

GABRIELA DE MORAIS GOUVÊA LIMA

**EFEITOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA HOMÓGENA
ASSOCIADA AO LASER ARSENETO DE GÁLIO-ALUMÍNIO
($\lambda=660$) NA REPARAÇÃO DE MUCOSITE ORAL EM RATOS
TRATADOS COM 5-FLUORURACILA: Análise histológica e
imunohistoquímica**



2011

GABRIELA DE MORAIS GOUVÊA LIMA

**EFEITOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA HOMÓGENA ASSOCIADA AO
LASER ARSENETO DE GÁLIO-ALUMÍNIO ($\lambda=660$) NA REPARAÇÃO
DE MUCOSITE ORAL EM RATOS TRATADOS COM 5-
FLUORURACILA: análise histológica e imunohistoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP- Univ. Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2011.

L628e Lima, Gabriela de Moraes Gouvêa.

Efeitos da membrana amniótica homogênea associada ao laser gálio-arseneto-alumínio ($\lambda=660$) na reparação de mucosite oral em ratos tratados com 5-fluoruracila: análise histológica e imunohistoquímica / Gabriela de Moraes Gouvêa Lima. - São José dos Campos : [s.n.], 2011. 101. f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

1. Mucosite Oral. 2. Membrana Amniótica. 3. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. 4. Quimioterapia. I. Gomes, Mônica Fernandes II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 14 de julho de 2011.

Assinatura :

E-mail: gabriela.lima@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Karem Lopes Ortega

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 14 de Julho de 2011.

Dedico este trabalho às pessoas que sempre me apoiaram e incentivaram

À minha mãe, **Joana Darc de Moraes** , minha irmã **Clarissa de Moraes Noronha Lima**, meu pai **Edgar Rodrigues de Lima**, minha tia e madrinha querida **Isabel Maria de Moraes** e ao meu marido e eterno companheiro **Lucas Daniel Santo Silva**.

Obrigada por estarem sempre ao meu lado, quer com conselhos, com explicações, com amizade, suporte, ou mesmo com um olhar cheio de amor e um ombro acolhedor. Obrigada por serem meu lar.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Adj. José Roberto Rodrigues**, a ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade de realização do curso Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, **Profa. Adj. Mônica Fernande Gomes**, pelo projeto de pesquisa que tanto me fez aprender, pela compreensão e pela confiança em mim depositada.

Aos docentes do Programa de Biopatologia Bucal, pela colaboração e ensinamentos transmitidos. Em especial à **Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho** por todo o incentivo e disposição em ajudar e ensinar.

Aos meus amigos **Pamela Aparecida Diniz, Valéria Adriano Vieira, Gabriela de Fátima Santana, Walter Cruz, Maria José Domingues Castro, Luana Martins Galvão, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Sabrina Pinotti Ferreira Leite e Mariana Cardozo Severo, Cybelle Hiraoka**. Sem vocês, definitivamente, não teria sido possível esse momento..

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.

À querida **Maria Alcionéia Carvalho de Oliveira**, que me mostrou que as técnicas de laboratório são mais fáceis do que eu pensava.

Aos funcionários do Biotério, em especial ao seu **Lorival** e ao **Marco**, pela imensa ajuda e pelos cafés com bom papo.

Aos funcionários da **FOSJC-UNESP**, que sempre me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.

Aos professores da Disciplina de histologia, em especial à **Prof. Dra. Marianne Spalding**, pelo acolhimento, ensinamento e pelo exemplo de profissional que é.

Aos **animais experimentais**, seres cujas vidas foram sacrificadas em benefício e progresso da ciência.

Obrigada a todos pela ajuda nessa caminhada, por dividirem o dia-a-dia nesses dois anos e por tornarem as coisas mais fáceis.

"Se ensinares, ensina ao mesmo tempo a duvidar daquilo
que estás a ensinar."

(José Saramago)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Mucosite Oral.....	16
2.2 Membrana Amniótica.....	22
2.3 Laser de Baixa Potência.....	25
2.4 Antígeno de proliferação celular (PCNA).....	28
2.5 Fator de Crescimento vaso-endothelial (VEGF).....	29
2.6 Linfócito T CD4 e CD8.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	32
4.1 Animais	32
4.2 Materiais.....	33
4.2.1 Laser.....	33
4.2.2 Drogas.....	33
4.3 Método	34
4.3.1 Acasalamento dos animais e esfregaço vaginal.....	34
4.3.2 Obtenção e preparação da MAH.....	34
4.3.3 Indução da mucosite oral.....	35
4.3.4 Aplicação da MAH na mucosite oral.....	38
4.3.5 Irradiação do laser.....	38
4.3.6 Períodos de observação e análise microscópica.....	40

4.3.7 Análise histomorfológica e histomorfométrica.....	40
4.3.7.1 Análise histomorfológica.....	40
4.3.7.2 Análise histomorfométrica.....	41
4.3.8 Análise imunohistoquímica.....	42
4.4 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Análise Descritiva	44
5.1.1 Mucosa normal.....	44
5.1.2 Aspecto microscópico da mucosite oral.....	45
5.1.2.1 Período 3 dias.....	45
5.1.2.2 Período 7 dias.....	51
5.1.2.3 Período 14 dias.....	58
5.1.2.4 Período 21 dias.....	63
5.2 Análise Imunohistoquímica.....	66
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	85
8 REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO A	95
ANEXO B	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGaAl=Arseneto de Gálio-Alumínio

CRAMP= Chemotherapy and Radiotherapy Associated Molecular Pathway

DAMP= Damage Associated Molecular Pathway

ISOO= International Society of Oral Oncology

LBP= Laserterapia de Baixa Potência

MA= Membrana Amniótica

MAH= Membrana Amniótica Homóloga

MASSC= Multinational Association of Supportive Care in cancer

MO= Mucosite Oral

OMS= Organização Mundial de Saúde

PAMP= Pathogen Associated Molecular Pathway

PRR= Pathogen Recognition Receptor

ROS= Reactive Oxygen Species

TLBP= Terapia com Laser de Baixa Potência

5-FU= 5-fluoruracila

Lima GMG. Efeitos da membrana amniótica homogênea associada ao laser gálio-arseneto-alumínio ($\lambda=660$) na reparação de mucosite oral em ratos tratados com 5-fluoruracila: Análise histológica e imunohistoquímica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A presente dissertação objetivou a análise dos efeitos da membrana amniótica homogênea associada ao laser arseneto de gálio-alumínio sobre a mucosite oral induzida em ratos sob uso do quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU). Foram estudados 100 ratos Wistar, divididos em 5 grupos (20 ratos cada grupo); sendo um grupo controle, um grupo tratado com 5-fluoruracila, grupo tratado com 5-FU+membrana amniótica homogênea (MAH), grupo 5-FU+laser arseneto de gálio-alumínio, grupo 5-FU+MAH+laser arseneto de gálio-alumínio. Cada grupo foi subdividido em 4 para sacrifício e obtenção dos cortes histológicos, sendo analisados os períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após indução da mucosite. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina para a análise histomorfológica e histomorfométrica. Para a análise imunohistoquímica foi usado o método indireto com sistema de amplificação (Peroxidase, Biotina e Estreptavidina) e as lâminas foram incubadas nos anticorpos primários anti-rato: CD-4, CD-8, VEGF e PCNA e anticorpo secundário LSAB+Sys-HRP. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer. As células imunomarcadas foram contadas na região mediana da lâmina própria, em uma área de aproximadamente 2.41 mm^2 usando o programa Axiovision 4.7. Os resultados da histomorfometria foram avaliados de forma descritiva, enquanto para a análise imunohistoquímica usou-se análise de variância (One Way ANOVA) e ao teste de Tukey (GraphPad Prisma 5 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). O nível de significância adotada foi de $p < 0.05$. Concluiu-se que a MAH apresentou biocompatibilidade, acelerando o processo de reparação das mucosites e que a laserterapia teve efeito antiinflamatório, principalmente nas fases iniciais da mucosite.

Palavras-chave: Mucosite Oral. Membrana Amniótica. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Quimioterapia

Lima GMG. *Effects of association between amniotic homogen membrane and gallium-aluminum arsenide laser ($\lambda=660$) on 5-fluoruracil induced oral mucositis healing process in rats: Histological and Immunohistochemical analysis [dissertation].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2011.

ABSTRACT

The objective of this dissertation was to analyse the effects of association between amniotic homogen membrane (AHM) and gallium-aluminum arsenide laser on 5-fluoruracil (5-FU) induced oral mucositis healing process in rats. 100 Wistar rats were divided in 5 groups (20 rats each group): control group, group 5-FU (treated with 5- fluoruracil), 5FU+AHM group (trated with 5-FU+AHM), Laser group (treated wuith 5-FU+laser) and 5-FU+MAH+Laser group (trated with 5FU+AHM+laser). Each group were subdivided in fourth according to sacrifice period (3, 7, 14 and 21 days), after mucositis induction. Histological slices were stained with hematoxilin-eosine for histomological analysis. For immunohistochemical and histomorfometric analysis, the indirect method with amplification system (Peroxidase, Biotin and Streptavidin) were used and glasses were incubated with anti-rat antibodies CD-4, CD-8, VEGF and PCNA and secondary antibody LSAB+Sys-HRP. Mayer Hematoxilin was used as couterstain and immunostained cells were counted on middle region of lamina propria, with 2.41 mm² using Axiovision 4.7 Imaging System. Histomorfometry results were decribed and immunohistochemistry were analised with ANOVA one-way and Tukey test (GraphPad Prisma 5 for Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Significance level was $p < 0.05$. AHM presented biocompatibility acelerating mucositis healing process and lasertherapy had anti-inflammatory effect, specially on begining phases of healing process.

Key-words: Oral Mucositis. Amniotic Membrane. Therapy; Chemotherapy.

1 INTRODUÇÃO

A mucosite oral é a manifestação clínica mais comum durante a quimioterapia para o tratamento de neoplasias malignas nas regiões de cabeça e pescoço. Ela aparece também como complicação freqüente no transplante de medula óssea e no tratamento de doenças hematológicas (Epstein, Schubert, 1999; Franceschini *et al.*, 2003; Fujisawa *et al.*, 2003).

As drogas anti-neoplásicas, principalmente, metotrexato, 5-fluoruracila, interferon, bleomicina, doxorubicina, cisplastina, vimblastina e vincristina promovem perda de coesão das células epiteliais e/ou alterações das células da camada basal do epitélio da cavidade bucal, prejudicando a sua proliferação e, conseqüentemente, tornando a mucosa atrófica e susceptível a lesões (Epstein, Schubert, 1999; Sonis *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 2002; Franceschini *et al.*, 2003). O epitélio mostra-se atrófico e ulcerado, enquanto que a lâmina própria exhibe intenso exsudato e infiltrado de células inflamatórias, bem como edema intercelular e numerosos vasos sanguíneos (Epstein, Schubert, 1999; McGuire, 2002; Franceschini *et al.*, 2003; Meropol *et al.*, 2003). Essas alterações, em conjunto, aumentam as incidências de infecções orais (McGuire, 2002; Meropol *et al.*, 2003).

Segundo Peterson (1999) e Lalla *et al.* (2008), os locais mais acometidos pela mucosite droga-induzida são as áreas não queratinizadas, tais como: a mucosa jugal, palato mole, assoalho bucal e fórnice do vestíbulo. Atualmente, a terapia paliativa preconizada na mucosite oral é realizada através de bochechos com soluções anti-sépticas, como solução salina alcalina, administração de analgésicos,

aplicação de pomadas esteróides, crioterapia ou ingestão de vitaminas K e E. Todavia, os resultados ainda são insatisfatórios (Knox *et al.*, 2000; Franceschini *et al.*, 2003; Fujisawa *et al.*, 2003).

Desde o início do século XIX, o uso da membrana amniótica (MA) como curativo biológico tem sido discutido por vários autores. Diferentes tipos de tecido foram testados como curativo biológico e todos revelaram excelente aceitação, comprovadas por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica. Na revisão da literatura, podemos verificar que a principal aplicação da MA, em humanos, é em queimaduras da pele e em feridas cruentas de origem variada (Egan *et al.*, 1983; Boc *et al.*, 1985; Ferreira *et al.*, 1986).

Há um grande número de procedimentos e produtos para aliviar os efeitos da mucosite, como soluções antimicrobianas, protetores de mucosa, crioterapia, analgésicos tópicos, fatores de crescimento e fototerapia com laser de baixa potência (Keefe *et al.*, 2007; Abramoff *et al.*, 2008).

O princípio para o uso da terapia a laser é que ela acelera a reparação da ferida tendo ação antiinflamatória. O reparo da ferida é um dos aspectos mais estudados do laser de baixa potência (Arora *et al.*, 2008).

Em estudos que observaram a resposta dos fibroblastos à laserterapia de baixa potência (LTBP), o aumento da divisão celular (Schatinger *et al.*, 2011) e produção de colágeno (Lopes *et al.*, 2010) foram notados, inclusive influenciando no aumento da força de ruptura da ferida (Yusikawa *et al.*, 2007), assim como melhor organização das fibras colágenas (França *et al.*, 2009).

A laserterapia tem como objetivo desacelerar a progressão da mucosite oral, evitando interrupção do tratamento anti-

câncer, melhorando as taxas de sobrevivência e qualidade de vida do paciente (Arora *et al*, 2008).

Os efeitos das drogas quimioterápicas na cavidade bucal, fatores de crescimento presentes na membrana amniótica e os efeitos da radiação do laser despertaram-nos o interesse em avaliar a resposta de ratos tratados com 5-fluoruracila à aplicação da membrana amniótica homogênea sobre mucosite oral e irradiação da área com laser de baixa potência.

Portanto, considerando a eficácia da membrana amniótica como curativo biológico, na reparação tecidual de várias estruturas e as ações trófico-regenerativas, antiinflamatórias e analgésicas da radiação laser nos tecidos em desenvolvimento, propusemo-nos realizar um estudo comparativo dos efeitos da membrana amniótica e da ação da radiação laser de baixa potência, Arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl,) no processo de reparação tecidual em mucosite oral de ratos submetidos à quimioterapia com o 5-fluoruracila.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mucosite Oral

O termo mucosite oral (MO) refere a lesões eritematosas e ulcerativas da mucosa bucal observadas em pacientes com câncer tratados com quimioterapia e/ou radioterapia. Keefe *et al.* (2007), no guia da Associação Multinacional de cuidados paliativos no Câncer e a Sociedade Internacional de Oncologia oral - Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO), sugerem, inclusive, o nome mucosite alimentar para descrever injúria da mucosa do trato alimentar (boca a ânus) associada à terapia para câncer.

A mucosite oral está entre as mais freqüentes sintomáticas e regime-limitantes toxicidades associadas aos protocolos de quimiorradiação (Treister, Sonis, 2007; Lalla *et al*, 2008). Clinicamente, pode apresentar-se como uma área eritomatosa atrófica, com mucosa intacta, nos casos moderados, a úlceras que penetram na lâmina própria causando intensa dor, nos casos graves (Sonis, 2004). Além da dor, compromete a função, nutrição e higiene bucal, aumentando, assim o risco de infecção focal e sistêmica (Treister, Sonis, 2007; Lalla *et al*, 2008). O grau e extensão da lesão parece estarem associados a fatores como idade, gênero, doença sistêmica anterior, raça e fatores específicos do tecido (Lalla *et al*, 2008).

Patologicamente, a MO revela mucosa delgada levando a úlcera, supostamente causada por inflamação e depleção da camada basal epitelial com subsequente exposição conjuntiva e infecção bacteriana (Bensadoun, 2006). Ela é normalmente limitada a regiões não queratinizadas como ventre e borda lateral de língua, mucosa jugal e palato mole (Peterson, 1999; Lalla *et al*, 2008).

As lesões normalmente começam como discretas perdas de tecido na mucosa, que então confluem no decorrer do tempo, tipicamente apresentando pseudomembrana fibrinosa recobrimdo a superfície ulcerada (Treister, Sonis, 2007).

Com o passar do tempo, crescem as evidências de que o dano da mucosa induzido por químico e/ou radioterapia é resultado de uma complexa série de eventos celulares e biológicos que ocorrem predominantemente na lâmina própria, tendo o epitélio como tecido-alvo (Treister, Sonis 2007, Sonis, 2010).

Alguns estudiosos sugeriram que a quimioterapia atuaria em células de rápida proliferação da camada basal do epitélio, causando a perda da habilidade do tecido em renovar-se. A atrofia e ulcerações da mucosa, que estão associadas com a mucosite oral, seriam uma consequência desses eventos, facilitada pelo trauma e microorganismos bucais (Sonis, 2004; Logan *et al.*, 2007).

Embora o desenvolvimento de mucosite seja um processo dinâmico, a patogênese desta lesão é consequência de uma série de eventos biológicos complexos. Segundo Sonis (2000), alterações no tecido conjuntivo e endotelial da submucosa, precedem o dano epitelial. Apesar de uma resposta celular inflamatória não ocorrer nos estágios iniciais da mucosite, são encontrados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (principalmente Fator de Necrose Tumoral α – TNF- α - e Interleucina-6 – IL-6) na periferia do sangue e/ou mucosa de pacientes com mucosite. O tratamento radioterápico também induz a produção de

citocinas pró-inflamatórias associadas com injúria tecidual, como TNF- α e IL-1 β (Sonis, 2004).

O processo patobiológico da mucosite pode ser dividido em cinco estágios: iniciação, resposta de danos primários, amplificação de sinal, ulceração e reparação (Sonis, 2004; Logan *et al.*, 2007).

Estágio 1: Iniciação: Químico e/ou radioterapia induzem dano tecidual ligado e não ligado ao DNA. A quebra na fita de DNA resulta em injúria celular direta, tendo como alvo as células da camada basal do epitélio e na submucosa. A geração de radicais livres (Reactive Oxygen Species- ROS) pela radiação ou quimioterapia é também tida como iniciadora da injúria da mucosa. Apesar de a mucosa parecer normal, inicia-se uma cascata de eventos na lâmina própria que desencadeará a destruição da mucosa.

Estágio 2: Resposta ao dano primário: Além de levar à morte celular, os radicais livres ativam mensageiros que transmitem sinais dos receptores da superfície para dentro da célula. Os danos ligados e não ligados ao DNA, juntamente com as ROS, iniciam uma série de eventos, entre os quais há a ativação de vários mecanismos de transdução que ativam fatores de transcrição, como p-53 e fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). O NF- $\kappa\beta$ é regulador de uma série de moléculas de adesão celular e parece ser importante regulador das alterações endoteliais precedentes da mucosite. Isso leva a superprodução das citocinas pró-inflamatórias, genes da resposta imediata e outros fatores de transcrição, injúria tecidual e morte celular. Todos esses processos ocorrem em todas as células e tecidos que compreendem a mucosa, inclusive fibroblastos, pela ação da proteína ativadora 1 (AP1) que

estimula a secreção de metaloproteinases, como MMP-1 e MMP-3.

Estágio 3: Amplificação de sinal: Aumento das citocinas pro-inflamatórias, produzidas principalmente por macrófagos, causa injúria às células da mucosa e também ativa mecanismos moleculares que amplificam esse dano primário ou podem ativar NF- κ B em outras células, que resulta na transcrição de genes como MAPK, COX-2 e moléculas sinalizadoras da Tirosina-Kinase, levando à ação de metaloproteinases nas células do epitélio e lâmina própria. Nesse estágio, apesar do caos biológico, clinicamente a lesão está quiescente, e os pacientes apresentam apenas alguns sintomas.

Estágio 4: Ulceração e inflamação: o infiltrado inflamatório associado às ulcerações mucosas leva à dor intensa e susceptibilidade à colonização secundária da microflora oral, também aumenta a demanda de citocinas pró-inflamatórias. Células inflamatórias migram por quimiotaxia para a base da lesão, onde produzem enzimas nocivas ao tecido. Em pacientes com neutrofilia, há risco de bacteremia e septicemia.

Estágio 5: Reparação: Sinais da matriz celular e mesênquima da lâmina própria controlam a taxa de migração das células epiteliais, taxa de proliferação e diferenciação do tecido reparado. Proliferação tecidual e diferenciação celular e tecidual restaurando a integridade do epitélio. A reparação normalmente ocorre espontaneamente com o fim da terapia anti-câncer (Sonis, 2004; Treister, Sonis, 2007; Lalla *et al*, 2008).

No modelo atual de mucosite, os dois componentes mais importantes para sua iniciação são a morte das células clonogênicas e produção das ROS pelas células danificadas. A fase de iniciação é um mantenedor, atrasá-la ou pará-la pode prevenir ou minimizar a lesão regime-associada, assim como entender seu controle genético pode predizer o risco de mucosite (Sonis, 2010).

É bem provável que as células normais, tornadas apoptóticas pela quimio ou radioterapia, liberem moléculas endógenas associadas ao modelo de dano (CRAMPs), que podem desempenhar papel na toxicidade inicial. Dentro das células normais essas moléculas participam de funções regulares e, nas células danificadas, são liberadas tendo um grande potencial destrutivo. As CRAMPs, quando liberadas, procuram receptores até encontrarem os de reconhecimento de patógenos (PRRs), expressos por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, e ligar-se a eles. Com essa ligação, o NF- κ B é ativado estimulando as proteínas pró-inflamatórias e aumentando a expressão do mecanismo molecular associado ao dano, chamado DAMP. O DAMP ainda pode ser associado a produtos da parede celular da microbiota da flora local, produzindo o chamado PAMP (Mecanismo molecular associado a patógenos) (Sonis, 2010).

Existem diferentes escalas para classificar o grau de mucosite oral, dentre elas as mais usadas são a escala da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3 (Treister, Sonis, 2007, Lalla *et al*, 2008), mostradas abaixo:

Escala da Organização Mundial de Saúde para mucosites orais:

- Grau 0 – nenhum sinal e sintomas de mucosite oral
- Grau 1 – Eritema e sensibilidade

- Grau 2 – Eritema, úlceras, capaz de alimentação sólida
- Grau 3 – Úlceras e eritema extenso, requer dieta líquida (devido à mucosite)
- Grau 4 – Úlceras, impossibilidade de alimentação via oral (devido à mucosite)

Critérios Tecnológicos Comuns do Instituto Nacional de Câncer para Eventos Adversos (versão 3):

Mucosite Oral (exame clínico):

- Grau 1 - eritema na mucosa
- Grau 2 - ulcerações irregulares e pseudomembrana
- Grau 3 - ulcerações confluentes ou pseudomembranas, sangramentos em traumatismo mínimo
- Grau 4 - tecido necrótico, sangramento espontâneo significativo, conseqüências de risco de vida
- Grau 5 – morte

Mucosite Oral (funcional/sintomático):

- Grau 1 – sintomas mínimos, dieta norma
- Grau 2 - sintomático, todavia pode alimenta-se e dieta modificada de fácil deglutição
- Grau 3 – Sintomático e incapaz para alimentos e hidratações orais
- Grau 4 – Sintomáticos associado com conseqüências de risco de vida
- Grau 5 – Morte

Dentre os tratamentos preconizados para a MO, segundo a MASCC/ISOO (Keefe *et al*, 2007; Lalla *et al*, 2008), estão:

1. Suporte nutricional: dieta pastosa a líquida, com suplementação, e, em casos mais graves, gastrostomia, dependendo do centro de tratamento.

2. Controle da dor: solução salina, pastilhas de gelo, bochechos com soluções anestésicas, assim como anestésicos tópicos de alívio transitório, agentes bioaderentes como o sucralfato e analgésicos opióides como a morfina. A MASCC/ISOO não recomenda o uso do sucralfato devido ausência de evidências de eficácia.

3. Descontaminação bucal: boa higiene bucal com dentifrício, escova e fio dental, além de colutórios não medicamentosos, como solução salina e bicarbonato de sódio, além de educação do paciente e família quanto à importância da higiene bucal.

4. Manejo da sensação de boca seca: pequena quantidade de água, saliva artificial, goma de mascar sem açúcar, agentes colinérgicos.

5. Manejo de sangramento: agentes hemostáticos tópicos como esponja ou cola de fibrina, ou, em caso de pacientes com menos de 20.000 plaquetas, transfusão de sangue.

6. Intervenções terapêuticas: crioterapia, fatores de crescimento, agentes antiinflamatórios, antioxidantes, terapia com laser de baixa potência.

2.2 Membrana Amniótica

A membrana amniótica (MA) é a camada mais íntima da placenta, com uma estrutura complexa, essencialmente composta por fino

epitélio com uma delicada membrana basal e um estroma avascular, ambos contendo diversos fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias metabolicamente ativas. Dois tipos celulares, de diferentes origens embriológicas, estão presentes na MA: células epiteliais amnióticas derivadas da ectoderme e células mesenquimais amnióticas derivadas da mesoderme (Alviano *et al*, 2007; Dua *et al*, 2010).

O fator de crescimento transformador- β (TGF- β), e o fator de crescimento epidermal (EGF) são os mais importantes fatores de crescimento. Porém também já foram estudados o fator de crescimento de queratinócitos, fator de crescimento hepático e fator de crescimento de fibroblasto (Chang *et al.*, 2002; Gomes, 2007, Dua *et al*, 2010). Citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), IL-10, IL-8 e IL-1ra, metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases, entre outros, também são descritos (Dua *et al*, 2010).

Seu mecanismo de ação não é precisamente conhecido, mas a maior parte de seus efeitos benéficos pode ser atribuída ao seu papel como substrato de suporte para crescimento, migração e adesão celular (Dua *et al*, 2010).

Desde o início do século XIX, o uso da membrana amniótica (MA) como curativo biológico tem sido discutido por vários autores. Diferentes tipos de tecido foram testados como curativo biológico e todos revelaram excelente aceitação, comprovadas por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica. Estudos experimentais e clínicos demonstram que o transplante da membrana amniótica promove re-epitelização, diminui a inflamação e fibrose, modula a angiogênese, previne escaras e também apresenta benefícios à córnea, sendo amplamente usada na oftalmologia (Egan *et al.*, 1983; Boc *et al.*, 1985; Ferreira *et al.*, 1986; Alviano *et al*, 2007; Dua *et al*, 2010).

Entre esses estudos podemos citar a utilização da MA, como: Reconstrução de bexiga urinária (Norris *et al.*, 1982; Fishman *et al.*, 1987), substrato para regeneração de axônios no sistema nervoso central

(Gage *et al.*, 1988), reparo na formação de aderência intra-abdominal (Badawy *et al.*, 1989), reparação de feridas cirúrgicas em mucosa oral sublingual em coelhos (Onerci, 1991), em reparo de alvéolos dentários cruentos (Gomes *et al.*, 1996), na reparação óssea e técnica de regeneração óssea guiada (Gomes *et al.*, 2001a), utilizada sobre feridas cruentas em áreas de biópsias incisional e excisional (Gomes *et al.*, 2001b) e na reparação de lesão hepática (Gomes *et al.*, 2007). Todos os autores citados afirmaram que, em quaisquer dos tecidos utilizados, não foram evidenciados sinais de rejeição e os resultados obtidos foram satisfatórios.

Koizumi *et al.* (2000) investigaram a expressão do RNA mensageiro, fator de crescimento e o nível de proteínas do fator de crescimento em membrana amniótica humana preservada. O PCR-RT revelou que a membrana amniótica humana expressa o mRNA para codificar o EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2, - β 3, KGFR e HGFR, enquanto que o teste ELISA mostrou que a membrana amniótica humana contém EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2. A MA sem epitélio também contém todos os sete fatores de crescimento examinados, porém, os níveis de proteínas de EGF, KGF, HGF e bFGF encontrados foram significativamente mais baixos do que membrana amniótica com epitélio. Os autores concluíram que a membrana amniótica humana contém vários fatores de crescimento que poderiam beneficiar a epitelização de feridas.

Através de estudo *in vitro*, Alviano *et al.* (2007) observaram diferenciação condrogênica, osteogênica, adipogênica e miogênica das células mesenquimais da membrana amniótica. Os autores puderam concluir que o potencial de expansão e diferenciação dessas células sugere que elas podem ser um importante meio de células pluripotentes disponíveis para futuros avanços na terapia celular. inclusive substituindo as mesenquimais da medula óssea como de eleição.

2.3 Laser de Baixa Potência

O mecanismo por trás das interações do laser com os tecidos biológicos é apenas parcialmente entendido, mas é descrito como um fenômeno fotobiológico no qual fotorreceptor primário (cromóforo), como citocromo C, peroxidase, flavinas e porfirinas, absorvem ondas luminosas e transformam a luz laser em energia útil para a célula. Um efeito cascata no mecanismo respiratório tecidual, resulta na produção de energia para os processos celulares metabólicos (Abramoff *et al.*, 2008).

A laserterapia de baixa potência (LTBP) consiste na aplicação de luz em energia suficientemente baixa para que a temperatura tecidual se eleve menos de 0,1°C. Lasers de Hélio-neon ou lasers diodo (por ex: gálio-alumínio-arseneto), são frequentemente usados.

Na literatura são encontradas doses de energia aplicadas na mucosite entre 1.8 e 10 J/cm², normalmente. (Yasukawa *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2009; Schartinger *et al.*, 2011). Embora, Lima *et al.* (2010), tenham obtido bons resultados usando a densidade de energia de 12 J/cm².

Lopes *et al.* (2010) investigaram a resposta tecidual à laserterapia de baixa potência (LTBP) em modelo animal de mucosite oral induzida por quimioterapia, usando comprimento de onda de 660nm e potência de 35 e 100 mW. Os autores observaram que a severidade da mucosite foi menor no grupo que recebeu 35 mW do que no que recebeu 100 mW, clinicamente, no decorrer do período estudado. Histologicamente, a LTBP levou à redução no infiltrado neutrofílico, suportando a hipótese de efeito antiinflamatório e, no grupo 35 mW, o tratamento com laser resultou em aumento na organização do colágeno e reparo da mucosite.

Estudo *in vitro* realizado com células de origem brônquica (simulando células da orofaringe), fibroblastos e células da linhagem de

carcinoma escamoso oral usando laser diodo AsGaAl (660 nm) mostrou que LTBP induziu aumento significativo na proliferação fibroblástica e aumento na fase S paralelamente com decréscimo na fase G1, não significativo, dos mesmos. As células epiteliais apresentaram decréscimo, não estatisticamente significativo, na proliferação após a aplicação da terapia com laser (Schartinger *et al.*, 2011).

Os efeitos terapêuticos do laser sobre os diferentes tecidos biológicos, *in vivo* e *in vitro*, têm sido demonstrados por vários autores, destacando-se as ações trófico-regenerativas, antiinflamatórias e analgésicas, promoção de alívio da dor e aumento da proliferação e mobilidade das células epiteliais, além de aumento significativo na produção e atividade fibroblástica, acelerando a produção de colágeno. (Abramoff *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010; Yasukawa *et al.*, 2010; Schartinger *et al.*, 2011), inclusive com aumento da resistência a ruptura da ferida (Yasukawa *et al.*, 2007).

Inclusive na prevenção da MO, a LTBP tem demonstrado bons resultados, (França *et al.*, 2009).

De acordo com Sandoval *et al.* (2003) e Simões *et al.* (2009), a irradiação do laser de GaAs (Arseneto de Galio) na MO acelera o processo de reparação tecidual, melhorando a qualidade de vida dos pacientes durante todo período de tratamento oncológico preconizado.

Além do mais, a terapia é não invasiva e não causa efeitos colaterais, sendo indicada pela MASCC/ISOO na prevenção de mucosite em pacientes pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (Keefe *et al.*, 2007; Abramoff *et al.*, 2008; Lalla *et al.*, 2008).

O uso do laser de InGaAlP (Indium-Gallium-Aluminium-Phosphide), no tratamento preventivo e curativo MO radioinduzida, tem promovido resultados significativos. Na diminuição na severidade da mucosite, tem se mostrado mais efetiva que a crioterapia, bem como tem auxiliado na diminuição da incidência de xerostomia e dor (Lopes *et al.*, 2006, França *et al.*, 2009).

Simões *et al.* (2009), observaram que a LTBP é eficaz em reduzir a severidade de mucosite em pacientes com mucosite grau III ou IV, e em mantê-la, em pacientes com grau I e II. Os mesmos ainda afirmam que a LTBP três vezes por semana, independente do protocolo aplicado, atingem os efeitos desejados (como manutenção dos scores de mucosite e dor).

Abramoff *et al.* (2008), estudaram a terapia com laser Arseneto de gálio-alumínio – 685 nm, 35 mW, 2J por ponto de aplicação, num total de aproximadamente 72 J/cm^2 , com tempo de exposição de 54 segundos por ponto – na prevenção e tratamento da MO de pacientes jovens sob altas doses de quimioterapia. Os pacientes foram divididos em três grupos: terapia placebo, laser profilático e laser placebo. Foram feitas três avaliações, em diferentes períodos, quanto a severidade da MO, sintomatologia dolorosa, esofagite e de granulócitos no sangue. A LTBP na proposta profilática mostrou os resultados mais satisfatórios. Na aplicação terapêutica, todos os pacientes notaram alívio da dor- efeito mais notável- e não houve piora no quadro da mucosite, mesmo com níveis de granulócitos abaixo de $2000/\text{mm}^2$. Os autores concluíram que a LTBP tem papel tanto preventivo quanto terapêutico na mucosite oral.

Histologicamente, França *et al.* (2009), encontraram danos menos severos, com maior organização do tecido de granulação, paralelismo das fibras de colágeno e aumento na angiogênese em mucosites induzidas por quimioterapia com 5-FU.

No entanto, existe dificuldade em demonstrar os efeitos benéficos da LTBP nos pacientes oncológicos com mucosite oral, devido à variedade nos tipos de doença e protocolos de radioterapia e quimioterapia, além de escassez de um sistema de classificação eficiente para severidade da MO (Abramoff *et al.*, 2008).

Diante disso, propusemo-nos realizar um estudo comparativo dos efeitos da membrana amniótica e da ação da radiação laser de baixa potência Arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) no processo

de reparação tecidual em mucosite oral de ratos submetidos à quimioterapia com o 5-fluoruracila.

2.4 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

O antígeno nuclear de proliferação celular (Proliferating Cell Nuclear Antigen - PCNA) é uma proteína nuclear de 36kd, associada à atividade proliferativa e sintetizada durante a interfase e que desaparece no final da mitose. Esta proteína é um auxiliar da DNA-polimerase-delta, a qual atua na replicação e também no reparo de moléculas de DNA lesadas por meio da excisão de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína P21, a ciclina D e a CDK (quinase dependente de ciclina). Durante o ciclo celular, a expressão imunohistoquímica do PCNA aparece reduzida nas fases G1, G2 e M e aumentada na fase S10. Geralmente, a demonstração da imunorreatividade do PCNA permite verificar a verdadeira fração proliferativa da célula estudada (Bravo, 1987; Bravo, Macdonald-Bravo, 1987; Birchall *et al.*, 1997; Sittel *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000).

O PCNA tem sido utilizado em pesquisas básicas e como ferramenta prognóstica em patologias cirúrgicas. Contudo, o valor da detecção de células proliferadas com o este anticorpo tem sido constantemente questionado devido aos níveis de variação de PCNA em diferentes tipos de células e entre células malignas e normais, além das soluções fixadoras e antígenos usados. Este também pode estar envolvido em reparo de DNA, sugerindo a sua expressão em células que não estão no ciclo de divisão. Em adição, o PCNA tem uma longa meia vida, causando a sua expressão contínua em algumas células que não estão dividindo ativamente e células imunorreativas contendo uma população nucleoplásmica de PCNA, o que não está diretamente associado com os sítios de replicação do DNA (Muskhelishvili *et al.*, 2003).

2.5 Fator de crescimento vâsculo-endotelial (VEGF)

O fator de crescimento de vasos endoteliais é um importante sinalizador de proteína envolvido na vasculogênese (formaao do sistema circulatório embrionário) e angiogenese (crescimento de vasos sangueos originados de vascularizaoes pré-existentes), sendo mediados por dois receptores tirosina quinase, Flt-1 (VEGFr-1) and KDR (VEGFR-2). A atividade do VEGF é restrita principalmente para as células do endotélio vascular, embora tenha efeitos no número limitado de outros tipos de células (exemplo estimulaao de monócitos/migraao de macrófagos). In vitro, o VEGF tem mostrado o processo de estimulaao da mitogenese de células endoteliais e migraao celular, bem como identificado o aumento da permeabilidade microvascular, sendo, por vezes, referido como um fator de permeabilidade vascular (Ferrara, Gerber, 2002).

É um sinal químico produzido pelas células que estimulam o crescimento de novos vasos sangueos (Ribatti, 2005). É parte do sistema que restaura o suprimento de oxigenio aos tecidos, quando a circulaao de sangue é insuficiente. Eles são importantes sinalizadores de proteínas envolvidas em vasculogênese e angiogenese (Patan, 2004).

Todos os membros da família VEGF estimulam as respostas celulares, mediante ligaao de receptores tirosina quinase (VEGFRs) na superfície das células, tornando-se ativados através da transfosforilaao (Matsumoto, Mugishima, 2006).

A produao de VEGF pode ser induzida em células que não estão recebendo oxigenio suficiente. Quando uma célula é deficiente em oxigenio, produz HIF, fator induzível por hipóxia, um fator de

transcrição. HIF estimula a liberação de VEGF entre outras funções (Loureiro; D`Amore, 2005).

2.6 Linfócito T CD4 e CD8

As células T apresentam três fases de desenvolvimento que ocorrem separadamente. O timo é colonizado pelas células T (1ª fase), as quais se dividem duas linhagens $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (2ª fase). Em seguida, ocorre a diferenciação das células das referidas linhagens (3ª fase). As células de linhagem $\alpha\beta$ diferenciam-se em células T imaturos (timócitos) que não expressam receptores para antígenos ou marcadores de superfície, incluindo CD4 e CD8 (Carpenter, Bosselut, 2010; Lee *et al.*, 2011).

A região medular do timo contém a maioria das células T maduras. Os linfócitos CD4 e CD8 são responsáveis pelas funções helper (ajuda) e citolítica (lise celular), respectivamente. As células T (CD4) são essenciais na resposta imune contra ação de patógenos, uma vez que atuam diretamente no recrutamento de células inflamatórias mononucleares, principalmente células T (CD8) (Carpenter, Bosselut, 2010; Lee *et al.*, 2011).

3 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente trabalho foi realizar um estudo para avaliar os efeitos da membrana amniótica e da ação da radiação laser de baixa potência Arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) no processo de reparação tecidual em mucosite oral de ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluoruracila.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos e aprovado de acordo com protocolo N° 034/2007-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Para o presente trabalho, foram utilizados 100 ratos jovens machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), de 90 a 100 dias de idade ao início das experiências, os quais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: 1) **grupo controle** (simulação da mucosite oral com lesão induzida por ácido acético a 50% na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, n=20), 2) **grupo 5-FU** (mucosite oral induzida pela 5-fluoruracila + ácido acético a 50%, n=20) , 3) **grupo 5-FU+laser** (mucosite oral induzida pela 5-fluoruracila + ácido acético a 50% na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores + radiação laser, n=20), 4) **grupo 5-FU+MAH** (mucosite oral induzida por 5-fluoruracila + ácido acético a 50%, tratado com membrana amniótica homogênea, n=20); 5) **grupo 5-FU+MAH+Laser** (mucosite oral induzida por 5-fluoruracila + ácido acético a 50%, tratado com membrana amniótica homogênea e irradiado com laser, n=20).

Além dos animais machos, foram utilizadas 15 ratas prenhes (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com idade de 90 e 100 dias, com 21 dias de gestação, para obtenção da MAH.

Estes animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP.

Antes dos procedimentos clínicos, os animais foram tratados com dose única de vermífugo polivalente (Zentel, São Paulo, Brasil) e com polivitamínico (Vita Gold potenciado, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo, Brasil), na proporção de 40 gotas /litro de solução durante 15 dias

4.2 Materiais

4.2.1 Laser

Foi utilizado o laser de baixa intensidade do tipo Laser diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl) (TWIN Laser, marca MM Optics), com potência de $20\text{mW}/\text{cm}^2$ e comprimento de onda de 660 nm e dosagem de $5\text{J}/\text{cm}^2$, por 10 segundos, em dias intercalados, até o sacrifício.

4.2.2 Drogas

5- FLUORURACILA (5-FU) – (Fauldfluor® 2,5g/50mL, LIBBS Farmacêutica Ltda. São Paulo-SP) doado pelo IOV (Instituto de oncologia do Vale), administrado em três doses de 30mg/kg/dia, por via intramuscular, para a indução de mucosite oral; CLORIDRATO DE KETAMINA - (DOPALEN®, Agribands do Brasil Indústria e comércio Ltda., São Paulo, Brasil) anestésico de uso veterinário, na dose de

5mg/kg; CLORIDRATO DE 2-(2,6-XILIDINO) – 5,6-DIHIDRO-4H-1,3-TIAZINA (ROMPUM®, Bayer S.A.-Saúde Animal, São Paulo, Brasil) sedativo, analgésico e relaxante muscular, na dose de 10mg/kg.

4.3 Método

4.3.1 Acasalamento dos animais e esfregaço vaginal

Ratas férteis foram acasaladas no período noturno e, pela manhã, realizou-se o esfregaço vaginal com o auxílio de uma alça de platina para a remoção do muco retido nas paredes da mucosa. Em seguida, o referido material foi espalhado sobre uma lâmina histológica para posterior análise microscópica. Após diagnóstico de prenhes positivas com a presença de espermatozóide na lâmina histológica, as ratas foram separadas e mantidas em gaiolas durante 21 dias, quando foram submetidas à cesariana para obtenção das membranas amnióticas (Figura 1).

4.3.2 Obtenção e preparação da MAH

Aos 21 dias da gestação, as ratas foram submetidas à cirurgia de cesariana, sendo anestesiadas com cloridrato de ketamina associada ao cloridrato de 2-(2,6-xilidino) – 5,6-dihidro-4h-1,3-tiazina, na proporção 1:2, respectivamente. Em seguida, as ratas foram colocadas em decúbito dorsal e fixadas pelas patas. Realizou-se incisão abdominal na linha mediana, de 3-4 cm, próximo ao apêndice xifóide. Por

compressão do abdômen houve exposição dos córneos uterinos. Os fetos serão retirados para obtenção das membranas fetais, compostas por membrana amniótica e coriônica. Após a remoção da placenta da rata, a membrana amniótica fetal foi assepticamente separada do cório e submetida a várias lavagens com soro fisiológico estéril e tampão fosfato pH 7,4. Para armazenagem do material biológico, a MAH foi imersa em solução de Ringer com lactato de sódio (EquiPLEX, Goiânia, Brasil), contendo o estabilizador de pH 10mM HEPES (2,38g/L) e os antibióticos 2ml de penicilina 10.000-UI/mL/estreptomicina-10mg/mL (CULTLAB, Materiais de Cultura de Células Ltda, Campinas, São Paulo) e estocada no nitrogênio líquido (Container de Nitrogênio Líquido, modelo Locator JR Plus, marca Fischer USA) até a sua utilização. No momento da aplicação do curativo biológico, a MAH foi incorporada na fórmula farmacêutica de orobase (Figura 2).

4.3.3 Indução da mucosite oral

A mucosite oral foi induzida por tratamento crônico de 5-fluoruracila (Fauldfluor® 2,5g/50mL, LIBBS Farmacêutica Ltda, fornecida pelo IOV- Instituto de Oncologia do Vale) que foi administrada em três doses intercaladas (30mg/kg/dia), por via intramuscular. Após o aparecimento da lesão, utilizou-se um filtro de 9 mm² embebido com ácido acético (C₂H₃COOH) a 50% (10µl), pressionado na região do fórnice vestibular dos incisivos inferiores por 60 segundos, de acordo com a técnica preconizada por Fujisawa et al. (2003). O objetivo desse procedimento foi delimitar a região a ser tratada e estudada (Figura 3)

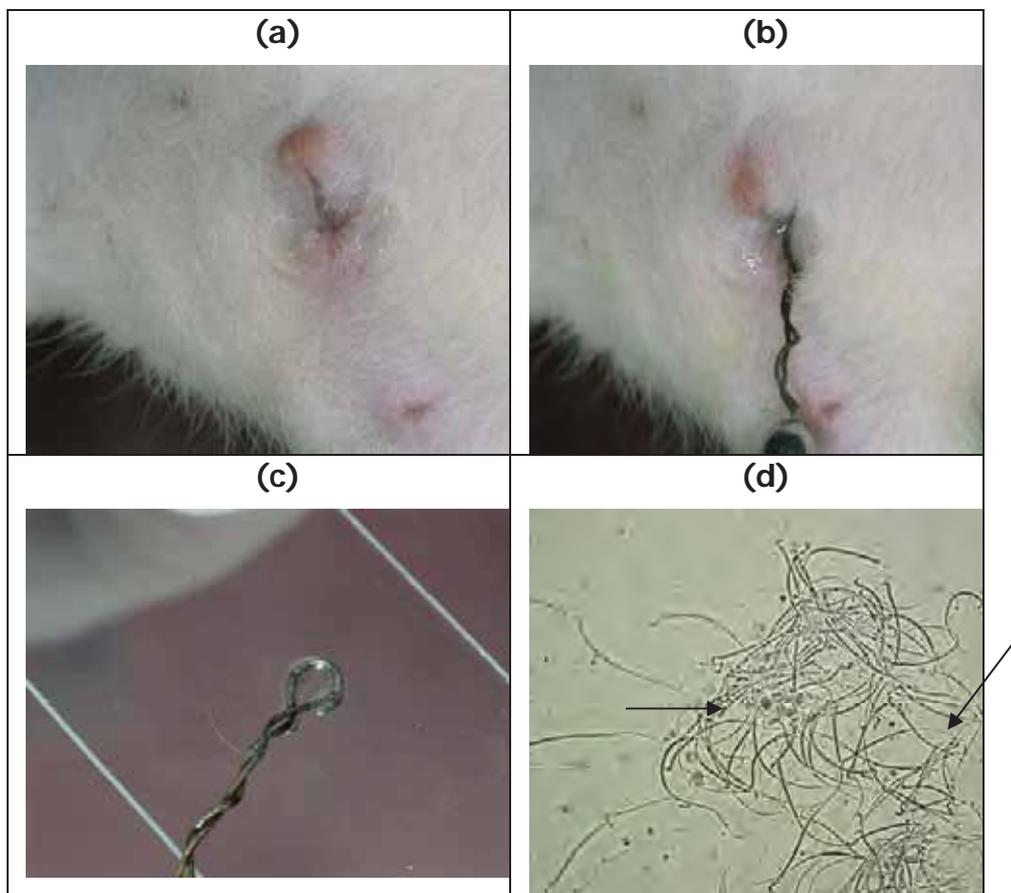


Figura 1 – Esfregaço vaginal para confirmação de acasalamento das ratas. (a) Região vaginal da rata; (b) Realização da coleta de material com alça de platina; (c) Esfregaço em lâmina do material coletado; (d) Visualização de células sexuais masculinas em microscopia óptica, confirmando o acasalamento.

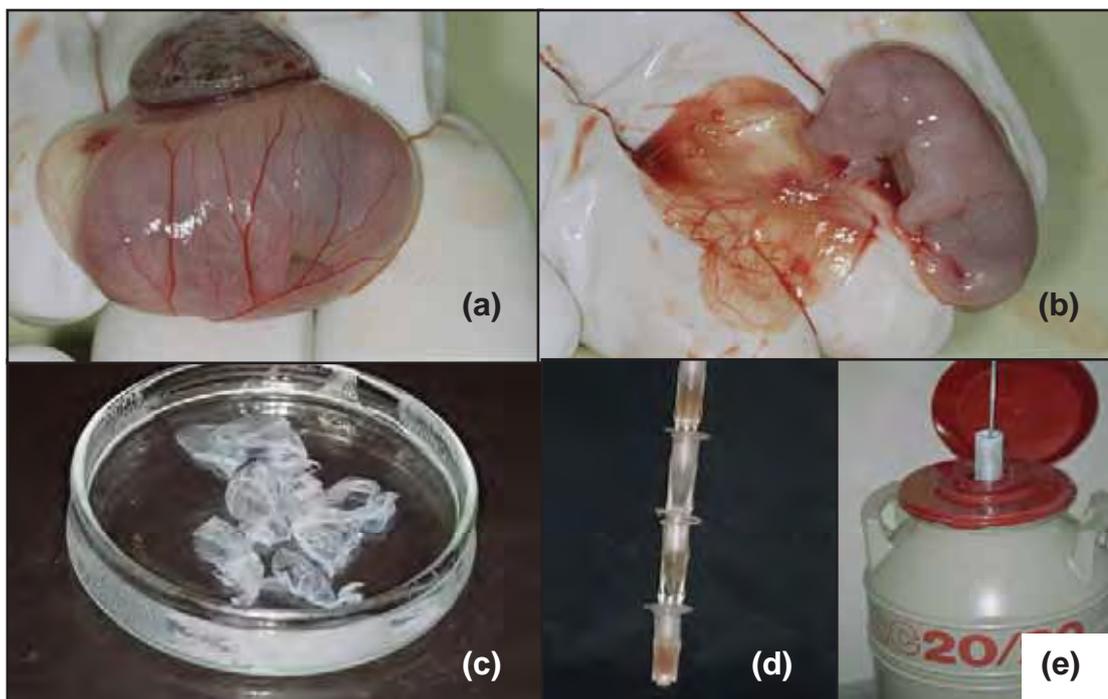


Figura 2 – Obtenção, limpeza e armazenamento da Membrana Amniótica Homógena (MAH). (a) Filhote da rata no saco amniótico; (b) Rompimento do saco amniótico para separação da membrana amniótica; (c) Membranas amnióticas limpas em solução fisiológica e tampão fosfato; (d) Estocagem das membranas em eppendorfs com solução antibiótica; (e) Container de nitrogênio líquido para armazenagem das membranas.

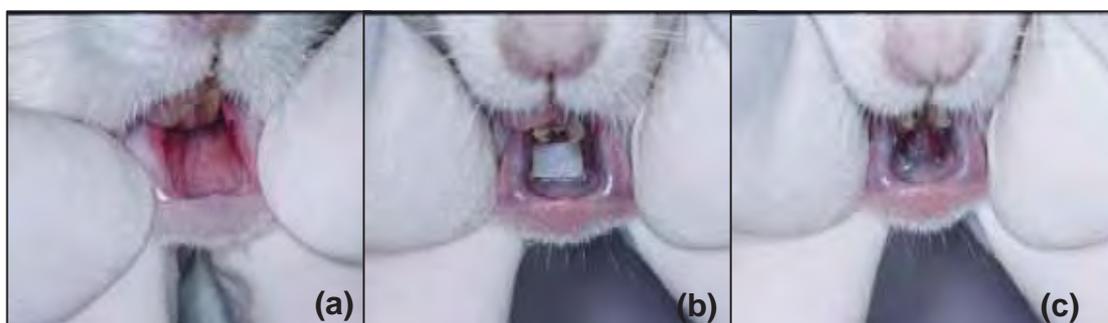


Figura 3 - Indução da mucosite oral com papel filtro embebido em ácido acético 50%. (a) Área de fôrnice vestibular iritada sem úlcera; (b) Colocação de filtro de papel de 3 cm² embebido em ácido acético; (c) Fôrnice vestibular ulcerado.

4.3.4 Aplicação da MAH na mucosite oral

No início dos sinais da mucosite oral, os ratos foram anestesiados com ketamina (5 mg/kg) associada a Xilazina (10 mg/kg). Em seguida, a MAH, misturada a uma base emoliente (orobase), foi aplicada na região da mucosite oral (fórnice vestibular dos incisivos inferiores), com o auxílio de uma cureta metálica estéril. Imediatamente após, as bordas do lábio inferior eram suturadas com fio de sutura absorvível (Vycril 6.0, Ethicon, Johnson & Johnson). Esta técnica empregada permitiu a permanência do curativo biológico no local (Figura 4).

4.3.5 Irradiação do laser

Na região da mucosite oral induzida, os grupos **5-FU+laser** e **5-FU+MAH+Laser** foram irradiados com laser diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio-GaAlAs (TWIN Laser, marca MM Optics), no comprimento de onda de 660nm, com potência de 20 mW durante 10 segundos. Desta forma, a região da lesão recebeu uma densidade de energia de $5\text{J}/\text{cm}^2$. Os ratos foram submetidos à radiação por um tempo de 10 segundos, em dias intercalares, até o sacrifício. (Figura 5)

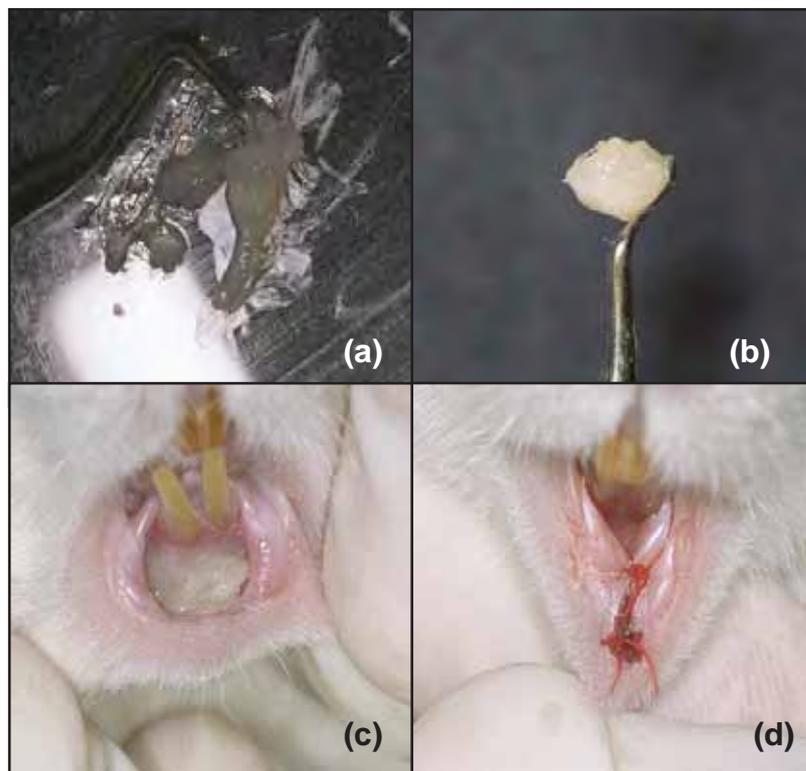


Figura 4 – Mistura da MAH com orobase (a)(b); e colocação da MAH na região da mucosite (c). Sutura da região marginal à MAH (d).

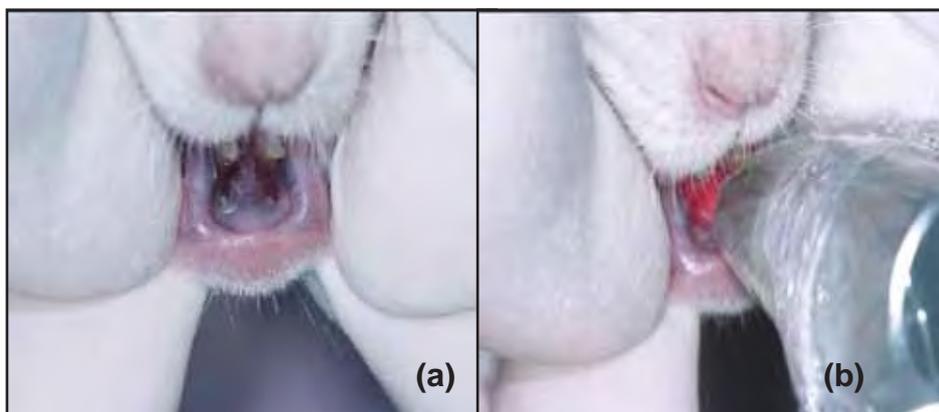


Figura 5- Área de mucosite (a). Aplicação do laser na região da mucosite (b).

4.3.6 Períodos de observação e análise microscópica

Decorridos 3, 7, 14 e 21 dias, cinco animais de cada grupo foram anestesiados e posteriormente sacrificados. As peças contendo a região da mucosite oral foram removidas em bloco, fixadas em paraformaldeído a 4% (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA) por 48 horas, bem como processadas e incluídas em Paraplast. Imediatamente após este procedimento, foram realizados cortes histológicos semi-seriados com 5 μ m de espessura. As lâminas foram, então, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por meio de microscopia de luz.

4.3.7 Análise histomorfológica e histomorfométrica

4.3.7.1 Análise histomorfológica

Analisamos as lâminas coradas com hematoxilina e Eosina de forma descritiva. As características histológicas da mucosa oral com lesão, reação tecidual frente aos efeitos da membrana amniótica sobre a ferida cruenta e à radiação de laser, intensidade das reações inflamatórias (presença e disposição dos linfócitos, neutrófilos,

macrófagos, células gigantes multinucleares, plasmócitos e outras), alterações epiteliais, conjuntivo e muscular em diferentes fases do processo de reparação foram observadas e descritas.

4.3.7.2 Análise histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi realizada contagem das células imunomarcadas pelos anticorpos PCNA, VEGF, CD4 e CD8, em uma área de aproximadamente 2,41 mm².

Os fragmentos de mucosa foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados de 3 µm de espessura, obtendo-se três lâminas com aproximadamente quatro cortes histológicos, para cada anticorpo usado, com aproximadamente seis cortes histológicos cada, para cada rato estudado. Dentre essas lâminas, um corte de cada lâmina foi separado aleatoriamente para análise histomorfométrica. Imediatamente após, os campos histológicos de cada corte da área da mucosite oral foi encontrado, em aumento de 100X, e, na camada média da lâmina própria, em aumento de 630X, foi realizada a contagem das células imunomarcadas em quatro campos aleatórios da área analisada usando o programa Axiovision 4.7 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha). Para o procedimento de mensuração, foram utilizadas a objetiva 63x/0,80 (ACHROPLAN, Carl Zeiss) e a ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss,

Alemanha). As imagens foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha).

4.3.8 Análise Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram obtidos com 3 µm de espessura e coletados em lâminas previamente preparadas com organossilano (3-aminopropyltriethoxy-silano). Para a imunohistoquímica, propriamente dita, utilizou-se o método indireto com sistema de amplificação (Peroxidase, Biotina e Estreptavidina), que é extremamente sensível, podendo ser utilizadas concentrações muito baixas do anticorpo primário. Previamente, os cortes foram desparafinizados em bandeja aquecedora a 60 ° C por 30 min e, em seguida com xilol, 20 min, a temperatura ambiente, hidratados com álcool absoluto, 90%, 80%, 70% e água destilada, 5min cada. O protocolo de imunohistoquímica seguido para os anticorpos usados segue no anexo B.

As lâminas foram incubadas nos anticorpos primários:

- a) Anticorpo “anti-rato CD4”:: Código: C2255-71, USBiological, Swampscott, Massachusetts, USA;
- b) Anticorpo “anti-rato CD8”: Código: C2259-36, USBiological, Swampscott, Massachusetts, USA;
- c) Anticorpo “anti-rato PCNA”: código: M0879, Dako Cytomatiom Norden A/S, Núcleo Trade Cooperation, Dinamarca;

d) Anticorpo VEGF: código: SC-7269, Santa Cruz Biotechnology, ALAB´S SUPPLY INC, California, USA;

4.4 Análise Estatística

Os resultados da histomorfometria serão submetidos à análise de variância (One Way-ANOVA) e ao teste de Tukey (GraphPad Prisma 5, GraphPad Software, San Diego, California, USA). O nível de significância adotada foi de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram divididos em duas partes, sendo a primeira descritiva, para a coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e a segunda estatística, para imunohistoquímica, conforme descrito nos materiais e métodos.

5.1 Análise Descritiva

Aspecto microscópico do processo de reparação da mucosite oral através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

5.1.1 Mucosa Normal

Na análise microscópica de um corte sagital mediano de lábio inferior de rato normal na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, observa-se três planos histológicos, compostos por mucosa bucal (epitélio e lâmina própria), camada muscular desenvolvida e pele. A mucosa bucal é revestida por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado exibindo discretas ondulações da camada da córnea e composto por 5 a 6 camadas celulares. As suas cristas epiteliais são curtas e espessas. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo, numerosos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre e numerosos feixes de fibras nervosas. A camada muscular é composta por feixes de fibras musculares esqueléticas, permeada por finos feixes de fibras nervosas. Os feixes musculares estão cortados transversalmente na face voltada para a mucosa e longitudinalmente na face voltada para a pele. A pele é delgada e composta de uma camada fina de epiderme e derme. A

epiderme é composta por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado e as projeções interpilares estão bem representadas. A derme é pouco desenvolvida e apresenta numerosos folículos pilosos, glândulas sebáceas e escassas glândulas sudoríparas. Notam-se ausência de camada submucosa e camada hipoderme (Figura 6).

5.1.2 Aspecto microscópico da Mucosite Oral

Os achados histológicos mais freqüentes observados nos espécimes foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento. Na descrição dos achados microscópicos, procurou-se ressaltar as diferenças entre os grupos controle (mucosite oral com lesão induzida por ácido acético a 50% na região do fórnice vestibular de incisivos superiores) e 5-FU (mucosite oral induzida pela 5-Fluorouracil + ácido acético a 50%).

5.1.2.1 Período 3 dias

No grupo controle, a região da mucosite oral estava parcialmente recoberta por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com degeneração hidrópica, espongirose e exocitose, e por pseudomembrana serofibrinosa e fibrinopurulenta exibindo tecido necrótico, fibrina e colônias bacterianas. A lâmina própria, constituída por tecido conjuntivo fibroso, mostrava intenso e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares, porém respeitando os planos da camada muscular e da pele. Células polimorfonucleares, associadas aos microorganismos, estavam predominantemente limitadas à superficial do

espécime. Além disso, verificávamos a presença de células inflamatórias nas áreas adjacentes do tecido muscular. Edema e numerosos vasos sangüíneos congestos eram também evidenciados. Nos planos mais profundos, notávamos difuso e moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares permeando os feixes de fibras musculares e preservação dos anexos da pele, tais como: folículo piloso e glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 7A).

No grupo 5-FU, observávamos que a região da mucosite oral estava totalmente recoberta por uma pseudomembrana fibrinopurulenta, composta por tecido necrótico, fibrina, células inflamatórias poli e mononucleares associada aos focos de colônias bacterianas. A lâmina própria exibia intenso e difuso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares, localizada principalmente nas áreas de ulceração, e mononucleares, com predominância de linfócitos, nos planos mais profundos.

Esse processo inflamatório mostrava-se mais exacerbado neste grupo do que no grupo controle. Verificávamos a presença de discretas áreas amorfas e hialinas, caracterizando o processo de necrose de coagulação, bem como intenso edema generalizado e numerosos vasos sangüíneos congestos de pequeno e médio calibre. Os feixes de fibras nervosas, localizados na porção central da lâmina própria, estavam em degeneração e em pouco número quando comparado com o grupo controle. Os feixes de fibras musculares, tanto nos cortes transversais quanto longitudinais, estavam comprometidos devido ao severo processo inflamatório. Em algumas regiões, observávamos a presença de atrofia dos lóbulos de feixes musculares e o comprometimento do seu sistema neuro-vascular. A área de transição entre a lâmina própria e a camada muscular mostrava-se mais desorganizada quando comparada com grupo controle. A camada da pele encontrava-se preservada sem sinais expressivos de reação inflamatória (Figura 7B).

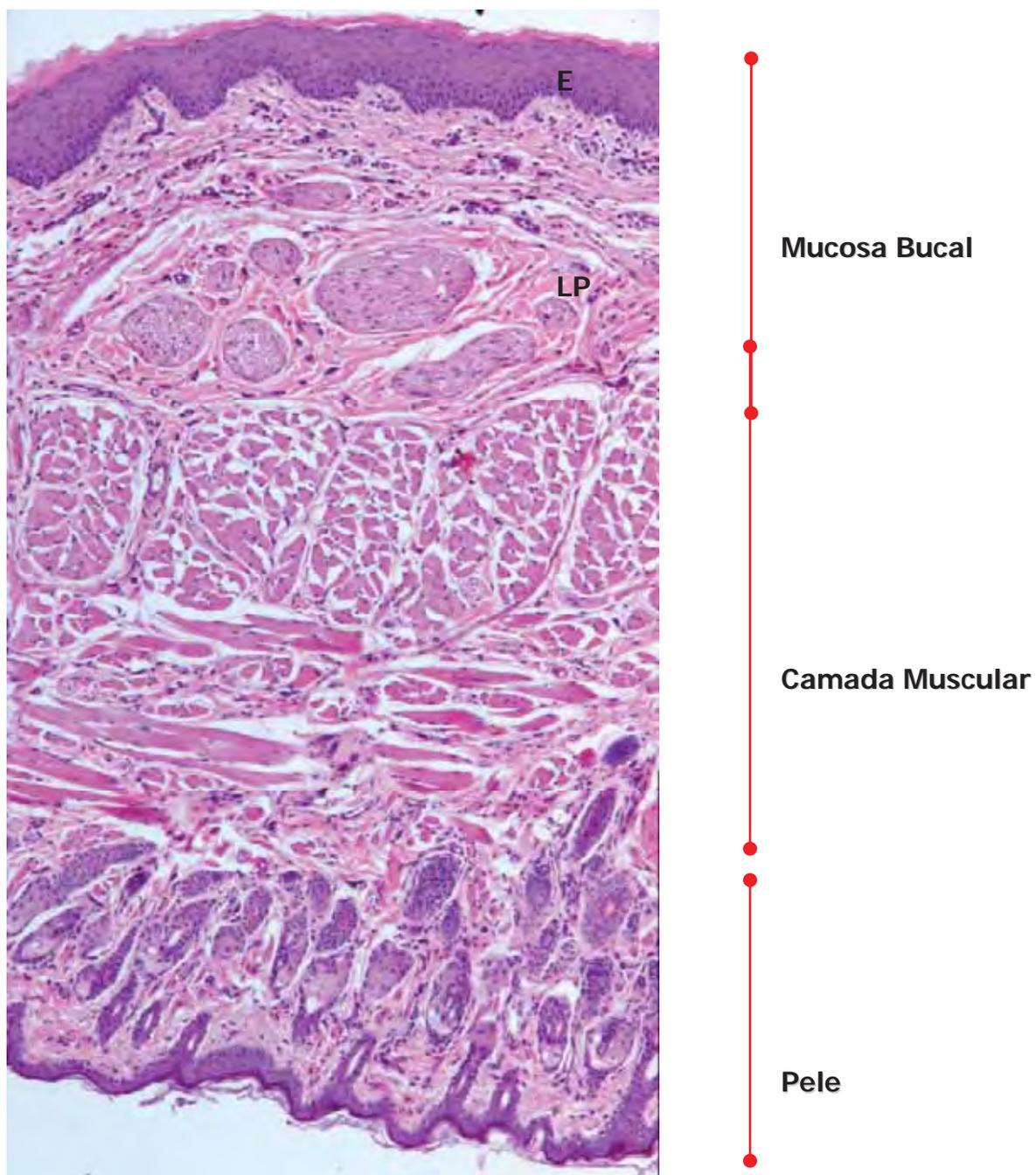


Figura 6 - Corte sagital mediano de lábio inferior de rato normal. Presença de três planos histológicos, compostos por mucosa bucal (epitélio e lâmina própria), camada muscular desenvolvida e pele.

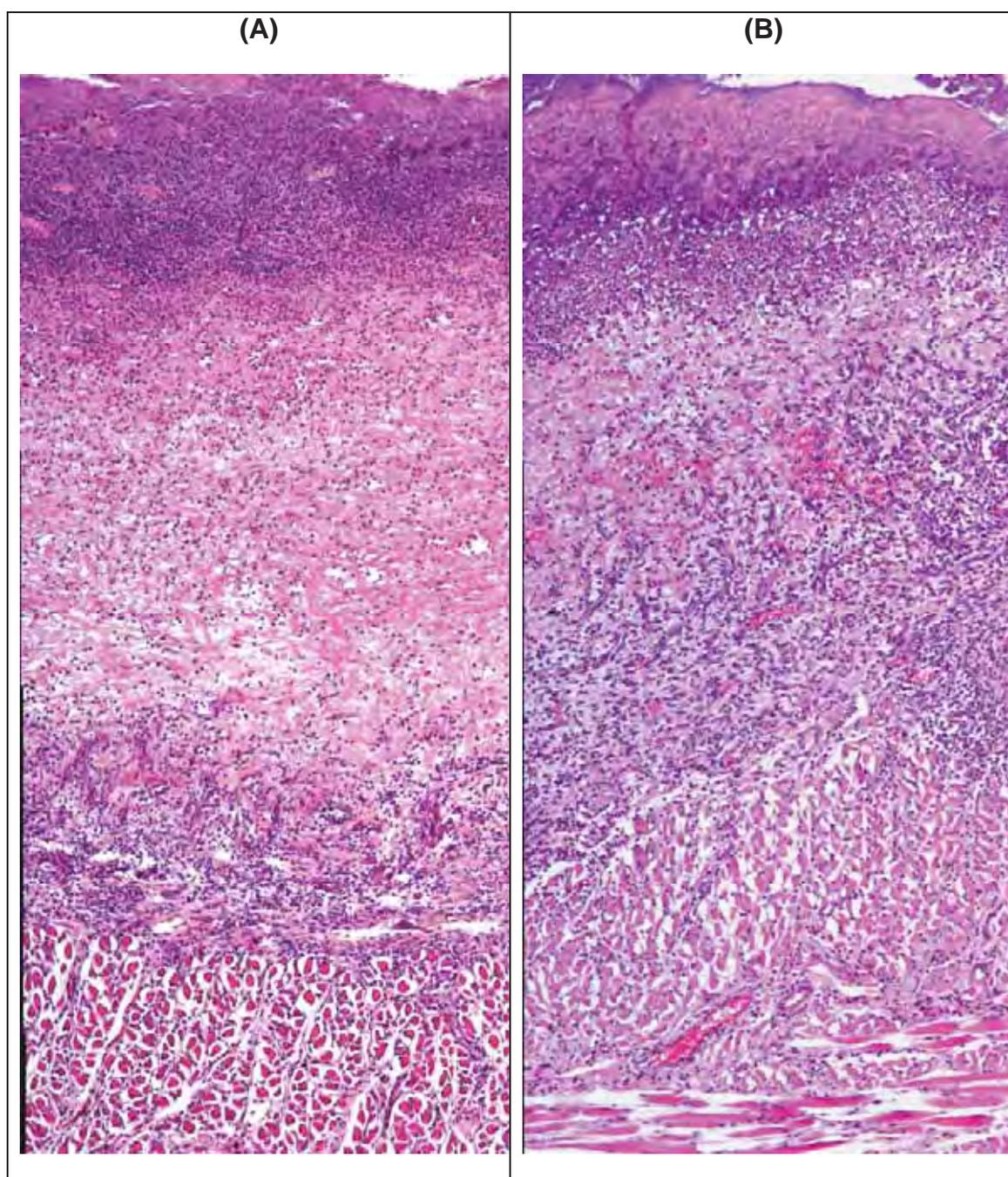


Figura 7 – 3 dias. Fotomicrografia do corte sagital mediano de lábio inferior na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, exibindo os planos da mucosa bucal (epitélio e lâmina própria) e camada muscular dos grupos controle (A) e 5-FU (B), aumento original: 50x. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

No grupo 5FU-LASER, verificávamos fragmentos de mucosa recoberta por uma pseudomembrana serofibrinosa, caracterizando a coloração esbranquiçada da mucosa, associada à intensa quantidade de colônias microbianas. Em alguns espécimes, verificavam-se extensas áreas de tecido necrótico (áreas amorfas e hialinas) apoiado em um tecido de granulação, composto por denso leito de macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados, o qual se estendia para a porção profunda da lâmina própria até o limite da camada muscular. Todavia, alguns fragmentos de mucosa exibiam intenso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares, localizado nas adjacências da superfície ulcerada e nas regiões mediana e profunda da lâmina própria, respectivamente.

Em adição, áreas de edema e feixes de fibras nervosas, em processo de degeneração e em pouco número, eram evidenciados, principalmente, na região mediana da lâmina própria. Na camada muscular, alguns feixes de fibras musculares dos cortes transversais mostravam-se comprometidos devido à extensa área de destruição tecidual e, conseqüentemente, a intensa reação tecidual durante o processo de reparo. Em algumas regiões, observávamos, ainda, discreta atrofia dos lóbulos de feixes musculares. A camada da pele encontrava-se preservada sem sinais expressivos de reação inflamatória.

No grupo 5FU-MAH, a região da mucosa estava recoberta por MAH e pseudomembrana serofibrinosa (superfície desnuda). Além disso, verificávamos que a MAH encontrava-se aderida intimamente à superfície do espécime, atuando, principalmente, como barreira biológica protetora para invasão microbiana.

A lâmina própria exibia áreas de necrose, localizadas nas adjacências da superfície do fragmento, sendo mais expressivas em regiões de superfície desnuda e, conseqüentemente, com invasão de microorganismos neste plano da mucosa. Havia, ainda, extensas áreas de edema com poucas células e vasos sanguíneos dilatados e congestos de

pequeno, médio e grande calibre dispersos, além de moderado e difuso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares.

Ressalva-se que, nas regiões mediana e profunda, principalmente na área de superfície desnuda e microorganismos, notavam-se numerosas células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares, além de vasos sanguíneos dilatados. Na transição entre lâmina própria e camada muscular, notávamos infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares, vasos sanguíneos congestos, bem como aumento da proliferação de fibroblastos e células endoteliais.

A região superficial da camada muscular revelava discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares. O epitélio de revestimento, adjacente à ferida cruenta, mostrava-se atrófico, exibindo discreta degeneração hidrópica, exocitose e espongirose. A camada da pele encontrava-se preservada sem quaisquer sinais de reação tecidual.

O grupo 5FU-MAH+LASER exibia aspectos histológicos semelhantes ao grupo 5FU-MAH. A região da mucosa encontrava-se recoberta por MAH e por pseudomembrana serofibrinosa (superfície desnuda). Esta membrana encontrava-se intimamente aderida à superfície do espécime, atuando, principalmente, como barreira protetora contra a invasão de microorganismos.

Notava-se que a reação tecidual era mais tênue quando comparado com o grupo 5FU-MAH. Na região da superfície desnuda, a lâmina própria exibia extensas áreas de edema e numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos de calibres variados. Em adição, havia moderado e difuso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares na região superficial e mononucleares nas porções medianas e profundas da lâmina própria.

Na transição entre lâmina própria e camada muscular, notávamos infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares, vasos sanguíneos congestos, discreta hemorragia

intersticial e intensa celularidade. A porção superficial da camada muscular revelava discreto e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares em toda a extensão da lesão. O epitélio de revestimento adjacente à ferida cruenta mostrava-se atrófico, exibindo discreta degeneração hidrópica, exocitose e espongirose. A camada do epitélio encontrava-se preservada sem sinais de reação tecidual (Figuras 8 e 9)

5.1.2.2 Período 7 dias

No grupo controle, notávamos que a região da mucosite oral permanecia recoberta por uma pseudomembrana serofibrinosa e por epitélio pavimentoso estratificado ora paraqueratinizado ora não queratinizado.

As áreas de ulceração exibiam células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares principalmente onde havia a presença de colônias bacterianas. O epitélio adjacente mostrava-se atrófico, com degeneração hidrópica, espongirose e discreta exocitose.

A lâmina própria revelava difuso e moderado infiltrado de células inflamatórias, áreas de edema intercelular, aumento da população de fibroblastos e fibrócitos e da quantidade de vasos sanguíneos. O infiltrado de células inflamatórias estava difuso e estendia-se até os planos superficiais da camada muscular. Notávamos que havia maior quantidade de feixes de fibras nervosas quando comparada com o período anterior. No plano da pele, verificávamos ausência de quaisquer sinais inflamatórios (Figura 10A).

No grupo 5-FU, notávamos a superfície da ferida cruenta exibia extensas áreas de necrose tecidual associada à presença de colônias bacterianas. O epitélio adjacente à ferida apresentava alterações histológicas relevantes quando comparado com o grupo anterior, tais

como: acantose, alongamento das cristas epiteliais, espongirose, degeneração hidrópica e exocitose.

Em alguns cortes, observávamos também necrose de liquefação representada por uma faixa hialina na região subepitelial. Na lâmina própria, notávamos que o tecido conjuntivo estava mais organizado e apresentava maior população de fibroblastos, fibrócitos, endotélio e vasos sanguíneos quando comparado com o período anterior. Células inflamatórias mononucleares encontravam-se principalmente nos planos mais profundos e células inflamatórias poli e mononucleares nos planos superficiais. Além disso, feixes de fibras nervosas eram bem evidenciados nas áreas de transição, entretanto algumas estruturas mostravam-se em processo de degeneração devido à reação inflamatória no local. Os planos superficiais da camada muscular também mostravam pouco representativos (Figura 10B).

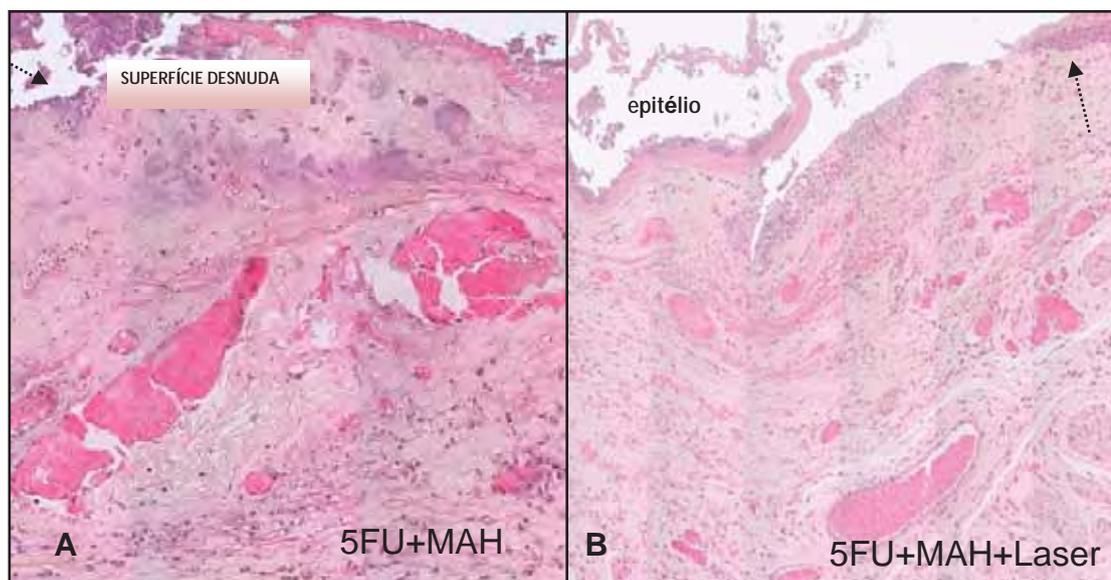


Figura 8 - 3 dias. 5-FU+MAH (a) e 5-FU+MAH+LASER (b). Aderência da MAH na superfície da região da mucosite oral (setas) em ambos os grupos tratados com membrana. Aumento original: 400x, H.E.

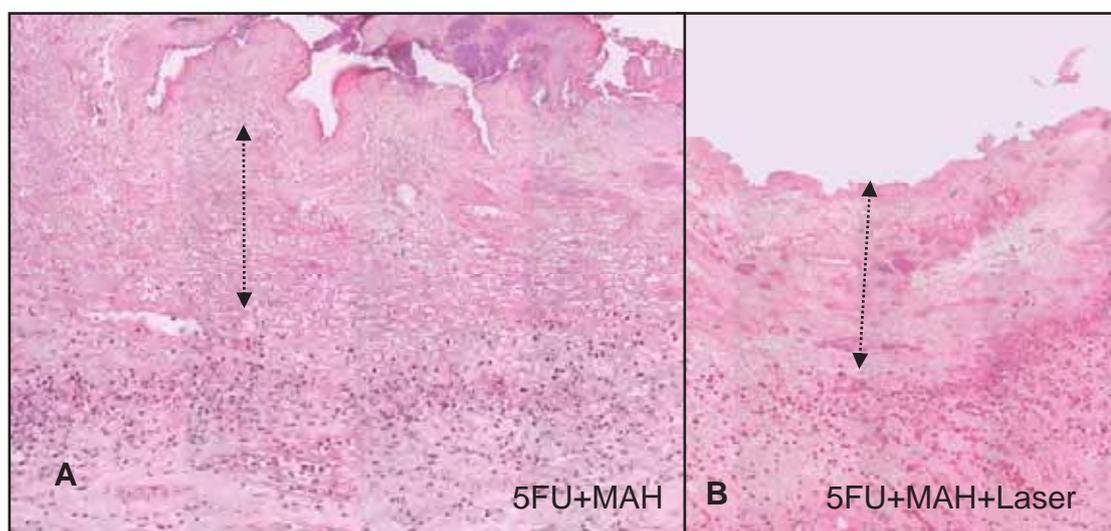


Figura 9 - 3 dias. 5-FU+MAH (a) e 5-FU+MAH+LASER (b). Infiltrado de células inflamatórias, dispostas em faixa e subjacente às extensas áreas de necrose tecidual (setas pontilhadas) em ambos os grupos com membrana. Aumento original: 400x, H.E

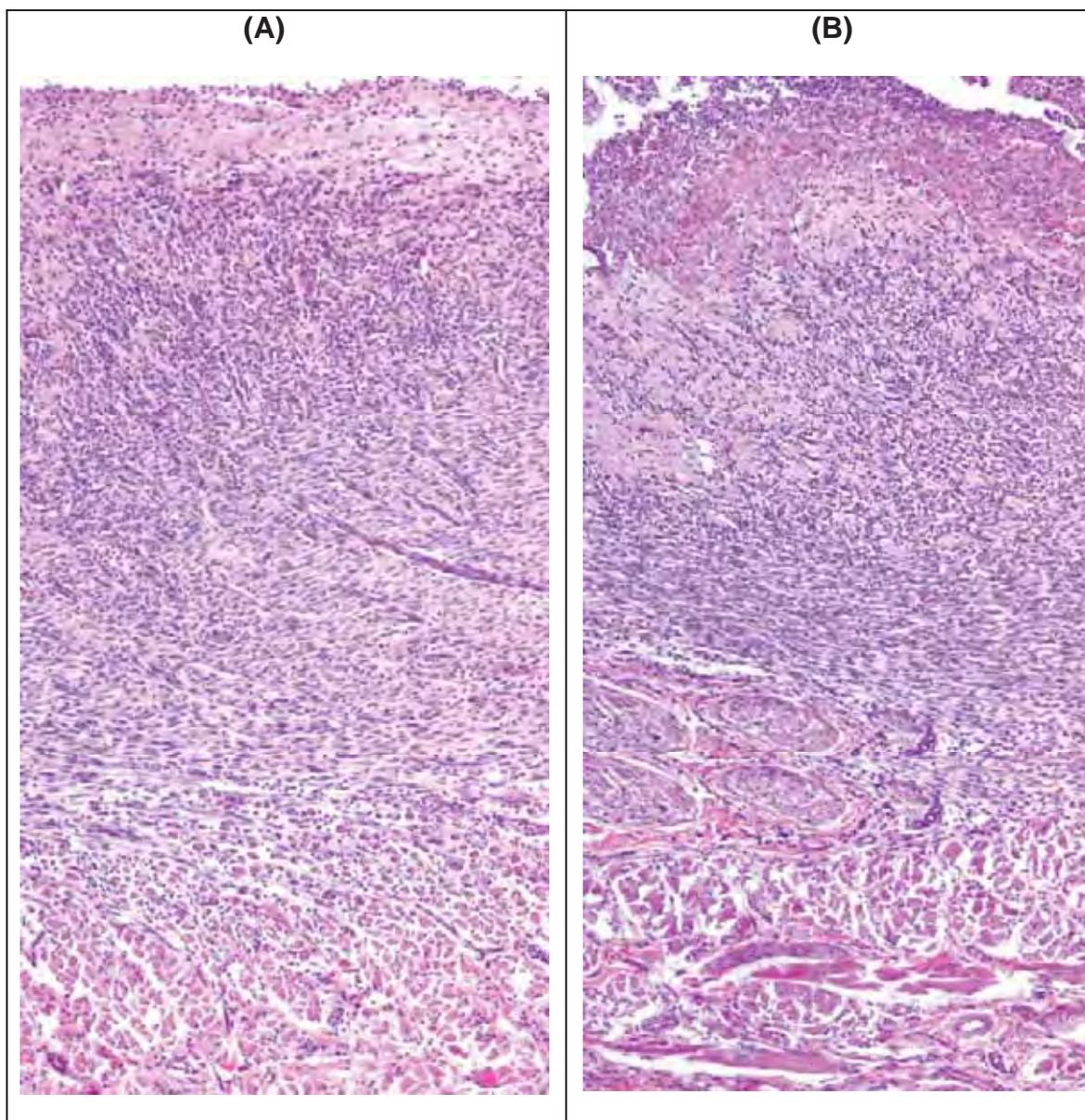


Figura 10 – 7 dias. Fotomicrografia do corte sagital mediano de lábio inferior na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, exibindo os planos da mucosa bucal (epitélio e lâmina própria) e camada muscular dos grupos controle (A) e 5-FU (B), aumento original: 50x. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

No grupo 5-FU+LASER, a superfície encontrava-se revestida por epitélio neorformado (região periférica da lesão) e ulcerada recoberta por espessa pseudomembrana serofibrinosa (região central da lesão), composta por rede de fibrinas e células. Intensa concentração de colônias de microorganismos, principalmente, sobre a superfície desnuda.

A lâmina própria (LP) exibia intensa proliferação celular, composta por fibroblastos, fibrócitos, células endoteliais, e vascularização. Em adição, notávamos intenso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares nas regiões superficiais e mononucleares, predominantemente, na região profunda da LP. Ressalva-se que, em alguns espécimes, havia destruição de feixes de fibras nervosas na lâmina própria, provavelmente, comprometendo as funções neurovasculares da região, além de atrofia e atresia dos feixes de fibras musculares nos cortes transversais da camada muscular. Os feixes de fibras musculares ou mioblastos, presentes dos cortes transversais e longitudinais, apresentavam aspectos histomorfológicos normais, porém havia discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares permeando este tecido, originado do mesoderma (Figura 11).

No grupo 5-FU+MAH, todos os planos da mucosa bucal (epitélio e lâmina própria) e camada muscular estavam representativos e bem definidos. A região, onde se localizava a lesão, estava parcialmente re-epitelizada, porém, em algumas cortes, era evidenciada superfície ulcerada (desnuda).

O epitélio neorformado, localizado nas adjacências da superfície desnuda, mostrava atrófico, camada basal retificada, exocitose e discreta espongirose. Colônias de microorganismos na superfície, também, eram observadas. A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo neorformado ricamente celularizado e vascularizado, estendendo-se até as regiões profundas deste plano. Em adição, havia desorganização da matriz extracelular devido à distribuição irregular dos feixes de fibras colágenas, além de difuso infiltrado de células

inflamatórias, predominantemente, mononucleares, e feixes de fibras nervosas preservadas.

Ressalva-se a presença de fragmentos de MAH, de aspecto vítreo e homogêneo, na região superficial da lâmina própria e incorporação dessa membrana no tecido conjuntivo neoformado. Estes fragmentos encontravam-se em íntimo contato com células inflamatórias (polimorfonucleares e mononucleares), fibroblastos, endoteliais e capilares sanguíneos. Além disso, havia fragmentos de MAH em processo de degradação, sem presença de células gigantes multinucleadas de tipo corpo estranho. Esta estrutura biológica foi denominada, neste estudo, de “tecido âmnio-mesenquimal”, podendo ser revestido por epitélio neoformado, principalmente, quando localizado nas regiões periféricas da lesão.

Na camada muscular, verificávamos feixes de fibras musculares dos cortes transversais e longitudinais com aspecto normal, porém havia discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares permeando este tecido.

No grupo 5-FU+MAH+LASER, a superfície da região da lesão mostrava-se revestida por epitélio neoformado, entretanto havia áreas ulceradas recobertas por pseudomembrana serofibrinosa, além de discreta colonização de microorganismos. A lâmina própria exibia aspectos histológicos semelhantes ao grupo 5-FU+MAH, sendo, portanto, composta por tecido conjuntivo neoformado, ricamente celularizado e vascularizado. Em alguns fragmentos, a camada muscular exibia fibras musculares em processo de degeneração e discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Nas adjacências da lesão deste mesmo fragmento, a intensidade do referido processo era mais tênue no tecido muscular (Figura 12).

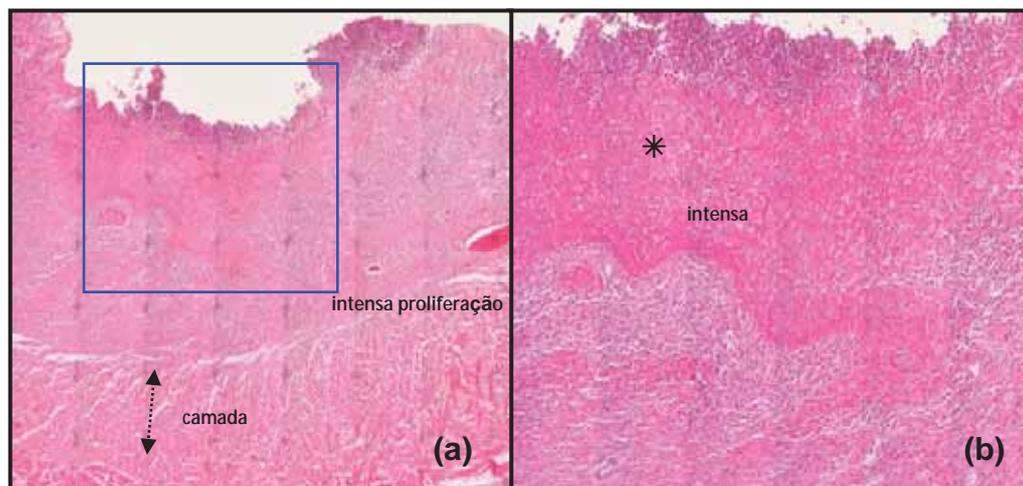


Figura 11 - 7 dias Exibindo lâmina própria com intensa proliferação celular e camada muscular do grupo 5-FU+LASER (a); superfície revestida por espesso material amorfo e eosinofílico, composto por rede de fibrinas e numerosas células, denominado de pseudomembrana serofibrinosa (b) e exibindo propriedade de barreira biológica (asterisco). Aumento original: 200x e 400x, H.E.

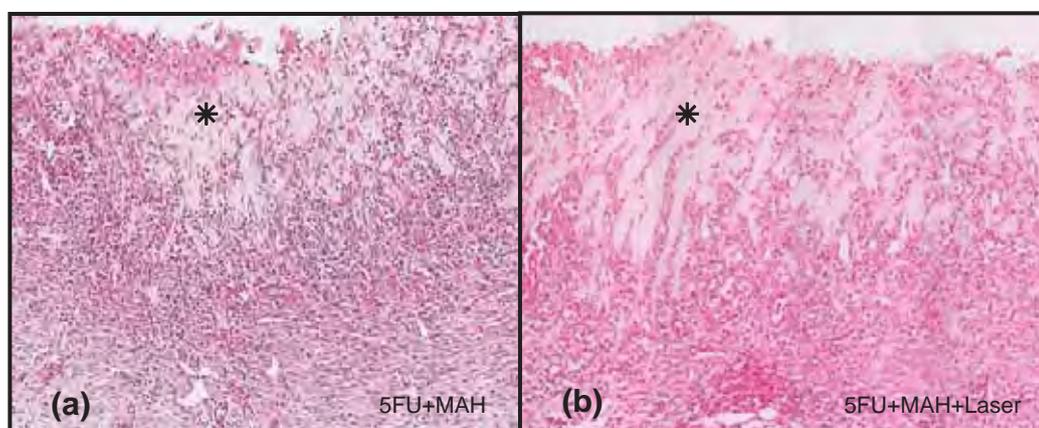


Figura 12 - 7 dias. 5-FU+MAH (a) e 5-FU+MAH+LASER (b). Fotomicrografia da região superficial da lâmina própria: fragmentos de MAH, de aspecto vítreo e homogêneo, incorporados no tecido conjuntivo neoformado e permeados por numerosas células e vasos sanguíneos: “tecido âmnio-mesenquimal” (asteriscos). Aumento original: 200 e 400x, H.E.

5.1.2.3 Período 14 dias

No grupo controle, notávamos que a região da mucosite oral estava quase que totalmente re-epitelizada, uma vez que exibia discretas áreas de ulceração em alguns cortes histológicos. Além disso, verificávamos a presença de discreta degeneração hidrópica e exocitose em algumas áreas do epitélio. Na lâmina própria, observávamos tecido conjuntivo em organização com aumento da celularidade, infiltrado difuso de células inflamatórias predominantemente mononucleares e presença de vasos sanguínea congestionados. Houve aumento do número de feixes de fibras nervosas quando comparado com período anterior. Na camada muscular, notávamos discreto infiltrado de células inflamatórias permeando o tecido muscular (Figura 13A).

No grupo 5-FU, a região da mucosite oral estava re-epitelizado, exibindo discretas áreas com degeneração hidrópica e exocitose. Na lâmina própria, observávamos também tecido conjuntivo em organização com aumento da celularidade e difuso e moderado infiltrado de células inflamatórias predominantemente Vasos sanguíneos congestionados de pequeno e médio calibre, discreta hemorragia intersticial e aumento do número de feixes nervos eram evidenciados. No plano superficial da camada muscular, notávamos infiltrado de células inflamatórias permeando o tecido muscular (Figura 13B).

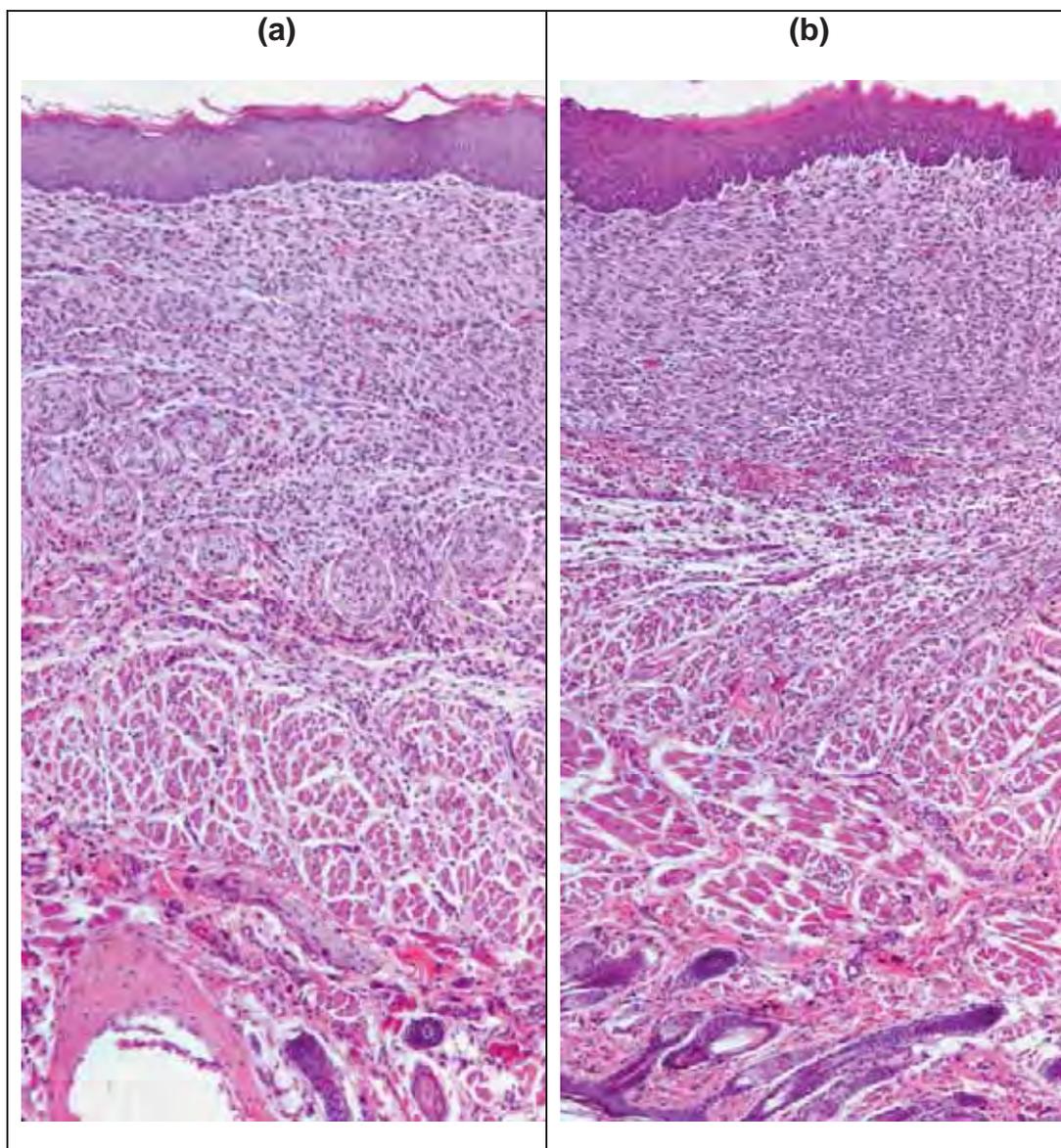


Figura 13 – 14 dias. Fotomicrografia do corte sagital mediano de lábio inferior na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, exibindo os planos da mucosa bucal (epitélio e lâmina própria) e camada muscular dos grupos controle (a) e 5-FU (b), aumento original: 50x. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

No grupo 5-FU+LASER, a maioria dos espécimes mostrava recoberta por epitélio neoformado, apresentando discreta exocitose e degeneração hidrópica. A lâmina própria (regiões superficial, mediana e profunda) era constituída por tecido conjuntivo frouxo, exibindo intensa celularidade e, conseqüentemente, acentuada desorganização dos feixes de fibras colágenas com distribuição irregular, além de numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos de pequeno e médio calibre.

Em adição, havia moderado infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares na região subjacente da superfície re-epitelizada e polimorfonucleares e mononucleares nas subjacências das superfícies desnudas. Poucos feixes de fibras nervosas eram evidenciados. Na região profunda da lâmina própria, poucos espécimes apresentavam fibras colágenas distribuídas uniformemente e longitudinalmente, caracterizando-se a fase de organização tecidual. Na camada muscular, notavam-se escassas células inflamatórias permeando este tecido nos cortes transversais e ausência nos cortes longitudinais.

No grupo 5-FU+MAH, todos os fragmentos de mucosa encontravam-se revestidos por epitélio neoformado, exibindo discreta exocitose. Na região superficial da LP, notava-se a presença de tecido conjuntivo frouxo exibindo intensa celularidade, numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos de pequeno e médio calibre e desorganização dos feixes de fibras colágenas com distribuição irregular, além de infiltrado de células inflamatórias mononucleares.

Nenhum “tecido âmnio-mesenquimal”, denominado nesta pesquisa, foi encontrado nesta região dos espécimes analisados. Nas regiões mediana-profunda deste mesmo plano da mucosa, verificava-se tecido conjuntivo fibroso exibindo matriz extracelular organizada com feixes de fibras colágenas distribuídas uniformemente e longitudinalmente, além de feixes de fibras nervosas preservadas. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade.

O grupo 5-FU+MAH+LASER exibiu aspectos morfológicos semelhantes ao grupo 5-FU+MAH. Os fragmentos de mucosa encontravam-se revestidos por epitélio neoformado, exibindo discreta exocitose. A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo frouxo (regiões superficial - mediano) e fibroso (regiões mediana – profunda), de modo que a desorganização da matriz extracelular, com distribuição irregular de fibras colágenas, era evidenciada no tecido conjuntivo frouxo, além da preservação de feixes de fibras nervosas. Em adição, notava-se infiltrado de células inflamatórias mononucleares, permeando os tecidos conjuntivos frouxo e fibroso. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade (Figura 14).

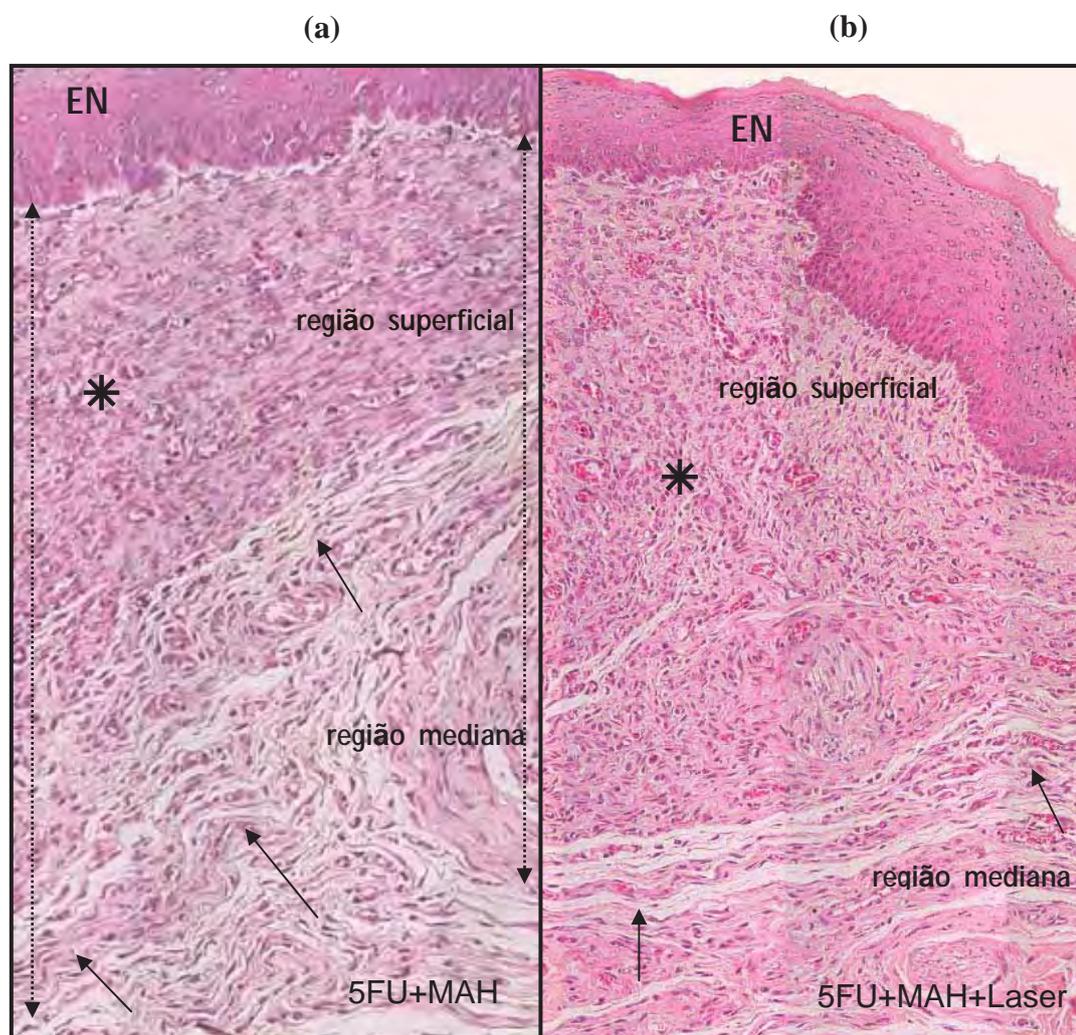


Figura 14 - 14 dias. Fragmentos de mucosa dos grupos 5-FU+MAH (a) e 5-FU+MAH+LASER (b), exibindo epitélio neoformado (EN) e tecidos conjuntivos frouxo, com intensa celularidade, veemência vascularização e pouca quantidade de fibras colágenas, distribuídas irregularmente, (asterisco), e fibroso com poucas células e grande quantidade de fibras colágenas, distribuídas uniformemente e longitudinalmente (setas), ambos localizados nas regiões superficial e mediana da lâmina própria – LP (setas pontilhadas), respectivamente. Aumento original: 200x e 400x. H.E.

5.1.2.4 Período 21 dias

No grupo controle, a região onde foi induzida a mucosite oral estava totalmente re-epitelizada, apresentando aspecto de normalidade em toda a sua extensão. A lâmina própria mostrava-se predominantemente mais organizada, porém em algumas regiões notávamos que o tecido conjuntivo neoformado apresentava pequenas áreas bem celularizadas e estava ainda em fase de organização. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade (Figura 15A).

No grupo 5-FU, observávamos que a região estava totalmente re-epitelizada, apresentando aspecto de normalidade em toda a sua extensão. A lâmina própria mostrava-se predominantemente organizada, porém em poucas regiões notávamos ainda pequenas áreas bem celularizadas. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade (Figura 15B).

No grupo 5-FU+LASER, observávamos que a região estava totalmente re-epitelizada. A lâmina própria mostrava-se desorganizada (tecido conjuntivo frouxo) na região superficial-mediana e organizada (tecido conjuntivo fibroso) na região mediana-profunda da LP. A camada muscular apresentava aspecto de normalidade.

Nos grupos 5-FU+MAH e 5-FU+MAH+LASER, a maioria dos espécimes exibia mucosa de aspecto normal, todavia raros fragmentos mostravam, ainda, pequenas áreas de tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado e com desorganização em sua matriz extracelular, na região subepitelial

Ressalva-se, ainda presença de fragmento de MAH, permeado por células do tecido conjuntivo frouxo com intensa celularidade e vascularização na região subepitelial dos animais do grupo 5-FU+MAH+LASER (Figura 16).

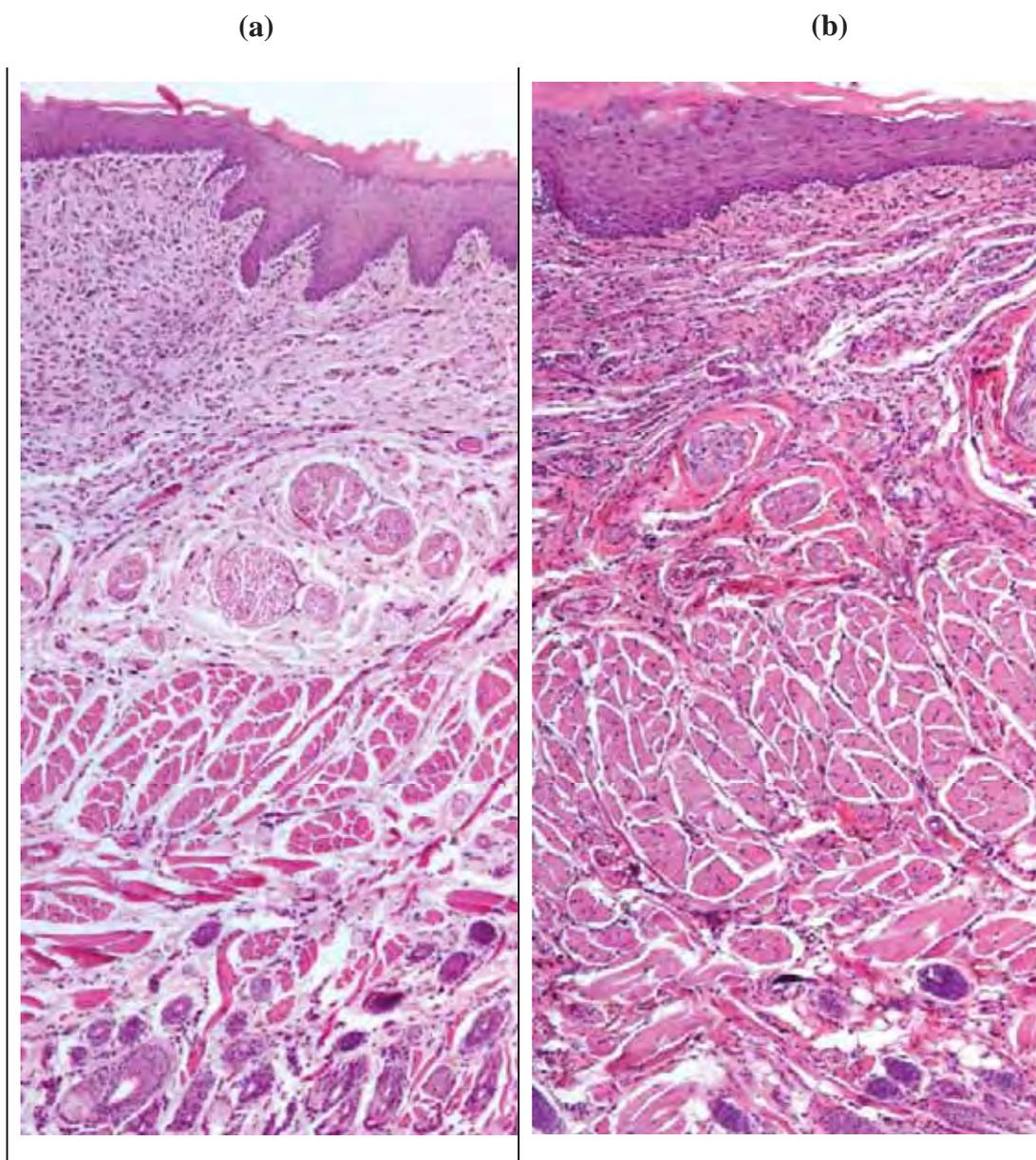


Figura 15 – 21 dias. Fotomicrografia do corte sagital mediano de lábio inferior na região do fórnice vestibular de incisivos inferiores, exibindo os planos da mucosa bucal (epitélio e lâmina própria) e camada muscular dos grupos controle (a) e 5-FU (b), aumento original: 50x. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

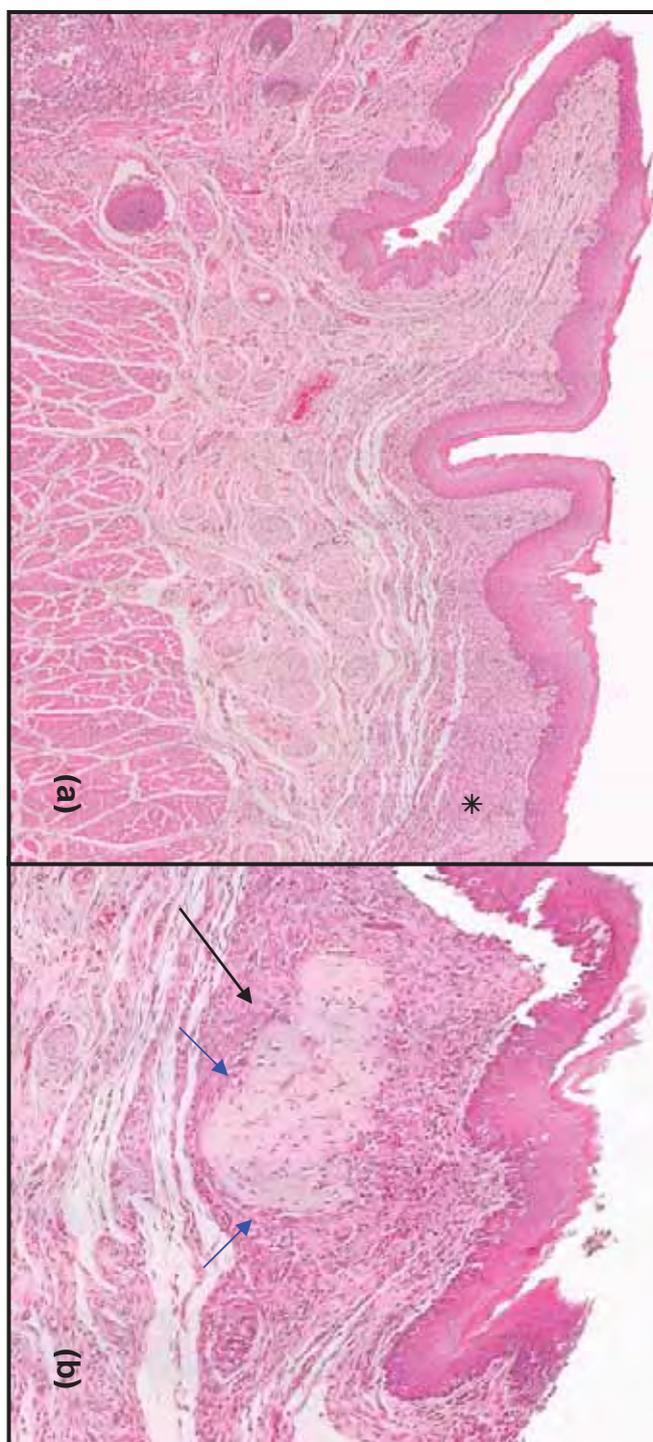


Figura 16 - 21 dias. (a) Mucosa bucal exibindo aspecto normal, porém ainda discreta área exibindo intensa celularidade (asterisco); (b) remanescente de MAH (seta preta), permeado por células (fibroblastos, células endoteliais e raras células inflamatórias mononucleares) e capilares sanguíneos de pequeno calibre (setas azuis), localizado na região subepitelial (seta). Aumento original: 400x, H.E.

5.2 Análise Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica foi usado o teste One Way ANOVA e teste de Tukey para pareamento dos pares.

Nesta análise, realizou-se a mensuração de células imunorreativas para os anticorpos PCNA, VEGF, CD4 e CD8, localizadas na região mediana da mucosa bucal de ratos induzidos com 5-Fluoruracil (5FU), tratados com membrana amniótica homogênea (MAH) associada ou não à irradiação laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl), sendo a análise de variância (Anova-One Way) com teste de Tukey e os dados histomorfometria demonstrados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Resultados da Análise de variância (ANOVA) com Teste de Tukey das células imunorreativas para PCNA, VEGF, CD4 e CD8, localizadas na região mediana da lâmina própria da mucosa bucal de ratos induzidos com 5FU, tratado com MAH e Laser

Período	GRUPO	PCNA(*)	VEGF (*)	CD4 (*)	CD8 (*)
3 dias	Controle vs 5FU-MAH (**,*)	ns	$P<0,001$	$P<0,05$	ns
	Controle vs 5FU-LASER (**, ***)	$P<0,01$	$P<0,001$	ns	ns
	Controle vs 5FU-MAH+LASER (**,*)	$P<0,01$	ns	$P<0,05$	ns
	5FU vs 5FU-MAH (*, **)	ns	$P<0,05$	$P<0,01$	ns
	5FU vs 5FU-LASER (**)	ns	$P<0,001$	ns	ns
	5FU vs 5FU-MAH+LASER (**, **)	ns	$P<0,01$	$P<0,01$	ns
	5FU-MAH vs 5FU-LASER (*, ***)	$P<0,05$	$P<0,001$	ns	ns
	5FU-MAH vs 5FU-MAH+LASER (**, ***)	$P<0,01$	$P<0,001$	ns	ns
5FU-LASER vs 5FU-MAH+LASER (**)	ns	$P<0,01$	ns	ns	
7 dias	Controle vs 5FU (***)	$P<0,001$	ns	ns	ns
	Controle vs 5FU-MAH (**, **, ***, ***)	$P<0,01$	$P<0,01$	$p<0,001$	$P<0,001$
	Controle vs 5FU-LASER (**, ***)	ns	$P<0,01$	$P<0,001$	ns
	Controle vs 5FU-MAH+LASER (**, **, *)	$P<0,01$	ns	$P<0,05$	$P<0,01$
	5FU vs 5FU-MAH (*, **, ***, ***)	$P<0,05$	$P<0,001$	$P<0,01$	$P<0,001$
	5FU vs 5FU-LASER (**, ***)	$P<0,001$	ns	$P<0,001$	ns
	5FU vs 5FU-MAH+LASER (*)	$P<0,05$	ns	ns	ns
	5FU-MAH vs 5FU-LASER (*, ***)	$P<0,05$	$P<0,001$	ns	ns
5FU-MAH vs 5FU-MAH+LASER (**, *)	ns	$P<0,01$	ns	$P<0,01$	
Períodos	GRUPO	PCNA (*)	VEGF (*)	CD4 (*)	CD8 (*)
14 dias	5FU vs 5FU-MAH (*, *)	$P<0,05$	$P<0,05$	ns	ns
	5FU vs 5FU-MAH+LASER (*)	ns	$P<0,05$	ns	ns
	5FU-MAH vs 5FU-LASER (*)	$P<0,05$	ns	ns	ns
	5FU-LASER vs 5FU-MAH+LASER (*)	ns	ns	ns	$P<0,05$
21 dias	Controle vs 5FU-MAH+LASER (***)	$P<0,001$	ns	ns	ns
	5FU vs 5FU-MAH (*)	ns	$P<0,05$	ns	ns
	5FU vs 5FU-LASER (*)	ns	ns	ns	$P<0,01$
	5FU vs 5FU-MAH+LASER (***, *)	$P<0,001$	$P<0,05$	ns	ns
	5FU-MAH vs 5FU-LASER (*)	ns	ns	ns	$P<0,05$
	5FU-MAH vs 5FU-MAH+LASER (***)	$P<0,001$	ns	ns	ns
5FU-LASER vs 5FU-MAH+LASER(***)	$P<0,001$	ns	ns	ns	

ns= Não Significante; , $P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**) e $P<0,001$ (***)

Tabela 2 – Dados histomorfométricos do número de células imunorreativas para PCNA, VEGF, CD4 e CD8 de ratos dos grupos Controle, 5FU, 5FU-Laser, 5FU-MAH e 5FU-MAH+Laser, nos diferentes períodos observado. Valores expressos por Média±DP (Desvio Padrão) para cada grupo (n=3)

Grupos	Períodos			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
PCNA				
Controle	30,11±1,25	16,20±3,88	9,14±0,38	2,14±0,57
5FU	23,22±2,22	37,53±1,40	7,91±2,67	1,75±1,75
5FU-MAH	27,25±6,47	27,25±4,55	20,17±7,72	7,00±4,88
5FU-Laser	15,67±0,14	18,25±0,00	8,67±0,38	5,25±0,25
5FU-MAH+Laser	14,17±4,04	27,08±2,52	14,75±4,75	20,00±2,05
VEGF				
Controle	13,58±0,60	15,58±1,91	6,25±0,87	6,25±0,87
5FU	17,58±1,81	9,58±3,62	9,33±1,47	9,33±1,47
5FU-MAH	22,92±1,94	26,08±1,01	4,75±2,61	4,75±2,61
5FU-Laser	4,58±2,02	5,92±0,88	8,17±1,51	8,17±1,51
5FU-MAH+Laser	11,00±2,00	14,92±4,16	5,00±0,66	5,00±0,66
CD4				
Controle	3,25±0,75	1,68±0,52	1,92±0,63	1,83±1,01
5FU	2,33±0,88	1,50±0,66	2,25±0,66	1,83±0,14
5FU-MAH	4,92±0,14	5,17±1,38	3,42±0,88	2,50±0,66
5FU-Laser	3,58±0,38	5,50±0,00	2,42±0,29	2,75±0,50
5FU-MAH+Laser	4,92±0,58	3,50±0,87	3,33±0,52	2,75±0,50
CD8				
Controle	5,5±1,32	3,08±1,01	3,67±0,58	2,42±0,38
5FU	2,58±0,88	2,83±0,80	2,25±1,09	1,17±0,38
5FU-MAH	4,92±1,44	6,92±0,29	3,08±0,38	1,42±0,52
5FU-Laser	2,67±0,72	3,17±0,38	1,83±0,63	3,67±0,76
5FU-MAH+Laser	5,50±1,39	6,08±1,01	3,83±0,76	2,67±0,95

Os resultados estatísticos da análise imunohistoquímica (Tabelas 1 e 2), referentes aos anticorpos PCNA, VEGF, CD4 e CD8 e respectivos períodos de observação, estão demonstrados nos gráficos a seguir:

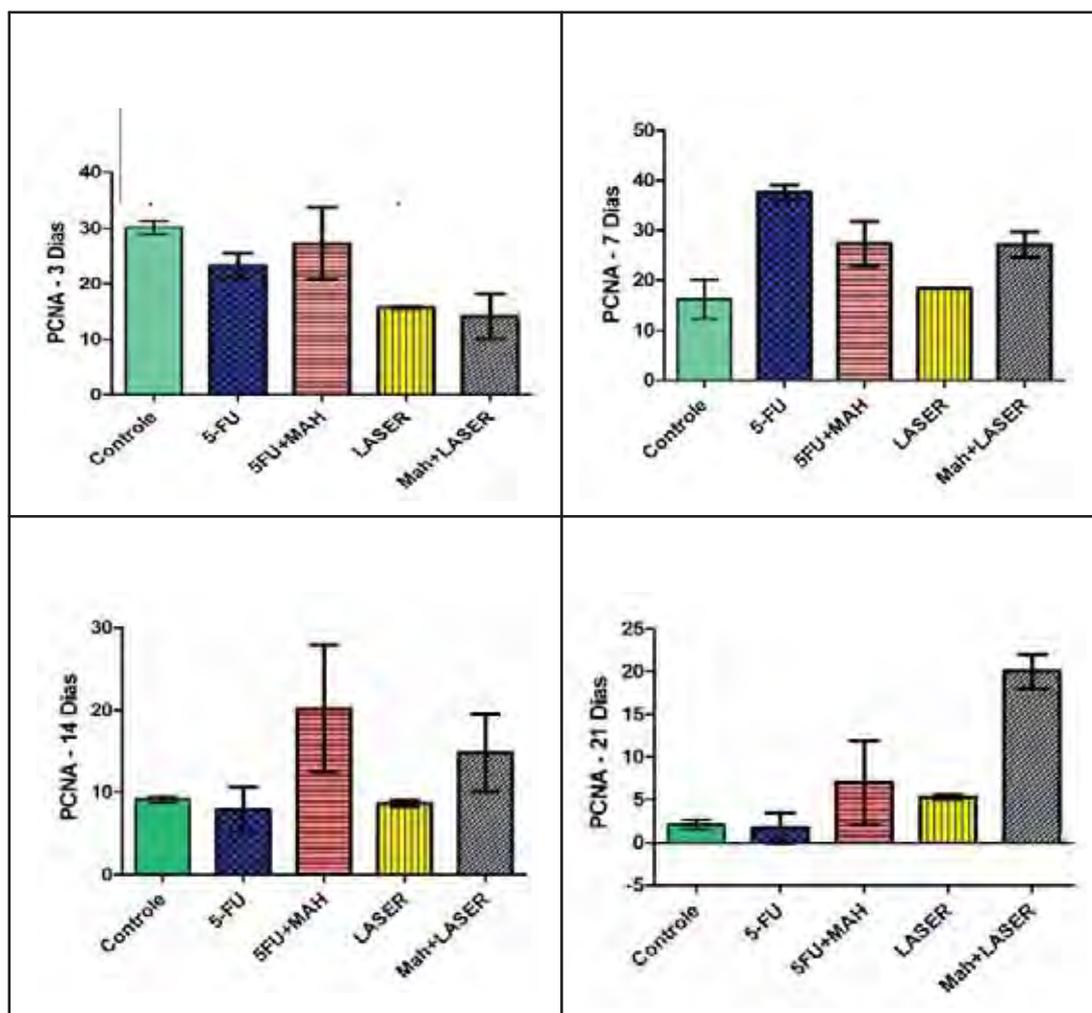


Figura 17 - Comparação entre o número de células imunorreativas para o anticorpo PCNA nos diferentes períodos de observação estudados.

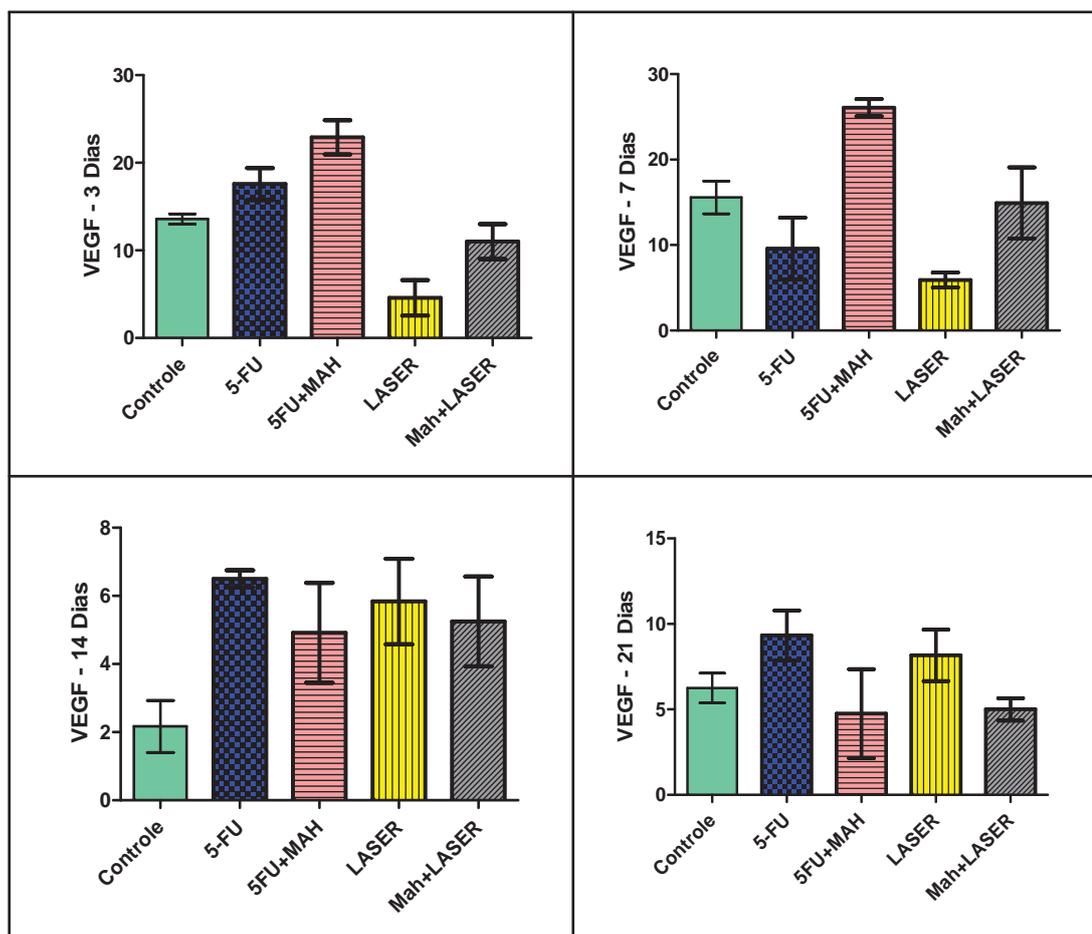


Figura 18 - Comparação entre o número de células imunorreativas para o anticorpo VEGF nos diferentes períodos de observação estudados.

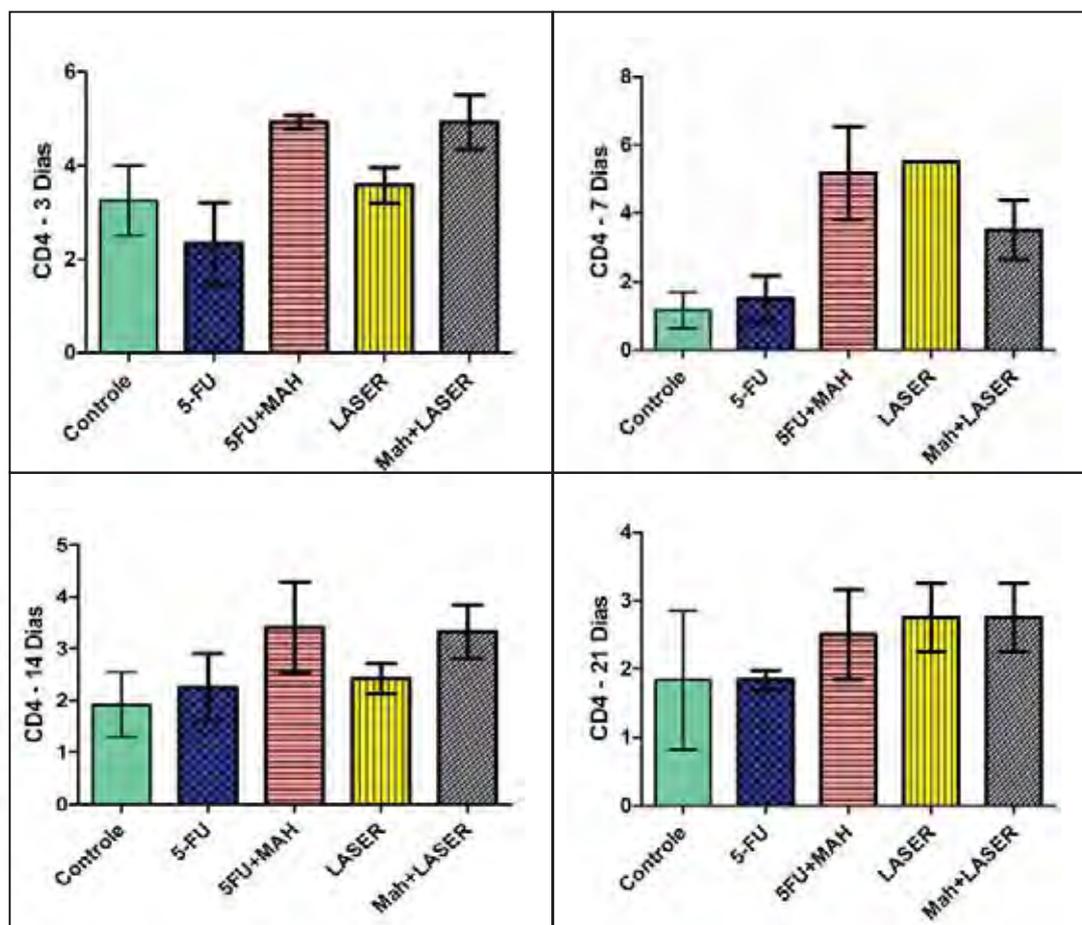


Figura 19 - Comparação entre o número de células imunorreativas para o anticorpo CD4 nos diferentes períodos de observação estudados

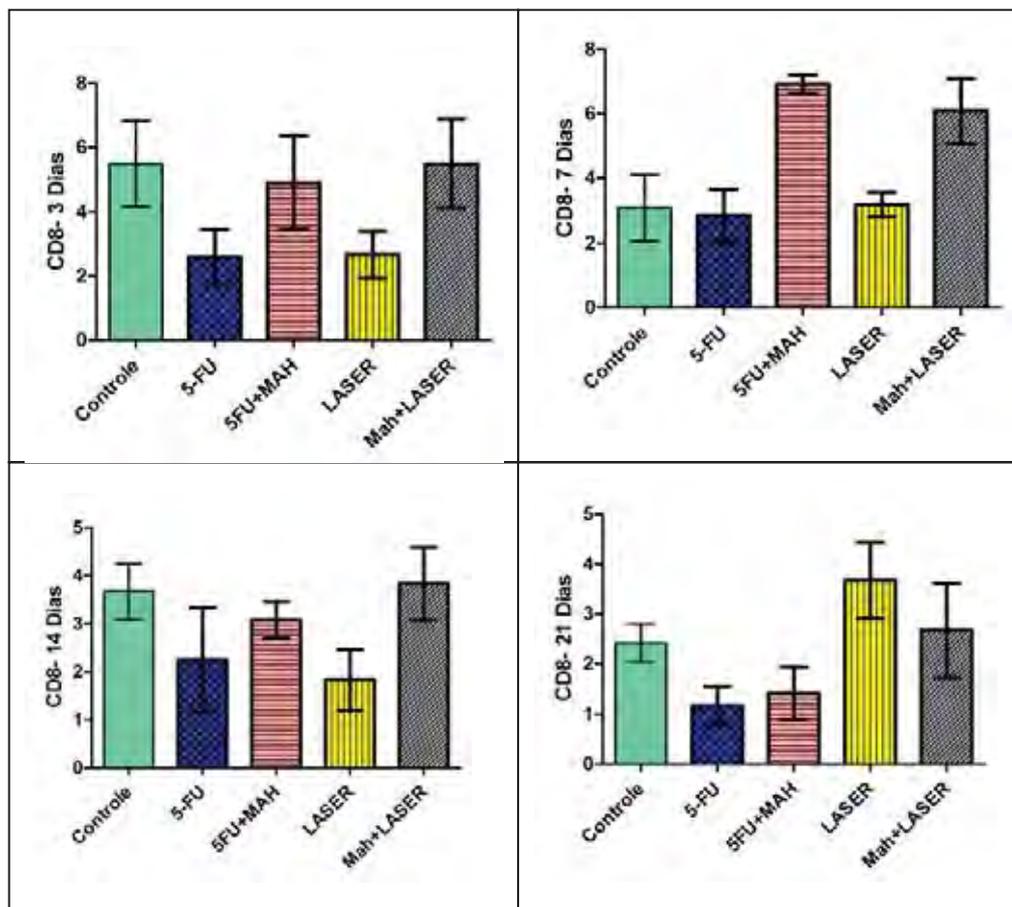


Figura 20 - Comparação entre o número de células imunorreativas para o anticorpo CD8 nos diferentes períodos de observação estudados

As figuras 21, 22, 23 e 24 mostram a imunomarcção na área mediana da lâmina própria da mucosite oral, nos períodos de 3 e 7 dias para os anticorpos PCNA, VEGF, CD4 e CD8, respectivamente.

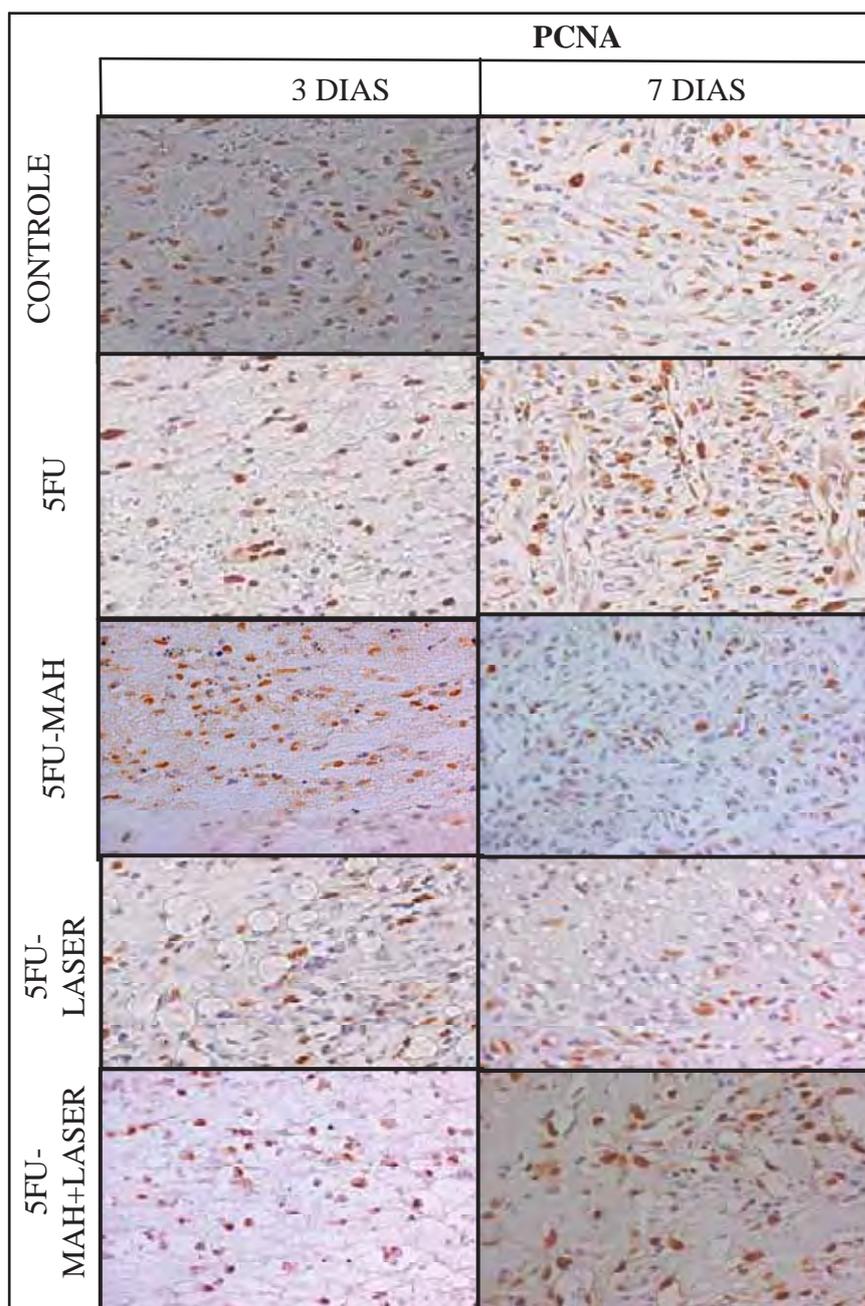


Figura 21 - Imunomarcção para o anticorpo PCNA no período de 3 e 7 dias nos grupos estudados (400X).

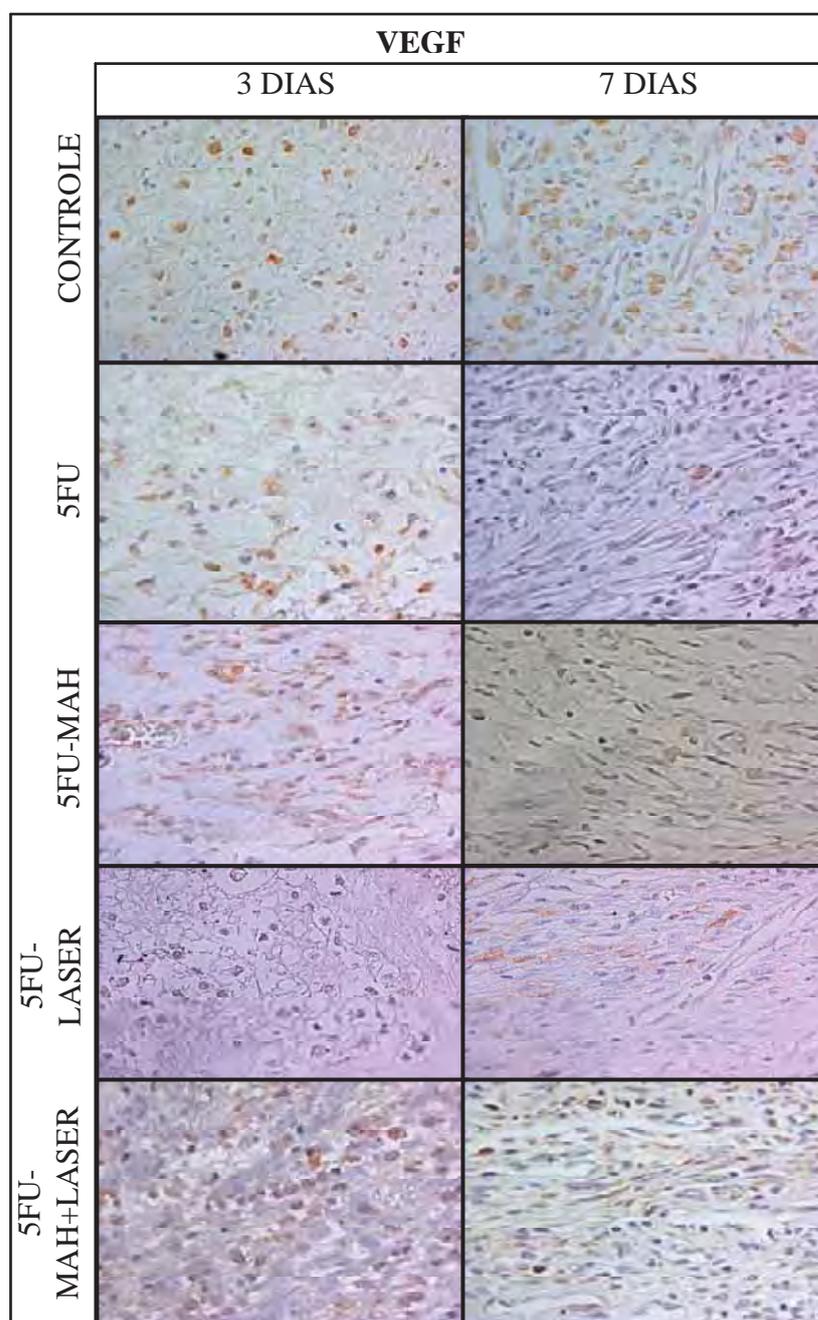


Figura 22 - Imunomarcção para o anticorpo VEGF no período de 3 e 7 dias nos grupos estudados (400X).

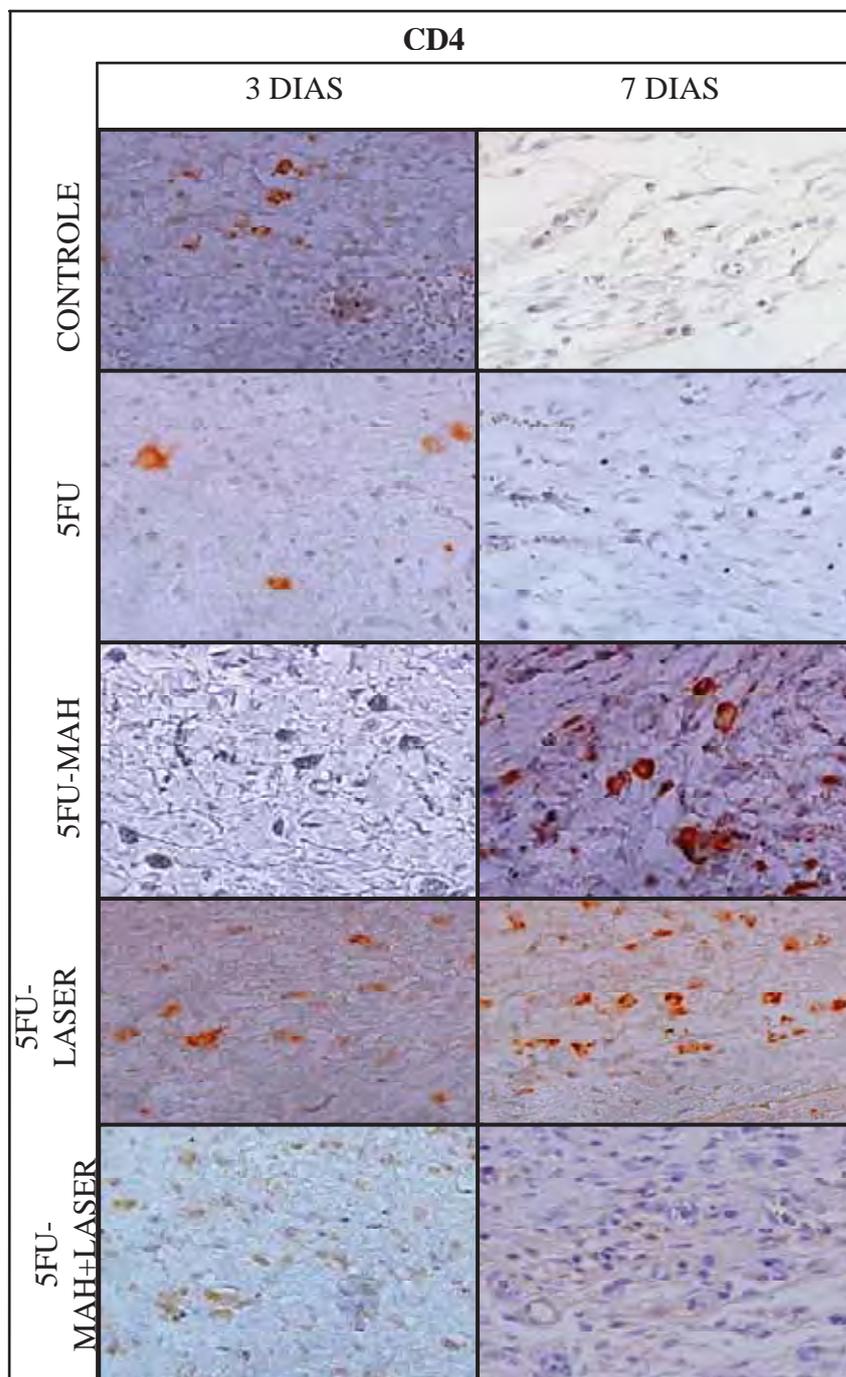


Figura 23 - Imunomarcção para o anticorpo CD4 no período de 3 e 7 dias nos grupos estudados (400X).

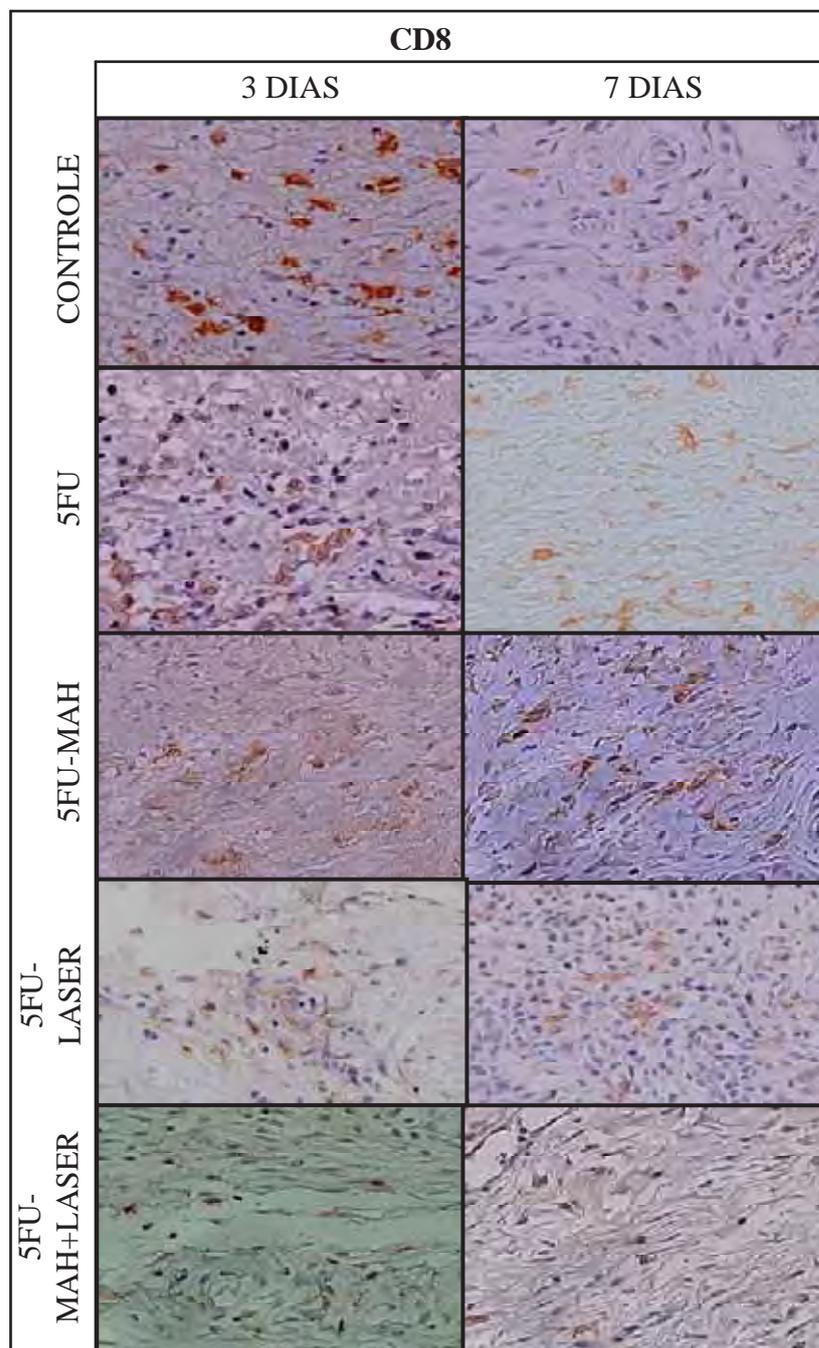


Figura 24 - Imunomarcção para o anticorpo CD8 no período de 3 e 7 dias nos grupos estudados (400X).

6 DISCUSSÃO

A mucosite é um grande problema clínico na oncologia que se manifesta devido aos efeitos citotóxicos de radioterapia e quimioterapia, podendo afetar a mucosa da cavidade oral e o trato gastrointestinal, promovendo dores na boca e garganta, ulcerações, dores abdominais, inchaço, vômitos, e diarréias, dependendo da região atingida. Esta condição patológica é resultante de uma interação de complexos danos teciduais locais, ambiente oral, imunossupressão do paciente, além de predisposição genética intrínseca do paciente para desenvolver esta condição (Treister, Sonis, 2007; Gibson *et al.*, 2008; Treister, Woo, 2010).

Baseados na farmacogenética, que estuda a variabilidade genética dos indivíduos com relação às drogas específicas, e considerando a capacidade do paciente em metabolizar e eliminar drogas, avaliações para identificação de pacientes com risco de toxicidade severa e prolongada, têm sido muito utilizadas. Por exemplo, as deficiências da desidrogenase dihidropirimidina, enzima que cataboliza a 5FU no fígado, estão associadas com os níveis da toxicidade (Gibson *et al.*, 2008). Se considerarmos estas hipóteses para este trabalho, isto poderia justificar, em parte, as diferentes respostas metabólicas de cada animal, após a administração do 5FU, manifestando-se em sinais e sintomas clínicos de grau de intensidade variada. Assim, alguns animais apresentaram diarréia de consistência pastosa e líquida, melanorréia, calafrio devido à hipertermia severa, queda e perda de brilho dos pêlos, perda de reflexo e anorexia severa. Além disso, devemos considerar que estes fatos devem estar relacionados com alterações do sistema imunológico do animal, o que explicaria as significativas variações no número de células imunorreativas para PCNA, VEGF, CD4 e CD8 de mucosites orais, induzidas pelo 5-FU, nos animais do mesmo grupo.

Na análise histológica do processo de reparação tecidual de mucosite oral deste estudo, constatamos que o referido processo apresentou fases bem distintas, interdependentes e em sincronia, sendo conseqüências de uma série de ações imediatas por fatores de crescimento e citocinas. De acordo com Sonis (1998), as principais citocinas liberadas após o efeito da quimioterapia e radioterapia, são as Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral - Alfa (TNF- α). O TNF é capaz de causar danos teciduais e pode ser um fator iniciador e acelerador do processo de mucosite. A IL-1 estimula aumento de resposta inflamatória. Ademais, outros aspectos relevantes são a presença de colônias bacterianas e as alterações do sistema imunológico.

Alguns estudiosos sugeriram que a quimioterapia atua em células de rápida proliferação da camada basal do epitélio, causando a perda da habilidade do tecido em renovar-se. A atrofia e ulcerações da mucosa, que está associada com a mucosite oral, são uma conseqüência desses eventos (Sonis, 2004; Logan *et al.*, 2007). Portanto, sugere-se que referido processo é facilitado pelo trauma e ação de microorganismos patogênicos bucais. Estes autores descrevem que, embora o desenvolvimento de mucosite seja um processo dinâmico, a patogênese desta lesão pode ser dividida em cinco estágios: iniciação, resposta de danos primários, amplificação de sinal, ulceração e reparação.

Quebras na cadeia de DNA podem resultar em danos celulares diretos, tanto das células da camada basal quanto da lâmina própria. Simultaneamente, moléculas de oxigênio reativo (Reactive Oxygen Species – ROS) são produzidas em nível mitocondrial. Esses mediadores são compostos resultantes da ativação e redução do oxigênio molecular e, funcionalmente, decisivos para a ocorrência de eventos biológicos (Sonis, 2004, Sonis, 2007; Treisler, Woo, 2007; Gibson *et al.*, 2008; Lalla *et al.*, 2008; Logan *et al.*, 2007).

Em nossos estudos, sugerimos que a presença excessiva dessas moléculas poderia promover danos oxidativos nos tecidos da

mucosa bucal, causando aumento de suscetibilidade das células T (CD4 e CD8) a apoptose, e, conseqüentemente, dificultando a resposta imunológica frente aos microorganismos presentes na região estudada. Este processo foi comprovado nos estudos de Mosca *et al.* (2002), o qual foi ratificada em nossos achados devido ao limitado da células imunorreativas para células T (CD4) e (CD8) presentes na região mediana da lâmina própria. Além disso, acreditamos que os efeitos da ação do 5FU nas células T poderiam, também, corroborar para a diminuição da quantidade das células imunorreativas para os anticorpos CD4 e CD8, uma vez que pode ter sido afetado o processo de replicação em novas células T, repercutindo diretamente na deficiência da resposta imunológica do animal, estando de acordo com os achados de acordo com Xiong, Bosselut (2011). Esta deficiência pode ser evidenciada, de forma indireta, devido às graves manifestações gerais de saúde destes animais.

Com embasamento na seqüência de eventos da patofisiologia da mucosite oral, já descrita na literatura (Sonis, 2004), e na confluência dos aspectos histomorfológicos, encontrados nesta pesquisa, padronizamos quatro fases seqüenciais da dinâmica do processo de reparação de mucosite oral, induzida pelo 5-FU, tais como: inflamatória, proliferação celular, organização tecidual e reparo tecidual. Essas fases estão, também, correlacionadas com os períodos de observação (3, 7, 14 e 21 dias) analisados, independentemente da aplicação da MAH sobre a superfície cruenta da mucosite oral.

Destarte, fase I ou fase inflamatória (3 dias) foi caracterizada pela presença de extensas áreas de edema e necrose tecidual, além de numerosas células inflamatórias, predominantemente, polimorfonucleares. A fase II ou proliferação celulares (7 dias) apresentava intensa proliferação celular, composta por fibroblastos e fibrócitos, células endoteliais, vasos sanguíneos neoformados e células epiteliais neoformadas, objetivando a reepitelização da superfície cruenta.

Isto caracteriza o tecido de granulação com evidente neovascularização. A fase III ou organização tecidual (14 dias) exibia intensa celularidade, deposição de fibras colágenas com arranjo irregular, regressão de capilares e superfície totalmente re-epitelizada. A fase IV ou reparação tecidual (21 dias) mostrava maturação tecidual, exibindo grande quantidade de fibras colágenas com arranjo regular e remodeladas, além de poucos vasos sanguíneos. O quadro histológico mostrou extensas áreas de mucosa oral (epitélio e lâmina própria) e camada muscular subjacente, com aspecto normal.

Frente ao tratamento da mucosite oral com MAH (grupo 5-FU+MAH), constatamos similaridade na padronização do desenvolvimento da mucosite oral em relação ao grupo controle. Embora, no grupo 5-FU+MAH, no período de 21 dias, verificamos ainda pequenas áreas de tecido neoformado em fase de organização, sendo considerado Fase III, onde foram observadas numerosas células imunorreativas para PCNA. Todavia, em comparação com o grupo 5-FU, houve uma redução expressiva da severidade dos aspectos imunohistoquímicos da mucosite oral durante todos os períodos.

Na análise imunohistoquímica, houve significância estatística de diferentes níveis em relação ao número de células imunorreativas para os anticorpos PCNA, VEGF nos grupos estudados dos períodos de 3 e 7 dias, confirmando as fases de formação tecidual propostas, inflamatória (fase I) e de proliferação celular (fase II), respectivamente. Estas fases estão diretamente relacionadas com a quantidade de danos teciduais (grupos controle e 5FU) associadas aos efeitos da MAH e da irradiação laser (grupos 5FU-MAH, 5FU-Laser e 5FU-MAH+Laser).

Apesar do número de células imunorreativas para CD4 e CD8 apresentar pouca significância entre os grupos estudados nos diferentes períodos, evidenciou-se células imunorreativas na região analisada, principalmente, onde havia presença de tecido de granulação.

Este tecido, muitas vezes, não estava presente na região mediana da lâmina própria da mucosa, mas em áreas de transição com a camada muscular. Este fato foi devido a muitos espécimes exibirem extensas áreas de necrose tecidual. Observávamos que este quadro diminuía com a evolução do processo, independentemente do tratamento preconizado.

Portanto, nos grupos tratados com MAH ($P < 0,01$), independentemente da laserterapia, havia presença de tecido de granulação na região mediana da lâmina própria no período de 3 dias sendo foi observado significância no número de células imunorreativas para CD4 quando comparado com o grupo 5-FU, caracterizando com ênfase a fase inflamatória (Fase I) neste período. Acreditamos que isto ocorreu devido ao efeito protetor da MAH sobre a região cruenta, promovendo a preservação tecidual da região mediana lâmina própria e, conseqüentemente, a aceleração do processo de reparo. No 7º dia, constatamos que houve significância no número de células imunorreativas para CD4 em todos os grupos tratados, enquanto que as células imunorreativas para CD8 apresentaram significância nos grupos 5FU-laser e 5FU-MAH+laser em relação aos grupos controle e 5-FU. Diante disso, evidenciamos que a associação dos tratamentos preconizados foi imprescindível para a melhor resposta imunológica dos animais. Ratifica-se que a MAH atuou como barreira mecânica biológica e preservação de suas propriedades antiinflamatórias frente à ação dos microorganismos e a irradiação laser como bioestimulador celular.

É importante salientar que as células imunorreativas para PCNA e VEGF encontravam-se, principalmente, em áreas de proliferação e migração celular. Nas áreas de ulceração, principalmente no período de 3 dias, os referidos aspectos histológicos eram raramente observados nos grupos controle e 5-FU, mas, sim, no grupo 5FU-MAH e 5FU-MAH+Laser.

Isto poderia ter ocorrido devido à ação efetiva da preservação de fatores de crescimento e função de barreira biológica da MAH, favorecendo, positivamente, os mecanismos de proliferação celular

(PCNA) e de sinalização da proteína envolvida na angiogênese e vasculogênese (VEGF).

A permanência e, posteriormente, aderência da MAH na superfície cruenta da mucosa oral dos animais tratados com 5-FU foi imprescindível para impedir a entrada de microorganismos patógenos e a ação de suas citotoxinas na lâmina própria, atuando como uma barreira biológica e mecânica.

A partir do conhecimento da patofisiologia da mucosite oral, bem estabelecido na literatura (Sonis, 2004; Sonis, 2007; Treisler, Woo, 2007), acreditamos que este fato preservaria os danos as estruturas teciduais, uma vez que, haveria redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, que são extremamente prejudiciais aos tecidos do epitélio e conjuntivo, quando em concentração elevada. Em adição, baseado nos relatos da literatura, as atividades antiinflamatórias e angiogênicas da MAH poderiam ser os fatores coadjuvantes na aceleração do processo de reparação tecidual, uma vez que expressam proteínas antagonistas ao receptor de Interleucina-1 (IL-1) e inibidores teciduais de metaloproteinase -1,-2,-3,-4 e de IL-10 (Hao *et al.*, 2000) e da atividade quimiotática de neutrófilos e macrófagos (Kamiya *et al.*, 2005).

Outros efeitos benéficos da MAH, atribuídas nesta pesquisa, foram às funções de substrato e “andaime” de suporte para intensa proliferação celular.

Na superfície ulcerada, em destaque no período de 7 dias, remanescentes de MAH, de aspecto vítreo e homogêneo, encontravam-se incorporadas no tecido conjuntivo neoformado, bem como havia numerosas células imunorreativas para PCNA e VEGF em permeio a esta estrutura. Portanto, esta estrutura foi denominada, neste estudo, de “tecido âmnio-mesenquimal”.

Estes achados poderiam ocorrer devido às ações de alguns constituintes químicos, presentes na membrana amniótica. De acordo com o Dua *et al.* (2010), suas concentrações exatas e

biodisponibilidade ainda são desconhecidas. Este autor reforça que a MA tem sido valiosamente utilizada para promover reparação tecidual, prevenir cicatrizes, inibir vascularização e facilitar a reepitelização. Ademais, outros estudos descrevem que a MA é uma fonte abundante de células-tronco (Kim, Tseng., 1995; Alviano *et al.*, 2007; Toda *et al.*, 2007; Dua *et al.*, 2010), as quais poderiam melhorar as suas propriedades biológicas.

Dentre os fatores de crescimento mais relevantes da MA, encontrados na literatura, o TGF- β executa função importante na reparação tecidual de feridas cruentas e o EGF influencia na migração e regeneração de células epiteliais. Ademais, fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento hepático (HGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), dentre outros presentes na MA, também foram relatados na literatura, todavia com menor enfoque (Koizumi *et al.* 2000, Chang *et al.*, 2002; Gomes, 2007, Dua *et al.*, 2010). Em adição, citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, como IL-6, IL-10, IL-8 e IL-1ra (Interleukin 1 receptor antagonist), metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases, dentre outros, também são encontrados nesta membrana (Dua *et al.*, 2010).

Baseados nestes achados, acreditamos que estas proteínas, preservadas na MAH, influenciaram a dinâmica do processo de reparação do tecido epitelial e da lâmina própria das mucosites orais dos grupos 5FU-MAH e 5FU-MAH+Laser, mostrando-se mais rápida, quando comparada com o grupo 5-FU.

Em relação à ausência de rejeição da MAH no tratamento de mucosite oral, provocada pela indução de 5-FU, os nossos resultados coincidem com os resultados de Norris *et al.* (1982), Badawy *et al.* (1989), Fishman *et al.* (1987), Gage *et al.* (1988), Kim e Tseng (1995), Gomes *et al.* (2001 a, 2001 b), Paridaens *et al.* (2001), Stangogiannis-Druya *et al.* (2004), Elieser *et al.* (2006), Carvalho-Rego *et al.* (2008), Fallah *et al.* (2008), Seitz *et al.* (2009).

Em relação à atividade angiogênica, constatamos que houve aumento significativo do número de células imunorreativas para VEGF nos animais do grupo 5FU-MAH, 5FU-Laser e 5FU-MAH+Laser, em 3 e 7 dias (fases de inflamação proliferação celular), quando comparado com os grupos Controle e 5-FU. Todavia, não houve significância para células imunorreativas para VEGF dos grupos controle e 5FU, reforçando os achados de extensas áreas de necrose tecidual na lâmina própria. Este fato caracteriza a atividade angiogênica, tanto da MAH e da irradiação Laser, entretanto foi constatado que os animais tratados com MAH, associados ou não com irradiação laser, exibiam maior número de células imunorreativas para VEGF na lâmina própria quando comparada com os demais. Este fato corrobora com a afirmação de Faulk *et al.* (1980), Gage *et al.* (1988), Gomes *et al.* (2001b), Alviano *et al.* (2007) e Fallah *et al.* (2008), em relação à capacidade da membrana amniótica de estimular e promover a neovascularização de um tecido e/ou órgão.

O presente estudo mostra que este modelo experimental oferece uma variedade de oportunidades terapêuticas, os quais poderiam atuar em quaisquer fases histomorfológicas da mucosite oral, estabelecidas neste trabalho. Com o uso freqüente de protocolos quimioterápicos agressivos, a importância da mucosite, como uma toxicidade limitante, é extremamente relevante, sendo, portanto, seu controle uma prioridade na oncologia clínica.

Além disso, mais avanços para o melhor entendimento dos efeitos das propriedades biológicas da MAH na patobiologia da mucosite oral, em relação ao conjunto de complexos de ocorrência de interações entre muitas moléculas e vias, reforçarão a utilização desta membrana em feridas cruentas, como curativo biológico, incluindo-a, principalmente, nos protocolos de tratamentos efetivos das mucosites orais de pacientes oncológicos gravemente imunossuprimidos.

7 CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais deste trabalho, podemos concluir que:

- A Membrana Amniótica Homóloga (MAH) foi biocompatível, uma vez que promoveu boa aderência no local de sua aplicação e incorporou com o tecido hospedeiro, além de apresentar atividades mitogênica e angiogênica;
- A MAH, independentemente do tratamento com laserterapia, acelerou o processo de reparação tecidual, entretanto a laserterapia teve um papel de extrema relevância como tratamento coadjuvante da mucosite oral de ratos induzidos pelo 5FU, mediante análises histológica e imunohistoquímica.

8 REFERÊNCIAS¹

Abramoff MMF, Lopes NNF, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran EM, et al. Low-Level Laser Therapy in the Prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4):393-400.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Develop Biol.* 2007; 7(11):1-14.

Arora H, Pai KM, Maiya A, Vidyasagar MS, Rajeev A. Efficacy of He-Ne Laser in the prevention and treatment of radiotherapy-induced oral mucositis in oral cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(2):180-6.

Badawy SZ, Baggish MS, ElBakry MM, Baltoyannis P. Evaluation of tissue healing and adhesion formation after an intraabdominal amniotic membrane graft in the rat. *J Reprod Med.* 1989;34(3):198-202.

Bensadoun RJ. Low level laser therapy (LLLTL): A new paradigm in the management of cancer therapy-induced mucositis ?. *Indian J Med Res.* 2006; 124:375-378

¹ Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Birchall MA, Schock E, Harmon BV, Gobé G. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study. *Oral Oncol.* 1997;33:419-25.

Boc SF, Chairman EL, Freed EL. Implications for the use of amnion and chorion in podiatric medicine and surgery. *J Foot Surg.* 1985;4(24):236-41.
Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol.* 1987; 105(4):1549-54.

Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology.* 2010;11(8):666-73.

Carvalho-Rego PR, Gomes JA, Ballalai PL, Cunha MC, Sousa LB, Erwenne CM. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction after conjunctival squamous cell carcinoma resection. *Arq Bras Oftalmol.* 2008.;71(1):22-7

Chang DS, Seo SJ, Hong CK. The effect of amniotic membrane extract on the expression of iNOS mRNA and generation of NO in HaCaT cell by ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(6):280-6.

Dua HS, Rahman, Miri A, Said DG. Variations in amniotic membrane: relevance for clinical applications. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94(8):963-4.

Egan TJ, O'driscoll J, Thakar DR. Human amnion in the management of chronic ulceration of the lower limb: a clinico-pathologic study. *Angiology* 1983;34(3):197-203.

Eliezer RN, Kasahara N, Caixeta-Umbelino C, Pinheiro RK, Mandia C Jr, Malta RFS. Use of amniotic membrane in trabeculectomy for the treatment of glaucoma: a pilot study. *Arq Bras Oftalmol.* 2006;69(3):309-12.

Epstein JB, Tsang AHF, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucosites: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med oral Pathol* 2002;94(1):39-44.

Epstein J, Schubert MM. Oral mucositis in mielosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 1999;88(3):273-6.

Fallah MR, Golabdar MR, Amozadeh J, Zare MA, Moghimi S, Fakhraee G. Transplantation of conjunctival limbal autograft and amniotic membrane vs mitomycin C and amniotic membrane in treatment of recurrent pterygium. *Eye (Lond)*. 2008;22(3):420-24.

Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, Hsi BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet*. 1980;1(8179):1156-8.

Ferrara N, Gerber HP. "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis". *Acta Haematology*. 2002;106(4):148-56.

Ferreira PCC, Madrid N, Camargo PJT, Vianna MR. Membrana amniótica humana no tratamento da área doadora nos enxertos de pele das úlceras de perna. *Rev Bras Angiol Cir Vasc* 1986;16(4):178-83.

Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol* 1987;138(5):1291-4.

França CM, França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, et al. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 2009;94(1):25-31.

Franceschini C, Jung JE, Amante CJ. Mucosite oral pós-quimioterapia em pacientes submetidos á supressão de medula óssea. *Rev Bras Patol Oral*. 2003;2(1):40-3.

Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(6):358-66.

Gage FH, Blaker SN, Davis GE, Engvall E, Varon S, Manthorpe M. Human amnion membrane matrix as a substratum for axonal regeneration in the central nervous system. *Brain Res* 1988;72(2):371-80.

Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DMK. Technological advances in mucosists research: New insights and new issues. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(5):476-482.

Gomes MF, Nogueira TO, Sousa CCO, Navarro MFL, Consolaro A. Implantation of human amniotic membrane on dental socket wound healing process in rat. In: general session and exhibition of the iadr, 74., San Francisco – U.S.A., 13-17 March 1996. Abstract n.1652.

Gomes MF, Anjos MJS, Nogueira TO, Catanzaro-Guimarães SA. Histological evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2001a;16(4):563-571.

Gomes MF, Santos VW, Nogueira TO. Membrana Amniótica Humana Liofilizada sobre Feridas Cruentas em Áreas de Biópsia Bucal. *Revista da APCD* 2001b;55(5):327-331.

Gomes MF. Homogenous amniotic membrane as biological dressing in the liver regeneration and function in rats [Tese de livre-docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2007.

Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000;19(3):348-52.

Kamiya K, Wang M, Uchida A, Amano S, Oshika T, Sakuragawa N, et al. Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Exp Eye Res.* 2005;80:671–679.

Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*. 2007; 109(5):820-31

Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*. 1995;5(14):473-4.

Knox JJ, Puodziunas ALV, Feld R. Chemotherapy induced oral mucositis: prevention and management. *Drugs & Aging* 2000;17(4):257-67.

Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20(3):173-7.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients with cancer.. *Dent Clin North Am*. 2008; 52(1):61-77,viii.Review.

Lee YJ, Jamenson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends in Immunology*. 2011; 32 (2):50-6.

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

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh ASJ, Gibson RJ, Sonis ST, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*. 2007;33(5):448-60

Lopes CO, Mas JR, Amaro RZ. Low level laser therapy in the prevention of radiotherapy-induced xerostomia and oral mucositis. *Radiol Brás*. 2006;39(2):131-136.

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

Loureiro RM, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(1):77-89.

Matsumoto T, Mugishima H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb.* 2006 Jun;13(3):130-5.

McGuire DB. Mucosal tissue injury in cancer therapy. *Cancer Practice* 2002;10(4):179-191.

Meropol NJ, Somer RA, Gutheil J, Pelley RJ, Modiano MR, Rowinsky EK, et al. Randomized phase I trial of recombinant human keratinocyte growth factor plus chemotherapy: potential role as mucosal protectant. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1452-8.

Mosca L, Marcellini S, Perluigi M, Mastroiacovo P, Moretti S, Famularo G, et al. Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(7):1305-14.

Muskhelishvli L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissue with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem and Cytochem.* 2003; 51(12):1681-8.

Norris MA, Cohen MS, Warren MM, Becker SN, Baur Jr PS, Seybold HM. Bladder reconstruction in rabbits with glutaraldehyde-stabilized amniotic membranes. *Urology.* 1982; 19(6):631-5.

Oliveira MDC, Novellino ATN, Freitas RA. Expressão do PCNA em epitélio normal, hiperplásico e atípico de mucosa oral. *RPG Rev Pos Grad* 2000; 7:149-54.

Onerci M. The effects of lyophilized homograft amniotic membrane on wound healing on rabbits. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1991;11(5):491-6

Paridaens D, Beekhuis H, Van den Bosch W, Remeyer L, Melles G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(6):658-61

Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis 2004. *Cancer Treat Res*. 2004;117:3-32.

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

Ribatti D. El papel crucial del factor vascular de la permeabilidad/del factor endothelial vascular del crecimiento en angiogenesis: una revisión histórica. *Br. J. Haematol*. 2005,128(3):303-9.

Sandoval RL. Management of chemo-and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy laser: initial results of A.C. Camargo Hospital. *J. Appl. Oral Sci* 2003;11(4):337-41.

Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudás J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support Care Cancer*. 2011 Feb 22. [Epub ahead of print]. DOI 10.1007/s00520-011-1113-0.

Seitz B, Das S, Sauer R, Mena D, Hofmann-Rummelt C. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects in eyes after penetrating keratoplasty. *Eye*. 2009;23(4):840-8.

Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PH, Cristófaró M, et al. Laser Phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: Comparison between low and high/low Power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009; 41(4):264-70.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.* 1999;35(6):583-9.

Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol.* 2007; (9 Suppl 4):3-11. Review.

Sonis ST, Van Vugt AG, Brien JPO, Muska AD, Bruskin AM, Rose A, Et al. Transforming Growth Factor-P3 Mediated Modulation of Cell Cycling and Attenuation of 5-Fluorouracil Induced Oral Mucositis. *Oral Oncology* 1997;33(1):47-54

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

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews* 2004; 4(4): 277-84.

Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Diseases* 2010, 16:597-200.

Stangogiannis-Druya E, Martínez M, Paz LE, Márquez K, Stangogiannis-Druya C. Trasplante de membrana amniótica o auto injerto conjuntival en pterigión nasal recidivantes Hospital Universitario de Caracas. *Rev Oftalmol Venez.* 2004;60(4):181-7.

Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007;105(3):215-28

Treister N, Sonis S. Mucositis: biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 15:123–9.

Treister NS, Woo S-B. Chemotherapy-induced oral mucositis. Medscape [Internet]. [Cited 2011 Set 16]; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1079570-overview>.

Xiong Y, Bosselut R. The enigma of CD4-lineage specification. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(3): 568–574.

Yasukawa A, Ohrui H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of Low reactive-level laser therapy (LLLT) with Helium-Neon laser on operative Wound Healing in a rat model. *J Vet Med Sci.* 2007; 69(8):799-806.

ANEXO A - Certificado do comitê de ética em pesquisa

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Dr. Armando José Torres, 177 - Jd. São Diniz -
Cidade Universitária - São José dos Campos - SP - 13506-900
Fones: (12) 3047-8810 - aigotti@foc.usp.br / Carolina@foc.usp.br



CERTIFICADO Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **026/2007-PA/CEP**, sobre “Efeitos da Membrana Amniótica Homóloga associado ao laser Arseneto de Gálio-Alumínio ($\lambda=660$) na reparação de mucosite oral em ratos quimioterápicos: Análise histológica e Parâmetros bioquímicos da saliva”, sob responsabilidade de **MONICA FERNANDES GOMES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 22 de junho de 2007.

Prof. Dra. **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

ANEXO B- Protocolo da Imunohistoquímica

- 1) Desparafinização dos cortes em bandeja aquecedora a 60°C, por 30 minutos.
- 2) Desparafinização com xilol por vinte minutos
- 3) Hidratação dos cortes com álcool (absoluto, 90, 80, 70 e 50) por 5 minutos cada. Para o anticorpo CD4 foi usada sequência (absoluto, 70 e 50), duas vezes cada, por 3 minutos.
- 4) Passagem dos cortes na água destilada
- 5) Recuperação antigênica com tampão Tris em microondas, na potência 8, dois ciclos de 10 minutos. Para o anticorpo CD4, recuperação em tampão Tris-EDTA em câmara de Pascal (panela de pressão) a 95°C por 30 minutos e 125°C por 3:30 minutos.
- 6) Resfriamento dos cortes em temperatura ambiente e posterior disposição em câmara escura umidecida, própria para imunohistoquímica.
- 7) Duas lavagens de 5 minutos com Tris
- 8) Inibição da peroxidase endógena com H₂O₂ a 1%, por 30 minutos
- 9) Incubação em Tris-Triton por 15 minutos
- 10) Lavagem com Tris por 5 minutos
- 11) Incubação em BSA por 30 minutos
- 12) Lavagem com Tris
- 13) Incubação em anticorpo primário por 2 horas (PCNA 1:100; VEGF 1:20; CD4 e CD8 1:50).
- 14) Lavagem com Tris por 5 minutos
- 15) Incubação em anticorpo secundário (Kit LSAB) por 10 minutos cada.
- 16) Lavagem com Tris por 5 minutos
- 17) Revelação com DAB por 1 minuto. Para CD4, 2 minutos.
- 18) Contracoloração dos cortes com Hematoxilina de Mayer
- 19) Montagem das lâminas