriz extracelular da submucosa, e demora mais a ocorrer em ulcerações de MO causada por radiação ionizante se comparada àquelas causadas por quimioterápicos, evidenciando a maior dificuldade clínica de conduzir lesões relacionadas à radioterapia e cabeça e pescoço. (SONIS, STEPHEN T., 2009) Em humanos, a reparação ocorre naturalmente entre duas a três semanas depois de cessadas as sessões de radioterapia, dependendo da severidade das lesões e capacidade de regeneração

intrínsecas ao organismo do paciente. (MALLICK et al., 2016; TREISTER; SONIS, 2007)

#### 3.2 PBM

A PBM é a técnica terapêutica que usa *laser* visando promover nos tecidos vivos diminuição da inflamação, aceleração do reparo tecidual e/ou diminuição da dor. A obtenção destes efeitos celulares e teciduais está determinada pela combinação dos parâmetros físicos relacionados ao feixe de fótons emitidos pelo *laser*, como energia, potência, comprimento de onda e tempo de irradiação. (CARVALHO et al., 2018; EDUARDO et al., 2015; EL BOUSAADANI et al., 2016; MCGUIRE et al., 2013; ROBIJNS et al., 2017; SAUNDERS et al., 2020; ZADIK et al., 2019) Além destes parâmetros, o efeito da PBM relaciona-se ainda condições inerentes ao estado metabólico da célula que recebe a energia do fóton emitido. (KARU, T. I. et al., 1987)

O laser é uma forma de radiação eletromagnética que, para comprimentos de onda no visível e infravermelho, é não ionizante, com propriedades físicas que diferem de outras fontes de luz. A emissão de fótons em um sistema laser ocorre por meio de um material ativo que, quando estimulado por uma fonte de bombeamento de energia, emite um feixe de fótons que, diferentemente de outras fontes de luz, possuem igual comprimento de onda (monocromático), mesma direção de emissão (unidirecional) e coerente (ondas se propagando em fase espacial e temporal). Quando o material da fonte emissora é estimulado, os elétrons que recebem este estímulo migram para uma camada de valência de um nível energético maior. Cessado o estímulo, este mesmo elétron retorna ao seu estado fundamental, ou seja, para a sua camada de valência inicial. A diferença energética entre essas duas camadas é liberada na forma de um fóton e, de acordo com o valor dessa energia, é definido seu comprimento de onda. Este, por sua vez, é capaz de estimular novos elétrons dos átomos do meio emissor. Decorre disso o caráter amplificado e estimulado da emissão estimulada de fótons da luz, que dá sentido e origem a palavra laser. (KARU, T., 1989; KARU, T. I. et al., 1987)

Basicamente, um *laser* pode interagir com um tecido de modo a gerar efeitos fotoquímicos ou causando efeitos fototérmicos. Efeitos fototérmicos estão

associados à geração de calor, e processos como, por exemplo, carbonização e coagulação tecidual, que podem ocorrer frente ao aumento de temperatura local promovido por essa interação. A ação fotoquímica na célula é aquela necessária para que de fato ocorra a PBM da atividade metabólica celular, produzindo os efeitos clínicos desejados. Para que se aumente a probabilidade de ocorrência deste efeito, a potência e energia do feixe de fótons emitidos por área irradiada, dada normalmente em cm<sup>2</sup>, devem ser baixas e entregues por uma quantidade de tempo prolongada. (HUANG et al., 2009) Na prática, verifica-se que efeitos de bioestimulação celular, sem causar danos térmicos, sejam verificados quando a potência emitida está em torno de 0,001 a 1 W/cm<sup>2</sup>. Figura 1 (NIEMZ, 2019)

Figura 1 – Mapa de interações laser-tecido. As elipses fornecem apenas uma estimativa didática aproximada dos parâmetros de irradiação com *laser*. Adaptado de Boulnois, 1986 por Niemz, 2019.



A primeira vez que se publicou sobre a visualização dos efeitos clinicamente perceptíveis da energia vinda de uma fonte *laser* foi em 1967, por Endre Mester e colaboradores na Hungria. Na época, a emissão de fótons

estimuladas por fontes de radiação, ou seja, a luz *laser*, havia sido recémdescoberta. Os autores planejaram avaliar se esta forma de energia luminosa teria potencial carcinogênico e, para tanto, irradiaram dorso de ratos cujos pelos teriam sido previamente raspados. Os autores verificaram nesse experimento que, além de não haver indícios de estímulo, emitindo fótons com 694 nm de comprimento de onda (espectro vermelho), aumentou a taxa de crescimento dos pelos nos animais do grupo experimental. A partir de então, abriu-se um horizonte para pesquisas que investigassem a ação dos diferentes *lasers* de baixa intensidade, ou seja, irradiação com baixa energia por área e baixa potência de emissão. (KARU, T. I. et al., 1987; SMITH, 1991) Para irradiação luminosa, em regime contínuo ou com pulsos mais longos que a ordem de microssegundos, os efeitos biológicos de interesse terapêutico somente ocorrem se houver o fenômeno de absorção do fóton pela célula/tecido alvo. Significa que as outras formas de interação luminosa com a matéria, como a reflexão e transmissão, não tem utilidade para fins terapêuticos. (NIEMZ, 2019)

Figura 2 – Ilustração didática da fotoabsorção do *laser* nos cromóforos da cadeia respiratória. Adaptado de Van Tran et al., 2021



Fonte: (VAN TRAN et al., 2021)

Os efeitos da PBM na cicatrização de feridas vem sendo foco de trabalhos há décadas. Pela teoria mais aceita, os fótons, uma vez absorvidos por uma célula, interagem com a cadeia respiratória de células cujo metabolismo esteja negativamente afetado, otimizando a produção energética de adenosina trifosfato (ATP), que é uma molécula cuja quebra de ligações libera energia para os processos funcionais da célula, e é indispensável para a manutenção do metabolismo tecidual (figura 2). Esta teoria foi proposta por Karu em 1989, quando verificou o efeito da luz vermelha a nível mitocondrial em células *HeLa*. (KARU, T., 1989)

Recentemente, um estudo corroborou essa teoria, ao verificar o aumento da síntese de ATP em hepatócitos bovinos irradiados por laser, por meio da marcação bioluminescente com luciferina. O laser utilizado emitia comprimento de onda de 808 nm, densidade de potência de 1 W/cm<sup>2</sup> e densidade de energia de 60 J/cm<sup>2</sup>, com exposição de 60 segundos. A temperatura local foi monitorada de modo que não houve aumento de temperatura detectado durante a irradiação. As células foram comparadas com amostra controle (não irradiada), que permaneceu também por 60 segundos sob as mesmas condições do local da irradiação, mas sem ser submetida ao feixe de luz. Após o experimento, enquanto o grupo controle tinha uma atividade de síntese de ATP mitocondrial da ordem de 25 nanomolar/ATP/min, as células irradiadas por *laser* produziam 35 nanomolar/ATP/min, sendo esta diferença estatisticamente significante. (AMAROLI et al., 2021)

Esse aumento na produção de energia celular vem sendo relacionado à aceleração do reparo de feridas, diminuição de tecido fibroso em cicatrizes, aumento da expressão de colágeno, aumento da permeabilidade vascular, alteração da produção de fatores nucleares e da expressão positiva de citocinas envolvidas na inflamação. (AVCI et al., 2013; CURRA et al., 2015; MUSSTTAF et al., 2019; ZADIK et al., 2019; ZECHA et al., 2016) A PBM também colabora com a redução de processos álgicos, podendo ter efeitos analgésicos que são explicados pela inibição de fibras nocioceptoras e diminuição na produção de fatores pró-inflamatórios relacionados à amplificação da resposta dolorosa. (CHOW et al., 2011) Além disso, Pellicioli e seus colaboradores verificaram que queratinócitos orais irradiados com *laser* de 660 nm (densidades de 4 e 20 J/cm<sup>2</sup>, 3 sessões, de 6 em 6 h) mostraram aumento da velocidade de migração destas células epiteliais, além do estímulo a via de sinalização AKT/mTOR, relacionada à migração celular. (PELLICIOLI et al., 2014)

Em emissões de altas densidades de energia luminosa, a PBM dá-se não na via de estímulo metabólico e melhora do funcionamento da cadeia respiratória, mas pode inibir a função celular. Karu coloca que altas densidades de energia entregues ao tecido/célula alvo podem prejudicar os receptores responsáveis por absorver e interagir com os fótons, além de diminuir a taxa de proliferação celular ou até mesmo inibir completamente o funcionamento da célula, gerando morte celular. (KARU, T. I. et al., 1987). Huang e colaboradores reforçam estes resultados, mencionando que, acima de um dado limiar energético, podem ocorrer efeitos inibitórios ao invés da bioestimulação. (HUANG et al., 2009)

De fato, foi demonstrado que altas densidades de energia podem induzir estagnação do metabolismo e induzir apoptose celular. Células de fibroblastos extraídas de feridas humanas foram irradiadas com *laser* de 632,8 nm, densidade de potência de 50 mW/cm<sup>2</sup> e divididas em grupos que receberam doses e 3, 30, 90 e 180 J/cm<sup>2</sup>. O grupo que recebeu 180 J/cm<sup>2</sup> teve uma diminuição significativa de células apresentando fase do ciclo de síntese de material biológico e um aumento expressivo de células que se encontravam com prolongamento da fase de crescimento celular e de células apoptóticas. (SHU et al., 2002) Ainda compatível com esse raciocínio, casos recentemente publicados de MO ulcerada foram satisfatoriamente tratados com *laser* 660 nm, e densidade de energia que variam de 10 a no máximo 50 J/cm<sup>2</sup>, com 0,4 a até 2 J entregues em cada ponto de irradiação nas lesões, de modo diário, por períodos de 5 a 10 dias. (HIRAMATSU-AZEVEDO; NUNES, 2021)

## 3.3 MO e terapia de PBM

A ação do *laser* em ativar vias de sinalização celular relacionadas à migração de queratinócitos mostra-se importante contribuindo com o fechamento das úlceras de MO. (ANTUNES et al., 2018) O conjunto de sinais e sintomas causados na fase ulcerativa traz aceleração do declínio do estado geral de saúde dos pacientes oncológicos, sendo a PBM um positivo aliado clínico nesta etapa, uma vez que acelera a cicatrização destas lesões. (CARVALHO et al., 2018; COTOMACIO et al., 2017; MUSSTTAF et al., 2019)

Irradiação com laser de baixa intensidade é eficaz na redução sintomática do quadro álgico apresentado pelos pacientes, bem como também apresenta resultados satisfatórios no tocante a involução dos sinais clínicos relacionados à MO, além de ser uma opção terapêutica não farmacológica. Esse fato é importante dentro do contexto clínico em que se apresenta, sendo pacientes oncológicos sob uso de medicamentos diversos, mais complexos de manejar farmacologicamente, dada а possibilidade de interações medicamentosas negativas e também do risco de sobrecarga metabólica, devido ao excesso de fármacos no organismo do indivíduo. (CARVALHO et al., 2018; EDUARDO et al., 2015; EL BOUSAADANI et al., 2016; LOPES et al., 2009; SILVA et al., 2015)

A PBM é apontada como opção clínica segura para conduta de MO em pacientes oncológicos. (DE PAULI PAGLIONI et al., 2019) Esta terapia atua em fatores relacionados à patogênese da lesão, como o NF- $\kappa$ B (CURRA et al., 2015), ciclooxigenase (LOPES et al., 2009), TNF- $\alpha$  (OTON-LEITE et al., 2015). A ação anti-inflamatória da PBM com *laser* infravermelho ( $\lambda$ =780 nm) e vermelho ( $\lambda$ = 660 nm) atuando de modo a diminuir a expressão de fatores relacionados à amplificação da MO, tais como interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ), interleucina 8 (IL-8), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e mieloperoxidase também já foram relatadas na literatura. (BASSO et al., 2018; SALVADOR et al., 2017)

Em relação aos efeitos clínicos, a literatura converge para benefícios acerca dos efeitos analgésicos e de aceleração no reparo tecidual. (CARVALHO et al., 2018; GUEDES et al., 2018) Outrossim, trabalhos sugerem que a PBM em MO mostrou-se capaz de evitar que o tratamento oncológico seja adiado por déficit nas condições clínicas gerais do paciente, que se enfraquecem devido às complicações da MO em pacientes não tratados com PBM. (ANTUNES et al., 2016; GAUTAM et al., 2015) O uso da PBM, associada a um protocolo de cuidados com higiene oral, mostrou-se eficaz em manter graus de manifestação de MO abaixo do esperado para pacientes submetidos a regimes terapêuticos oncológicos com alto risco para desenvolvimento de MO com quadro ulcerativo severo. (EDUARDO et al., 2015)

Além dos efeitos clínicos benéficos, Rupel et al. em 2018 observaram que, para densidade de 6 J/cm<sup>2</sup>, a PBM com *laser* infravermelho,  $\lambda$  =970 nm foi capaz de diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio formadas por

neutrófilos e queratinócitos, coletados da saliva de 7 pacientes submetidos ao tratamento oncológico com quimioterápicos e 3 submetidos ao tratamento com radioterapia. Os pacientes foram tratados diariamente com PBM por 4 dias, e as amostras celulares coletadas a partir de amostras salivares colhidas 5 minutos antes e imediatamente após as sessões de PBM. Os autores não detalham o regime radioterápico ao qual os pacientes estavam submetidos. (RUPEL et al., 2018)

Antunes e seus colaboradores verificaram que a PBM com *laser*  $\lambda$  = 660nm, com densidade de energia relatada de 4 J/cm<sup>2</sup>, foi capaz de estimular a transcrição de genes relacionados à diferenciação de queratinócitos linguais nas lesões ulceradas de MO, em pacientes oncológicos submetidos à dose diária de radioterapia em cabeça e pescoço de 1.8 Gy. As amostras celulares foram coletadas com auxílio de escova citológica nos dias 1 e 10 de radioterapia, de 6 pacientes tratados com PBM e 7 de um grupo placebo. Foi verificada por análise de PCR, para as amostras coletadas no dia 10 do experimento, uma maior expressão no grupo tratado com PBM dos genes SPRR2B e SPRR2F, relacionados à diferenciação de queratinócitos e ao desenvolvimento do epitélio queratinizado. (ANTUNES et al., 2018)

No entanto, os parâmetros energéticos utilizados para a irradiação tecidual para o tratamento de MO não são homogêneos. (BENSADOUN, R. J., 2018; CARVALHO et al., 2018; EL BOUSAADANI et al., 2016; LALLA et al., 2019; ZADIK et al., 2019) As revisões sistemáticas que pesquisaram esses parâmetros relatam variações energéticas de1 a 6 J/cm<sup>2</sup> ou de 1 a 70 J/cm<sup>2</sup>, com variação de potência do aparelho de 15 a 125 mW e em ambos os comprimentos de onda, vermelho e infravermelho, utilizados de modo individual ou simultâneo. (BENSADOUN, R.-J., 2018; ZADIK et al., 2019) Os relatos sobre de frequência de irradiação em pacientes acometidos por lesões de MO também varia, porém, a maioria dos trabalhos converge para irradiações diárias ou cinco vezes por semana para PBM com foco no tratamento de MO. (EDUARDO et al., 2015; ZADIK et al., 2019)

#### 3.4 Epitélio e Citoqueratinas

A integridade epitelial é importante para manter os tecidos subjacentes protegidos de invasão microbiana, exposição de vasos sanguíneos e desnudamento de terminações nervosas que podem causar quadros álgicos severos. Frente a uma injúria que destrua essa camada de revestimento tecidual, as células que compõe o epitélio, os queratinócitos, devem migrar da borda para o centro da ferida, recompondo assim a superfície de recobrimento do tecido exposto. (EVANS, 2017) A maturidade epitelial está sabidamente associada não só à proteção mecânica, mas também à competência bioquímica da imunidade local. Queratinócitos maduros e diferenciados são capazes de, mediante estímulos agressores, secretar fatores, como defensinas, que participam da defesa local e refletem a competência do epitélio, em termos de mediação de resposta imune inata. (LIU et al., 2002; PIIPPONEN et al., 2020)

Para o processo de reconstituição epitelial, a função dos queratinócitos é determinante, sendo estes responsáveis por iniciar, na camada basal do epitélio, um ciclo de diferenciação e proliferação celular. A migração centrípeta das células epiteliais forma um leito delgado sobre a matriz de tecido conjuntivo da ferida, que também se encontra em recomposição. Esses queratinócitos da camada basal seguem proliferando e aumentando sua estratificação, migrando os queratinócitos mais maduros para estratos mais superiores do novo epitélio. Quanto mais rápida for a velocidade de recomposição deste epitélio, mais cedo o tecido estará novamente protegido das injúrias ambientais. (ORGILL; DEMLING, 1988)

Os queratinócitos possuem em seu citoesqueleto celular proteínas filamentosas, denominadas citoqueratinas (CK). Há algumas décadas, a identificação destas proteínas do citoesqueleto mostrou-se importante, uma vez que foi verificada a sua participação na identificação da patogênese de diversos acometimentos epiteliais. Isso ocorre porque a expressão das CK dá-se de modo dinâmico, mudando de acordo com a camada do epitélio e também se alterando em função do seu grau de maturidade. Tal fato permite verificar um maior ou menor grau de maturidade epitelial, de acordo com o padrão de CK expresso. (MOLL et al., 1982) Sugere-se que as CKs participam de modo importante na transmissão de sinais extracelulares para o núcleo celular, sendo importantes

para o processo de sinalização celular. (COULOMBE; OMARY, 2002) Na camada basal, as CKs relacionam-se com a integridade e resistência mecânica epitelial, uma vez que junções desmossômicas que compõem as ligações intracelulares do epitélio encontram-se ligadas aos filamentos de citoqueratinas das células presentes. (DALE et al., 1985; WERNER et al., 2007)

A CK14 é caracteristicamente observada em camadas basais epiteliais, onde há maior atividade proliferativa, como se espera que ocorra no processo de cicatrização tecidual e, também, em células de menor maturidade. Na porção supra-basal, em estratos mais amadurecidos, a expressão de CK14 é menos marcante. Nessa região mais superior do epitélio, a CK10 é um exemplo de tipo de proteína estrutural abundantemente encontrado. A CK10 é uma das principais CKs que se expressa nas camadas mais diferenciadas da epiderme e em outros epitélios queratinizados. (BONAN et al., 2006; COULOMBE; OMARY, 2002; DE ALMEIDA, 2004; MOLL et al., 1982; SAWAF et al., 1991)

Lourenço e seus colaboradores avaliaram as CKs 10 e 14 em fetos humanos de 4, 12 e 24 semanas, visando a descrição do desenvolvimento dérmico fetal em região de couro cabeludo, coxa, dorso, planta, palma, dígito, antebraço, pálpebra, sobrancelha e região de mucosa genital. As proteínas foram avaliadas por meio de marcação imunohistoquímica de modo visual qualitativo. Os autores relatam que, independentemente da região, na quarta semana de desenvolvimento a expressão geral da CK14 era baixa e da CK10 praticamente inexistente. Na medida em que aumentava idade fetal, aumentava a expressão de CK10 nas camadas superiores do epitélio bem como a CK14 nas camadas basais. (LOURENO et al., 2008)

A literatura é escassa em relação à CKs em lesões de MO, sejam estas radioinduzidas ou quimioinduzidas. Um estudo de 2006 avaliou a CK14 expressa na MO de pacientes submetidos a doses radioterápicas de 35 Gy, e após 3 semanas do início do tratamento radioterápico. Os pacientes estavam sob tratamento com medicação antiulcerativa e apresentavam grau 1 de MO. O estudo comparou essas amostras com exemplares de epitélio sadio, dos mesmos pacientes, obtidas imediatamente antes da sessão de irradiação. As expressões de CKs foram medidas por meio de marcação IHQ, utilizando a porcentagem de marcação no epitélio e a análise visual qualitativa da distribuição das proteínas para estabelecer os resultados. Foi concluído que a CK14 apresentava um claro

padrão de distribuição supra basal nas amostras de MO em relação às amostras de epitélio saudável, embora não tenham sido detectadas diferenças significativas no percentual de marcação dessa proteína entre um grupo e outro. (BONAN et al., 2006)

A CK14 também foi encontrada aumentando de modo progressivo, em amostra de queratinócitos gengivais humanos, de paciente submetido à enxertia gengival, coletados imediatamente antes do procedimento e nos dias sete e quatorze após o ato cirúrgico. Os autores comentam que o processo de amadurecimento epitelial, em termos de composição intracelular, poderia levar mais do que duas semanas. (RUSU et al., 2016)

Chmara e seus colaboradores pesquisaram a expressão de RNA mensageiro de CK14, por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de células epiteliais de pacientes submetidos a irradiação total de 18 Gy, no protocolo de irradiação corporal total. Foram coletadas amostras celulares de epitélio oral de dois pacientes, 2 semanas antes imediatamente depois das sessões de irradiação, que eram feitas duas vezes por dia, por 4 dias, sendo 2.25 Gy cada sessão. Os autores verificaram que logo ao término da primeira sessão a expressão de RNA da CK14 diminuiu exponencialmente até o terceiro dia de irradiação, quando começou a aumentar seus níveis de expressão. Os autores colocam que ambos os pacientes desenvolveram MO em graus severos, não detalhando sobre o tempo transcorrido até o aparecimento das lesões. Os autores associaram ainda a queda da expressão de CK14 com a concomitante diminuição da síntese da p53, proteína relacionada a supressão de dano celular, colocando que ambos poderiam ser possíveis indicadores de risco de desenvolvimento de MO. (CHMARA et al., 2018)

Ainda falando de queratinócitos humanos, um estudo de engenharia tecidual evidenciou que a CK14, característica de queratinócitos menos maduros e menos diferenciados, aumenta significativamente após amostra de epitélio gengival ser submetida ao contato com uma matriz polimérica que, em meio de cultura, visava acelerar a proliferação celular. Na interpretação dos autores, que comparam esse marcador em células cultivadas com e sem a matriz, quanto mais CK14 expressa, maior o potencial proliferativo e mitótico da célula. (STRASSBURG et al., 2019)

A marcação da CK14 e CK10, para avaliar processos e materiais que tentam acelerar um processo de cicatrização epitelial, parece variar de acordo com o período de coleta da amostra de tecido. Em 2019, um grupo de pesquisadores coreanos testou um hidrogel à base de beta glucano, que é um polímero de glicose com propriedades cicatrizantes, em feridas provocadas em dorso de ratos e tratadas diariamente com o novo gel, por 14 dias. O hidrogel foi capaz de acelerar a cicatrização clínica das lesões, em relação a um grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. O grupo tratado, que obteve melhor resultado clínico, teve CK10, proteína expressa em células mais diferenciadas, significativamente mais marcada e menos CK14. No grupo não tratado, além de ainda apresentar úlceras no décimo quarto dia do experimento, a expressão das proteínas se invertia: houve menos CK10 e mais CK14. (MUTHURAMALINGAM et al., 2019)

#### 3.5 Citoqueratinas e efeitos da PBM

A CK14 foi utilizada para avaliar os efeitos da PBM em feridas abrasivas feitas cirurgicamente em ratos, e comparados com um grupo controle. Houve destaque para a ação do *laser* de 810 nm, com densidade de potência de 10 mW/cm<sup>2</sup> e energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, que revelou expressões de CK14, proteína expressa por células menos diferenciadas, significativamente mais elevada que o grupo controle, e mostrou-se ainda mais eficaz em acelerar o fechamento clínico das feridas abrasivas. Estes resultados foram obtidos após oito dias decorridos da data em que foram provocadas as lesões. (GUPTA et al., 2014)

Um estudo verificou a ação positiva do *laser* em linhagem de queratinócitos humanos incubadas por 24h e então irradiadas com *laser* de baixa intensidade, e usou CK10 como meio de avaliar a maturidade epitelial promovida pela PBM. Foi usado *laser* vermelho, de 660 nm, com potência de 3,57 W/cm<sup>2</sup> e densidades de energia de 3, 6 e 12 J/cm<sup>2</sup>, comparadas a um grupo controle que não recebeu nenhuma irradiação. No terceiro dia pós irradiação, todos os grupos *laser*, inclusive o de 12 J/cm<sup>2</sup> apresentava capacidade de proliferação significativamente maior que o grupo controle, sendo do de 6 J/cm<sup>2</sup> o que mais se destacou estatisticamente de todos os grupos em relação à marcação da CK10. (SPERANDIO et al., 2015)

Um trabalho observou a diferença significativa da marcação da CK10 e reepitelização clínica induzida por PBM em feridas feitas em dorso de ratos. O trabalho utilizou *laser* de 660 nm, potência de 40 mW/cm<sup>2</sup> e densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup> e de 50 J/cm<sup>2</sup>. Os animais receberam 5 sessões de PBM, sendo uma imediatamente após a ferida cirúrgica e as outras quatro sessões nos dias 1, 2, 3 e 7 do experimento. As amostras foram então coletadas no sétimo e décimo quarto dia, e foi feita a quantificação da área de CK10 marcada nas lâminas, comparando-se os resultados da quantificação da área marcada pela proteína, e dos achados clínicos, com grupo controle não tratado. O grupo de PBM de 10 J/cm<sup>2</sup> obteve área de marcação para CK10 significativamente maior em relação aos demais grupos, bem como melhores resultados clínicos de fechamento de ferida. (DE CASTRO et al., 2020)

Até o presente momento, encontra-se publicado um único estudo que utilizou CK como meio de avaliar uma determinada modalidade de tratamento em MO induzida por radiação. Cini e seus colaboradores publicaram em 2020 um trabalho que induziu MO em camundongos, com dose total de 30 Gy com fonte de Raios X, e usou a marcação de CK por IHQ como recurso para avaliar o potencial de tratamento da MO com dermatan sulfato, um anti-inflamatório de uso sistêmico. O trabalho utilizou como parâmetro de maturidade e proliferação celular a CK 5 que, assim como a CK14, mostra-se restrita a camada basal em epitélios saudáveis e é positivamente associada ao potencial mitótico da célula e a baixos graus de diferenciação. O estudo de Cini verificou que a CK5 estava mais expressivamente marcada no epitélio do grupo tratado com o antiinflamatório e, em ambos os grupos, não se restringia à marcação da camada basal do epitélio, mas se extendia pela camada supra basal. (CINI et al., 2020)

Ilustrando a importância do papel destas proteínas no processo de reparo da MO, um trabalho recentemente conduzido pela *Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology* (MASCC/ISSO) reforça a importância da pesquisa de citoqueratinas na evolução da MO, sugerindo, por meio de uma revisão sistemática, que estas proteínas potencialmente podem vir ser utilizadas clinicamente no tratamento da MO. (LOGAN et al., 2020)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho foi desenvolvida em parceria com a Profa. Dra. Luciana Corrêa, do Laboratório de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP). Obtida a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (94/11/CEUA-IPEN/SP), utilizou-se 33 (trinta e três) línguas de ratos machos *Wistar* com massa corpórea aproximada de 350 g, provenientes do experimento da dissertação da aluna Maira Franco de Andrade, sob orientação da Profa. Dra. Denise M. Zezell, do programa de pós-graduação em Tecnologia Nuclear do IPEN/USP. (ANDRADE, 2014) A parte viável do material biológico produzido a partir do referido estudo, já fixado e parafinado, foi utilizado no presente trabalho.

## 4.1 Indução de MO e terapia de PBM

Do total da amostra, utilizou-se material referente a trinta e três animais. A indução de feridas ulceradas de MO foi obtida por meio de radiação gama emitida por fonte de <sup>60</sup>Co do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR, IPEN-CNEN), com dose total de 20 Gy, com taxa dose de 0,60 Gy/minuto, entregues em um único tempo experimental. Os animais encontravam-se anestesiados, imobilizados, com região de tronco e membros protegidos por blindagem de chumbo com 10 cm de espessura e a uma distância de 20 cm da fonte (figura 3). (ANDRADE, 2014)

Para a PBM, o esquema de tratamento foi feito com o *laser* de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) modelo *Twin Laser*, MM Optics<sup>®</sup> Ltda (São Carlos, SP, Brasil), de 48/48hs, com três pontos de irradiação no dorso e dois pontos de irradiação no ventre da língua, de modo a englobar toda a área exposta à radiação ionizante. Os parâmetros de irradiação com *laser* de baixa intensidade para os grupos tratados estão descritos na tabela 1. Os espécimes tratados com PBM foram comparados a amostras de línguas de animais de um grupo controle, submetido aos mesmos parâmetros de indução de MO, mas que não recebeu nenhuma intervenção terapêutica. As amostras incluídas neste estudo constituem material coletado no oitavo e vigésimo dia do experimento, conforme descrito na tabela 2.

Figura 3 – Desenho esquemático da disposição do animal em relação à fonte de raios gama para etapa de indução da MO (esquerda) e fotografia do posicionamento real dos animais no momento da irradiação (direita).



Fonte: ANDRADE, 2014.

Tabela 1 – Parâmetros do tratamento com PBN	M
---	---

	λ = 660 nm	λ = 780 nm
Potência (mW)	30	30
Diâmetro do feixe (mm)	0,04	0,04
Tempo por ponto (s)	10	10
Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	7,5	7,5
Periodicidade de irradiação com <i>laser</i>	48/48h	48/48h

Fonte: ANDRADE, 2014.

	Dia 8	Dia 20	Total
λ = 660 nm	7	7	
λ = 780 nm	7	5	
Controle	4	3	
TOTAL	18	15	33

Tabela 2 – Distribuição dos animais nos grupos experimentais, de acordo com os dias de eutanásia e coleta de material

Fonte: ANDRADE, 2014.

#### 4.2 Reação IHQ

Com o uso de blocos de parafina com línguas de ratos com MO induzida por radiação descrito nos itens anteriores, neste trabalho foi realizada a reação IHQ com marcadores das proteínas CK10 e CK14 (Dako-Dinamarca). Para tanto, foram obtidos cortes histológicos de 3 micrometros de espessura, dispostos sobre lâminas silanizadas (Sigma Chemica Co.-EUA). O material foi submetido à desparafinização com uso de xilol, em estufa na temperatura de 60 – 65° C, por 10 minutos. A reidratação do tecido com álcool, em cuja concentração foi feita de modo seriado e decrescente, partindo do álcool absoluto ao álcool 75%. Feito isso, a recuperação antigênica dos tecidos foi feita com ácido cítrico de concentração 0,01 molar, em banho-maria, a 95°C, por meia hora.

Depois de resfriados, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena, feita com solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%, sendo dois banhos com duração de 15 minutos cada um. Os cortes foram então lavados em dois banhos de água destilada de modo abundante, e feitos em seguida dois banhos de solução salina tamponada de pH de 7,6, tendo cada um dos quatro banhos duração de 2 minutos. Seguiu-se o bloqueio de sítio inespecífico pela imersão do material em albumina de soro bovino de concentração a 1%, por uma hora. Passado esse tempo, os cortes foram então incubados, por 1 hora em temperatura ambiente, com os anticorpos anti-CK10 (na concentração 1:100) e anti-CK14 (1:400).

As lâminas então foram novamente lavadas com três banhos de solução salina tamponada de pH de 7,6, com duração de dois minutos, cada. Procedeu-se a incubação com anticorpo secundário conjugado com biotina (30 minutos) e com o complexo terciário (30minutos) (Vectastain kit, Vector Laboratories, CA, USA). Para a revelação, este trabalho usou o cromógeno diaminobenzidina (DAB) na concentração e 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, *Sigma ChemicalCo.,St Louis MO/USA*) e a contra-coloração foi feita por imersão durante 5 minutos em hematoxilina de Mayer.

Os cortes foram então desidratados em série crescente de álcool (70%, 90%, e 100%), sendo 2 minutos por banho, e submetidos à diafanização com xilol (2 banhos de 5 minutos cada um). As lâminas foram montadas com fita de polietileno (*Coverslipping Film Finitek*, Sakura, EUA) por meio de um sistema de montagem automatizada (Tissue- TekSCA, Sakura, EUA). Após terminada essa etapa de reação, para evidenciação das proteínas CK 10 e CK 14 pela coloração DAB, foram obtidas imagens de microscopia óptica (Nikon Eclipse Ti-E, Shinagawa, Japão) com auxílio do programa *NIS-Elements Advanced Research*, (Nikon, Shinagawa, Japão).

## 4.3 Quantificação da IHQ

Quantificou-se objetivamente a marcação da área epitelial marcada pela reação de IHQ dos anticorpos anti-CK10 e anti-CK14 por meio da análise colorimétrica, revelada pela coloração marrom da DAB. O método usado para o isolamento da cor DAB foi a deconvolução de cores (LANDINI et al., 2021; RUIFROK; JOHNSTON, 2001) das imagens obtidas, por meio do qual se é possível separar a cor marrom, correspondente à marcação dos anticorpos, dada pelo corante DAB, da cor azul originada pela hematoxilina. Foram adquiridas as imagens digitalizadas de 6 cortes de cada lâmina das regiões de dorso e ápice lingual, no aumento de 40 X, e escolhidos aleatoriamente em triplicata, para que fosse então, procedida a deconvolução de cor da área epitelial marcada pela DAB, de modo a manter inalterada a área de tecido (em *pixels*). As regiões de dorso e ápice foram escolhidas, pois foram as regiões mais afetadas clinicamente pelas lesões de MO na fase ulcerativa do processo (figura 4). Para cada uma das proteínas avaliadas, obteve-se então um total de 99 cortes para análise,
correspondentes a triplicata de cada um dos 33 espécimes aqui utilizados. A resolução e o formato das imagens obtidas foram de 300 dpi (*dots per inch*) em TIFF (*Tag Image File Format*). As imagens foram renomeadas de modo a cegar análise da marcação e, posteriormente, re-identificadas no momento de analisar os resultados.

Figura 4 – Aspecto clínico de úlcera de MO (circulada em amarelo) em dorso e ápice lingual, no oitavo dia do experimento.



Fonte: ANDRADE, 2014.

Foi então selecionada a área correspondente ao epitélio de cada um dos cortes com auxílio de ferramenta de seleção manual disponível no programa *ImageJ* (*ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda*, Maryland, USA). (SCHNEIDER et al., 2012) O mesmo programa permitiu obter, após essa delimitação, o valor total da área do epitélio de cada corte. De posse deste valor, utilizou-se a ferramenta de exclusão da área da imagem que se encontrava fora da área delimitada e, consequentemente, obteve-se uma imagem que continha somente a área do epitélio do campo a ser avaliado (figura 5).



Figura 5 – Imagem original (superior) do corte histológico (40x) e após seleção da área correspondente ao epitélio e exclusão das demais áreas (inferior)



Fonte: autora da dissertação.

Após esse processo de seleção da área epitelial, e obtenção dos seus valores numéricos, procedeu-se a análise da coloração DAB pela técnica de deconvolução de cor. A deconvolução dos campos selecionados foi feita utilizando um *plug-in* específico, o *Colour Deconvolution 2* (LANDINI et al., 2021) para separar os espectros correspondentes à marcações histológicas selecionadas conforme a necessidade, que foi instalado no programa *ImageJ*. O

programa gerou então três imagens distintas: uma com a cor azul, referente à marcação dada pela hematoxilina, uma com a cor marrom, sendo esta a imagem de interesse (cor marrom corresponde à marcação com DAB) e uma terceira imagem contendo cores residuais, que aparecia normalmente em branco.

Escolhida então a imagem da deconvolução, que correspondia a coloração DAB, o *plug-in* utilizado forneceu um histograma de intensidade de tons de marrom contidos em cada um dos *pixels* que compunham a imagem. Esses tons de marrom variaram de 0 a 255, sendo 0 o tom mais escuro (menor transmissão de luz) e 255 o tom mais claro (maior transmissão de luz). O programa gerava então, de modo automático, uma imagem que destacava na cor vermelha os *pixels* nos quais o programa sinalizou que a transmitância correspondente à marcação DAB estava presente, gerando uma região do epitélio destacada em vermelho, que variou em extensão de acordo com a expressão do marcador enxergada pelo programa (figura 6). Os valores do intervalo numérico (de 0 a 255) identificado em cada uma das imagens (figura 7), que correspondia ao intervalo de transmitância luminosa considerada correspondente à marcação DAB, para ambos os marcadores, foi submetido a avaliação estatística a fim de identificar homogenização no padrão da análise (apêndice).

Em seguida, o valor correspondente à área evidenciada pela cor vermelha foi então relacionado com a área total do epitélio anteriormente obtida pela seleção. Foi então possível gerar um valor que correspondeu ao percentual de área positiva para a marcação da proteína avaliada no caso (CK10 ou CK14), dada pela coloração com DAB, em relação à área total do epitélio presente no corte avaliado. Esse método foi adaptado de Zhou et al. (ZHOU et al., 2015) Tal sequência foi feita para cada um dos 198 cortes, sendo 99 cortes pertencentes à CK 10 e 99 à CK 14. Figura 6 – Etapas do processo de deconvolução de cor pelo programa *ImageJ*. (a) Imagem original do corte histológico da reação IHQ corado com DAB e hematoxilina. (b) epitélio delimitado após o uso da ferramenta de corte e exclusão de demais regiões, cuja medida foi utilizada para obter a área total do epitélio avaliado. (c) imagem contendo apenas os tons de marrom correspondente ao corante DAB. (d) área marcada correspondente ao *threshold*. Notar que o programa desconsidera a intensidade da marcação e define de modo dicotômico a região marcada ou não pela DAB.





Fonte: autora da dissertação.

# 4.4 Tratamento estatístico

Os valores correspondentes ao percentual de área epitelial marcada pelos marcadores CK 10 e CK 14, para cada um dos dois grupos tratados com PBM, com *laser* de 660 nm e *laser* de 780 nm, e do grupo controle, foram submetidos à análise quantitativa não pareada, de modo a avaliar se a área de

marcação de cada uma das proteínas variava de acordo com os grupos e/ou com o tempo clínico de evolução da lesão (8 ou 20 dias).

Foi utilizado o programa *Graph Pad Prism* (*GraphPad Software, San Diego, CA*). O teste de normalidade utilizado foi o teste de Shapiro-Wilk, que verificou a distribuição paramétrica dos dados. Por tal motivo e pela quantidade de grupos avaliados (acima de dois), foi então escolhido um teste de análise de variâncias para dados paramétricos (ANOVA). O teste foi complementado pelo teste *post hoc* de Tuckey. Este último teste visou testar a diferença dos valores intra-grupo. Foi considerado o nível de significância menor ou igual a 0,05.

Os valores correspondentes ao intervalo considerado como correspondente à transmitância considerada válida para a positividade de DAB foram também submetidos à análise estatística. O teste de Shapiro-Wilk não verificou parametria dos dados e por isso foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com *post hoc* de Dunn. Também foi considerado o nível de significância menor ou igual a 0,05.

Figura 7 – Ilustração metodológica da definição de *threshold* (tons de 0 a 255) demonstrado no histograma do programa *ImageJ* após deconvolução colorimétrica. Observar imagem original do epitélio abaixo da imagem com espectro DAB.



Fonte: Autora da dissertação

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Viabilidade do Material

Foram submetidos à reação IHQ para a marcação das proteínas um total de 198 cortes, divididos igualmente para cada uma das duas proteínas, CK 10 e CK 14. Esse total foi obtido a partir de 3 cortes de cada um dos 33 espécimes de língua de ratos *wistar* submetidas à indução de lesões de MO por radiação ionizante, sendo 99 cortes para cada um dos dois marcadores avaliados. No momento da obtenção das imagens, aquelas cujo material encontrava-se inviável para análise foram dispensadas. Eliminou-se, assim, os cortes que apresentavam artefatos como dobras, dilacerações e outras características que inviabilizassem a análise (figura 8). Foram então selecionadas imagens consideradas adequadas em termos de integridade tecidual, totalizando de 6 campos de cada um dos 33 espécimes de língua da sua região de dorso e ápice. Destes 6 campos, 3 foram escolhidos de modo aleatório por um avaliador colaborador e procedeu-se assim, a análise em triplicata da reação IHQ para CK10 e CK14 de acordo com os grupos experimentais. Figura 8 – Exemplos de imagens consideradas inviáveis e excluídas da seleção aleatória para quantificação



Fonte: autora da dissertação

#### 5.2 Porcentagem de área marcada com anti-CK 10

A análise estatística mostrou diferença significativa na porcentagem de área marcada com DAB para o grupo tratado com PBM de 660 nm no vigésimo dia do experimento. Este grupo apresentou os maiores valores de área de epitélio positivamente marcada pela reação IHQ para a CK10 se comparado aos outros grupos experimentais para todos os períodos avaliados. (Figura 9 e 10)

Figura 9 – Porcentagem de área epitelial marcada pela CK 10 dada pela reação IHQ. Média e desvio-padrão dos grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0.05)



Fonte: autora da dissertação

Figura 10 – Imagens representativas dos cortes contendo as áreas apresentando marcação positiva para CK10, de acordo com os períodos e grupos experimentais.



Fonte: autora da dissertação

## 5.3 Porcentagem de área marcada com anti-CK 14

No oitavo dia do experimento, não houve diferença estatística para os valores correspondentes a área do epitélio em que foi detectada expressão de CK14. No vigésimo dia, o grupo controle apresentou maiores valores percentuais de área marcada com CK14 do que todos os grupos do oitavo dia do experimento, mas não foi significativamente maior do que os valores dos grupos tratados com PBM para o vigésimo dia do experimento. Nota-se que o padrão de distribuição da CK14 no vigésimo dia do experimento não se restringe a camada basal como verificado nos grupos tratados com PBM para esse período. (Figura 11 e 12)

Figura 11 – Porcentagem de área epitelial marcada pela CK14 dada pela reação IHQ. Média e desvio-padrão dos grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0.05)



Fonte: autora da dissertação

Figura 12 – Imagens representativas dos cortes contendo as áreas apresentando marcação positiva para CK14, de acordo com os períodos e grupos experimentais.



Fonte: autora da dissertação

### 6. DISCUSSÃO

O presente estudo visou ilustrar a ação da PBM com *laser*s emissores de  $\lambda$ =660 nm e  $\lambda$ =780 nm em relação às expressões de CKs 10 e 14, em epitélio lingual com feridas de MO induzidas por meio de radiação ionizante, no oitavo e vigésimo dia pós-indução. Os grupos de PBM tiveram seus resultados de marcação comparados entre si e com um grupo controle, que não recebeu qualquer tratamento. De acordo com o levantamento bibliográfico, este é o primeiro estudo a abordar os efeitos da PBM com *lasers* vermelho e infravermelho em MO induzida por radiação ionizante, descrevendo a variação da marcação epitelial das CK10 e CK14 sob a ótica da evolução da maturidade epitelial potencialmente associada à PBM.

A indução do quadro clínico de ulceração causada pela MO, no presente estudo, deu-se por meio da irradiação com 20 Gy por meio de uma fonte de raios gama. Tal parâmetro dosimétrico está dentro do que a literatura aponta classicamente como sendo a faixa de valores de energia necessária para que se desenvolvam ulcerações por MO em humanos (HANDSCHEL J, 1999; SONIS, STEPHEN T., 2009, 2011; TREISTER; SONIS, 2007) e em modelo animal (tabela 3). (DE FREITAS CUBA et al., 2016; KIM et al., 2017; MARIA et al., 2016; NAKASHIMA et al., 2017) Os modelos de indução de MO mais frequentes na literatura envolvem o uso de quimioterápicos, e não de fontes radioativas, devido a maiores dificuldades éticas e técnicas envolvendo estudos *in vivo* com radiação ionizante. (WARDILL et al., 2019) Tal fato reforça a importância do aproveitamento do material biológico obtido por Andrade, 2014, nesta dissertação. (ANDRADE, 2014)

Um importante destaque metodológico deste trabalho reside no fato de que os parâmetros de irradiação com o *laser* de comprimentos de onda de 660 nm e de 780 nm foram iguais: potência 30 mW e densidade de energia de 7,5 J/cm<sup>2</sup> por ponto (tabela 1). Essa padronização permite maior segurança no momento de comparar os resultados dos protocolos de PBM.

Embora a etapa experimental deste estudo tenha sido conduzida em 2014 (ANDRADE, 2014), o cenário de parâmetros para a PBM na conduta da MO, seja induzida por radiação e/ou quimioterápicos, continua heterogêneo. (BENSADOUN, R. J., 2018; CARVALHO et al., 2018; EL BOUSAADANI et al.,

2016; LALLA et al., 2019; ZADIK et al., 2019) Em 2019 uma importante revisão sistemática destacou a alta variabilidade nos parâmetros de densidade de energia para os protocolos terapêuticos em MO, cuja densidade de energia variava de 1 a 70 J/cm<sup>2</sup> por ponto de irradiação e a potência do aparelho de 15 a 125 mW. (ZADIK et al., 2019) A publicação mais recente da MASCC/ISSO, feita em Agosto de 2020, como *guideline* na conduta da MO foca em protocolos de prevenção desta lesão promovida pela PBM, e não cita parâmetros terapêuticos de PBM para MO já instalada. (ELAD et al., 2020) Portanto, ainda não foi divulgada pela literatura uma diretriz mais homogênea nos parâmetros relacionados à PBM para terapia de MO, seja ela induzida por radiação e/ou por quimioterápicos.

Tabela 2 – Distribuição dos animais nos grupos experimentais, de acordo com os dias de eutanásia e coleta de material

Autoria	Fonte	Dose	Таха	Espécie
		Gy	Gy/min	
De Freitas Cuba et al., 2016	Raio gama	30	0,9	Ratos Wistar
Kim et al., 2017	Partícula			Ratos
	beta	18	2	Sprague-
				Dawley
Maria et al., 2016	Raios X	10, 15 18, 20 e 25	0,116	Camundongo
Nakashima et al., 2017	Raios X	15	2,18	Camundongo
Watanabe et al., 2014	Raios X	20, 25, 30,40 e 50	5,1	Hamster

Fonte: autora da dissertação.

No caso dos espécimes deste estudo, principalmente no que se refere aos animais do grupo controle do oitavo dia de experimento, foi verificado no material corado com corados com HE que o pleomorfismo celular era visualmente mais intenso nesse grupo, além de que havia maior presença de células apoptóticas, de maiores dimensões. (ANDRADE, 2014) Essa heterogenicidade no padrão da forma e tamanho poderia comprometer a quantificação por unidade de célula feita pelo programa, uma vez que a densidade celular se encontrava comprometida.

Ainda sobre as amostras, houve a necessidade de se descartar parte das imagens adquiridas por artefatos inerentes ao processamento do material que prejudicariam as análises do trabalho. Taqi e seus colaboradores (TAQI et al., 2018) descrevem fatores comumente encontrados na prática do manejo de cortes histológicos que podem comprometer a qualidade das imagens como por exemplo, como dobras, dilacerações, presença de ar e manchamento. Segundo os autores, tais eventos são comumente encontrados, e podem estar associados a falhas nas etapas de coleta, fixação, emblocamento, microtomia ou processamento químico. É esperado, assim, que cortes de espessura muito fina, como aquela que precisou ser feita neste trabalho (3 micrometros de espessura) sejam mais sujeitos a problemas como dobras tecidual e dilaceração, o que justifica o ocorrido com parte da amostra deste estudo.

Neste trabalho, a análise da marcação IHQ, para as proteínas CK 10 e CK 14, foi feita de modo quantitativo, relacionando a área total do epitélio com a área de marcação positiva para o corante referente à reação antígeno-anticorpo. Tal corante, DAB, para esta metodologia, representa um indicador dicotômico de área marcada ou não, o que significa que, segundo os próprios desenvolvedores do *plug-in* do *ImageJ* aqui utilizado. Embora na prática clínica a intensidade do corante seja relacionada a uma maior ou menor quantidade de proteínas no corte avliado, não é adequado relacionar de modo linear a intensidade da cor gerada por esse corante com uma dada quantidade de proteína expressa por cada uma dada células. (LANDINI et al., 2021) Sendo assim, foi possível verificar se em uma dada área do epitélio a CK 10 ou CK 14 estava ou não presente, não sendo possível, pela metodologia aqui utilizada, considerar a intensidade da marcação do corante como parâmetro para quantificar a proteína com auxílio do *plug-in* aqui utilizado.

A deconvolução colorimétrica foi introduzida por Ruifork, como recurso de separar em diferentes imagens da área correspondente à marcação com diferentes corantes em até três espectros de cor. (RUIFROK; JOHNSTON, 2001).No entanto, o código original de deconvolução proposto por estes autores

não pareceu ser o mais adequado para avaliar marcações IHQ. Segundo Van der Loos, (VAN DER LOOS, C. M.; GOBEL, 2000; VAN DER LOOS, CHRIS M., 2008) que escreveu sobre os produtos de reação DAB visualmente observáveis aos olhos humanos, em conjunto com a contra-coloração de hematoxilina, a coloração IHQ com DAB, além de não ser tecnicamente válida para análise a olho nu, também não segue uma relação linear de expressão da proteína com grau de escurecimento da imagem.

O plug-in de deconvolução colorimétrica aqui utilizado, o Colour Deconvolution 2, é uma versão matematicamente aprimorada daquele proposto por Ruifork. O desenvolvedor adequou a deconvolução colorimétrica à área da histologia, refinando os já existentes filtros para colorações histológicas. Com isso, foi possível obter a separação virtualmente assistida dos três espectros de cor que compõem a coloração original da reação IHQ: cor DAB, cor azul da hematoxilina e cores residuais. Essa separação ocorre de maneira mais otimizada com essa nova versão do plug-in. (LANDINI et al., 2021)

O programa gera um histograma de valores que vai de 0 (tom mais escuro) a 255 (tom mais claro). Estes valores representam a transmitância luminosa detectada pelo programa, em cada pixel, dada pela presença do corante ao qual o vetor de código do plug-in de deconvolução se refere. No caso deste estudo, a transmitância observada foi em relação ao corante DAB. O programa gerava de modo automático um intervalo de valor correspondente ao máximo e o mínimo de transmitância correspondente, segundo sua programação, à marcação DAB. No entanto, pequenos ajustes manuais foram necessários nesse momento, sem que se pudesse considerar exclusivamente o modo automático de delimitação da área marcada pela DAB. Isso porque marcações de fundo, dadas por proteínas inespecíficas do tecido, interferem na distribuição e intensidade da marcação da DAB (figura 13). Essas marcações de fundo não são homogêneas entre os cortes. Para atestar que essa etapa manual tenha sido homogênea em todas as 198 imagens analisadas, procedeu-se um teste de Kruskall-Walis (variâncias não homogêneas), que não verificou diferença estatística entre os valores de intervalo de transmitância considerados válidos para a coloração DAB entre os grupos. Essa verificação teve como objetivo atestar a homogeneidade do padrão da avaliação entre os espécimes, mesmo com a necessidade de uma etapa manual no processo.

Figura 13 – Imagem representativa da imagem original da microscopia (a), marcação automática dada pelo programa (b) e marcação definida após ajuste manual do valor do *threshold*, visando excluir a marcação de fundo.







Fonte: autora da dissertação

Assim como feito neste estudo, outros autores que trabalharam com IHQ também utilizaram softwares com códigos desenvolvidos, direta ou indiretamente, com base na deconvolução colorimétrica. A deconvolução foi base para análise de cortes corados com DAB por reação IHQ avaliando citoqueratinas (DE CASTRO et al., 2020), fator de necrose tumoral, (ALESE et al., 2021) proteínas relacionadas a tumor de pâncreas, (BAO et al., 2019) e também em análise de substância P e calcitonina em células musculares. (HAN et al., 2021)

A análise feita neste trabalho limitou-se, assim como De Castro et al., a quantificar a área do epitélio que estava ou não marcada pela coloração, após verificada a quantificação da área feita pelo programa pós deconvolução, também utilizando o programa *ImageJ* e o *plugin* proposto por Landini. Esta dicotomia na análise, limitando-se a apontar o que está ou não marcado, está de acordo com o fato de que a densidade óptica da marcação DAB na IHQ não segue uma relação linear, como propõe a lei de Beer-Lambert, na imagem da deconvolução. Ou seja, não é verdadeiro quantificar a proteína baseada na intensidade de tom de marrom obtida na imagem da deconvolução espectral. (LANDINI et al., 2021; VAN DER LOOS, C. M.; GOBEL, 2000; VAN DER LOOS, CHRIS M., 2008)

Neste trabalho foi encontrada diferença significativa no vigésimo dia de experimento em relação à expressão de CK10 para o grupo tratado com *laser* de

660 nm em relação aos demais grupos (figuras 9 e 10). De fato, a CK10 é associada, em amostras de epitélio lingual normal, a extratos de células epiteliais suprabasais, com maior grau de maturidade e de queratinização (COULOMBE; OMARY, 2002; DE ALMEIDA, 2004; MOLL et al., 1982; SAWAF et al., 1991) Reforçando estes resultados, o trabalho de Antunes e seus colaboradores verificaram que a PBM com *laser* vermelho é capaz de estimular a expressão de genes relacionados à diferenciação de queratinócitos humanos, em um estudo *in vivo* que avaliou a resposta da PBM em MO (ANTUNES et al., 2018) Além disso, sabe-se que o *laser* vermelho tem uma ação mais superficial do que em profundidade quando em contato com o tecido (BASHKATOV et al., 2005), o que justifica sua maior eficácia em relação aos demais grupos no que tange à resposta epitelial positiva aqui encontrada.

Concordando com os resultados aqui obtidos em relação ao aumento da CK10 promovida pelo grupo tratado com *laser* vermelho, na densidade de energia de 7,5 J/cm<sup>2</sup> e potência de 30 mW, De Castro e seus colaboradores (DE CASTRO et al., 2020) revelaram que o aumento na expressão da CK10 é diretamente associada à melhor qualidade clínica e histomorfológica do reparo epitelial em pele de ratos. No referido estudo, feridas cirúrgicas foram tratadas com PBM com *laser* de 660 nm, com potência de 40 mW e densidade de energia de 10 J/cm<sup>2</sup> por ponto de irradiação. Além disso, o trabalho de Sperandio et al. afirmou que o *laser* de baixa intensidade, de 660 nm foi capaz de acelerar a expressão da CK10 e a maturação epitelial nas feridas de pele de ratos, nos parâmetros de irradiação de 3, 6 ou 12 J/cm<sup>2</sup>. (SPERANDIO et al., 2015)

O aumento da expressão da CK10 mostra um potencial indicador da melhora das características não só clínicas, mas a nível constitucional intracelular, que pode encorajar pesquisas que foquem na diferença de qualidade funcional resultante de lesões tratadas com PBM com o comprimento vermelho. Isso porque queratinócitos maduros são capazes de secretar defensinas e expressar receptores de membrana que colaboram de maneira importante para a sinalização da imunidade local, estimulando o recrutamento de células, a secreção de fatores pró inflamatórios e, consequentemente, colaborando para uma resposta mais efetiva do hospedeiro a eventuais agressões microbiológicas. (LIU et al., 2002; PIIPPONEN et al., 2020) Este provável aumento de competência imune epitelial, induzida pela PBM, apresenta-se como uma vantagem para o

paciente portador de MO pois, como relatado por alguns estudos, a MO está relacionada à maior susceptibilidade à infecções locais, com potencial de disseminação sistêmica, e complicação de quadro geral de saúde do paciente oncológico. (ANTUNES et al., 2016; ROBIJNS et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2016)

Em relação à marcação de CK14 (figuras 11 e 12), este trabalho encontrou diferença significativa entre os grupos de 8 dias tratados com *laser* de 660 nm e 780 nm, se comparados com o grupo controle de 20 dias, lembrando que, neste período do experimento, todas as feridas de MO encontravam-se reparadas (ANDRADE, 2014), como é previsto pela história natural da evolução clínica da MO. (SONIS, STEPHEN T. et al., 2004; TREISTER; SONIS, 2007) Este achado, em um primeiro momento, parece contradizer o fato de que a CK 14 é um marcador associado a epitélios com menor grau de maturidade nos processos regenerativos do epitélio. (RUSU et al., 2016; SPERANDIO et al., 2015)

No entanto, em lesões de MO, a interpretação da marcação da CK14, que em amostras de epitélio saudável encontra-se exclusivamente expressa em camadas basais (COULOMBE; OMARY, 2002; DE ALMEIDA, 2004; MOLL et al., 1982; SAWAF et al., 1991), parece não se limitar somente à maturidade epitelial. Assim como em todos os grupos de 8 dias e no grupo controle de 20 dias deste estudo, os poucos trabalhos até hoje publicados que avaliaram a expressão dessa proteína em lesões de MO verificaram que, na fase de reparo, a CK14 encontra-se positivamente expressa também em extratos epiteliais superiores, na camada suprabasal, não limitada à camada basal, como em epitélios saudáveis. (BONAN et al., 2006; CINI et al., 2020)

Completando este raciocínio, destaca-se que a análise histológica nos animais do grupo de 20 dias feita por Andrade 2014 evidenciou que as feridas de MO encontravam-se totalmente reepitelizadas, como esperado pelo curso natural de regressão clínica deste tipo de lesão. (SONIS, STEPHEN T. et al., 2004; TREISTER; SONIS, 2007) Mesmo completamente reparadas as amostras de epitélio dos grupos de 20 dias apresentaram valores de porcentagem de área marcada pela CK14 maiores do que o grupo de 8 dias, ainda que não estatisticamente significativas – exceto para o grupo controle. Já para o período de 8 dias, todos os grupos encontravam-se ainda com áreas de ulceração e, consequentemente, portavam um epitélio de menor grau de maturidade. Baseado nisso, a aparente contrariedade nos resultados parece ser desfeita se a interpretação destes resultados não se restringir à análise quantitativa da área marcada, mas sim levar em conta a distribuição da CK14 pelos diferentes extratos epiteliais (figura 12). Os grupos tratados com PBM, no dia 20, apresentaram uma clara restrição da CK14 em camada basal do epitélio, como é esperado em epitélios saudáveis (SAWAF et al., 1991), inclusive submetidos à tratamentos com PBM para estimular reparo de lesões epiteliais induzidas mecanicamente. (GUPTA et al., 2014) Tal fato não aconteceu no grupo controle: no dia 20, mesmo não havendo mais sinal clínico que indicasse presença de úlceras de MO (ANDRADE, 2014), a CK14 ainda encontrava-se expressa em extratos supra-basais, característica essa de lesões de MO ainda em fase de reparo, conforme estudos prévios já demonstraram. (BONAN et al., 2006; CINI et al., 2020)

Portanto, em relação à CK14 e à MO, este trabalho sugere que a avaliação da distribuição desta proteína no epitélio deve ser levada em consideração no momento de interpretar os resultados da marcação por IHQ. Deve-se, portanto, ter atenção ao fato de que a camada basal abriga células, não somente com característica de "imaturidade", mas cuja interpretação deve-se dar ao nível do potencial mitótico proliferativo das células, essencial para a renovação epitelial. (GUPTA et al., 2014; MUTHURAMALINGAM et al., 2019; STRASSBURG et al., 2019). Somado a isto, a literatura descreve que a radiação ionizante inibe tal potencial de renovação celular, (DÖRR, 2009; HAHN et al., 2010; SONIS, STEPHEN T. et al., 2004) normalmente presente nas células da camada basal do epitélio saudável, e que, segundo os achados descritivos deste trabalho, poderia ser otimizado pela PBM.

Este raciocínio poderia explicar a menor expressão da CK14 nos grupos de 8 dias deste estudo, uma vez que, devido à alta dose de radiação à qual estes animais foram submetidos, o potencial de proliferação epitelial encontrava-se prolongada. Colaborando com este raciocínio, a expressão de CK14 já mostrou ser imediatamente diminuída nos primeiros dias após contato com radiação ionizante. (CHMARA et al., 2018) Não obstante, o fato de o grupo controle de 20 dias ter apresentado área significativamente maior de marcação positiva de CK14, quando comparada aos grupos tratados com PBM no período de 8 dias pode, então, somar-se ao fato de que, aos 20 dias, o grupo controle

ainda apresentava CK14 marcada em estratos supra basais, conforme mostram as imagens. (figura 10)

Com isto, este trabalho sugere que houve uma aceleração no tempo bioquímico do reparo epitelial no grupo tratado com PBM em relação à expressão qualitativa de CK14 do grupo não tratado. Consequentemente, a PBM pareceu reorganizar a distribuição da CK14 no epitélio, uma vez que restringiu a presença de células mitóticas com alto poder proliferativo à camada basal, que é o observado em amostras de epitélio saudável.

# 7. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos na amostra que compôs este estudo e condições experimentais utilizadas, conclui-se que:

 A fotobiomodulação com *laser* vermelho (660 nm) em mucosite oral induzida por radiação ionizante foi, capaz de promover um claro aumento na área epitelial expressando proteína relacionada ao grau de maturidade epitelial, a CK10 no vigésimo dia do experimento.

 Não houve diferença significativa na quantificação da área de CK14 em nenhum dos grupos experimentais.

 Houve diferença na distribuição da CK14 nos grupos tratados com laser no vigésimo dia do experimento, em relação ao grupo controle não tratado, sugerindo que a fotobiomodulação para ambos os comprimentos de onda (660 nm e 780 nm) foi capaz de reorganizar a expressão da CK14, restringindo sua expressão à camada basal do epitélio.

 O grupo controle, que seguiu naturalmente o curso cicatricial da lesão de mucosite oral, ainda apresentava a distribuição da CK14, no dia 20, não restrita à camada basal, mas também em camadas supra basais, mantendo, portanto, a característica das fases menos evoluídas da cicatrização da mucosite oral.

# 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESE, M. O.; DAMILOLA BAMISI, O.; ALESE, O. O. Progesterone modulates cadmium-induced oxidative stress and inflammation in hepatic tissues of Wistar rats. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 14, n. 10, p. 1048–1055, 2021. Disponível em: www.ijcep.com/

AMAROLI, A.; ARANY, P.; PASQUALE, C.; BENEDICENTI, S.; BOSCO, A.; RAVERA, S. Improving consistency of photobiomodulation therapy: A novel flat-top beam hand-piece versus standard gaussian probes on mitochondrial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 15, , 1 ago. 2021.

ANDRADE, M. F. DE. INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarguia Associada à Universidade de São Paulo Orientadora: São Paulo. 2014. 0-92 p. Dissertação. (Mestre em Tecnologia Nuclear) INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia à Universidade São associada de Paulo. 2014. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-22092014-145546/publico/2014AndradeComparacao.pdf. Acesso em: 14 abr. 2022.

ANTUNES, H. S.; SCHLUCKEBIER, L. F.; HERCHENHORN, D.; SMALL, I. A.; ARAÚJO, C. M. M.; VIÉGAS, C. M. P.; RAMPINI, M. P.; FERREIRA, E. M. S.; DIAS, F. L.; TEICH, V.; TEICH, N.; FERREIRA, C. G. Cost-effectiveness of low-level laser therapy (LLLT) in head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation. *Oral Oncology*, v. 52, p. 85–90, 2016.

ANTUNES, H. S.; WAJNBERG, G.; PINHO, M. B.; JORGE, N. A. N.; DE MORAES, J. L. M.; STEFANOFF, C. G.; HERCHENHORN, D.; ARAÚJO, C. M. M.; VIÉGAS, C. M. P.; RAMPINI, M. P.; DIAS, F. L.; DE ARAUJO-SOUZA, P. S.; PASSETTI, F.; FERREIRA, C. G. cDNA microarray analysis of human keratinocytes cells of patients submitted to chemoradiotherapy and oral photobiomodulation therapy: pilot study. *Lasers in Medical Science*, v. 33, n. 1, p. 11–18, 2018.

AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: Stimulating, healing, restoring. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 32, n. 1, p. 41–52, 2013. BAO, J.; WALLIANDER, M.; KOVÁCS, F.; NAGARAJ, A. S.; HEMMES, A.; SARHADI, V. K.; KNUUTILA, S.; LUNDIN, J.; HORVATH, P.; VERSCHUREN, E. W. Spa-RQ: an Image Analysis Tool to Visualise and Quantify Spatial Phenotypes Applied to Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, , 1 dez. 2019.

BASHKATOV, A. N.; GENINA, E. A.; KOCHUBEY, V. I.; TUCHIN, V. V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n. 15, p. 2543–2555, 2005.

BASSO, F. G.; PANSANI, T. N.; SOARES, D. G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. LLLT Effects on Oral Keratinocytes in an Organotypic 3D Model. *Photochemistry and Photobiology*, v. 94, n. 1, p. 190–194, 2018.

BENSADOUN, R.-J. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Current Opinion in Oncology*, p. 1, maio. 2018.

BENSADOUN, R. J. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Current Opinion in Oncology*, v. 30, n. 4, p. 226–232, 2018.

BONAN, P. R. F.; KAMINAGAKURA, E.; PIRES, F. R.; VARGAS, P. A.; DE ALMEIDA, O. P. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 101, n. 2, p. 205–211, 2006.

CARVALHO, C. G.; MEDEIROS-FILHO, J. B.; FERREIRA, M. C. Guide for health professionals addressing oral care for individuals in oncological treatment based on scientific evidence. *Supportive Care in Cancer*, v. 26, n. 8, p. 2651– 2661, 2018.

CHMARA, J.; BROWNING, J. W. L.; ATKINS, H.; SABLOFF, M.; MCKAY, B. C. Rapid Decrease in KRT14 and TP53 mRNA Expression in the Buccal Mucosa of Patients Receiving Total-Body Irradiation for Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Radiation Research*, v. 189, n. 2, p. 213–218, 1 fev. 2018.

CHOW, R.; ARMATI, P.; LAAKSO, E.-L.; BJORDAL, J. M.; BAXTER, G. D. Inhibitory Effects of Laser Irradiation on Peripheral Mammalian Nerves and Relevance to Analgesic Effects: A Systematic Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 29, n. 6, p. 365–381, jun. 2011. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2010.2928

CINI, N.; GRUBER, S.; ARICAN ALICIKUS, Z.; DÖRR, W. Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes. *Strahlentherapie und Onkologie*, v. 196, n. 1, p. 85–94, 1 jan. 2020.

COTOMACIO, C. C.; CAMPOS, L.; NESADAL DE SOUZA, D.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; SIMÕES, A. Dosimetric study of photobiomodulation therapy in 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *Journal of Biomedical Optics*, v. 22, n. 1, p. 018003, 2017.

COULOMBE, P. A.; OMARY, M. B. "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 14, n. 1, p. 110–122, 2002.

CURRA, M.; PELLICIOLI, A. C. A.; FILHO, N. A. K.; OCHS, G.; MATTE, Ú.; FILHO, M. S.; MARTINS, M. A. T.; MARTINS, M. D. Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF-kB. *Journal of Biomedical Optics*, v. 20, n. 12, p. 125008, 2015.

DALE, B. A.; HOLBROOK, K. A.; KIMBALL, J. R.; HOFF, M.; SUN, T. T. Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *Journal of Cell Biology*, v. 101, n. 4, p. 1257–1269, 1 out. 1985. Disponível em: https://rupress.org/jcb/article/101/4/1257/55109/Expression-of-epidermal-keratins-and-filaggrin

DE ALMEIDA, H. L. Cytokeratins. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 135–145, 2004.

DE CASTRO, J. R.; DA SILVA PEREIRA, F.; CHEN, L.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BALLESTER, R. Y.; DIPIETRO, L. A.; SIMÕES, A. Improvement of fullthickness rat skin wounds by photobiomodulation therapy (PBMT): A dosimetric study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 206, n. October 2019, p. 111850, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111850

DE FREITAS CUBA, L.; BRAGA FILHO, A.; CHERUBINI, K.; SALUM, F. G.; FIGUEIREDO, M. A. Z. De. Topical application of Aloe vera and vitamin E on induced ulcers on the tongue of rats subjected to radiation: clinical and histological evaluation. *Supportive Care in Cancer*, v. 24, n. 6, p. 2557–2564, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s00520-015-3048-3

DE PAULI PAGLIONI, M.; ARAÚJO, A. L. D.; ARBOLEDA, L. P. A.; PALMIER, N. R.; FONSÊCA, J. M.; GOMES-SILVA, W.; MADRID-TROCONIS, C. C.; SILVEIRA, F. M.; MARTINS, M. D.; FARIA, K. M.; RIBEIRO, A. C. P.; BRANDÃO, T. B.; LOPES, M. A.; LEME, A. F. P.; MIGLIORATI, C. A.; SANTOS-SILVA, A. R. Tumor safety and side effects of photobiomodulation therapy used for prevention and management of cancer treatment toxicities. A systematic review. **Oral Oncology**, v. 93, n. January, p. 21–28, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.04.004

DÖRR, W. Pathogenesis of normal-tissue side-effects. In: JOINER, M.; KOGEL, A. VAN DER. **Basic Clinical Radiobiology**. 4th. ed., London: Hodder Arnold, 2009. cap. 1, p. 1–9. Disponível em: https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.2846&rep=rep1&ty pe=pdf#page=178

EDUARDO, F. D. P.; BEZINELLI, L. M.; DE CARVALHO, D. L. C.; LOPES, R. M. D. G.; FERNANDES, J. F.; BRUMATTI, M.; VINCE, C. S. C.; DE AZAMBUJA, A. M. P.; VOGEL, C.; HAMERSCHLAK, N.; CORREA, L. Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: Clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. *Pediatric Transplantation*, v. 19, n. 3, p. 316–325, 2015.

EL BOUSAADANI, A.; ELJAHD, L.; ABADA, R.; ROUADI, S.; ROUBAL, M.; MAHTAR, M. Actualités de la prévention et du traitement des mucites orales chez les enfants cancéreux: Recommandations pratiques. *Cancer/Radiotherapie*, v. 20, n. 3, p. 226–230, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.canrad.2015.11.006

ELAD, S.; CHENG, K. K. F.; LALLA, R. V.; YAROM, N.; HONG, C.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J.; GIBSON, R.; SAUNDERS, D. P.; ZADIK, Y.; ARIYAWARDANA, A.; CORREA, M. E.; RANNA, V.; BOSSI, P.; ARANY, P.; AL-AZRI, A. R.; BLIJLEVENS, N.; HOVAN, A.; FREGNANI, E.; FULTON, J.; GUEIROS, L. A.; ROULEAU, T.; COLLER, J. K.; AL-DASOOQI, N.; WARDILL, H.; AMERINGER, S.; ANTUNES, H. S.; BATEMAN, E. H.; BEKTAS, K.; BENSADOUN, R. J.; TEN BOHMER, K.; BRITO-DELLAN, N.; CASTILLO, D.; CHIANG, K.; DE MOOIJ, C.; EILERS, J.; EPSTEIN, J.; GALITI, D.; FALL-DICKSON, J. M.; GOBBO, M.; ISSA HAZBOUN, H.; JENSEN, S. B.; JOHANSEN, J.; JOY, J.; JOY, K.; KANDWAL, A.; KATAOKA, T.; KEEFE, D.; LOPRINZI, C. L.; LUBART, R.; SKRIPNIK LUCAS, A.; MAJORANA, A.; MAYO, B.; DE MOOIJ, C.; MORI, T.; NAIR, R. G.; NASR, N.; NICOLATOU-GALITIS, O.; OTTAVIANI, G.; MIGLIORATI, C.; PENTENERO, M.; PORCELLO, L.; PETERSON, D.; POTTING, C.; RABER-DURLACHER, J.; VAN SEBILLE, Y. Z. A.; SOGA, Y.; SONIS, S.; STRINGER, A. M.; THORPE, D.; TILLY, V.; TISSING, W.; TORO, J. J.; TREISTER, N. S.; VADDI, A.; WEIKEL, D.; VAN DE WETERING, M.; ZUR, E. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*, p. 1–9, 2020.

ELTING, L. S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S. B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E. B. The burdens of cancer therapy. *Cancer*, v. 98, n. 7, p. 1531–1539, 1 out. 2003.

EVANS, E. W. Treating Scars on the Oral Mucosa. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 25, n. 1, p. 89–97, 2017.

GAUTAM, A. P.; FERNANDES, D. J.; VIDYASAGAR, M. S.; MAIYA, A. G.; 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 Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 144, p. 51–56, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.01.011

GUEDES, C. D. C. F. V.; DE FREITAS FILHO, S. A. J.; FARIA, P. R. De; LOYOLA, A. M.; SABINO-SILVA, R.; CARDOSO, S. V. Variation of Energy in Photobiomodulation for the Control of Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: A Clinical Study in Head and Neck Cancer Patients. *International Journal of Dentistry*, v. 2018, , 2018.

GUPTA, A. D.; HAMBLIN, T.; R, M. Effect of red and near infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers in Medical Science*, v. 29, n. 1, p. 257–265, 2014.

HAHN, T.; ZHELNOVA, E.; SUCHESTON, L.; DEMIDOVA, I.; SAVCHENKO, V.; BATTIWALLA, M.; SMILEY, S. L.; AMBROSONE, C. B.; MCCARTHY, P. L. A Deletion Polymorphism in Glutathione-S-Transferase Mu (GSTM1) and/or Theta (GSTT1) Is Associated with an Increased Risk of Toxicity after Autologous Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 16, n. 6, p. 801–808, jun. 2010. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879110000066 HAN, S. H.; KIM, H. K.; JANG, Y.; LEE, H. H.; RHIE, J.; HAN, D.; OH, J.; LEE, S. The expression of substance P and calcitonin gene-related peptide is associated with the severity of tendon degeneration in lateral epicondylitis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 22, n. 1, , 1 dez. 2021.

HANDSCHEL J, P. F. S. C. M. D. M. U. J. U. Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of beta2-integrin-expressing cells in humans. *Int J RadiatOncolBiol Phys.*, v. 45, p. 475–481, 1999.

HIRAMATSU-AZEVEDO, L.; NUNES, L. M. F. Odontologia Hospitalar. In: NUNES, S. C.; GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S. *Livro Aplicações Clínicas do Laser na Odontologia*. 1st. ed., Barueri: Manole, 2021. v. 1, cap. 13, p. 310–343.

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C. H.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level lightherapy. *Dose-Response*, v. 7, n. 4, p. 358–383, 2009.

KARU, T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 3, n. 4, p. 638–640, ago. 1989. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1011134489800880

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. V. Stimulation of cell proliferation in vitro by He-Ne Laser irradiation. *II Nuovo Cimento D*, v. 9, n. 12, p. 1485–1494, dez. 1987.

KAWASHITA, Y.; KOYAMA, Y.; KURITA, H.; OTSURU, M.; OTA, Y.; OKURA, M.; HORIE, A.; SEKIYA, H.; UMEDA, M. Effectiveness of a comprehensive oral management protocol for the prevention of severe oral mucositis in patients receiving radiotherapy with or without chemotherapy for oral cancer: a multicentre, phase II, randomized controlled trial. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 48, n. 7, p. 857–864, jul. 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502718304193

KIM, J. H.; JUNG, M. H.; KIM, J. P.; KIM, H.-J.; JUNG, J. H.; HAHM, J. R.; KANG, K. M.; JEONG, B.-K.; WOO, S. H. Alpha lipoic acid attenuates radiationinduced oral mucositis in rats. *Oncotarget*, v. 8, n. 42, p. 72739–72747, 22 set. 2017. Disponível em:

https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.20286

KUSIAK, A.; JERECZEK-FOSSA, B. A.; CICHOŃSKA, D.; ALTERIO, D.

Oncological-Therapy Related Oral Mucositis as an Interdisciplinary Problem— Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 7, p. 24–64, 3 abr. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1660-4601/17/7/2464

LALLA, R. V.; BRENNAN, M. T.; GORDON, S. M.; SONIS, S. T.; ROSENTHAL, D. I.; KEEFE, D. M. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*, v. 2019, n. 53, p. 17–24, 2019.

LANDINI, G.; MARTINELLI, G.; PICCININI, F. Colour deconvolution: Stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics*, v. 37, n. 10, p. 1485–1487, 2021. Disponível em: https://academic.oup.com/bioinformatics/advancearticle/doi/10.1093/bioinformatics/btaa847/5913390

LE CAËR, S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H2 Production under Ionizing Radiation. *Water*, v. 3, n. 1, p. 235–253, 2011.

LIU, A. Y.; DESTOUMIEUX, D.; WONG, A. V.; PARK, C. H.; VALORE, E. V.; LIU, L.; GANZ, T. Human β-Defensin-2 Production in Keratinocytes is Regulated by Interleukin-1, Bacteria, and the State of Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 118, n. 2, p. 275–281, fev. 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15415611

LOCKHART, P. B.; SONIS, S. T. Alterations in the Oral Mucosa Caused by Chemotherapeutic Agents. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, v. 7, n. 12, p. 1019–1025, dez. 1981. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-4725.1981.tb00208.x

LOGAN, R. M.; AL-AZRI, A. R.; BOSSI, P.; STRINGER, A. M.; JOY, J. K.; SOGA, Y.; RANNA, V.; VADDI, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; LALLA, R. V.; CHENG, K. K. F.; ELAD, S. Systematic review of growth factors and cytokines for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Supportive Care in Cancer*, v. 28, n. 5, p. 2485–2498, 2020.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Nuclear factor-κB (NF-κB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncology*, v. 43, n. 4, p. 395–401, abr. 2007. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837506001242

LOPES, N. N. F.; PLAPLER, H.; CHAVANTES, M. C.; LALLA, R. V.;

YOSHIMURA, E. M.; ALVES, M. T. S. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. *Supportive Care in Cancer*, v. 17, n. 11, p. 1409–1415, 22 nov. 2009. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00520-009-0603-9

LOURENO, S. V.; KAMIBEPPU, L.; FERNANDES, J. D.; SOTTO, M. N.; NICO, M. M. S. Relationship of adhesion molecules expression with epithelial differentiation markers during fetal skin development. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 35, n. 8, p. 731–737, ago. 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0560.2007.00893.x

MALLICK, S.; BENSON, R.; RATH, G. K. Radiation induced oral mucositis: a review of current literature on prevention and management. *European Archives* of Oto-Rhino-Laryngology, v. 273, n. 9, p. 2285–2293, 2016.

MARIA, O. M.; SYME, A.; ELIOPOULOS, N.; MUANZA, T. Single-dose radiation-induced oral mucositis mouse model. *Frontiers in Oncology*, v. 6, n. JUN, , 2016.

MCGUIRE, D. B.; FULTON, J. S.; PARK, J.; BROWN, C. G.; CORREA, M. E. P.; EILERS, J.; ELAD, S.; GIBSON, F.; OBERLE-EDWARDS, L. K.; BOWEN, J.; LALLA, R. V. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, v. 21, n. 11, p. 3165–3177, 10 nov. 2013.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, v. 31, n. 1, p. 11–24, 1982.

MUSSTTAF, R. A.; JENKINS, D. F. L.; JHA, A. N. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology*, v. 95, n. 2, p. 120–143, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944

MUTHURAMALINGAM, K.; CHOI, S. I.; HYUN, C.; KIM, Y. M.; CHO, M. β-Glucan-Based Wet Dressing for Cutaneous Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 8, n. 4, p. 125–135, 2019.

NAKASHIMA, T.; UEMATSU, N.; SAKURAI, K. Intra-oral administration of rebamipide liquid prevents tongue injuries induced by X-ray irradiation in rats. *Supportive Care in Cancer*, v. 25, n. 7, p. 2205–2213, 2017.

NIEMZ, M. H. *Laser-Tissue Interactions*. 4rd. ed., Cham: Springer International Publishing, 2019. 45–152 p.

NISHII, M.; SOUTOME, S.; KAWAKITA, A.; YUTORI, H.; IWATA, E.; AKASHI, M.; HASEGAWA, T.; KOJIMA, Y.; FUNAHARA, M.; UMEDA, M.; KOMORI, T. Factors associated with severe oral mucositis and candidiasis in patients undergoing radiotherapy for oral and oropharyngeal carcinomas: a retrospective multicenter study of 326 patients. *Supportive Care in Cancer*, v. 28, n. 3, p. 1069–1075, 2020.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. *Critical Care Medicine*, v. 16, n. 9, p. 899–908, set. 1988. Disponível em: http://journals.lww.com/00003246-198809000-00016

OTON-LEITE, A. F.; SILVA, G. B. L.; MORAIS, M. O.; SILVA, T. A.; LELES, C. R.; VALADARES, M. C.; PINEZI, J. C. D.; BATISTA, A. C.; MENDONÇA, E. F. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 296–305, 2015.

OUBAYOUN, J. P.; GOSSELIN, F.; FOREST, N.; WINTER, S.; FRANKE, W. W. Cytokeratin patterns of human oral epithelia: Differences in cytokeratin synthesis in gingival epithelium and the adjacent alveolar mucosa. *Differentiation*, v. 30, n. 2, p. 123–129, 1985.

PELLICIOLI, A. C. A.; MARTINS, M. D.; DILLENBURG, C. S.; MARQUES, M. M.; SQUARIZE, C. H.; CASTILHO, R. M. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Journal of Biomedical Optics*, v. 19, n. 2, p. 028002, 14 fev. 2014. Disponível em: http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.19.2.0 28002

PIIPPONEN, M.; LI, D.; LANDÉN, N. X. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 1–26, 2020.

RABER-DURLACHER, J. E.; BARASCH, A.; PETERSON, D. E.; LALLA, R. V.; SCHUBERT, M. M.; FIBBE, W. E. Oral Complications and Management Considerations in Patients Treated with High-Dose Chemotherapy. *Supportive Cancer Therapy*, v. 1, n. 4, p. 219–229, jul. 2004. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1543291213601319

RIBEIRO, S. B.; DE ARAÚJO, A. A.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F. De; BRITO, G. A. de C.; LEITÃO, R. C.; BARBOSA, M. M.; GARCIA, V. B.; MEDEIROS, A. C.; MEDEIROS, C. A. C. X. De. Protective effect of dexamethasone on 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *PLOS ONE*, v. 12, n. 10, p. e0186511, 23 out. 2017.

ROBIJNS, J.; CENSABELLA, S.; BULENS, P.; MAES, A.; MEBIS, J. The use of low-level light therapy in supportive care for patients with breast cancer: review of the literature. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n. 1, p. 229–242, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2056-y

RUIFROK, A.; JOHNSTON, D. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, v. 23, n. 4, p. 291–299, 2001. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/11531144

RUPEL, K.; ZUPIN, L.; COLLIVA, A.; KAMADA, A.; POROPAT, A.; OTTAVIANI, G.; GOBBO, M.; FANFONI, L.; GRATTON, R.; SANTORO, M.; DI LENARDA, R.; BIASOTTO, M.; ZACCHIGNA, S. Photobiomodulation at multiple wavelengths differentially modulates oxidative stress in vitro and in vivo. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, , 2018.

RUSU, D.; CALENIC, B.; GREABU, M.; KRALEV, A.; BOARIU, M.; BOJIN, F.; ANGHEL, S.; PAUNESCU, V.; VELA, O.; CALNICEANU, H.; STRATUL, S. I. Evaluation of oral keratinocyte progenitor and T-lymphocite cells response during early healing after augmentation of keratinized gingiva with a 3D collagen matrix - a pilot study. *BMC Oral Health*, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/s12903-016-0240-x

SALVADOR, D. R. N.; SOAVE, D. F.; SACONO, N. T.; DE CASTRO, E. F.; SILVA, G. B. L.; E SILVA, L. P.; SILVA, T. A.; VALADARES, M. C.; MENDONÇA, E. F.; BATISTA, A. C. 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 tr. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n. 8, p. 1801–1810, 2017.

SAUNDERS, D. P.; ROULEAU, T.; CHENG, K.; YAROM, N.; KANDWAL, A.; JOY, J.; BEKTAS KAYHAN, K.; VAN DE WETERING, M.; BRITO-DELLAN, N.; KATAOKA, T.; CHIANG, K.; RANNA, V.; VADDI, A.; EPSTEIN, J.; LALLA, R. V.; BOSSI, P.; ELAD, S. Systematic review of antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, and analgesics for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Supportive Care in Cancer*, v. 28, n. 5, p. 2473–2484, 12 maio. 2020.

SAWAF, M. H.; OUHAYOUN, J. P.; FOREST, N. Cytokeratin profiles in oral epithelial: a review and a new classification. *Journal de Biologie Buccale*, v. 19, n. 3, p. 187–198, 1991. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/1718955

SCHAUBER, J.; DORSCHNER, R. A.; YAMASAKI, K.; BROUHA, B.; GALLO, R. L. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*, v. 118, n. 4, p. 509–519, 6 jun. 2006. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2006.02399.x

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nmeth.2089

SHIH, A.; MIASKOWSKI, C.; DODD, M. J.; STOTTS, N. A.; MACPHAIL, L. Mechanisms for radiation-induced oral mucositis and the consequences. *Cancer Nursing*, v. 26, n. 3, p. 222–229, 2003.

SHU, B.; WU, Z.; HAO, L.; ZENG, D.; FENG, G.; LIN, Y. Experimental study on He-Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*, v. 5, n. 4, p. 246–9, ago. 2002.

SILVA, G. B. L.; SACONO, N. T.; OTHON-LEITE, A. F.; MENDONÇA, E. F.; ARANTES, A. M.; BARIANI, C.; DUARTE, L. G. L.; ABREU, M. H. N.; QUEIROZ-JÚNIOR, C. M.; SILVA, T. A.; BATISTA, A. C. Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 1, p. 117–126, 19 jan. 2015. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s10103-014-1624-2

SMITH, K. C. THE PHOTOBIOLOGICAL BASIS OF LOW LEVEL LASER RADIATION THERAPY. *LASER THERAPY*, v. 3, n. 1, p. 19–24, 1991.

SONIS, S. T. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Diseases*, v. 16, n. 7, p. 597–600, 2010.

SONIS, S. T.; SCHERER, J.; PHELAN, S.; LUCEY, C. A.; BARRON, J. E.;

O'DONNELL, K. E.; BRENNAN, R. J.; PAN, H.; BUSSE, P.; HALEY, J. D. The gene expression sequence of radiated mucosa in in an animal mucositis model. *Cell Proliferation*, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 93–102, 2002.

SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncology*, v. 34, n. 1, p. 39–43, jan. 1998. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837597000535

SONIS, Stephen T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncology*, v. 45, n. 12, p. 1015–1020, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.006

SONIS, Stephen T. Oral mucositis. *Anti-Cancer Drugs*, v. 22, n. 7, p. 607–612, ago. 2011.

SONIS, Stephen T. Oral Mucositis in Head and Neck Cancer: Risk, Biology, and Management. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, n. 33, p. e236–e240, maio. 2013.

SONIS, Stephen T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury: Pathogenesis, Measurement, Epidemiology, and Consequences for Patients. *Cancer*, v. 100, n. 9 SUPPL., p. 1995–2025, 2004.

SONIS, Stephen T.; OSTER, G.; FUCHS, H.; BELLM, L.; BRADFORD, W. Z.; EDELSBERG, J.; HAYDEN, V.; EILERS, J.; EPSTEIN, J. B.; LEVEQUE, F. G.; MILLER, C.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M. M.; SPIJKERVET, F. K. L.; HOROWITZ, M. Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 8, p. 2201–2205, 15 abr. 2001.

SPERANDIO, F. F.; SIMÕES, A.; CORRÊA, L.; ARANHA, A. C.; GIUDICE, F. S.; HAMBLIN, M. R.; SOUSA, S. C. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *Journal of Biophotonics*, v. 8, n. 10, p. 795–783, 2015.

STRASSBURG, S.; CADUC, M.; STARK, G. B.; JEDRUSIK, N.; TOMAKIDI, P.; STEINBERG, T.; SIMUNOVIC, F.; FINKENZELLER, G. In vivo evaluation of an electrospun gelatin nonwoven mat for regeneration of epithelial tissues. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 107, n. 8, p. 1605–1614, 2019.
TAO, J.; FAN, M.; ZHOU, D.; HONG, Y.; ZHANG, J.; LIU, H.; SHARMA, S.; WANG, G.; DONG, Q. MiR-200c modulates the pathogenesis of radiation-induced oral mucositis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, , 2019.

TAQI, S. A.; SAMI, S. A.; SAMI, L. B.; ZAKI, S. A. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 1 maio 2018. . [S.I.]: Wolters Kluwer Medknow Publications

TREISTER, N.; SONIS, S. Mucositis: Biology and management. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, v. 15, n. 2, p. 123–129, 2007.

TROTTI, A.; BELLM, L. A.; EPSTEIN, J. B.; FRAME, D.; FUCHS, H. J.; GWEDE, C. K.; KOMAROFF, E.; NALYSNYK, L.; ZILBERBERG, M. D. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: A systematic literature review. *Radiotherapy and Oncology*, v. 66, n. 3, p. 253–262, 2003.

VAN DER LOOS, C. M.; GOBEL, H. The Animal Research Kit (ARK) can be used in a multistep double staining method for human tissue specimens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 48, n. 10, p. 1431–1437, 2000.

VAN DER LOOS, Chris M. Multiple immunoenzyme staining: Methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 56, n. 4, p. 313–328, 2008.

VAN TRAN, V.; CHAE, M.; MOON, J. Y.; LEE, Y. C. Optics and Laser Technology, 1 mar. 2021. . [S.I.]: Elsevier Ltd. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0030399220313311

VASCONCELOS, R. M.; SANFILIPPO, N.; PASTER, B. J.; KERR, A. R.; LI, Y.; RAMALHO, L.; QUEIROZ, E. L.; SMITH, B.; SONIS, S. T.; CORBY, P. M. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis. *Journal of Dental Research*, v. 95, n. 7, p. 725–733, 2016.

VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis. *Current Opinion in Oncology*, v. 27, n. 3, p. 159–164, maio. 2015.

WARDILL, H. R.; TISSING, W. J. E.; KISSOW, H.; STRINGER, A. M. Animal models of mucositis: Critical tools for advancing pathobiological understanding and identifying therapeutic targets. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 13, n. 2, p. 119–133, 2019.

WATANABE, S.; SUEMARU, K.; NAKANISHI, M.; NAKAJIMA, N.;

TANAKA, M.; TANAKA, A.; ARAKI, H. Assessment of the hamster cheek pouch as a model for radiation-induced oral mucositis, and evaluation of the protective effects of keratinocyte growth factor using this model. *International Journal of Radiation Biology*, v. 90, n. 10, p. 884–891, 2014.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700786

ZADIK, Y.; ARANY, P. R.; FREGNANI, E. R.; BOSSI, P.; ANTUNES, H. S.; BENSADOUN, R.-J.; GUEIROS, L. A.; MAJORANA, A.; NAIR, R. G.; RANNA, V.; TISSING, W. J. E.; VADDI, A.; LUBART, R.; MIGLIORATI, C. A.; LALLA, R. V.; CHENG, K. K. F.; ELAD, S. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Supportive Care in Cancer*, v. 27, n. 10, p. 3969–3983, 8 out. 2019. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00520-019-04890-2

ZECHA, J. A. E. M.; RABER-DURLACHER, J. E.; NAIR, R. G.; EPSTEIN, J. B.; ELAD, S.; HAMBLIN, M. R.; BARASCH, A.; MIGLIORATI, C. A.; LANSAAT, L.; BRINK, R. Van Der; ARNABAT-, J.; MOLEN, L. Van Der; JACOBI, I.; DIESSEN, J. Van; LANGE, J. De; SMEELE, L. E.; SCHUBERT, M. M.; SURGERY, M.; INTERACTION, D.; MEDICINE, O.; PATHOLOGY, O.; DISEASES, H.; CONSULTANT, O. M.; HEALTH, Q.; ANGELES, L.; SURGERY, N.; HOSPITAL, M. G.; CORNELL, W. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Supportive Care in Cancer*, v. 24, n. 6, p. 2781–2792, 2016.

ZHOU, S.; PARHAM, D. M.; YUNG, E.; PATTENGALE, P.; WANG, L. Quantification of glypican 3, β-catenin and claudin-1 protein expression in hepatoblastoma and paediatric hepatocellular carcinoma by colour deconvolution. *Histopathology*, v. 67, n. 6, p. 905–913, dez. 2015. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/his.12730

World Health Organization., 1979. . Geneva: [s.n.]

**APÊNDICE –** Captura de tela do programa estatístico *Graph Pad Prism*, mostrando o resultado do teste de Kruskal-Wallis, que o programa denomina "*non parametric ANOVA*", e os resultados das múltiplas comparações feitas pelo teste de Dunn, para os valores de *threshold* manualmente adquiridos na análise da área marcada por CK10 (a) e CK14 (b). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores de *threshold* manualmente definidos para cada uma das imagens.

А

Prism File Sheet Undo Clipboard Analy   Image: Constraint of the state of the s	is	Interpret Change Draw	Write Ω Ω T α A A I	Text		cport Print Send	LA Help &	RIJM
ily	1	1way ANOVA						
a with Results		Multiple comparisons						
Tables								
Data 1	1	Number of families	1					
CK 10 Threshold	2	Number of comparisons per family	15					
CK14 Threshold	3	Alpha	0.05					
	4							1
Project into 1	5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
1 outliner identificado a 5%	6			1				
📓 Cleaned data	7	Column A vs. Column B	-8.543	No	ns	>0.9999	A-B	-
Outliers Summary (ruskal-Wallis test of Identify outliers of Identify outliers of Data 1	8	Column A vs. Column C	7.976	No	ns	>0.9999	A-C	1
	9	Column A vs. Column D	-17.71	No	ns	0.6909	A-D	+
	10	Column A vs. Column E	-10.56	No	ns	>0.9999	A-E	+
Multiple comparisons	11	Column A vs. Column F	-25.09	No	ns	0.4003	A-F	
Guskal-Wallis test of CK 10 Threshold   ANOVA   Multiple comparisons	12	Column B vs. Column C	16.52	No	ns	>0.9999	B-C	+
	13	Column B vs. Column D	-9.167	No	ns	>0.9999	B-D	
	14	Column B vs. Column F	-2 017	No	ns	>0 9999	B-F	+
Kruskal-Wallis test of CK14 Threshold	15	Column B vs. Column F	-16 54	No	ns	>0 9999	B-F	+
Multiple comparisons	16	Column C vs. Column D	-25.69	No	ns	0.0572	C-D	+
phs	17	Column C vs. Column E	-18 54	No	ns	>0.9999	C-E	+
Data 1	18	Column C vs. Column E	-33.06	No	ns	0.0524	C-E	+
Cleaned data: 1 outliner identificado a 5%	19	Column Divs. Column F	7 15	No	ns	>0.9999	D.F	
outs ting Notes	20	Column Divs. Column E	-7 378	No	ns	>0.9999	D.E	+
ing notes	21	Column E vs. Column E	-14.53	No	ne	>0.9999	E-F	+
	22		- 14.00		113	-0.3333	-	+

▲ GraphPad Prism 7.04 - [Project1:Kruskal-Wallis test of CK14 Threshold] ❀ File Edit View Insert Change Arrange Family Window Help

The Edit view insert Change Arrange Family window	и пе	P						
Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis		Interpret Change Draw	Write	Text	Exp	ort Print Send I	LA Help	
▲   □ • Ⅰ   ● <td>*</td> <td></td> <td></td> <td><b>β</b> <u>Γ</u> <u>U</u> x<sup>2</sup> x<sub>2</sub></td> <td></td> <td></td> <td>&amp;. @. Pf</td> <td>RIM</td>	*			<b>β</b> <u>Γ</u> <u>U</u> x <sup>2</sup> x <sub>2</sub>			&. @. Pf	RIM
nily		1						
rch results	1	Multiple comparisons					-	
a with Results								
a Tables								
Data 1	1	Number of families	1					
CK 10 Threshold	2	Number of comparisons per family	15					
CK14 Threshold	3	Alpha	0.05					
3	4							
Project info 1	5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value	+	<u> </u>
ults	6			olgrinount.	Cumulary			
1 outliner identificado a 5%	L-							
Cleaned data	<u> </u>	Column A vs. Column B	10.1	No	ns	>0.9999	A-B	
Vutliers	8	Column A vs. Column C	-7.238	No	ns	>0.9999	A-C	
Summary Kruckal-Wallis test of Identify outliers of Identify outliers of Data 1	9	Column A vs. Column D	-3.381	No	ns	>0.9999	A-D	
ANOVA	10	Column A vs. Column E	-9.292	No	ns	>0.9999	A-E	
Multiple comparisons	11	Column A vs. Column F	-9	No	ns	>0.9999	A-F	
Kruskal-Wallis test of CK 10 Threshold	12	Column B vs. Column C	-17.34	No	ns	>0.9999	B-C	
F ANOVA	13	Column B vs. Column D	-13.48	No	ns	>0.9999	B-D	
Multiple comparisons	14	Column B vs. Column E	-19.39	No	ns	>0.9999	B-E	
ANOVA	15	Column B vs. Column F	-19.1	No	ns	>0.9999	B-F	
Multiple comparisons	16	Column C vs. Column D	3.857	No	ns	>0.9999	C-D	
phs	17	Column C vs. Column E	-2.054	No	ns	>0.9999	C-E	
Data 1 Classed data: 1 autilizer identificado a 5%	18	Column C vs. Column F	-1.762	No	ns	>0.9999	C-F	
outs	19	Column D vs. Column E	-5.911	No	ns	>0.9999	D-E	
ating Notes	20	Column D vs. Column F	-5.619	No	ns	>0.9999	D-F	
	21	Column E vs. Column F	0.2917	No	ns	>0.9999	E-F	

В

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 Fone/Fax(0XX11) 3133-8908 SÃO PAULO – São Paulo – Brasil http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.