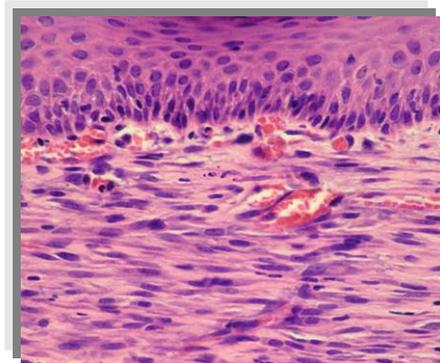


NANCY TOMOKO SACONO

## USO DE LED VERMELHO EM MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA



Orientador:

**Prof. Dr. Fabio Cesar Braga de Abreu-e-Lima**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

Araraquara

2007

NANCY TOMOKO SACONO

**USO DE LED VERMELHO EM MUCOSITE INDUZIDA POR  
QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Concentração Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

**Prof. Dr. Fabio Cesar Braga de Abreu-e-Lima**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

Araraquara

2007

Sacono, Nancy Tomoko

Uso de LED vermelho em mucosite induzida por quimioterapia  
/ Nancy Tomoko Sacono. – Araraquara : [s.n.], 2007.

161 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia.

*Orientador: Prof. Dr. Fabio Cesar Braga de Abreu-e-Lima*

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Fototerapia 2. Neoplasias 3. Quimioterapia 4. Fluoruracila  
5. Mucosa bucal 6. Hamsters I. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAQUARA

**Nancy Tomoko Sacono**

**USO DE LED VERMELHO EM MUCOSITE INDUZIDA POR  
QUIMIOTERAPIA**

COMISSÃO EXAMINADORA  
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

**Presidente:** Prof. Dr. Fabio Cesar Braga de Abreu-e-Lima

**2° Examinador:** Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

**3° Examinador:** Profa. Dra. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli

Araraquara

2007

## Dados Curriculares

### **Nancy Tomoko Sacono**

NASCIMENTO	19 de setembro de 1977 – São Paulo/SP
FILIAÇÃO	Tomoti Sacono Tomiko Sacono
1999/2002	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003/2004	Estágio de Atualização na Disciplina de Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005/2007	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

# *Dedicatória*

---

## **À Deus**

Presente em todos os momentos da minha vida, me abençoando e atendendo minhas preces...

## **PEGADAS NA AREIA**

Uma noite tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

## *Dedicatória*

---

Aos meus pais, **Tomiko e Tomoiti**

Agradeço por todo o esforço feito para que eu chegasse até aqui. Anos de muito trabalho e dedicação no Japão para que eu tivesse a oportunidade de estudar, de me formar e fazer a tão sonhada pós-graduação. Agradeço também por todo amor, confiança e incentivo. Espero um dia conseguir retribuir tudo que fizeram por mim. Amo muito vocês!

À minha irmã, **Cintia**

Que há tantos anos não vejo! Que está lutando por um futuro melhor, fora do nosso país. Sempre me incentivando a buscar os meus sonhos. Muitas saudades...

À minha sobrinha querida **Megumi** e ao meu cunhado **Demyson**

Por fazerem minha irmã tão feliz. É muito bom saber que ela está rodeada por pessoas que a amam e que constituiu uma linda família.

Ao meu namorado **Rodrigo**

Pelos quase oito anos de namoro, sempre com muito companheirismo. Mesmo distante, está sempre presente, sempre se preocupando comigo, me dando muito carinho e amor. Obrigada por todas as viagens feitas para Araraquara, pelo incentivo e por toda a compreensão. Você é meu porto seguro. Te amo!

## *Agradecimentos especiais*

---

### **Ao Prof. Dr. Fabio Cesar Braga de Abreu-e-Lima**

Agradeço pela orientação dada a esta dissertação, por tudo que me ensinou e pela paciência quando aparecia em sua sala “desesperada” com a tese. Obrigada por ter me acalmado nos momentos mais difíceis, por buscar os hamsters em Paulínia para mim, pela companhia nas idas à São Carlos, enfim, pelo companheirismo e por toda serenidade que sempre me transmitiu.

### **Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

Muito obrigada por todos os ensinamentos transmitidos, pela ajuda no delineamento experimental, pela análise histopatológica, pelo incentivo à pesquisa e por todos os conselhos valiosos. Admiro-o como pesquisador, um exemplo de dedicação à pesquisa. Nestes últimos anos tive a oportunidade de conhecê-lo melhor como pessoa e minha admiração cresceu ainda mais quando percebi o ser humano que é.

### **À Junia Carolina Linhares Ferrari**

Por ter me ensinado, com tanta paciência, a metodologia adotada neste trabalho. Sua tese serviu de base para a minha e sem sua ajuda, grandiosa, nunca conseguiria terminar a pesquisa. Você sempre foi um exemplo de persistência para mim e eu te considero como minha “co-orientadora”. Muito obrigada por tudo!

## *Agradecimentos*

---

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, nas pessoas da Diretora **Profª Drª Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio** e vice-diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria **Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro**, pela convivência sempre próxima e agradável. Sempre muito solícitos e gentis.

Às minhas amigas do curso de mestrado **Cármén, Juliana, Michele e Simone** por todos os momentos compartilhados nas dificuldades e nas alegrias. Sempre unidas e ajudando-nos umas às outras. Obrigada Cármén por ser essa pessoa tão educada e carinhosa. Obrigada Ju pela companhia no laboratório de Patologia quer seja nos feriados ou nos fins de semana. Obrigada Mi pelo companheirismo, pela bondade, sempre disposta a ajudar quem precisa. Obrigada Si pela amizade e alegria, pelas conversas até altas horas para aliviar o estresse e pela companhia no Biotério.

## *Agradecimentos*

---

Aos amigos de Pós-graduação **Andreza, Emi, Érika, Fábio, Fernanda, Hermes, Jonas, Luciana, Murilo e Pedro** pela amizade e convivência compartilhadas durante o curso de mestrado.

Às professoras **Elisa Maria Aparecida Giro e Rita de Cássia Loiola Cordeiro** e à amiga **Fernanda Campos Rosetti Lessa** pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, em que o experimento não dava certo, pelos conselhos e incentivos para recomeçar novamente.

Ao amigo **João Fernando Kina** pelas conversas e conselhos que sempre me ajudaram muito, pela força que me animava nos momentos difíceis e pelas palavras de apoio.

À **Camila Fávero de Oliveira** pela ajuda no Biotério, sempre disposta e com muita alegria e alto astral. “Qualquer coisa você grita, viu?”

Às amigas **Cristiane Duque, Cristiane Motisuki e Célia Lanza** pelo incentivo à pesquisa.

Aos amigos **Ewerton, Mari, Lívia e “Marcinha”**, pelo apoio constante, pelas discussões com relação à pesquisa e pelas conversas reconfortantes. Muito obrigada pelo carinho de vocês.

## *Agradecimentos*

---

Aos funcionários do laboratório de ortodontia **Pedrinho e Toninho**, obrigada por sempre me emprestarem alicates e moldeiras quando precisava.

Às secretárias do Departamento de Clínica Infantil **Celinha e Soninha** por sempre estarem disponíveis a ajudar.

À **Dona Odete, Dulce, Silvia e Cristina** pela convivência durante as clínicas e pela amizade construída ao longo desses anos de graduação, estágio e mestrado.

Ao técnico de laboratório **Pedrinho** pela ajuda preciosa durante a realização da parte histopatológica deste trabalho.

Às técnicas **Sônia e Juliana** pela ajuda fornecida sempre que precisei. Obrigada Ju pelos artigos on-line enviados por e-mail.

Aos professores do CEPOF (IFSC/USP) **Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli e Vanderlei Salvador Bagnato** pelos valiosos ensinamentos quanto à luz laser e ao LED e por sempre estarem dispostos a ajudar e esclarecer possíveis dúvidas.

## *Agradecimentos*

---

À amiga **Juçáira Stella Martins Giusti** pela ajuda na interpretação dos resultados histopatológicos dos efeitos causados pela aplicação do LED.

Aos amigos do IFSC/USP **Lilian Tan Moriyama e Denis Pablo Jacomassi** pela ajuda na realização do mapeamento térmico da mucosa jugal dos animais.

A todos os vigias e amigos da portaria desta faculdade (**Eliezer, Euclides, Gea, Guiomar, Luis, Marta, Noêmia e Nunes**) pela amizade, desde a graduação, pelas conversas à noite, pela preocupação quando saía de madrugada do laboratório, pelos lanchinhos “filados” e por todo carinho que sempre tiveram comigo.

A todos os funcionários da seção de Pós-graduação, em especial para **Mara** por toda atenção e carinho com que nos atende. Sempre alegre, de bom humor e de bem com a vida.

A todos os funcionários da Biblioteca, em especial para **Adriano, Eliane, Maria Inês e Silvia** pela convivência sempre agradável e pelos bate-papos no balcão e para **Maria Helena Matsumoto Komasti Leves** pela revisão e correção das referências bibliográficas deste trabalho.

## *Agradecimentos*

---

Ao estaticista **Olympio Teixeira Neto** pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

A **CAPES** pela disponibilidade de bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

## Sumário

Resumo.....	16
Abstract.....	18
1 Introdução.....	20
2 Revisão da literatura.....	26
2.1 Desenvolvimento da mucosite.....	26
2.2 Prevenção e tratamento da mucosite.....	40
2.3 Utilização da luz para o tratamento de feridas.....	58
2.3.1 Laser terapêutico para redução da incidência e severidade da mucosite.....	61
2.3.2 LED vermelho para redução da incidência e severidade da mucosite.....	66
3 Proposição.....	69
4 Material e método.....	71
4.1 Procedimentos operatórios.....	71
4.2 Avaliação clínica da mucosa.....	78
4.3 Avaliação histológica da mucosa.....	80
4.4 Resumo dos procedimentos.....	84
4.5 Planejamento estatístico.....	84
5 Resultado.....	88
5.1 Avaliação clínica da mucosa.....	88
5.1.1 Estudo da concordância.....	88
5.1.2 Comparação em função dos grupos.....	91

5.1.3	Comportamento em função do tempo.....	94
5.2	Avaliação dos animais.....	100
5.2.1	Alterações de peso corporal.....	100
5.2.2	Taxa de mortalidade.....	101
5.3	Avaliação histológica da mucosa.....	102
5.3.1	Comparação em função dos grupos.....	102
5.3.2	Comportamento em função do tempo.....	104
5.4	Correlações.....	113
5.5	Mapeamento térmico da mucosa jugal dos animais.....	115
6	Discussão.....	118
7	Conclusão.....	137
8	Referências.....	139
	Anexos.....	153



**Resumo**



Sacono NT. Uso de LED vermelho em mucosite induzida por quimioterapia [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

## **Resumo**

A mucosite é uma das complicações orais mais incidentes relacionadas à quimioterapia, que provoca ulcerações, dor, dificuldade de alimentação e pode levar à interrupção do tratamento antineoplásico. O objetivo deste estudo foi testar o efeito do LED (Ligth Emitting Diode) no tratamento da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters. Os animais do grupo experimental (G1) e do grupo controle (G2) receberam injeção de 5-fluoruracila nos dias 0 e 2 do experimento e tiveram as mucosas direita e esquerda arranhadas nos dias 3 e 4. O G1 recebeu tratamento com LED (630 nm, 160 mW, 12 J/cm<sup>2</sup>) durante 37,5 segundos nos dias 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. A mucosa jugal foi evertida e fotografada a cada dois dias a partir do dia 4 até o dia 14. As fotografias foram classificadas por meio de uma escala de acordo com o grau de severidade da mucosite (0 a 5). O G2 não recebeu tratamento. O grupo controle negativo (G3) não foi submetido à indução de mucosite. Nos dias 5, 9, 13 e 14, as mucosas de 8 animais (G1 e G2) foram removidas para avaliação histopatológica. A análise estatística demonstrou haver diferenças significantes entre o grupo tratado com LED e o grupo não tratado ( $p < 0,05$ ) quando se comparou a severidade da mucosite, apesar de a avaliação histopatológica ter demonstrado degeneração muscular em aproximadamente 18% da amostra (G1). A aplicação do LED nos parâmetros utilizados neste estudo foi efetiva na redução da severidade da mucosite oral e na cicatrização das lesões, embora não tenha prevenido completamente o surgimento das mesmas.

Palavras-chave: Fototerapia; neoplasias; quimioterapia; fluoruracila; mucosa bucal; hamsters.



**Abstract**



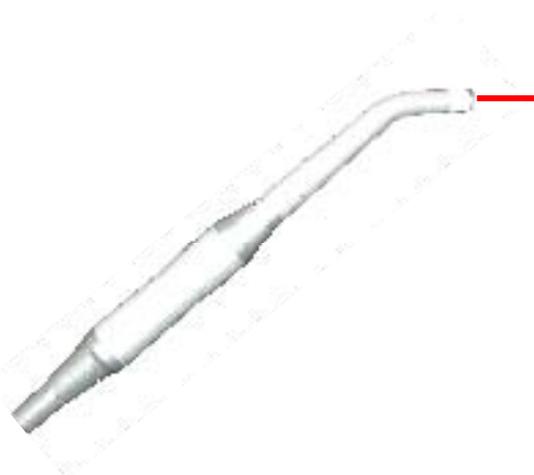
Sacono NT. LED therapy in chemotherapy-induced mucositis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

## **Abstract**

Mucositis is the most common oral complication of cancer chemotherapy that causes pain and impairs patient's ability to eat, swallow and may determine interruption of the treatment. The aim of this study was to evaluate the effect of LED (Ligth Emitting Diode) therapy on chemotherapy-induced mucositis in hamsters. The animals of both experimental (G1) and positive control group (G2) received intraperitoneal injections of 5-fluorouracil on days 0 and 2. All animals had right and left oral mucosa irritated by superficial scratching on days 3 and 4. The G1 received LED irradiation (630 nm, 160 mW, 12 J/cm<sup>2</sup>) during 37,5 seconds at days 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 14. The cheek pouches were everted and photographed from day 4 until 14 at 2-day intervals. Photographs were randomly scored according to the severity of induced mucositis (0 to 5). The G2 received no treatment. The negative control group (G3) received no mucositis induction. The cheek pouches of 8 animals (G1 and G2) were dissected for histopathological examination on days 5, 9, 13 and 15. The statistical analysis showed significant differences between treated and non-treated groups ( $p < 0,05$ ), although histopathological findings have demonstrated muscular degeneration in 18% of the sample (G1), approximately. These results pointed out that LED therapy protocol established for this study was effective to reduce the severity of oral mucositis and accelerated the healing process, although it has not completely prevented the appearance of oral lesions.

**Keywords:** Phototherapy; neoplasms; drug therapy; fluorouracil; oral mucosa; hamsters.

# Introdução



## 1 Introdução

As doenças neoplásicas malignas constituem uma das principais causas de mortalidade mundial, sendo preocupante o alto índice de ocorrência de câncer atualmente. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), para o ano de 2006 estimou-se a ocorrência de 472.050 novos casos de câncer no Brasil (Ministério da Saúde<sup>11</sup>, 2005). Entretanto, a evolução da ciência e da medicina tem amenizado esse quadro. O câncer já não é, necessariamente, uma sentença de morte. Com avanços no diagnóstico e no tratamento, muitos casos podem ser curados.

Além das cirurgias para remoção de tumores e do transplante de medula óssea, a medicina lança mão de outros tipos de tratamento visando à destruição das células tumorais, como é o caso da quimioterapia e da radioterapia que podem ser realizadas em conjunto ou isoladamente. Porém, a quimioterapia constitui a escolha mais freqüente dentre as terapias contra o câncer (Mealey et al.<sup>44</sup>, 1994) por atuar de forma sistêmica e alcançar células neoplásicas em qualquer região do corpo. No entanto, os quimioterápicos agem não somente nas células tumorais, mas também nas células saudáveis com rápida proliferação, como é o caso das células presentes na cavidade oral, sem fazer distinção entre elas (Guggenheimer et al.<sup>28</sup>, 1997; McGuire<sup>43</sup>, 2002).

A mucosite oral é uma das complicações mais freqüentes relacionadas tanto à quimioterapia quanto à radioterapia (Rubenstein et al.<sup>54</sup>, 2004). É uma alteração de caráter inflamatório que torna a mucosa mais delgada e, portanto, mais vulnerável a ocorrência de ulcerações (Spijkervet, Sonis<sup>69</sup>, 1998; Epstein et al.<sup>22</sup>, 2002). Acomete, geralmente, superfícies não-queratinizadas como as mucosas jugal e labial, assoalho da boca, palato mole e superfícies ventral e lateral da língua (Parulekar et al.<sup>52</sup>, 1998; Epstein, Schubert<sup>21</sup>, 1999; Scully et al.<sup>57</sup>, 2006).

Quando presente, a mucosite provoca dor e desconforto, dificuldade na alimentação e na ingestão de medicamentos por via oral, aumento no tempo de internação bem como aumento dos gastos durante o tratamento contra o câncer (Worthington, Clarkson<sup>76</sup>, 2002). Pacientes que apresentam quadros de mucosite oral podem necessitar de cuidados adicionais como nutrição via parenteral, administração de analgésicos de ação central (narcóticos), modificação do esquema terapêutico com alteração da dose ou até interrupção da quimioterapia, comprometendo assim o tratamento antineoplásico (Sonis<sup>59</sup>, 1998; Spijkervet, Sonis<sup>69</sup>, 1998).

Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas no campo da biologia molecular utilizando-se agentes com ação específica no epitélio da mucosa oral, como a interleucina-11 (IL-11), o fator de transformação de crescimento- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3), o fator de crescimento keratinocítico (Palifermina) e o fator estimulante de colônia de granulócito-

macrófago (GM-CSF) (Sonis et al.<sup>61</sup>, 1992; Sonis et al.<sup>63</sup>, 1995; Sonis et al.<sup>67</sup>, 1997; Hejna et al.<sup>31</sup>, 2001; Spielberger et al.<sup>68</sup>, 2004). Porém, existem vários procedimentos descritos na literatura que são, na realidade, tratamentos paliativos para a mucosite e incluem cuidados com a higiene oral, bochechos com soluções anti-sépticas e agentes antimicrobianos para evitar infecções secundárias, uso de antiinflamatórios, analgésicos tópicos e sistêmicos para alívio da dor, antioxidantes tópicos, agentes de proteção e revestimento da mucosa, vitaminas e crioterapia com a utilização de cubos de gelo (Worthington, Clarkson<sup>76</sup>, 2002; Duncan, Grant<sup>19</sup>, 2003; Stokman et al.<sup>71</sup>, 2006). A maioria desses estudos não apresenta resultados consistentes e as terapias testadas não trazem grandes benefícios para a prevenção e/ou tratamento da mucosite (Spijkervet, Sonis<sup>69</sup>, 1998; Worthington, Clarkson<sup>76</sup>, 2002). Conseqüentemente, a pesquisa por novas terapias que atuem não somente no alívio dos sintomas, mas também na prevenção e na redução efetiva da mucosite oral é de extrema importância.

O laser de baixa intensidade tem sido estudado como alternativa para o tratamento e a prevenção da mucosite induzida por quimioterapia. A interação da luz laser com o tecido promove a biomodulação da atividade celular resultando em aceleração da cicatrização, modulação da inflamação e supressão da dor (Karu<sup>34</sup>, 1989; Karu et al.<sup>36</sup>, 1995; Karu<sup>35</sup>, 1999; Almeida-Lopes et al.<sup>3</sup>, 2001; Bensadoun, Ciais<sup>6</sup>, 2002). Os resultados das pesquisas demonstraram que a

laserterapia reduz a severidade das lesões (Barasch et al.<sup>5</sup>, 1995; Cowen et al.<sup>15</sup>, 1997; Bensadoun et al.<sup>7</sup>, 1999; Sandoval et al.<sup>56</sup>, 2003), previne o desenvolvimento das alterações, acelera o processo de cicatrização (Bensadoun et al.<sup>7</sup>, 1999; Wong, Wilder-Smith<sup>75</sup>, 2002) e diminui a sintomatologia dolorosa causada pela mucosite oral (Nes, Posso<sup>50</sup>, 2005).

O diodo emissor de luz (LED – *light emitting diode*) é um outro tipo relativamente novo de fonte de luz que tem sido utilizado em substituição à luz laser. Estudos recentes têm demonstrado que o LED pode exercer um efeito curativo semelhante ao laser em feridas de pele e de mucosa (Whelan et al.<sup>73</sup>, 2003), constituindo-se, assim, em uma alternativa mais acessível que a laserterapia. Porém, poucas evidências têm sido encontradas sobre os efeitos bioestimulantes do LED, embora alguns estudos *in vitro* sugiram que exista um aumento da proliferação de fibroblastos (Vinck et al.<sup>72</sup>, 2003). Com relação a mucosite oral, o LED aplicado antes do tratamento quimioterápico usual demonstrou um forte efeito preventivo além de ser capaz de induzir uma significativa redução de dor em pacientes pediátricos submetidos a transplante de medula óssea (Whelan et al.<sup>74</sup>, 2002). Em um estudo mais recente, Corti et al.<sup>14</sup> (2006) demonstraram que a aplicação do LED vermelho (645 nm) foi segura e capaz de reduzir a duração da mucosite oral induzida por quimioterapia em pacientes com tumor hematológico.

O pequeno número de estudos nos quais foi avaliada a ação do LED terapêutico na redução da incidência e da severidade da

mucosite representa um estímulo para a investigação do efeito desta modalidade terapêutica no reparo da mucosite oral. Além disso, ainda não existem protocolos bem definidos em relação aos melhores parâmetros para uso da terapia de baixa intensidade com LED, sendo importante a realização de estudos para se definir doses ideais de irradiação, potência e comprimento de onda e se conhecer melhor os efeitos biológicos causados pela interação entre o LED e o tecido a ser tratado.

# Revisão da literatura



## **2 Revisão da literatura**

### **2.1 Desenvolvimento da mucosite**

Para melhor investigar o processo de mucosite oral, Sonis et al.<sup>62</sup>, em 1990, descreveram um modelo animal de indução de mucosite por quimioterapia que mimetiza as condições observadas em seres humanos. Foram utilizados 20 hamsters Sírios Dourados com pesos entre 91 e 100 g e 2 meses de idade. Os animais receberam injeções intraperitoneais de 5-fluorouracil (5-FU) nos dias 0, 5 e 10, na dose de 60 mg/kg. A dose e a frequência de aplicação do quimioterápico (5-FU) foram determinadas em um estudo piloto prévio que comprovou o desenvolvimento de mucosite com mínima morbidade e mortalidade utilizando-se esse esquema terapêutico. Para reproduzir o efeito de uma irritação crônica, a mucosa jugal dos animais foi evertida e superficialmente arranhada com uma agulha durante um, dois ou três dias. Um grupo de 4 animais serviu como controle e recebeu somente a irritação superficial da mucosa jugal durante três dias. Os animais foram pesados e anestesiados com éter, diariamente, para que as mucosas fossem evertidas e fotografadas. Dois animais de cada grupo, tratados com 5-FU, foram aleatoriamente selecionados para o sacrifício nos dias 0, 2, 5, 10, 12, 14 e 16 para realização de coleta de sangue e biópsia excisional da mucosa jugal. Três dias após exposição inicial ao 5-FU foi observado eritema na mucosa de 4 animais sem sinais de ulceração do epitélio. No dia 5 (segunda injeção de 5-FU), observou-se eritema com

áreas localizadas de abscesso. No dia 7 houve ruptura do epitélio e ilhas de necrose. No dia 9 notou-se progressão do quadro caracterizado por amplas áreas de ruptura do epitélio e necrose superficial. No dia 16 quase todas as mucosas estavam completamente cicatrizadas. Os animais do grupo controle apresentaram somente irritação na mucosa e, ocasionalmente, formação de abscessos superficiais com cura espontânea entre 24 e 48 horas. A análise das células brancas mostrou intensa mielossupressão no dia 10, indicativo de leucopenia profunda. Microscopicamente, observou-se epitélio paraqueratótico e áreas de degeneração hidrópica entre os dias 2 e 5 do experimento. Os capilares apresentaram-se dilatados e preenchidos por eritrócitos. Houve presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos bem como um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares nas regiões de abscesso. Além disso, diferenças significantes foram observadas nos animais sacrificados nos estágios mais tardios do experimento (dia 14). A característica mais marcante deste período foi a destruição epitelial caracterizada por franca ulceração. Entretanto, o infiltrado inflamatório não foi tão intenso quanto o esperado. Também foram observadas áreas de infecção relacionadas a extensas áreas de degeneração tecidual, caracterizadas por colônias de microrganismos e epitélio necrótico.

Após o estabelecimento de um modelo animal de indução de mucosite, Sonis et al.<sup>61</sup>, em 1992, realizaram um estudo para verificar se a taxa de renovação do epitélio oral é o principal fator na determinação

da susceptibilidade da mucosa aos efeitos estomatotóxicos da quimioterapia. Sessenta hamsters receberam injeção intraperitoneal de 5-FU na dose de 60 mg/kg de peso nos dias 0 e 5 e irritação da mucosa no dia 7 para a indução da mucosite. O fator de crescimento epidermal, uma citocina capaz de estimular a proliferação epitelial, foi aplicado topicamente na mucosa esquerda por meio de um dispositivo apropriado. A presença do fator de crescimento interferiu no curso e na severidade da mucosite. Os animais que receberam a citocina apresentaram mucosite mais severa e durante um tempo mais prolongado quando comparados aos animais que receberam placebo. Observou-se, também, uma relação direta entre a severidade da mucosite e a perda de peso dos animais. Os autores sugerem que uma terapia visando inibição ou redução da taxa de proliferação epitelial da mucosa seria um tratamento efetivo para a prevenção da mucosite oral.

Porém, para que a eficácia de uma determinada terapia seja corretamente avaliada, é necessária a realização de um adequado acompanhamento da regressão dos sinais e sintomas da mucosite oral por meio de sistemas de classificação das lesões. Em 1998, Parulekar et al.<sup>52</sup>, publicaram uma revisão de literatura sobre os sistemas de classificação da mucosite. Apesar de haver um grande número de classificações para a mucosite, nenhum sistema é universalmente aceito. O desenvolvimento de uma escala de classificação adequada é importante para a documentação correta dos efeitos colaterais causados

pelos tratamentos antineoplásicos, serve como instrumento de comparação entre diferentes modalidades terapêuticas para a mucosite oral, além de ser útil para o acompanhamento da morbidade, mortalidade e qualidade de vida do paciente durante as terapias contra o câncer. Segundo os autores, um bom sistema de classificação deve ter validade, confiabilidade e reprodutibilidade intra e inter examinadores adequados. Os autores encontraram na literatura sistemas de classificação para mucosite oral que se enquadram, basicamente, em duas categorias: sistemas baseados na aparência geral da cavidade oral, utilizando escalas de 4 a 5 pontos e sistemas que avaliam vários parâmetros relacionados a saúde bucal, função do sistema estomatognático e morbidade. Os métodos mais utilizados de classificação são aqueles desenvolvidos por órgãos especializados como, por exemplo, o World Health Organization (WHO), National Cancer Institute (NCI), Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) e National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG). Porém, mesmo utilizando os parâmetros dessas instituições, os níveis de classificação ainda diferem muito. Alguns incluem a habilidade de alimentação do paciente e outros, a necessidade de analgésicos ou narcóticos. Outro fator limitante para comparações diretas entre os sistemas de classificação é a terminologia utilizada para descrever os sinais da mucosite. Por exemplo, uma úlcera pode ser intitulada como “desnudação da mucosa” ou “ponto de confluência da mucosite”. A maioria dos sistemas foca as mudanças

físicas da mucosa oral, mas alguns associam essas mudanças à função e fatores qualitativos subjetivos. O Oral Assessment Guide possui oito categorias para avaliar o estado geral do paciente: voz, deglutição, lábios, língua, saliva, membrana mucosa, gengiva e dentes ou área de apoio de próteses. Após uma extensa revisão, os autores chegaram à conclusão de que é muito difícil desenvolver uma única escala para classificação da mucosite que seja apropriada para todas as situações clínicas, devido à diversidade de tratamentos oncológicos existentes e seus efeitos adversos. Porém, com o avanço da ciência e da medicina, novos tratamentos contra o câncer surgem freqüentemente, tornando necessário um método efetivo de acompanhamento do impacto dessas novas modalidades terapêuticas na qualidade de vida dos pacientes.

McCarthy et al.<sup>42</sup>, em 1998, em um estudo cohort prospectivo, investigaram fatores associados ao desenvolvimento de mucosite em pacientes recebendo tratamento com 5-FU para câncer no trato digestivo. O 5-FU é o quimioterápico mais indicado para o tratamento desse tipo de malignidade. Seu mecanismo de ação está diretamente ligado à síntese de DNA, podendo interferir também nos processos biológicos relacionados ao RNA. A privação de DNA e RNA atinge, principalmente, células com alto índice de mitose incluindo tecido normal e com rápida proliferação celular. Por essa razão o 5-FU está associado a altos índices de desenvolvimento de mucosite oral e intensa mielossupressão. Vários fatores podem interferir na incidência, freqüência

e duração da mucosite, como por exemplo, o protocolo quimioterápico, o fluxo salivar, o tipo de câncer, dentre outros. Sessenta e três pacientes fizeram parte deste estudo que teve como objetivos mensurar a frequência de mucosite oral em pacientes recebendo 5-FU para o tratamento de câncer no trato digestivo e identificar fatores de risco associados a mucosite oral. A hipótese nula testada foi de que não existe diferença significativa na frequência de mucosite oral de pacientes tratados com 5-FU com e sem quadro de xerostomia. No início do experimento os pacientes fizeram uma entrevista e passaram por uma anamnese detalhada para a identificação de dados sócio-demográficos, presença de diabetes, hábito de fumar, consumo de álcool, regime terapêutico do tratamento de câncer, distúrbios hematológicos e outras complicações sistêmicas. Um exame intra-oral também foi realizado para verificação do nível de higiene e presença de prótese. O fluxo salivar foi medido para determinação da presença de xerostomia (fluxo  $\leq 0,1$  ml/min). A titulação de anticorpos para o vírus do herpes simples também foi realizada utilizando-se testes imunológicos com enzimas. Os pacientes foram acompanhados clinicamente por dois meses. O critério de diagnóstico da mucosite foi ulceração ou inflamação na mucosa oral durante o tratamento quimioterápico. Quando presente, a mucosite foi classificada de acordo com as recomendações do World Health Organization (WHO). Quarenta e seis por cento dos participantes desenvolveram ao menos um episódio de mucosite oral durante o

tratamento citotóxico. Os pacientes submetidos ao tratamento com 5-FU desenvolveram mais mucosite quando comparados àqueles submetidos ao tratamento com 5-FU associado a Levamisole, leucovorine ou cisplatina. Houve uma associação estaticamente significativa entre o desenvolvimento de mucosite e pacientes com contagem de neutrófilos abaixo de  $4000 \text{ cel/mm}^3$  e fluxo salivar reduzido. Os autores concluíram, portanto, que a xerostomia e a neutropenia são fatores de risco significativamente associados ao desenvolvimento de mucosite oral e que esses fatores devem ser levados em consideração no delineamento experimental de trabalhos que pesquisam a diminuição da freqüência e da severidade da mucosite oral induzida por 5-FU.

Sonis<sup>59</sup>, em 1998, formulou uma hipótese baseada em dados clínicos e estudos em animais para explicar o desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterapia. Segundo o autor, a mucosite é um processo biológico complexo que ocorre em quatro fases: *fase vascular/inflamatória*, *fase epitelial*, *fase ulcerativa/bacteriológica* e *fase de cicatrização*.

Na primeira fase, os agentes quimioterápicos promovem a liberação de citocinas inflamatórias pelo epitélio como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  é capaz de causar danos teciduais e promover o início e a aceleração do processo de mucosite. Já a IL-1 exacerba a resposta inflamatória resultando em aumento da vascularidade sub-epitelial o que leva a uma elevação da

concentração dos agentes citotóxicos na mucosa. A fase epitelial é a mais crítica para o surgimento de úlceras, pois ocorre uma redução da renovação epitelial resultando em atrofia do tecido. Uma vez que o tecido se torna atrófico e a renovação é inibida, traumas funcionais levam ao surgimento de ulcerações na mucosa. Áreas eritematosas podem ser observadas como resultado da combinação entre o aumento da vascularidade e a redução da espessura do epitélio. Essa fase inicia-se em 4 ou 5 dias após a administração do quimioterápico. A fase ulcerativa é a mais sintomática e a mais complexa biologicamente, representando grande impacto na qualidade de vida do paciente. Nessa fase, tanto fatores intrínsecos como extrínsecos podem interagir contribuindo para a severidade da mucosite. As úlceras surgem, aproximadamente, uma semana após o início da quimioterapia e caracterizam-se por áreas erosivas recobertas por uma pseudomembrana fibrinosa. Além disso, as áreas de úlceras podem ser colonizadas por bactérias levando a infecções secundárias no tecido. A partir deste quadro, endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeos) penetram no tecido causando uma liberação adicional de IL-1 e TNF- $\alpha$  e a produção de óxido nítrico, amplificando ainda mais o processo de injúria da mucosa. A fase final da mucosite está relacionada ao processo de reparo da lesão. Ocorrem, então, processos como proliferação e diferenciação celular, normalização de células brancas e controle da flora bacteriana local.

No mesmo ano (1998), Pico et al.<sup>53</sup> publicaram um artigo no qual apresentam alguns aspectos como ocorrência, conseqüências e tratamento da mucosite baseados na literatura corrente. Os autores classificam os efeitos mucotóxicos dos agentes quimioterápicos em diretos e indiretos. A ação direta da quimioterapia resulta na inibição da replicação do DNA e da proliferação celular da mucosa, levando a eventos biológicos já descritos por Sonis<sup>59</sup> (1998). A ação indireta consiste na mielossupressão causada pelos agentes quimioterápicos comprometendo a habilidade do paciente a resistir a infecções causadas por diversos tipos de patógenos (vírus, fungos e bactérias). Além disso, visando contribuir com estudos próximos, os autores exploram diversos tipos de escala para a classificação da mucosite oral. Muitos procedimentos têm sido desenvolvidos na literatura para documentar e quantificar as mudanças nos tecidos da cavidade oral durante e após o tratamento do câncer. De acordo com os autores, para que uma escala de classificação seja adequada, ela deve satisfazer dois critérios: conteúdo e validade e reprodutibilidade intra e inter examinadores. Uma tabela contendo os fatores de risco para mucosite também foi elaborada de acordo com a literatura. Os fatores de risco relacionados ao paciente são: tipo de tumor (tumores hematológicos constituem maior risco para o estabelecimento da mucosite quando comparados aos tumores sólidos); idade do paciente (pacientes jovens apresentam um risco maior) e saúde oral (doenças periodontais predispõem ao surgimento da mucosite). Os

fatores relacionados à terapia incluem: agente quimioterápico utilizado; dose da droga ou da radiação; terapia concomitante e radioterapia envolvendo cabeça e pescoço. Higiene oral, modificação de dieta e utilização de protetores tópicos da mucosa constituem cuidados gerais para prevenção da mucosite. Além disso, o uso apropriado de anestésicos tópicos e sistêmicos traz alívio aos sintomas dolorosos, porém, são soluções paliativas. Agentes promissores que aceleram a cicatrização da mucosa e alteram o curso do processo biológico da mucosite estão sendo investigados.

Para melhor entender o surgimento da mucosite oral, Squier, Kremer<sup>70</sup>, em 2001, publicaram um artigo sobre a biologia da mucosa oral e esofágica. Segundo os autores, a mucosa da cavidade bucal é recoberta por epitélio estratificado escamoso. Em regiões associadas a forças mecânicas como a mastigação, o epitélio é queratinizado. Porém, o assoalho da boca, mucosa e regiões não submetidas a forças excessivas, não são queratinizadas. A função principal do epitélio oral é proteger o tecido subjacente contra perda de fluido e ingresso de agentes irritantes, o que inclui toxinas bacterianas, enzimas, antígenos e substâncias carcinogênicas provenientes da alimentação e ingestão de bebidas. A mucosa oral é repleta de glândulas salivares menores que são responsáveis pela umidade do tecido, pela produção de mucina e uma variedade de substâncias antimicrobianas bem como o fator de crescimento epidermal (EGF). As terapias contra o

câncer tendem a diminuir a proliferação celular e o *turnover* das células epiteliais. Com isso, a capacidade de cicatrização e a resistência do tecido contra infecções são prejudicadas. Os agentes quimioterápicos limitam a capacidade regenerativa do epitélio, que se torna fino ou ulcerado. Eventos celulares e moleculares envolvidos na diferenciação das células epiteliais também são abordados pelos autores.

A mucosite oral pode interferir nos processos alimentares dos pacientes, dependendo do grau de severidade. Em 2001 Dodd et al.<sup>18</sup> realizaram um estudo longitudinal para comparar a qualidade de vida de pacientes submetidos à quimioterapia que desenvolveram e não desenvolveram mucosite oral. Cento e trinta e três pacientes de ambulatório foram acompanhados durante três ciclos completos de quimioterapia. Os pacientes completaram um questionário para medir a qualidade de vida (Escala Multidimensional de Qualidade de Vida, versão Câncer) e um questionário para medir a disposição (Perfil do Estado de Ânimo) no início do tratamento e foram instruídos a procurar tratamento médico ao menor sinal de mucosite oral. Quando era confirmada a presença de mucosite, os pacientes preenchiam novamente os dois questionários. Setenta e sete pacientes completaram os questionários dos quais 28 desenvolveram algum grau de mucosite oral. Os pacientes que desenvolveram mucosite tiveram um aumento significativo nos distúrbios de ânimo quando comparados aos pacientes que não desenvolveram

mucosite. Os autores concluíram que, o desenvolvimento de mucosite afetou o estado emocional do paciente, mas não a sua qualidade de vida.

Em 2004, Sonis et al.<sup>65</sup> pesquisaram a relação existente entre a expressão de COX-2 na mucosite induzida por radioterapia. A COX-2 é uma enzima envolvida no processo inflamatório e com fundamental importância na produção de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico. A expressão dessa enzima é induzida por várias citocinas, fatores de crescimento, LPS bacteriano e pela radiação. Para este estudo foram utilizados 20 hamsters que receberam uma única sessão de radioterapia com 40 Gy de radiação. Quatro animais foram sacrificados nos dias 2, 10, 16 e 21 do experimento para análise imunohistoquímica para avaliar a expressão de COX-2 pelas mucosas. Os resultados mostraram uma expressão muito acentuada da enzima nos dias 10 e 16. Os autores concluem que a COX-2 não é a principal desencadeadora das injúrias causada pela radiação, porém, possui um papel importante na amplificação dessas injúrias.

No mesmo ano (2004) Sonis<sup>60</sup> lançou uma hipótese mais elaborada para explicar a patobiologia da mucosite em bases moleculares. Segundo o autor a mucosite é um processo complexo que envolve cinco fases biológicas: *iniciação, resposta ao dano primário, amplificação do sinal, ulceração e cicatrização*.

A fase de *iniciação* ocorre rapidamente após a radiação ou a quimioterapia e é seguida tanto por danos ao tecido quanto ao

material genético (DNA). Uma injúria direta das células da camada basal do epitélio ocorre simultaneamente à geração de espécies de oxigênio reativo (ROS) como o superóxido.

A fase de *resposta ao dano primário*, observada nas células e nos tecidos da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes, pela ativação de fatores de transcrição e de moléculas de adesão vascular. Ocorre, então, um aumento da expressão dos genes que modulam a resposta tecidual, resultando na produção de algumas proteínas e moléculas destrutivas: citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); ciclooxigenase-2 (COX-2); óxido nítrico (NO) e metaloproteinases – MMPs, que levam à apoptose e à injúria tecidual. Essas substâncias, além de serem danosas ao tecido, desencadeiam um processo de feedback positivo, caracterizando a fase de *amplificação do sinal*.

Portanto, a IL-1 e o TNF-  $\alpha$  assim como a IL-6 (produzida por leucócitos, linfócitos, monócitos e células endoteliais) estão envolvidos com os eventos vasculares e com as reações da fase aguda do processo inflamatório e segundo Sonis<sup>59</sup> (1998), o TNF- $\alpha$  é capaz de provocar danos teciduais, iniciando e acelerando o processo de mucosite e as interleucinas IL-1 e IL-6 aumentam a vascularização local e, conseqüentemente, elevam a concentração de agentes citotóxicos na mucosa.

Cabe notar que durante essa fase do desenvolvimento da mucosite, apesar de haver a manifestação de um agressivo processo biológico pode-se perceber poucas alterações clínicas. Embora possam ser observadas áreas de eritema, na maior parte das vezes a mucosa permanece íntegra e o paciente relata poucos sintomas. Esse quadro se altera caso o epitélio se rompa, permitindo o desenvolvimento de úlceras.

A fase de *ulceração* da mucosite é a mais sintomática, tendo grande impacto no bem-estar do paciente. A perda da integridade da mucosa propicia a colonização superficial por bactérias. No caso de pacientes com neutropenia, a região ulcerada constitui uma porta aberta para a entrada de numerosos microorganismos presentes na cavidade bucal, podendo desencadear um processo de bacteremia e septicemia. Produtos da parede celular das bactérias, como os lipopolissacarídeos (LPS), amplificam os mecanismos de injúria tecidual, aumentam o recrutamento de macrófagos e, conseqüentemente, a produção de citocinas inflamatórias.

A fase de *cicatrização* é a de reparo tecidual, que se resolve espontaneamente tão logo a terapia antineoplásica seja suspensa e inexistam quaisquer complicações associadas. É também uma fase biologicamente dinâmica, na qual a matriz extracelular da submucosa sinaliza para que haja o estímulo da migração, diferenciação e proliferação celular, promovendo a cicatrização do epitélio.

## 2.2 Prevenção e tratamento da mucosite

Ferreti et al.<sup>24</sup>, em 1987, realizaram estudo prospectivo randomizado duplo cego para testar a efetividade da clorexidina na prevenção de complicações orais em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Além dos efeitos das drogas quimioterápicas e da radioterapia na mucosa oral, pacientes que recebem transplante de medula óssea são submetidos à imunossupressão durante o tratamento, tornando-os susceptíveis a severas infecções orais. Segundo os autores, mucosite e infecções orais são as principais complicações associadas à morbidade desses pacientes. Os pacientes, selecionados para o estudo, realizaram bochechos e gargarejos com solução de gluconato de clorexidina 0,12% ou solução placebo (sem clorexidina), três vezes ao dia, após higiene oral, durante 60 dias desde o início do tratamento. A utilização da clorexidina promoveu uma diminuição significativa na incidência e severidade da mucosite oral assim como uma diminuição de infecções causadas por *Candida*.

Após ter comprovado a relação entre a taxa de proliferação epitelial e o surgimento de mucosite oral, Sonis et al.<sup>64</sup>, em 1994, realizaram um estudo aplicando o fator de transformação do crescimento beta 3 (TGF- $\beta$ 3), um potente regulador negativo de crescimento epitelial, para a prevenção da mucosite ulcerativa induzida por quimioterapia. O recombinante TGF- $\beta$ 3 foi aplicado topicamente na mucosa jugal de hamsters Sírios Dourados (4 doses de 20  $\mu$ g durante 24

horas) após a administração do quimioterápico 5-FU, no dia 0 do experimento. O 5-FU foi administrado intraperitonealmente nos dias 0 (60 mg/kg) e 2 (40 mg/kg). A mucosa jugal foi mecanicamente irritada no dia 4 para produzir eritema. Os animais foram pesados, anestesiados com éter e as mucosas foram evertidas e fotografadas do dia 5 ao dia 16 do experimento. As mensurações realizadas incluíram classificação do grau de mucosite, mudança de peso e índice de sobrevivência. A expressão epitelial foi avaliada através de exame imunohistoquímico com PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e exame histológico. Os autores observaram que o TGF- $\beta$ 3 pode controlar ou diminuir o ciclo celular do epitélio oral, conferindo uma resistência adicional aos efeitos citotóxicos da quimioterapia. Houve redução significativa da severidade e da duração do processo de mucosite. Além disso, os animais que foram tratados com TGF- $\beta$ 3 demonstraram menor perda de peso e maiores índices de sobrevivência quando comparados aos animais do grupo controle.

Em 1995, Sonis et al.<sup>63</sup> realizaram um estudo no qual investigaram o papel de outra citocina muito importante no processo inflamatório, a interleucina-11 (IL-11). Essa citocina é produzida pelo estroma das células da medula e possui funções relacionadas à estimulação de plaquetas e neutrófilos após a mielossupressão induzida pela quimioterapia. Os autores testaram a hipótese de que a IL-11 teria efeito na frequência, severidade e duração da mucosite induzida em hamsters. Os animais receberam injeção intraperitoneal de 5-FU nos dias

0 e 2 do experimento e a IL-11 foi administrada, subcutaneamente, duas vezes ao dia, do início do experimento ao dia 14. A mucosa jugal dos animais foi irritada superficialmente no dia 4 e a partir do dia 6, fotografias foram realizadas diariamente para se fazer a classificação do grau de mucosite induzida. Três animais de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para o sacrifício nos dias 8, 12 e 16. As biópsias foram obtidas da mucosa jugal e do fêmur dos animais. A medula óssea do fêmur foi utilizada para a avaliação da celularidade. Além disso, coletas de sangue foram realizadas para avaliação das células brancas e contagem do número de plaquetas. Houve um aumento significativo na produção de plaquetas no grupo que recebeu a IL-11 quando comparado ao grupo controle que recebeu placebo. A severidade e a frequência da mucosite foram marcadamente menores no grupo tratado, assim como a perda de peso e a mortalidade dos animais. Porém, não houve diferenças com relação ao número de células brancas entre os grupos. A celularidade da medula óssea foi maior no grupo tratado, mostrando que a IL-11 estimulou a produção medular em hamsters. Os autores concluíram que a IL-11 pode ter um efeito preventivo na mucosite induzida por quimioterapia, porém, esse efeito não é mediado pela sua ação mieloproliferativa e que o mecanismo pelo qual essa citocina protege a mucosa oral ainda é desconhecido.

Ainda em 1995, Mueller et al.<sup>48</sup> publicaram os resultados de uma pesquisa por meio de questionários, com o objetivo de identificar

tratamentos para mucosite oral e mucocutânea, herpes simples e candidíase oral vigentes nos Estados Unidos e compará-los ao protocolo sugerido pelo National Institute of Health (NHI). Os questionários foram enviados a 200 hospitais americanos, em 1992, para documentar os métodos de prevenção e tratamento da mucosite. Sessenta e dois questionários, dentre os 200 enviados, foram respondidos e retornaram de 42 estados. Todas as regiões geográficas dos Estados Unidos foram representadas. Os resultados da pesquisa demonstraram haver uma grande variedade de agentes utilizados para o tratamento da mucosite como lubrificantes labiais, saliva artificial, soluções para controle de placa e soluções para bochecho de variadas composições. Já para o alívio da dor, a lidocaína tópica foi a mais utilizada. Os autores concluíram que a maioria das terapias utilizadas pelos hospitais dos Estados Unidos inclui agentes ou combinações eficazes, já comprovados por estudos clínicos controlados.

O processo de mucosite oral é geralmente doloroso ao paciente, pois envolve o desenvolvimento de úlceras na mucosa jugal. Berger et al.<sup>8</sup>, em 1995, em um estudo piloto, examinaram o efeito da capsaicina, uma substância encontrada em pimentas vermelhas, para o alívio da dor causada pela mucosite. Essa substância, quando aplicada sobre pele ou mucosa, provoca uma sensação de queimação. Repetidas aplicações produzem uma menor sensação de queimação, levando a uma dessensibilização das fibras nervosas, que pode ocorrer em poucos

minutos. Comercialmente, já existem cremes à base de capsaicina para o tratamento de algumas nevralgias. Porém, para este estudo, os autores utilizaram balas como veículos, já que as balas permanecem durante mais tempo na cavidade oral quando comparadas aos cremes, podendo prolongar o efeito da substância na mucosa jugal. Onze pacientes, que estavam em tratamento antineoplásico, foram examinados com relação ao desenvolvimento de mucosite oral que foi classificada de acordo com a severidade das lesões. Os pacientes foram questionados, verbalmente, quanto à sensação dolorosa provocada pela mucosite. A dor foi classificada em uma escala de intensidade que variou de 0 a 10. Essa avaliação foi realizada antes e 10 minutos após a administração da bala de capsaicina. Após a comparação entre os resultados, os autores concluíram que a taxa de dor antes e após a aplicação da substância foi estatisticamente diferente. Todos os pacientes reportaram alívio da dor. Esse método se mostrou eficaz, de baixo custo e fácil aplicação. Porém, segundo os autores, é um tratamento que requer mais pesquisas, pois não foi capaz de abolir completamente a dor e o efeito foi passageiro. Além disso, concentrações muito elevadas aumentam a sensação de queimação. Os autores sugerem a associação da capsaicina a anestésicos tópicos para minimizar a sensação de queimação e tornar o produto mais aceitável por parte dos pacientes.

Para testar o efeito da terapia antimicrobiana sobre a mucosite, Bondi et al.<sup>9</sup>, em 1997, realizaram um estudo clínico para se

determinar o efeito da aplicação tópica de tobramicina, polimixina E e anfotericina (antibióticos) no tratamento da mucosite oral em crianças submetidas a quimioterapia, previamente ao transplante de medula óssea. Vinte e sete crianças, com tumores sólidos e não-sólidos, que seriam submetidas a transplante de medula óssea fizeram parte do estudo. Todos os pacientes foram instruídos com relação à higiene oral e passaram por tratamento odontológico a fim de eliminar qualquer fonte potencial de infecção sistêmica. Além disso, para auxiliar no controle da placa bacteriana, os pacientes fizeram bochechos com clorexidina 0,12%, três vezes ao dia. Todos os pacientes desenvolveram algum grau de mucosite e foram divididos aleatoriamente em dois grupos. No grupo I os pacientes foram tratados com uma solução de bochecho contendo elixir de difenidramina (Benadril), alumínio-magnésia (Maalox) e gel de lidocaína 2% (BMA – 5/5/3 ml) três vezes ao dia. O BMA foi adicionado a solução de clorexidina. No grupo II os pacientes utilizaram tabletes contendo polimixina E, tobramicina e anfotericina B (PTA – 2/2/10 mg). O PTA também foi adicionado a clorexidina. Portanto, todas as substâncias testadas foram administradas em forma de bochechos diários, três vezes ao dia. A média de escore da mucosite do grupo tratado com PTA foi significativamente menor do que o grupo tratado com BMA. Os autores concluíram que o regime de tratamento, utilizando polimixina E, tobramicina e anfotericina, reduziu a severidade e a duração da mucosite oral, ao menos estatisticamente. Porém, os efeitos clínicos benéficos da

terapia antimicrobiana foram pequenos. Os autores discutem sobre o método utilizado de classificação da mucosite, que talvez não tenha sido capaz de detectar pequenas mudanças no quadro clínico e sugerem a utilização de um método mais sensível, associando sinais e sintomas da mucosite induzida por quimioterapia.

Tendo comprovado o efeito da IL-11 na severidade e duração da mucosite em 1995, Sonis et al.<sup>67</sup>, em 1997, realizaram um outro estudo utilizando a mesma citocina. O estudo teve três objetivos principais: avaliar o efeito da IL-11 recombinante humana (rhIL-11) na mucosite induzida por dois esquemas consecutivos de quimioterapia; estabelecer o melhor regime de aplicação da citocina e determinar se a IL-11 exacerba o efeito de mielossupressão associado aos dois esquemas terapêuticos do quimioterápico 5-FU. Cento e trinta hamsters Sírios Dourados machos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: controle X, controle Y, Regime A e Regime B. Os grupos controles (X e Y) receberam injeção subcutânea de solução salina tamponada e 0,5% de soro de hamster (solução placebo). Os animais que fizeram parte do Regime A foram tratados com 100 µg de rhIL-11, uma vez ao dia, por 12 dias consecutivos logo após a quimioterapia. Já no Regime B o tratamento era feito com 50 µg de rhIL-11, duas vezes ao dia, um dia antes e um dia após a quimioterapia, totalizando somente dois dias de aplicação da citocina. O protocolo de indução da mucosite foi realizado em dois momentos (ciclo 1 e ciclo 2). No primeiro ciclo, os

animais receberam injeção intraperitoneal do quimioterápico 5-FU (60 mg/kg) nos dias 0 e 2 e irritação superficial da mucosa jugal esquerda no dia 4. Os animais foram pesados e observados diariamente durante todo o ciclo, do dia 0 ao dia 14 do experimento. A mucosite foi avaliada por meio de fotografias realizadas do dia 5 ao dia 14. Após sete dias do término do 1º ciclo de quimioterapia, o protocolo de indução de mucosite foi novamente repetido (ciclo 2). O 5-FU foi aplicado nos dias 21 e 23, na mesma dose do ciclo 1 e a irritação da mucosa foi feita no dia 25. Os animais foram igualmente pesados, diariamente observados e a mucosite avaliada do dia 26 ao dia 35 (término do 2º ciclo). No 1º ciclo os grupos testados foram: controle X, Regime A e Regime B. No 2º ciclo, além dos mesmos grupos testados no 1º ciclo, houve a inclusão de mais um grupo, o controle Y, que passou, portanto, por somente um ciclo de quimioterapia. Nos dias 14 e 35, três animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para o sacrifício. O fêmur esquerdo de cada animal foi utilizado para a avaliação da celularidade da medula óssea. Amostras de sangue foram coletadas para a contagem de plaquetas e de células brancas. Para avaliação da resposta imune dos animais, o teste de ELISA foi utilizado para detecção da presença de anticorpos anti-rhIL-11. Durante o ciclo 1, o tratamento com rhIL-11 reduziu significativamente a severidade e a duração da mucosite independente do regime utilizado. O controle X apresentou mucosite mais severa quando comparado tanto ao Regime A quanto ao Regime B. Porém, durante o ciclo 2, somente o

Regime A foi efetivo. A incidência, severidade e duração da mucosite no Regime A foram similares nos dois ciclos. O regime B, entretanto, foi efetivo durante o ciclo 1 mas ineficaz no ciclo 2. A celularidade da medula óssea foi significativamente maior no controle X quando comparado aos Regimes A e B no ciclo1. No entanto, a celularidade permaneceu dentro dos limites de normalidade para todos os grupos. A análise das amostras de sangue revelou que os animais do Regime A apresentaram maior número de plaquetas e células brancas quando comparados aos demais grupos. Os autores concluíram, portanto, que o Regime A foi efetivo durante o 1º ciclo, porém, menos efetivo no segundo ciclo e que, essa diminuição na eficácia se deve a um processo de seleção natural. Os animais tornaram-se mais resistentes aos efeitos estomatotóxicos do 5-FU durante o 2º ciclo de quimioterapia, fato este comprovado pela menor severidade da mucosite do controle X com relação ao controle Y no ciclo 2. Durante o 2º ciclo, o regime A ainda foi mais efetivo que o Regime B, provavelmente pela maior concentração do rhIL-11 o qual também foi administrado durante mais tempo. A mielossupressão não foi exacerbada pelo tratamento com rhIL-11.

Malik et al.<sup>41</sup>, em 1997, realizaram um estudo randomizado duplo-cego placebo/controle para testar os efeitos do tetraclorodecaóxido (TCDO) na redução da severidade e dos sintomas associados a mucosite induzida por quimioterapia. O TCDO é uma substância quimicamente estável, solúvel em água e que contém oxigênio

em uma matriz de cloreto. Essa substância, além de possuir propriedades antibacterianas e mitogênicas, é capaz de promover a ativação de macrófagos quando associada às proteínas do sangue. A população estudada era composta por 62 pacientes que apresentavam mucosite, de grau III a grau IV segundo o World Health Organization (WHO), induzida por quimioterapia e que não fizessem uso de outros medicamentos a não ser nistatina para candidíase oral ou acyclovir para infecção por herpes simples. Os pacientes foram aleatoriamente divididos em dois grupos. Trinta e dois pacientes receberam o TCDO e 30 pacientes receberam placebo. O TCDO e o placebo tinham a mesma forma (suspensão oral), aparência e sabor. Tanto os examinadores quanto os pacientes não tinham conhecimento do que estavam utilizando. Os pacientes faziam bochechos com 10 ml da solução (TCDO ou placebo) e depois a deglutiam, duas vezes ao dia (pela manhã e antes de dormir) até a remissão das lesões ou até no máximo 7 dias. Os pacientes foram examinados diariamente e qualquer sinal ou sintoma novo foi registrado. A intensidade de disfagia, dor esofágica e oral e a quantidade de ingestão oral foram documentadas diariamente. O grau de mucosite foi classificado com o auxílio de uma escala de 5 pontos de acordo com a severidade das lesões. A duração total da mucosite e o desenvolvimento de febre e infecções orais também foram registrados. Não houve diferença significativa entre a média do grau de dor oral e esofágica, disfagia e ingestão oral entre o grupo tratado com TCDO e o grupo tratado com

placebo. A única diferença significativa foi a menor duração da dor oral nos pacientes que estavam recebendo TCDO. A severidade e a duração da mucosite também não diferiram entre os grupos. Os autores concluíram que o TCDO pode exercer efeito paliativo sobre alguns sintomas relacionados ao desenvolvimento de mucosite como é o caso da dor, porém, os efeitos benéficos foram pequenos, necessitando estudos adicionais para confirmá-los.

Com o objetivo de verificar a eficácia da profilaxia oral na mucosite induzida por radio e quimioterapia, Adamietz et al.<sup>1</sup>, em 1998, realizaram um estudo prospectivo randomizado utilizando solução de iodo-povidona. Quarenta pacientes com câncer de cabeça e pescoço foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, tratado e controle, com 20 pacientes em cada grupo. O tratamento antineoplásico consistiu em irradiação do tumor com uma dose total de 71.2 Gray (Gy) e quimioterapia simultânea com carboplatina (60 mg/m<sup>2</sup>) nos dias 1 a 5 e 29 a 34. Todos os pacientes passaram por profilaxia para mucosite com nistatina, rutoside, pantenol e imunoglobulina. Vinte pacientes realizaram bochechos com 100 ml de solução de iodo-povidona diluída (1:8), 4 vezes ao dia, e 20 pacientes realizaram bochechos com água esterilizada (grupo controle). Exames clínicos foram realizados semanalmente para avaliação da mucosa oral. A severidade da mucosite foi classificada de acordo com normas do World Health Organization (WHO). Todos os pacientes do grupo controle apresentaram quadros de mucosite contra quatorze do

grupo tratado. Os resultados obtidos indicam que a incidência, severidade e duração da mucosite induzida pelo regime quimioterapia-radioterapia foram significativamente reduzidos com a utilização de bochecho de iodo-povidona e que, nessa diluição, o iodo não causou nenhuma irritação à mucosa. Concluiu-se que a solução de iodo-povidona é um método profilático barato, fácil e seguro para ser utilizado na terapia de suporte durante o tratamento de câncer de cabeça e pescoço.

Em 1999, Loury et al.<sup>40</sup>, testaram o efeito da aplicação local do peptídeo antimicrobiano IB-367 na incidência e severidade da mucosite oral em hamsters. O IB-367 possui propriedades bacterianas e fúngicas comprovadas sobre a microflora endógena da saliva humana. Para testar a hipótese de que o IB-367 pode reduzir a microflora oral e, portanto, ter efeito favorável no curso da mucosite induzida por quimioterapia quando aplicado topicamente na mucosa, os autores utilizaram o protocolo de indução de mucosite em hamsters, já descrito por Sonis et al.<sup>62</sup> em 1990. Todos os animais receberam injeção intraperitoneal de 5-FU no dia 1 (90 a 120 mg/kg) e no dia 3 ou 4 (60 a 120 mg/kg). A irritação superficial da mucosa foi realizada nos dias 5 e/ou 6. A formulação placebo e a formulação teste, contendo IB-367 em duas concentrações (0.12 e 2.0 mg/mL), foram preparadas utilizando hidroxipropilmetilcelulose para conferir uma consistência de gel. Uma solução de gluconato de clorexidina a 0.12% disponível comercialmente, o Periogard, também foi utilizada por ser comumente indicada para o

tratamento da mucosite oral. O tratamento iniciou-se nos dias 5, 6 ou 7 do experimento. Todas as substâncias testadas foram aplicadas topicamente na mucosa jugal esquerda dos animais, por meio de uma seringa apropriada, 5 a 6 vezes por dia, durante 5 a 7 dias. As mucosas foram fotografadas diariamente a partir do dia 6 para classificação da mucosite. Coletas microbiológicas da mucosa foram realizadas com auxílio de swabs esterilizados 1 hora e/ou 3 horas após o tratamento no terceiro ou no quarto dia e, novamente, no sétimo dia do experimento, para contagem de unidades formadoras de colônia. Os animais foram sacrificados no final do experimento (dia 14) para avaliação histopatológica das mucosas. Os principais objetivos do estudo foram: comparar a eficácia do gel de IB-367 e do Periogard na prevenção da mucosite oral; determinar o efeito da concentração do IB-367 na densidade da microflora oral e na severidade da mucosite; avaliar a efetividade do regime de tratamento com IB-367 na prevenção da mucosite oral e verificar a contribuição do gel placebo na redução da mucosite oral. Os resultados demonstraram que o IB-367 nas concentrações de 0.5 e 2.0 mg/mL reduziu a densidade da microflora oral e que a severidade da mucosite foi significativamente menor nos grupos tratados quando comparada ao grupo placebo. O tratamento dos animais com IB-367 com concentrações variando de 0.12 a 2.0 mg/mL resultou em uma redução dose-dependente da severidade da mucosite. A clorexidina foi tão efetiva quanto o IB-367 na redução da microflora oral,

porém, não foi efetiva na redução da mucosite e o gel placebo produziu uma relativa redução na severidade das lesões. Os autores atribuem esses fatos à consistência das formulações. A clorexidina foi utilizada na forma de solução e o placebo, na forma de gel, o que poderia ter contribuído para a hidratação da mucosa tornando-a menos susceptível a traumas. Os autores concluíram que a redução da microflora oral pelo IB-367 pode contribuir para a diminuição dos riscos de desenvolvimento de mucosite oral em pacientes submetidos à quimioterapia.

Clarke et al.<sup>12</sup>, em 1999, utilizaram a lactoferrina bovina, uma proteína encontrada no leite bovino, que possui propriedades antimicrobianas e participa como mediador do processo inflamatório, para o tratamento da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters. O protocolo de indução da mucosite utilizado para o experimento foi o modelo animal já descrito por Sonis et al.<sup>62</sup> em 1990. Foram aplicadas 10 mg de lactoferrina topicamente na mucosa dos animais nos dias 0, 1 e 2 do experimento. A partir do dia 3, a concentração da proteína utilizada aumentou para 15 mg para garantir a cobertura completa das lesões. A lactoferrina foi aplicada diariamente até o final do experimento. As úlceras foram avaliadas a partir do dia 5 por meio de medições de largura e profundidade realizadas com paquímetro digital. A lactoferrina bovina falhou em diminuir a severidade das úlceras, sendo ainda observada uma redução no processo de cicatrização das lesões quando comparado ao grupo controle.

Em 2000, Sonis et al.<sup>66</sup> continuaram a linha de pesquisa sobre a ação da IL-11 na progressão da mucosite oral. Porém, neste estudo a mucosite foi induzida por radioterapia. Trinta hamsters receberam uma única dose de radiação e foram divididos em dois grupos: grupo tratado com administração diária de IL-11 do dia 1 ao dia 14 do experimento e grupo não tratado. O grau de mucosite foi classificado por meio de uma escala de 6 pontos e os animais foram sacrificados nos dias 5, 8, 10, 15, 19 e 20 para análise imunohistoquímica e realização de PCR. O grupo tratado apresentou menor severidade nas lesões. Os resultados sugerem que a IL-11 module favoravelmente a mucosite induzida por quimioterapia atenuando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  e mantendo a integridade epitelial pelo estímulo às funções de diferenciação das células da mucosa.

Para testar se a aplicação tópica de fatores biologicamente ativos de leite bovino (WGFE-A) reduz a severidade da mucosite, Clarke et al.<sup>13</sup> (2002), utilizou o modelo de indução em hamsters. Os animais receberam injeção intraperitoneal de 5-FU nos dias 0 e 2, associado à irritação da mucosa jugal dos animais nos dias 1 e 2. O princípio ativo foi aplicado na mucosa oral antes e durante a administração do 5-FU. Cinco concentrações de WGFE-A foram testadas. Quando aplicado continuamente após o esquema quimioterápico, o WGFE-A falhou em reduzir as áreas de úlceras. A redução da taxa de proliferação celular foi menor com a utilização do WGFE-A, conferindo-lhe

uma função protetora da mucosa. Além disso, possui ação antimicrobiana, antiproliferativa e antiapoptose. Os autores concluem que o WGFE-A é uma fonte potencial de proteínas para aplicação clínica e preventiva da severidade da mucosite causada pela quimioterapia.

Para prevenir a mucosite, Morvan et al.<sup>47</sup> em 2004, utilizaram um biopolímero (RG1503) com propriedades regenerativas e antiinflamatórias em hamsters que receberam o quimioterápico 5-FU. Foram utilizados 45 hamsters distribuídos em 3 grupos: Grupo controle (não tratado), placebo (tratado com injeção de solução salina) e experimental (tratado com o RG1503). Todos os animais passaram pelo protocolo de indução de mucosite que consistiu em injeção intraperitoneal de 5-FU, na dosagem de 60 mg/kg, nos dias 0, 5 e 10 do experimento associado à escarificação da mucosa com fresa de baixa rotação nos dias 1, 2 e 3 (três escarificações paralelas com 1 cm cada). O biopolímero foi administrado nos dias 4 e 12 através de injeção intramuscular (1,5 mg/kg). No dia 15 a avaliação clínica da mucosite induzida foi realizada por meio de fotografias e, posteriormente, procedeu-se a biópsia das mucosas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica. Não foram encontradas diferenças com relação ao peso e contagem de células brancas entre os grupos, sugerindo que os efeitos citotóxicos indiretos do 5-FU não ocorreram. Somente metade dos animais tratados com RG1503 desenvolveu mucosite, com lesões 70% menores com relação ao grupo controle. A membrana basal do grupo não tratado foi quase

completamente destruída, porém, no grupo tratado encontrou-se preservada. Os autores concluíram que o biopolímero RG1503 foi efetivo para prevenir e reduzir a mucosite induzida em hamsters.

Outra pesquisa realizada em hamsters foi o estudo publicado por Lima et al.<sup>38</sup> em 2005. Os autores testaram os efeitos da inibição de citocinas pela pentoxifilina (PTX) e pela talidomida (TLD) na resposta inflamatória em um modelo experimental de indução de mucosite oral em hamsters. A PTX bloqueia a síntese de TNF- $\alpha$  pela interferência na transcrição genética dessa citocina que está, comprovadamente, relacionada à severidade da mucosite oral. Já a TLD é conhecida pelo seu efeito teratogênico e causa a inibição da atividade angiogênica. Essas drogas têm se mostrado efetivas no tratamento de úlceras aftosas em pacientes imunocomprometidos. A indução da mucosite foi realizada com injeção intraperitoneal de 5-FU no primeiro e no segundo dia do experimento associada à irritação superficial da mucosa no dia 4. As lesões foram examinadas macroscopicamente e microscopicamente nos dias 4, 5, 10, 12, 14 e 16. Ambas as drogas reduziram os parâmetros histológicos e macroscópicos da mucosite oral além de reverter casos de neutrofilia periférica. Porém, somente a PTX preveniu a perda de peso. Os resultados indicaram um efeito protetor da PTX e da TLD, sugerindo um importante papel desses agentes na patofisiologia da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters.

Em 2007, Leitão et al.<sup>37</sup> publicaram uma pesquisa sobre o papel do óxido nítrico na patogênese da mucosite induzida por quimioterapia. A produção do óxido nítrico é estimulada por citocinas e este gás pode produzir tanto efeitos benéficos quanto maléficos ao tecido, dependendo da situação em que é requerido. Pode exercer atividade antimicrobiana e de imuno modulação e por outro lado, apresentar ação citotóxica, causando dor, lesão tecidual, apoptose e reabsorção óssea. Foram utilizados 72 hamsters que receberam injeção intraperitoneal de 5-FU no primeiro e segundo dia do experimento, associado a trauma superficial da mucosa no dia 4. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, tratado com aminoguanidina (inibidor seletivo de iNOS) e tratado com L-NAME (inibidor não seletivo de iNOS) 1 hora antes da aplicação do 5-FU e diariamente até o dia do sacrifício. A mucosa jugal foi fotografada no dia 10 e, logo após, os animais foram sacrificados para avaliação histológica. O tratamento com aminoguanidina reduziu os parâmetros tanto clínico quanto histológico da mucosite oral e o infiltrado de células inflamatórias. Já o L-NAME não foi capaz de reverter o quadro de inflamação da mucosite. Os resultados sugerem um importante papel do óxido nítrico produzido pelo iNOS na patogênese da mucosite oral induzida por quimioterapia.

### **2.3 Utilização da luz para o tratamento de feridas**

Karu<sup>34</sup>, em 1989, publicou um artigo no qual discute os principais efeitos do laser de baixa intensidade durante a fotoestimulação celular provocada no tecido aplicado. A eficácia da laserterapia no tratamento de úlceras e feridas já é um fato comprovado, porém, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estavam totalmente elucidados, gerando muitas dúvidas e ceticismo. O laser promove um aumento do metabolismo celular levando a um estímulo na proliferação celular, regulando a concentração de adenosina monofosfato cíclica e a produção de RNA e DNA. No entanto, para que esses efeitos fotoestimulantes e fotobiológicos ocorram, cada tipo de tecido necessita de intensidade luminosa, dose e comprimento de onda específicos. Os fotorreceptores absorvem a luz com comprimento de ondas específicos, produzindo uma resposta biológica. Os principais fotorreceptores são representados por componentes da cadeia respiratória como citocromos, flavina desidrogenase e citocromo oxidases. A absorção da luz pela cadeia respiratória desencadeia eventos químicos e físicos na mitocôndria, ocorre, então, um aumento na síntese de ATP e de íon hidrogênio ( $H^+$ ). O aumento de ATP e  $H^+$  ativa outros íons da membrana celular como  $Na^+$  e  $K^+$  além de alterar o fluxo de  $Ca^{++}$ , provocando, dessa forma, a homeostase celular e favorecendo a aceleração das mitoses. Segundo a autora, a fotossensibilidade da célula depende de seu estado biológico. Por exemplo, quando a célula apresenta funcionamento normal

o efeito do laser é mínimo ou inexistente. Por outro lado, se houver injúria tecidual, ocorre queda na concentração de oxigênio, pH e nutriente, essenciais para a proliferação celular, que fica prejudicada. Diante dessa situação, o laser é capaz de bioestimular o tecido e promover aumento da proliferação celular e mudanças no potencial de ação das células.

Em 2003, Vinck et al.<sup>72</sup> investigaram o aumento da proliferação fibroblástica induzida tanto por irradiação com LED quanto por laser. Para isso, os autores utilizaram culturas de fibroblastos para o experimento. O laser utilizado foi de AsGaAl com comprimento de onda de 830 nm, potência variando de 1-400 mW, frequência de 0-1500 Hz e área de 0,196 cm<sup>2</sup>. O LED possuía três comprimentos de onda emitidos por diferentes pontas. A primeira ponta emitia luz verde com comprimento de 570 nm e potência variando de 10-0,2 mW. A segunda ponta emitia luz vermelha (660 nm) com potência de 80-15 mW e a terceira ponta, luz infravermelha (950 nm), com 160-80 mW de potência. Todas as pontas possuíam área de 18 cm<sup>2</sup> e frequência também variando de 0-1500 Hz. As aplicações foram feitas diariamente durante 3 dias consecutivos e a distância de irradiação foi mantida constante para todos os grupos (0,6 cm). O laser foi aplicado durante 5 segundos com potência de 40 mW e densidade de energia de 1 J/cm<sup>2</sup>. Foram utilizadas densidades de 0,53 J/cm<sup>2</sup> para o LED infravermelho e vermelho e de 0,1 J/cm<sup>2</sup> para o verde, durante 1, 2 e 3 minutos, respectivamente, com potências de 160 mW, 80 mW e 10 mW. Algumas placas, contendo fibroblastos, não foram

---

irradiadas constituindo o grupo controle. Após as irradiações, o meio de cultura foi removido e substituído por novo meio. As células foram mantidas em incubação por 24 horas para posterior realização do teste de MTT, que mede a taxa de respiração mitocondrial das células. Os resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) para todas as culturas irradiadas quando comparadas ao controle. O LED vermelho promoveu o maior aumento na quantidade de fibroblastos seguido pelo LED infravermelho e pelo laser. Os autores concluíram que tanto o laser quanto o LED estimularam um aumento da proliferação de fibroblastos *in vitro* e, possivelmente, podem ter efeitos estimulatórios na cicatrização de feridas *in vivo*, se aplicados com parâmetros adequados.

Whelan et al.<sup>73</sup>, em 2003, avaliaram as mudanças moleculares promovidas por LED desenvolvido pela NASA na cicatrização de feridas. Foram utilizados 80 camundongos diabéticos divididos em 2 grupos: tratado e não tratado. Implantes subcutâneos de esponja de PVA foram colocados no dorso dos animais. O LED de 670 nm  $\pm$  12,5 nm de comprimento de onda foi aplicado diariamente, por 14 dias, com densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados nos dias 2, 4, 7 e 14 para remoção das esponjas e realização de RT-PCR. Os resultados revelaram que certos genes relacionados à regeneração tecidual, como integrinas, laminina, proteínas de adesão e proteínas da superfamília das cinesinas, apresentaram aumento significativo de

---

expressão gênica quando os animais foram tratados com LED. Os autores acreditam que o LED desenvolvido pela NASA pode acelerar o processo de cicatrização natural de feridas.

### **2.3.1 Laser terapêutico para redução da incidência e severidade da mucosite**

Em 1995, Barasch et al.<sup>5</sup> investigaram o uso do laser de Hélio-Neônio em pacientes submetidos a transplante de medula óssea que apresentaram mucosite oral. O estudo foi controlado, prospectivo e duplo cego. Vinte pacientes receberam, diariamente, aplicação unilateral de laser na cavidade oral por 5 dias consecutivos, de 1 a 2 dias antes do transplante de medula óssea. A região contralateral não recebeu tratamento com laser, sendo o controle do experimento. Os parâmetros utilizados foram: laser de 632.8 nm de comprimento de onda, potência de 25 mW, 0,8 cm<sup>2</sup> de área, aplicações em 5 regiões da cavidade, tempo de aplicação de 40 segundos e densidade de energia de 1,0 J/cm<sup>2</sup>. A classificação da mucosite foi feita por uma escala de severidade e a dor, mensurada por meio de uma escala visual analógica (VAS). Os escores para mucosite e para dor foram significativamente menores no lado tratado com laser. Todos os pacientes desenvolveram lesões bilateralmente. As regiões mais acometidas foram assoalho da boca, região lateral da língua, mucosa jugal, ventre da língua, lábio e palato. A severidade da mucosite aumentou no dia 6 e a cura ocorreu no dia 21. Os

autores concluíram que o tratamento com laser de Hélio-Neônio foi bem tolerado e reduziu a severidade da mucosite oral em pacientes submetidos a transplante de medula óssea.

Cowen et al.<sup>15</sup>, 1997, avaliaram os efeitos do laser de Hélio-Neônio na prevenção da mucosite oral em pacientes também submetidos a transplante de medula óssea. O estudo duplo cego randomizado utilizou 30 pacientes que receberam tratamento quimioterápico previamente ao transplante de medula. O laser foi aplicado diariamente por 5 dias consecutivos (dia -5 ao dia -1) no lábio inferior e superior, mucosa jugal, língua e assoalho de boca, totalizando 15 aplicações em 5 regiões, com os seguintes parâmetros: 232,8 nm, 60 mW, 10 segundos cada aplicação, 1,5 J/cm<sup>2</sup> e energia total de 54 J em cada região. Um grupo de pacientes recebeu tratamento com uma luz placebo, que emitia o mesmo som que o aparelho de laser. Os pacientes foram diariamente examinados por enfermeiras que não sabiam qual tratamento (laser ou placebo) cada paciente tinha recebido. O grau de mucosite foi classificado de acordo com uma escala de 4 pontos. Além disso, alterações na deglutição, fala, fluxo salivar e presença de dor também foram avaliados. Os pacientes tratados com laser apresentaram menor incidência, severidade e duração de mucosite quando comparados ao grupo não tratado, sendo estas diferenças estatisticamente significantes. Todas as outras alterações avaliadas tiveram melhores resultados no grupo que recebeu tratamento com laser.

Migliorati et al.<sup>46</sup>, em 2001, realizaram um estudo sobre a laserterapia para o tratamento da mucosite. Onze pacientes oncológicos foram submetidos a altas doses de quimioterapia para mieloablação. O laser foi utilizado para diminuir a sintomatologia dolorosa provocada pela mucosite oral. Todos os pacientes receberam tratamento com laser de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 780 nm e potência de 60 mW, por toda mucosa, com 2,5 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia. O laser foi aplicado do dia -5 ao dia +5 após o transplante. A incidência e a severidade da mucosite foram avaliadas por uma escala da WHO (World Health Organisation) e a dor por uma escala visual análoga (VAS). Todos os pacientes, com exceção de um, desenvolveram quadros de mucosite oral. Não foram registrados escores máximos para mucosite e para dor em nenhum caso. Os autores concluíram que o laser teve papel importante no controle da dor associada a mucosite oral.

Em 2003, Sandoval et al.<sup>56</sup> publicaram resultados iniciais do hospital Amaral Carvalho no manejo da mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia. Dezoito pacientes receberam aplicações diárias de laser (630 nm, 30 mW, 2 J/cm<sup>2</sup>) até que os sintomas da mucosite cessassem. O tempo de aplicação para cada lesão variou de 1 minuto a 6 segundos. O tempo total de cada sessão foi dependente do número e das extensões da lesão. A severidade da mucosite foi classificada de acordo com uma escala de 5 pontos e a dor mensurada por meio de escala visual (VAS) antes e após a aplicação do laser. O

alívio imediato da dor foi registrado em 66% dos casos logo após a primeira aplicação do laser. O grau III de mucosite (incapacidade de ingestão de alimentos sólidos) foi reduzido em 42.85% dos casos e o pior grau (grau IV) foi reduzido em 75% dos pacientes. Os autores concluíram que o laser foi bem tolerado e demonstrou efeitos benéficos no manejo da mucosite oral, melhorando a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento oncológico.

Em 2005, Nes, Posso<sup>50</sup> avaliaram o efeito analgésico do laser em pacientes com mucosite oral induzida por quimioterapia. Neste estudo utilizou-se o Thera Lase, um laser de AsGaAl com 830 nm de comprimento de onda, potência de 250 mW e diâmetro da ponta de 0.60 mm. A aplicação foi pontual, com uma densidade de energia de 35 J/cm<sup>2</sup> por ponto e realizada diariamente por 5 dias consecutivos. Enfermeiras especializadas realizaram a avaliação e a classificação da mucosite desenvolvida pelos pacientes em leve, moderada e severa observando-se alterações em lábios, língua, mucosa oral, salivação e deglutição. A dor foi mensurada (VAS) em todos os dias do tratamento, logo após a aplicação do laser. Os resultados demonstraram uma redução, estatisticamente significativa de 67% da experiência dolorosa relatada pelos pacientes. Os autores concluíram que, nos parâmetros utilizados neste estudo, existe um efeito analgésico logo após a aplicação do laser de AsGaAl em pacientes com mucosite induzida por quimioterapia.

Ferrari<sup>23</sup>, em 2005, avaliou o efeito do laser terapêutico na redução da incidência e da severidade da mucosite induzida em hamsters. O quimioterápico 5-FU foi aplicado em 60 animais nos dias 0 e 2 do experimento, nas doses de 90 e 60 mL/Kg de peso, respectivamente. Para simular o efeito de uma irritação crônica, as mucosas jugais dos animais foram escarificadas nos dias 3 e 4. Aplicou-se o laser terapêutico (InGaAlP, 683 nm, 12 J/cm<sup>2</sup>) em 5 pontos da mucosa jugal direita e esquerda 30 animais (Grupo I), durante 7 dias. Os animais do Grupo II não receberam tratamento. O Grupo III (controle negativo) foi composto por 5 animais que não receberam o protocolo de indução de mucosite. Nos dias 0, 8, 12 e 15 do experimento, as mucosas de 6 animais dos Grupos I e II foram removidas para avaliação histopatológica. A partir de fotografias tiradas diariamente, a mucosite foi classificada clinicamente. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo tratado com laser e o grupo não tratado quando se comparou, clínica e histopatologicamente, a intensidade da mucosite induzida. Concluiu-se que a aplicação do laser de baixa intensidade promoveu a redução da severidade da mucosite oral e acelerou a cura das lesões, embora não tenha prevenido o surgimento das mesmas.

---

### **2.3.2 LED vermelho para redução da incidência e severidade da mucosite**

Whelan et al.<sup>74</sup>, em 2002, avaliaram o LED desenvolvido pela NASA na prevenção da mucosite em pacientes pediátricos submetidos a transplante de medula óssea. Trinta e dois pacientes com uma média de idade de 12.5 anos fizeram parte do estudo. Cada paciente foi avaliado por dentistas previamente treinados que observaram regiões como mucosa bucal e lateral da língua, antes e após o transplante. Os pacientes foram questionados também quanto à dor e xerostomia. As avaliações foram repetidas até 14 dias após o transplante, três vezes por semana. A mucosite foi classificada por escala de 3 pontos. O LED aplicado possuía 670 nm de comprimento de onda e 56 mW de potência. As aplicações foram realizadas diariamente na mucosa por 71 segundos e densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, desde o primeiro dia após o transplante até 14 dias depois. A incidência de mucosite oral foi de 53% contra uma taxa esperada de 70-90%. Houve redução de 48% e 39% de dor relacionada à mucosa esquerda e direita, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os lados (direito ou esquerdo da cavidade bucal) no que diz respeito à incidência de mucosite e intensidade dolorosa. Segundo os autores, apesar de necessitar de mais estudos, o LED parece ser uma alternativa efetiva na prevenção de mucosite oral em crianças que passaram por transplante de medula óssea.

Em 2006, Corti et al.<sup>14</sup> publicaram um estudo no qual avaliaram os efeitos clínicos da fototerapia com fonte de luz não coerente (LED) no alívio da mucosite oral induzida por quimioterapia em pacientes com câncer metastático. O LED foi aplicado em 12 pacientes que apresentaram quadro de mucosite oral. O grupo controle foi composto por 12 pacientes com tumores hematológicos que desenvolveram mucosite após altas doses de quimioterapia. O tratamento foi realizado três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), por 7 dias consecutivos, diretamente na área afetada, pelos próprios pacientes que receberam treinamento prévio. Cada sessão durava 5 minutos totalizando uma energia de 2,34 J, com densidade de energia de 0,99 J/cm<sup>2</sup>. O LED utilizado era um aparelho portátil (20 cm de altura e 30 g) que emitia ondas de 645 nm ± 15 nm de comprimento com 7,8 mW de potência. A incidência e severidade da mucosite foram avaliadas e classificadas diariamente, durante 7 dias, por examinadores experientes. Além disso, aspectos como deglutição, salivação, qualidade de voz e dor foram classificados por meio de relato dos pacientes. O tratamento com LED promoveu um aumento da taxa de cicatrização de 117% para 164% e o tempo médio de cicatrização diminuiu. Nenhum paciente reportou a ocorrência de efeitos colaterais relacionados à utilização do LED. Os autores concluem que o tratamento com LED é seguro e capaz de reduzir a duração da mucosite induzida por quimioterapia.



**Proposição**



### **3 Proposição**

- O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do LED (Light Emitting Diode) com comprimento de onda vermelho ( $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ) e densidade de energia de  $12 \text{ J/cm}^2$  na redução da incidência e da severidade da mucosite induzida por agente quimioterápico (5-FU) associado a escarificação da mucosa jugal em hamsters.



## Material e método



## 4 Material e método

O protocolo de pesquisa apresentado a seguir foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo 1).

### 4.1 Procedimentos operatórios

Foram utilizados 72 hamsters Sírios Dourados (*Mesocricetus Auratus*) machos, saudáveis (Anexo 2), com peso variando entre 100 e 120 gramas e idade entre 6 e 8 semanas, provenientes de um criadouro especializado em animais para laboratório (AniLab)\*. Os animais foram mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e tiveram acesso livre à comida e à água. Cada gaiola continha no máximo 6 animais, identificados individualmente com perfurações na orelha, que foram monitorados e pesados periodicamente. Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos e distribuídos da seguinte maneira:

**Grupo I:** Grupo experimental, composto por 32 animais que passaram pelo protocolo de indução de mucosite e receberam tratamento com LED vermelho (630nm  $\pm$  10nm) com densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup>.

---

\* ANILAB - Animais para Laboratório, Paulínia/SP.

**Grupo II:** Controle positivo, composto por 32 animais que passaram pelo protocolo de indução de mucosite e não receberam tratamento.

**Grupo III:** Controle negativo, composto por 6 animais que não receberam o protocolo de indução de mucosite, sendo o controle íntegro do experimento. Esses animais foram sacrificados no dia 5 do experimento e tiveram as mucosas jugais cirurgicamente removidas e processadas para exame histológico, representando ausência de mucosite.

A indução da mucosite foi realizada por meio de injeção intraperitoneal (Figura 1) do quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU)\* nos dias 0 e 2 do experimento, nas doses de 90 mg/Kg de peso e 60 mg/Kg de peso, respectivamente .

Para reproduzir o efeito de uma irritação crônica, a mucosa jugal dos animais foi evertida e fixada na mesa cirúrgica (folha de isopor) com auxílio de agulhas para insulina e escarificada (traumatizada) superficialmente nos dias 3 e 4 com uma escova apresentando 2 cm de largura, confeccionada com fio ortodôntico de 0,7 mm (Figura 2). A escova foi arrastada na superfície da mucosa por 4 vezes consecutivas, por um único operador, com força suficiente para produzir leve eritema na região sem causar ruptura da mucosa.

---

\* Fluoruracil 25 mg/mL – Eurofarma Laboratórios Ltda.

Os hamsters do grupo experimental (Grupo I) tiveram a mucosa jugal direita e esquerda tratadas nos dias 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 do experimento e foram irradiados com um protótipo de LED especialmente criado para este experimento pelo CEPOF\* com comprimento de onda de  $630 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ , potência de 160 mW, diâmetro da ponta de 0,8 cm e com um LED único localizado na extremidade da ponta (Figura 3). Após proteção da ponta do aparelho com filme de PVC transparente\*\*, um único ponto central da mucosa jugal direita e esquerda de cada animal foi irradiado (Figura 4) com densidade de energia de  $12 \text{ J/cm}^2$  durante 37,5 segundos totalizando uma energia de 6 J para cada mucosa jugal. A partir do momento em que foram observadas lesões na mucosa jugal dos animais, a aplicação foi feita diretamente sobre a lesão mais severa.

Foram selecionados aleatoriamente 8 animais dos grupos I e II para realização de biópsia excisional da mucosa jugal direita e esquerda nos dias 5, 9, 13 e 15 do experimento.

A biópsia foi realizada após anestesia. Neste procedimento, as mucosas foram evertidas, fixadas em um pedaço de cortiça, removidas com uma tesoura cirúrgica (Figura 5) e imediatamente imersas em solução de formalina tamponada a 10% por um período de 72 horas para o processamento histológico.

---

\* Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica – IFSC/USP, São Carlos SP.

\*\* Magipack®.

---

Os animais foram, em seguida, sacrificados por sobredose do anestésico hidrato de cloral a 20%, administrado intraperitonealmente.

Dois animais foram utilizados para medição da variação de temperatura na mucosa (mapeamento térmico) durante a irradiação com LED. Esses animais não passaram pelo protocolo de indução de mucosite. A mucosa esquerda dos animais foi evertida e um termistor de alta precisão\* (Figura 6) foi inserido na mucosa (Figura 7) após um pequeno corte no tecido. O termistor estava conectado a um multímetro digital\*\* que registrava os valores de resistência elétrica ao longo do tempo. Foram feitas quatro aplicações centrais consecutivas, do mesmo protótipo de LED utilizado para o Grupo I, com a mesma dose ( $12 \text{ J/cm}^2$ ), durante o mesmo tempo (37,5 segundos) e com o termistor em posição (Figura 8). Duas situações foram simuladas: aplicação do LED protegido com filme de PVC e sem proteção. A cada aplicação os valores medidos para os tempos de 0 segundo, 15 e 37,5 segundos foram registrados e os dados transformados em gráficos.

Em todos os procedimentos operatórios (escarificação da mucosa, aplicação do LED, tomadas fotográficas, biópsias excisionais e medição da temperatura) os animais foram anestesiados por meio de

---

\* Modelo 120-202 EAJ, FenWal Eletronic, Milford, MA.

\*\* Digitest DT 105, Alfatronic S/A.

injeção intraperitoneal do anestésico geral Quetamina\* na dosagem de 0,16 mL/100g de peso corpóreo associado ao relaxante muscular e analgésico Cloridrato de Xylazina\*\* na dosagem de 0,04 mL/100g de peso corpóreo. Para administração da anestesia foi utilizada seringa de insulina (1 mL).

---

\* Ketamina<sup>®</sup> - 10 mL – uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.

\*\* Dopaser<sup>®</sup> - 10 mL – uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.



FIGURA 1 – Injeção intraperitoneal do agente quimioterápico.



FIGURA 2 – Escarificação da mucosa.

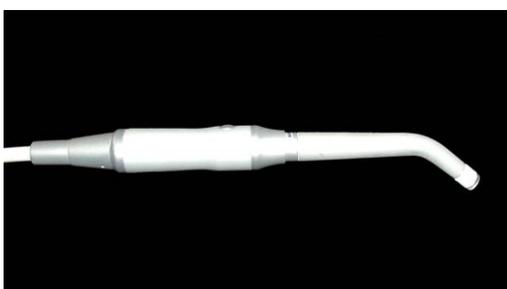


FIGURA 3 – Protótipo de LED desenvolvido pelo CEPOF.



FIGURA 4 – Aplicação do LED na região central da mucosa jugal.



FIGURA 5 – Remoção cirúrgica da mucosa jugal.

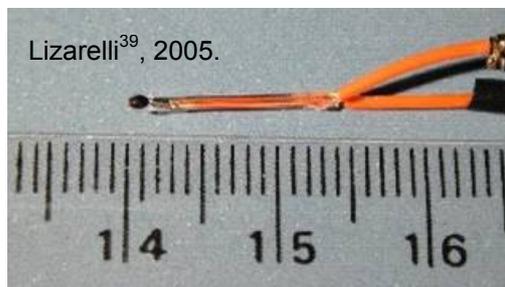


FIGURA 6 – Termistor digital de alta precisão.

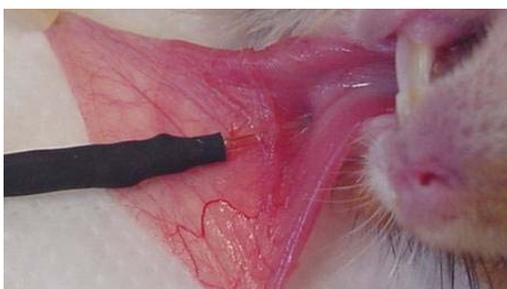


FIGURA 7 – Termistor inserido na mucosa jugal do animal.



FIGURA 8 – LED e termistor em posição na região central da mucosa.

No momento da escarificação superficial da mucosa jugal dos animais e após o surgimento das primeiras lesões, foi administrado paracetamol\* via oral, sendo este analgésico escolhido por ser indicado para o controle da dor em roedores e não apresentar efeito antiinflamatório (Alloui et al.<sup>2</sup>, 2002; Harkness, Wagner<sup>30</sup>, 1993). Foi utilizada seringa de insulina sem agulha para a administração do medicamento. O paracetamol foi administrado na dose de 300 mg/ kg de peso corporal por via oral (Mezadri et al.<sup>45</sup>, 2004), diariamente, até o término do experimento ou até a regressão completa das lesões orais.

Optou-se pelo sacrifício precoce dos animais que se encontraram moribundos ou muito debilitados pela quimioterapia, independentemente da presença de lesões severas ou leves. A presença de lesões severas não foi um critério de sacrifício precoce se o animal não estivesse moribundo.

---

\* Paracetamol - Tylenol® gotas 200 mg/mL.

## 4.2 Avaliação clínica da mucosa

As lesões foram avaliadas nos dias 4, 6, 8, 10, 12 e 14, sendo a mucosa jugal evertida após anestesia e fotografada com máquina digital\*, utilizando-se parâmetros padronizados. Também foram realizadas fotografias nos dias de sacrifício dos animais antes da biópsia excisional da mucosa jugal.

A avaliação clínica da severidade da mucosite foi realizada a partir da observação das fotografias obtidas, que foram previamente embaralhadas, codificadas e analisadas de maneira cega por um único examinador. Essa análise foi realizada duas vezes pelo mesmo examinador, com intervalo de um mês, para que houvesse uma correta calibração. Cada fotografia foi classificada por meio de uma escala de 6 pontos (Sonis et al.<sup>66</sup>, 2000 ), mostrada na Tabela 1 e na Figura 9.

Tabela 1 - Classificação clínica da mucosite

Classificação da mucosite	Características clínicas da mucosa jugal
Grau 0	Mucosa saudável
Grau 1	Presença de eritema leve, sem sinais de erosão
Grau 2	Eritema severo, vasodilatação e erosão superficial
Grau 3	Formação de úlceras em um ou mais locais, restritas a 25% da superfície total
Grau 4	Formação de úlceras abrangendo 50% da região
Grau 5	Completa ulceração da mucosa e perda de elasticidade/maleabilidade

\* FujiFilm® FinePix S7000 6.0 megapixel .

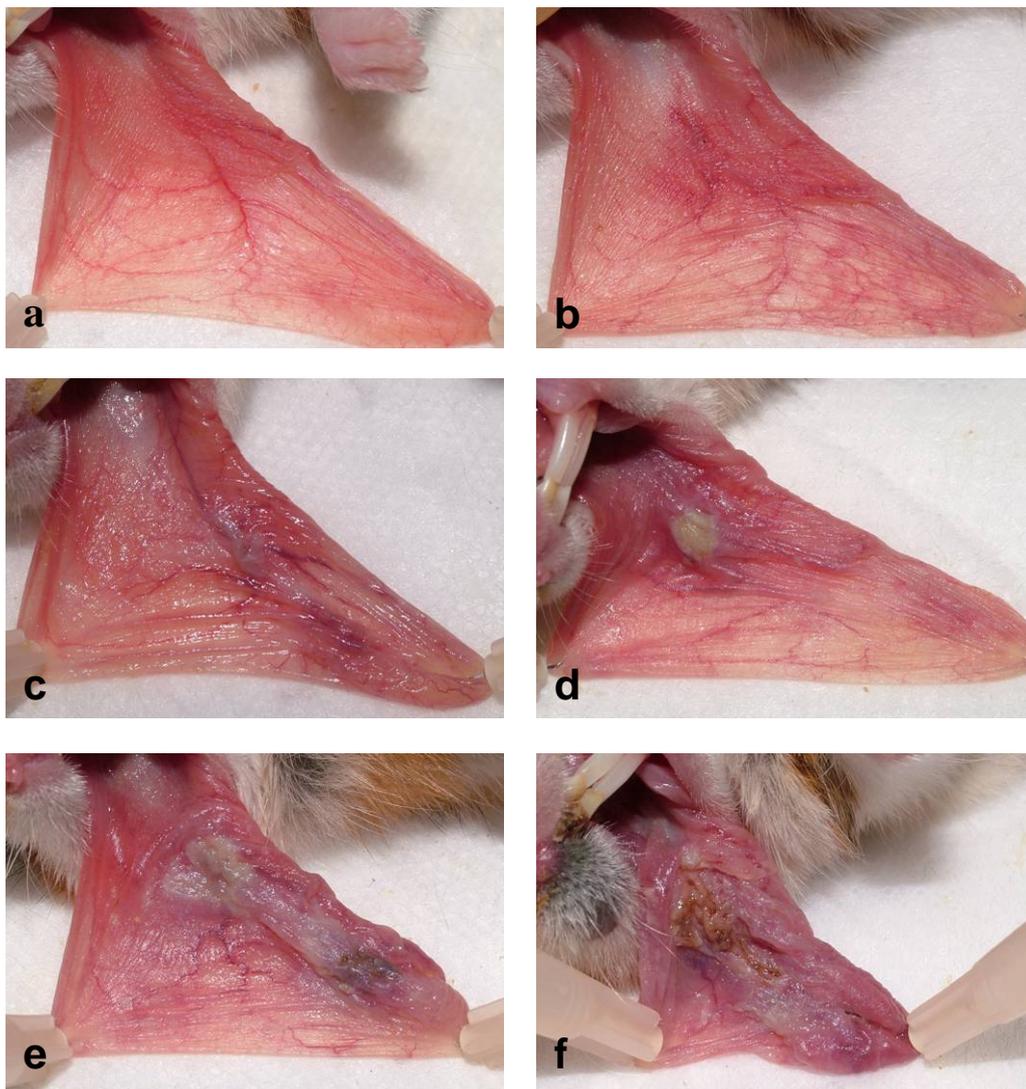


FIGURA 9 – Classificação clínica da mucosite.

a - grau 0 (mucosa saudável)

b - grau 1 (presença de eritema leve, sem sinais de erosão)

c - grau 2 (eritema severo, vasodilatação e erosão superficial)

d - grau 3 (úlceras em um ou mais locais, restritas a 25% da superfície total)

e - grau 4 (úlceras abrangendo 50% da região)

f - grau 5 (completa ulceração da mucosa e perda da elasticidade/maleabilidade)

### **4.3 Avaliação histológica da mucosa**

Os tecidos obtidos pelas biópsias excisionais foram fixados em formol de Lillie tamponado a 10% (pH 7,4) por 72 horas e preparados para exame histológico. Para tal, as peças histológicas obtidas a partir da mucosa jugal dos animais foram reduzidas, cortadas ao meio e armazenadas em compartimentos identificados (cassetes). Quando havia presença de lesão esta era seccionada ao meio, obtendo-se, assim, duas metades para serem analisadas em microscopia de luz. As peças foram submetidas ao seguinte processamento laboratorial de rotina:

- 1) Fase de desidratação por trocas consecutivas de álcoois em concentrações crescentes:
  - álcool 70% por 1 hora;
  - álcool 90% por 1 hora;
  - álcool absoluto, 6 trocas de 1 em 1 hora.
- 2) Fase de diafanização:
  - álcool-xilol por 30 minutos;
  - xilol puro por 30 minutos;
  - novo xilol puro por mais 30 minutos.

3) Fase de embebição em parafina histológica a 58°C:

- parafina líquida por 3 horas;
- nova parafina líquida por mais 3 horas.

Após o processamento laboratorial, as peças cirúrgicas foram incluídas em fôrmas de papel contendo parafina líquida. Após seu endurecimento, as fôrmas foram removidas e com auxílio de navalhas descartáveis\* foram obtidos blocos de parafina que continham as peças incluídas centralmente. Esses blocos foram fixados em suportes de madeira para serem posicionados em um micrótomo rotatório\*\*. Dez cortes histológicos seriados de cada bloco, com 6 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro e corados alternadamente pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson para posterior avaliação dos eventos histológicos ocorridos em cada um dos grupos através de microscopia de luz\*\*\*.

A reação do tecido foi analisada de acordo com a intensidade da inflamação, determinada pela presença de células inflamatórias, alteração da população das células residentes do tecido conjuntivo, características da substância intercelular amorfa e da substância intercelular fibrosa. O material foi classificado em escores (Tabela 2 e Figura 10) por um único examinador e os eventos histológicos

---

\* Disposable Microtome Blades – LEICA, model 818, Germany.

\*\* 820 Spencer Microtome, Spencer Products Co., Carson, CA, USA.

\*\*\* Microscópio Olympus BX51, Olympus Optical do Brasil, Ltda.

---

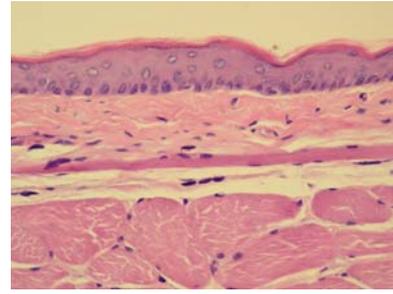
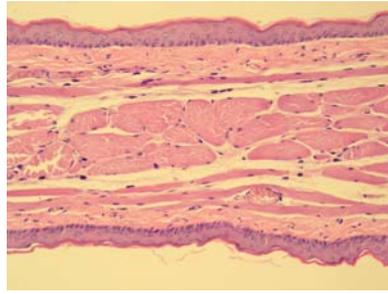
---

observados na região da mucosa para cada grupo experimental foram descritos nos diversos períodos de avaliação.

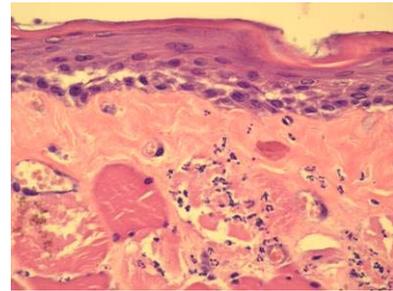
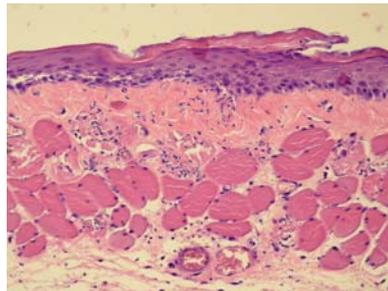
Tabela 2 – Classificação dos eventos histopatológicos (ISO 7405: 1997)

<b>Escore</b>	<b>Evento histopatológico</b>
0	Inflamação ausente
1	Inflamação discreta
2	Inflamação moderada
3	Inflamação severa
4	Formação de abscesso

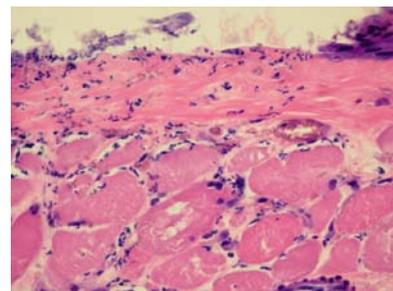
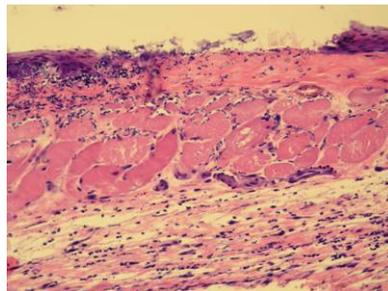
**Escore 0**  
Ausência de  
inflamação



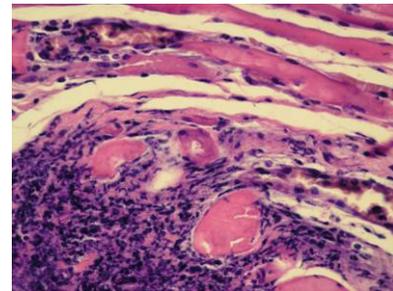
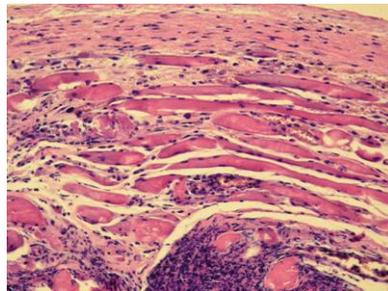
**Escore 1**  
Inflamação  
discreta



**Escore 2**  
Inflamação  
moderada



**Escore 3**  
Inflamação  
severa



**Escore 4**  
Formação de  
abscesso

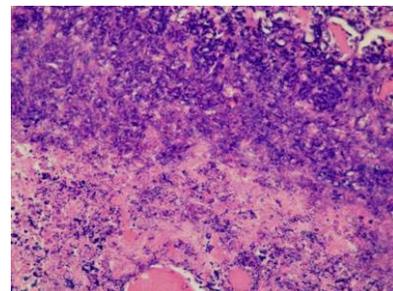
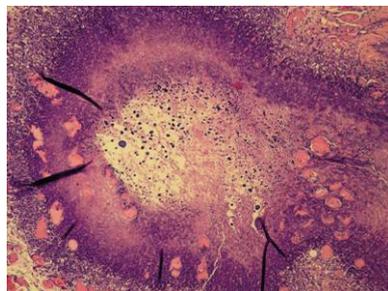


FIGURA 10 – Classificação histológica da mucosite.

#### 4.4 Resumo dos procedimentos

Na Tabela 3 estão relacionados os procedimentos experimentais ao longo dos dias do experimento:

Tabela 3 – Representação esquemática do experimento

	Dia do experimento													
	0	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15	
Injeção de 5-FU	■ ■	■ ■												
Arranhadura da mucosa			■ ■	■ ■										
Tratamento (LED)			■	■		■	■		■	■		■		
Fotografia				■ ■		■ ■	■ ■		■ ■	■ ■		■ ■		
Sacrifício					■ ■ ◆			■ ■			■ ■		■ ■	

■ - Grupo I (LED)

■ - Grupo II (Controle positivo – ausência de tratamento)

◆ - Grupo III (Controle negativo)

#### 4.5 Planejamento estatístico

Nesta pesquisa, a irradiação com LED ou a ausência de tratamento dos animais submetidos à quimioterapia foram considerados variáveis independentes, influenciando ou não na severidade da mucosite induzida, considerada como variável dependente. Assim, de acordo com a proposição deste trabalho, as hipóteses testadas foram:

H<sub>0</sub>: O tratamento não exerce influência sobre a severidade da mucosite.

H<sub>1</sub>: O tratamento exerce influência sobre a severidade da mucosite.

O coeficiente Kappa ( $\kappa$ ) foi calculado para o estudo da concordância intra-examinador verificando-se, dessa maneira, a reprodutibilidade e a confiabilidade das medições realizadas. Para realização dos cálculos utilizou-se o software estatístico com pacote “irr” (Development Core Team<sup>17</sup>, 2006; Gamer<sup>27</sup>, 2006).

Primeiramente realizou-se a análise descritiva dos dados obtidos (escore clínico, peso dos animais e escore histológico) para, em seguida, realizar-se os testes inferenciais.

A avaliação clínica do grau de mucosite e a avaliação histológica do grau de inflamação forneceram variáveis qualitativas com escala ordinal pela atribuição de escores. Grupos independentes foram comparados e, portanto, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar se há diferenças entre os grupos. A análise estatística foi realizada ao nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

Já para a avaliação dos escores clínicos em função do tempo dentro de cada grupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Skillings-Mack para dados em blocos incompletos arbitrariamente (Hollander, Wolfe<sup>32</sup>, 1999).

Para comparar o desenvolvimento da mucosite ao longo do período experimental entre os grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis associado ao método de Dunn, tanto para o exame clínico quanto para o histológico.

O coeficiente de correlação de Kendall foi calculado para verificação da correlação entre o peso dos animais e os escores tanto clínico quanto histológico.

Por fim, uma análise descritiva da variação de temperatura da mucosa jugal dos animais foi realizada com a utilização de Gráficos e Tabelas.



**Resultado**



## 5 Resultado

### 5.1 Avaliação clínica da mucosa

#### 5.1.1 Estudo da concordância

A classificação clínica da mucosite foi realizada em dois momentos distintos, com um mês de intervalo, por um único pesquisador, previamente calibrado. O teste Kappa ( $\kappa$ ) foi realizado para verificar a concordância entre os escores atribuídos à mucosite para cada um dos grupos (LED e controle positivo). Em uma escala que varia de -1 (discordância total) a 1 (concordância total), o valor mínimo considerado satisfatório é de 0,5, ou seja, valores acima disso representam uma concordância adequada.

Uma variante do teste  $\kappa$ , denominado  $\kappa$ -múltiplo, verificou a concordância dentro de cada um dos grupos e também gerou um valor global para esta estatística (Fleiss et al.<sup>25</sup>, 1969; Fleiss et al.<sup>26</sup>, 2003). Os intervalos de confiança de 95% foram calculados para se verificar as seguintes hipóteses:

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0: \kappa = 0 \\ H_1: \kappa \neq 0 \end{array} \right.$$

Caso o valor de  $H_0$  estiver presente no intervalo de confiança, a hipótese nula é aceita. Para se verificar tal fato, o método de bootstrap foi utilizado. Esse método lança mão de computação intensiva

para replicar a amostra, obtendo-se, assim, várias estatísticas nessas simulações, para o cálculo dos intervalos de confiança necessários (Efron, Tibshirani<sup>20</sup>, 1994).

Para o Grupo I (LED), após a obtenção do valor da estatística  $\kappa$ , as simulações bootstrap foram realizadas, com 14.500 replicações da amostra e obteve-se um intervalo de confiança de 95%. A Tabela 4 apresenta estes resultados.

Tabela 4 - Valores da estatística  $\kappa$  de Cohen para o Grupo I (LED)

Intervalo de confiança 95%		
Limite Inferior	$\kappa$	Limite Superior
0,802	0,857	0,907

O intervalo de confiança de 95% para esta estatística fica entre (0,802; 0,907) e o valor estimado de  $\kappa$  para a amostra é de 0,857. Existe uma excelente concordância entre os escores com 90% de resultados idênticos. Assim, tendo em vista as hipóteses formuladas anteriormente, rejeita-se  $H_0$  ( $\kappa = 0$ ) ao nível de significância de 5%, já que o valor 0 não se encontra neste intervalo de confiança. Pelo valor de  $\kappa$  há fortes evidências de que a concordância seja maior que o valor mínimo pré-definido como sendo satisfatório ( $\kappa = 0,5$ ).

Para o Grupo II (CP - controle positivo) foi dado o mesmo tratamento descrito para o Grupo I. Foram realizados os testes de hipótese por meio de intervalos de confiança bootstrap para a estatística  $\kappa$  de Cohen. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores da estatística  $\kappa$  de Cohen para o Grupo II (CP)

Intervalo de confiança 95%		
Limite Inferior	$\kappa$	Limite Superior
0,618	<b>0,688</b>	0,757

Os resultados indicam que o valor estimado para a amostra é 0,688 e que os valores, segundo um intervalo de 95% bootstrap, ficam entre (0,618; 0,757). Além disso, o nível de concordância foi relativamente alto, ficando em 77,2% de resultados idênticos nas várias aferições.

Para o Grupo II, ao nível de significância de 5%, também se rejeita  $H_0$  ( $\kappa = 0$ ), uma vez que o valor 0 não se encontra dentro do intervalo de confiança.

Os resultados obtidos pelos testes estatísticos mostraram haver alta concordância entre as duas avaliações, realizadas pelo mesmo pesquisador, para ambos os Grupos (I e II), mostrando que houve uma calibração adequada. Portanto, a avaliação clínica realizada no primeiro momento pelo pesquisador foi a escolhida para se aplicar os demais testes estatísticos, visto que a segunda avaliação possui maiores chances de influências na classificação do grau da mucosite.

### 5.1.2 Comparação em função dos grupos

O conjunto de dados relativo ao exame clínico é composto por 478 observações que representam os escores obtidos para a severidade da mucosite (Anexos 3, 4 e 5).

A Tabela 6 informa as principais características da estatística descritiva para cada grupo.

Tabela 6 – Estatística descritiva em função dos grupos

Tratamento	N	Mediana	Média	Variância
CN	12	0	0,00	-
CP	214	1	1,87	4,01
LED	252	0	1,25	2,33

Os resultados da Tabela 6 indicam que há uma maior estabilidade dos escores no grupo tratado com LED. Além disso, a mediana do Grupo CP foi maior que os Grupos CN e LED.

O gráfico de barras da Figura 11 auxilia na análise descritiva, mostrando, de maneira simplificada, o número de escores obtidos para cada grupo não se levando em conta o tempo.

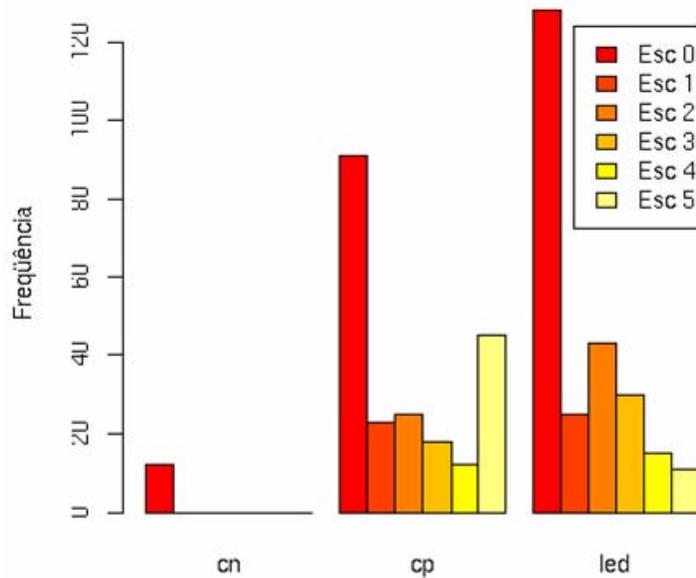


FIGURA 11 – Contagem dos escores em função dos grupos.

Na Figura 11 observa-se que há um grande número de escores 0 no grupo tratado com LED, enquanto o Grupo CP apresenta uma quantidade maior de escores representando alta severidade de mucosite.

Para verificar se essas diferenças entre os grupos são significativas, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para realização do teste, foi calculado o escore mediano de cada animal ao longo do experimento. Assim, foram obtidos dois vetores com escores medianos: o Grupo LED consistiu de 56 observações e o Grupo CP, 48. Nenhum animal do Grupo CN apresentou quadro de mucosite, consistindo, portanto em 12 observações de escore 0.

As seguintes hipóteses foram testadas:

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0: R_{LED} = R_{CP} = R_{CN} \\ H_1: \text{Não existe igualdade entre os postos.} \end{array} \right.$$

R (Rank) representa a soma dos postos dos animais para cada grupo. Foi adotado  $\alpha = 0,05$ . O resultado foi uma estatística  $\chi^2 = 19,24$  com  $p < 0,001$ . Desta maneira, rejeita-se a hipótese nula de que os escores sejam iguais.

Há fortes evidências de que há diferenças entre as somas dos postos entre os grupos. Uma análise de comparações múltiplas não-paramétrica foi utilizada para se detectar estas diferenças. O teste de comparação é baseado em  $\kappa = 3$  grupos com um valor crítico  $q_{0,05} = 4,424$ . Assim, se a estatística  $|W| > q_{0,05}$ , rejeita-se a hipótese nula de que não existem diferenças entre os grupos tomados 2 a 2. A Tabela 7 apresenta este resultado.

Tabela 7 – Comparações múltiplas entre os grupos

Teste	$W$	$ W $	Status
$H_0: R_{CP} = R_{LED}$	-31,19	31,19	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$
$H_0: R_{CP} = R_{CN}$	-15,58	15,58	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$
$H_0: R_{LED} = R_{CN}$	-12,46	12,46	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$

De acordo com a Tabela 7, todos os grupos são diferentes entre si, sendo que o menor escore mediano foi atribuído ao Grupo CN (Med = 0), o segundo menor ao Grupo tratado com LED (Med = 1) e o maior escore é dado ao Grupo CP (Med = 1,5). O valor 1,5 pode

ser interpretado como sendo uma alta probabilidade de se encontrar escores 1 e 2 na região central dos dados e indica que esta probabilidade é maior do que a obtida para os demais grupos.

### 5.1.3 Comportamento em função do tempo

A Figura 12 mostra a dispersão dos dados relativos ao exame clínico e fornece uma visão geral sobre a mediana dos escores de acordo com os dias do experimento.

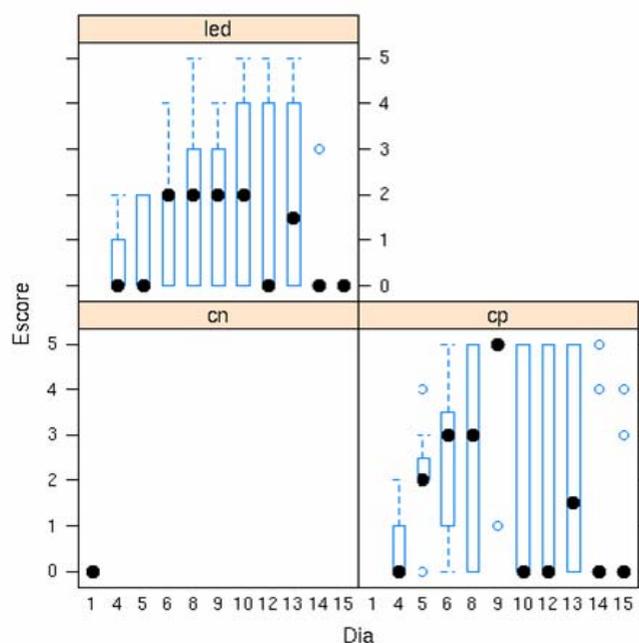


FIGURA 12 – Boxplot dos escores em função dos dias e dos grupos.

A representação gráfica da evolução da severidade da mucosite ao longo dos dias experimentais é ilustrada pela Figura 13.

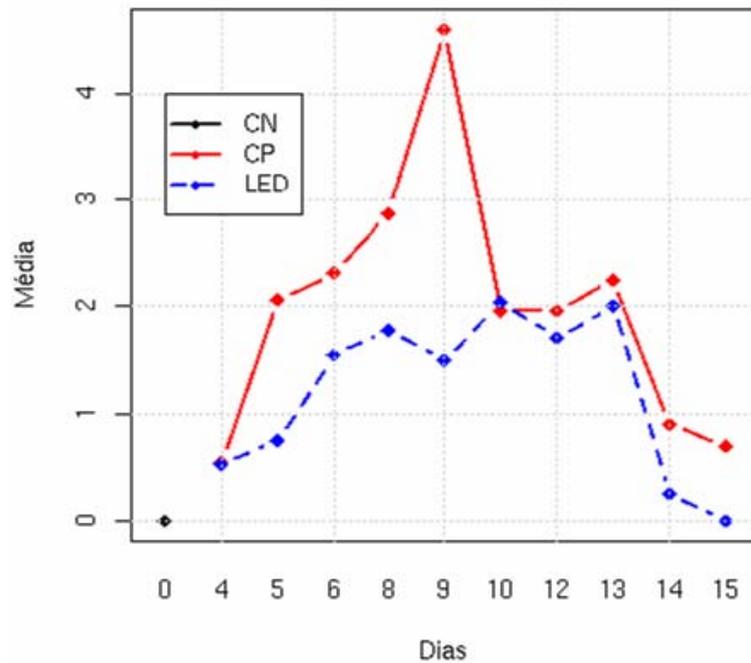


FIGURA 13 – Evolução dos escores médios de severidade em função dos dias para os três grupos.

Pode-se observar que a média diária dos escores para o grupo controle positivo é sempre superior ao grupo tratado com LED com ligeira sobreposição no dia 10 do experimento (Figura 13).

Para verificar se existe diferença entre os escores ao longo do experimento para cada grupo, uma análise inferencial foi realizada. Porém, como os animais foram sacrificados em momentos distintos para a obtenção dos exames histopatológicos, a amostra estudada consistiu em blocos incompletos de dados, pois o tempo de acompanhamento do grau da mucosite diferiu de um animal para o outro. Portanto, o teste não-paramétrico de Skillings-Mack foi o teste selecionado por ser indicado para experimentos com blocos incompletos

arbitrariamente (Hollander, Wolfe<sup>32</sup>, 1999). O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ . A Tabela 8 mostra o resultado deste teste para o Grupo LED e para o Grupo CP.

Tabela 8 – Resultado do teste de Skillings-Mack

Teste Skillings-Mack	Estatística	p-valor( $\chi_9^2$ )
CP	52,376	< 0,0001
LED	21,775	0,0096

Para ambos os grupos o valor de p foi menor que  $\alpha = 0,05$ . Assim, há evidências favoráveis de que haja diferenças entre os escores medianos de cada grupo ao longo do experimento.

Comparando-se o desenvolvimento da mucosite ao longo do período experimental entre o Grupo LED e o Grupo CP por meio do teste de Kruskal-Wallis associado ao método de Dunn (Tabela 9), nota-se que entre os dias 5 e 9 existe diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9 – Teste de Kruskal-Wallis associado ao método de Dunn para comparação do grau de mucosite em cada dia experimental

GRUPOS	DIAS									
	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15
LED x CP	NS	S	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS

S – Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

NS – Diferença não significativa

A mucosite induzida durante o experimento variou desde áreas com leve eritema (Figuras 14a, 14h) até a presença de eritema severo (Figuras 14b, 14c, 14e). Houve surgimento de lesões ulceradas de

diversos tamanhos, envolvendo desde uma pequena região (Figura 14g) até a completa ulceração da mucosa jugal (Figura 14f).

A partir da Figura 14 pode-se notar que, para ambos os Grupos (I e II), o grau médio de severidade da mucosite foi pequeno no dia 5, aumentou nos dias 9 e 13 (pico da mucosite) e regrediu no final do experimento (dia 15), caracterizando a fase de cicatrização das lesões. Porém, os animais do Grupo CP desenvolveram mucosite mais severa nos dias 9 e 13 quando comparados ao Grupo tratado com LED.

FIGURA 14 - Comparação do grau médio de mucosite induzida no Grupo I (LED) e no Grupo II (controle positivo) ao longo dos dias experimentais.

a – dia 5; mucosite grau 1 (grupo I)

b – dia 9; mucosite grau 2 (grupo I)

c – dia 13; mucosite grau 2 (grupo I)

d – dia 15; mucosite grau 0 (grupo I)

e – dia 5; mucosite grau 2 (grupo II)

f – dia 9; mucosite grau 5 (grupo II)

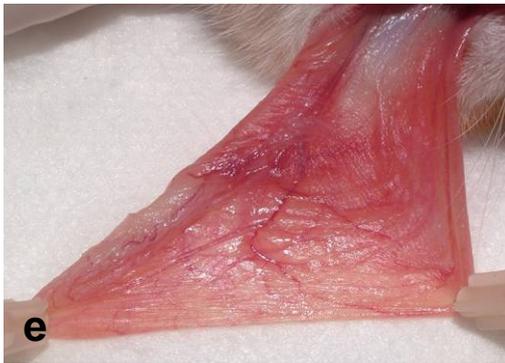
g – dia 13; mucosite grau 3 (grupo II)

h – dia 15; mucosite grau 1 (grupo II)

**Grupo I (LED)**



**Grupo II (controle positivo)**



## 5.2 Avaliação dos animais

### 5.2.1 Alterações de peso corporal

Os animais dos Grupos I e II apresentaram redução do peso corpóreo ao longo do período experimental (Anexos 6 e 7). Vale ressaltar que para o Grupo III só houve medidas para o tempo 5 (Anexo 8). A Tabela 10 apresenta o resumo da análise descritiva do peso dos animais. Pode-se observar que a variância entre os desvios padrões dos Grupos LED e CP é semelhante e que existe uma menor variabilidade no Grupo CN.

Tabela 10 – Estatística descritiva para o peso dos animais em função dos grupos

Tratamento	$\hat{\mu}$	IC 95%		$\hat{\sigma}_\kappa$	Med
		LI	LS		
CN	106,67	96,55	116,79	5,16	110
CP	102,56	81,36	123,75	10,81	105
LED	97,19	75,89	118,49	10,87	100

A Figura 15 é a representação gráfica da evolução das médias dos pesos em função dos dias do experimento. As curvas de evolução são muito semelhantes para os Grupos LED e CP, sendo que há uma tendência de queda até o dia 9 e depois um comportamento irregular, com uma recuperação no peso a partir do 13° dia do experimento.

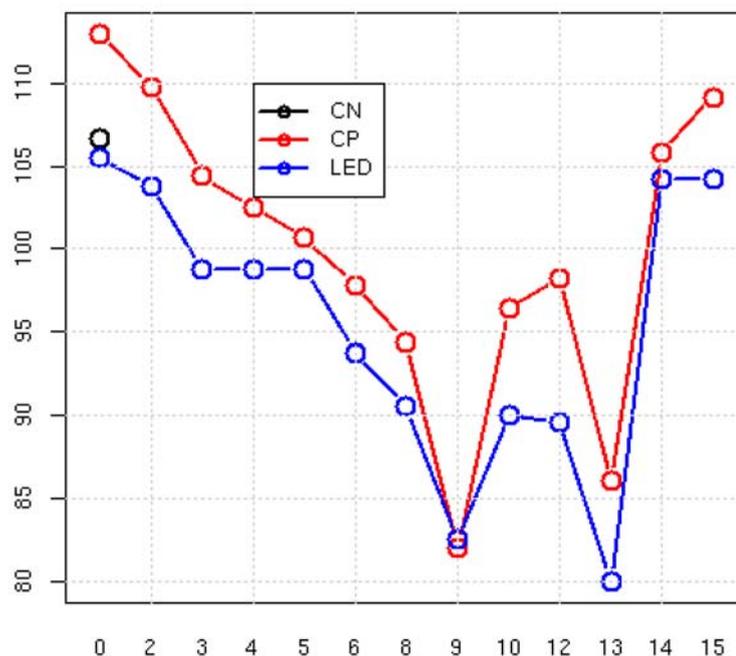


FIGURA 15 – Evolução das médias dos pesos em função do tempo para os grupos.

### 5.2.2 Taxa de mortalidade

Nos Grupos LED e CP o protocolo de indução de mucosite provocou mortalidade de 12,5% e 25%, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 – Mortalidade dos animais para os Grupos LED e CP

Grupos	N	Mortes	Taxa de mortalidade
CP	32	8	25.0%
LED	32	4	12.5%

### 5.3 Avaliação histológica

#### 5.3.1 Comparação em função dos grupos

O conjunto de dados relativos ao exame histológico é composto por 107 observações (Anexos 9, 10 e 11) que representam os escores obtidos para o grau de inflamação. Durante o processamento histológico 9 amostras (3 do Grupo I e 6 do Grupo II) foram perdidas.

A estatística descritiva de cada grupo está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Estatística descritiva em função dos grupos

Tratamento	N	Mediana	Média	Variância
CN	12	0	0,00	-
CP	42	1	1,00	2,11
LED	53	1	1,45	1,19

Na Figura 16 se observa que há um grande número de escore 0 tanto no Grupo CP quanto no Grupo LED, no entanto, o Grupo LED apresenta menor quantidade de escores indicando inflamação severa, que dá indícios de que haja diferenças entre os grupos.

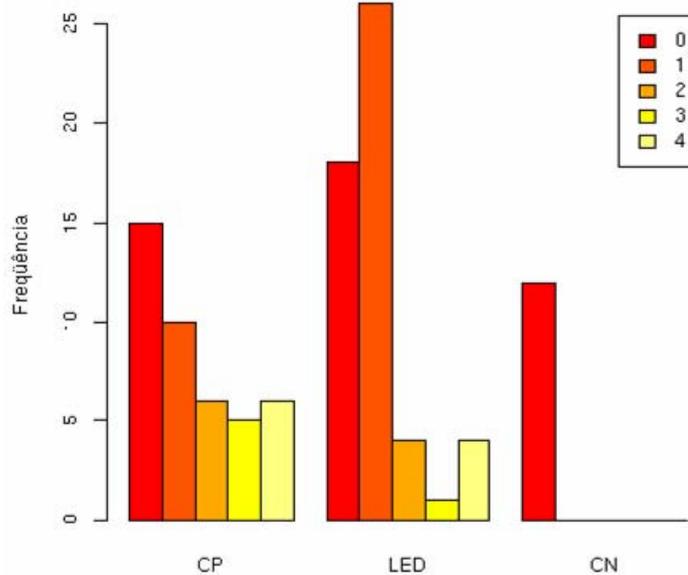


FIGURA 16 – Contagem dos escores em função dos grupos.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar se existem diferenças entre os escores. Assim, o teste foi realizado adotando-se um intervalo de confiança de 95%, o que significa  $\alpha = 0,05$ . Desta maneira, como resultado do teste tem-se que a estatística  $\chi^2 = 16,41$  com 2 graus de liberdade, o que fornece um valor de  $p = 0,0002$ , implicando na rejeição da hipótese nula de que não existe diferença entre os escores dos grupos. Para saber quais grupos são diferentes entre si, o mesmo teste de comparações múltiplas não-paramétrico utilizado para os escores clínicos foi adotado (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparações múltiplas entre os grupos

Teste	$W$	$ W $	Status
$H_0 : R_{CP} = R_{LED}$	-30,14	30,14	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$
$H_0 : R_{CP} = R_{CN}$	-15,56	15,56	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$
$H_0 : R_{LED} = R_{CN}$	-13,64	13,64	Rejeita-se $H_0$ , pois $ W  > 4,424$

Há fortes evidências de que haja realmente diferenças entre a soma dos postos de cada grupo. Os escores relativos ao Grupo CN são menores que os do Grupo LED, que por sua vez, são menores que os do Grupo CP.

### 5.3.2 Comportamento em função do tempo

A dispersão dos dados de acordo com os dias do experimento está representado na Figura 17.

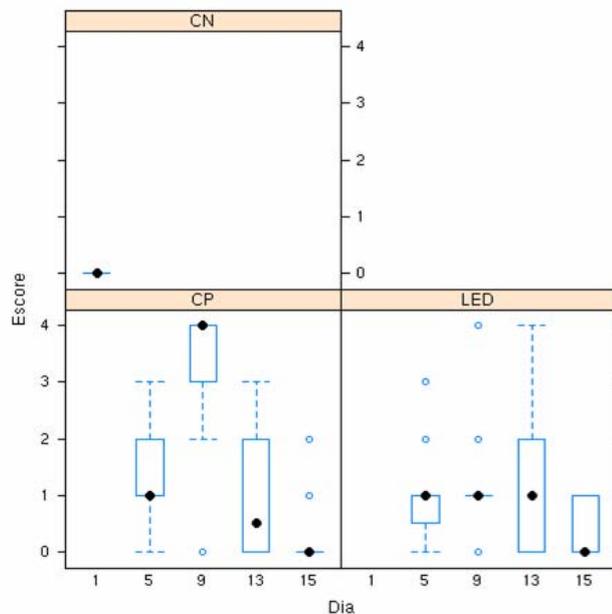


FIGURA 17 – Boxplot dos escores em função dos dias e dos grupos.

A evolução dos escores do exame histológico é apresentada na Figura 18. O comportamento das curvas é muito acentuado e as diferenças entre elas são muito grandes. O Grupo LED

apresenta escores mais estáveis quando comparado ao Grupo CP que possui um pico máximo no dia 9 do experimento. As linhas azul e vermelha se sobrepõem depois do dia 13. A Tabela 14 mostra que existe diferença significativa entre o grau de inflamação somente para o dia 9 do experimento.

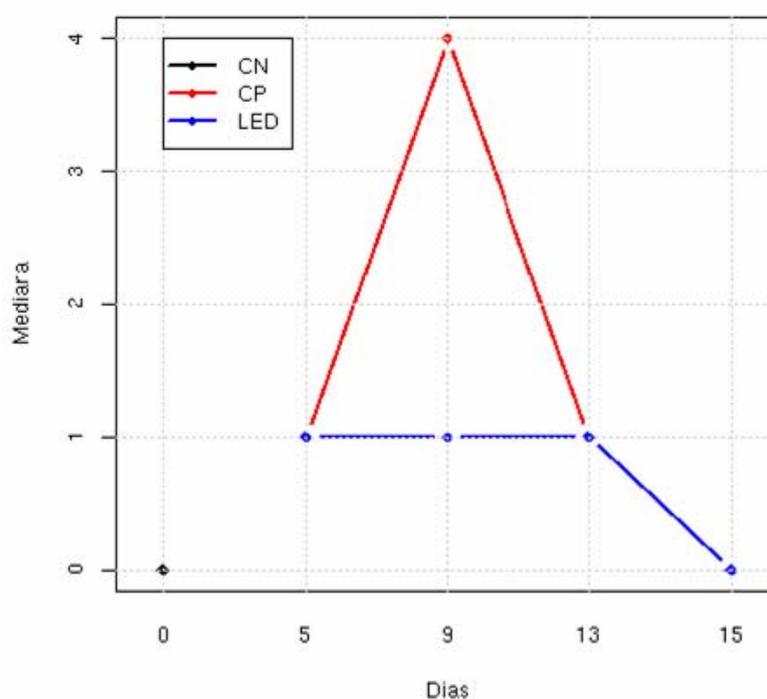


FIGURA 18 – Evolução dos escores de severidade em função dos dias para cada grupo.

Tabela 14 - Teste de Kruskal-Wallis associado ao método de Dunn para comparação do grau de inflamação em cada dia experimental

GRUPOS	DIAS			
	5	9	13	15
LED x CP	NS	S	NS	NS

S – Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

NS – Diferença não significante

No Grupo LED foram avaliados 53 espécimes ao longo do experimento e os escores 0 e 1 (Figuras 19b, 19c; Figuras 20a, 20b, 20c, 20d), representativos de ausência de inflamação e presença de eritema leve, respectivamente, foram predominantes totalizando 44 espécimes (83% das amostras). Porém, para este grupo, 18% das amostras (10 espécimes) apresentaram degeneração muscular, visível somente ao exame histológico, sem evidências clínicas. A degeneração muscular ocorreu mesmo quando o epitélio se manteve íntegro e com pequeno grau de inflamação (escores 1 e 2) (Figuras 19d, 19e, 19g, 19h).

Já no Grupo CP foram avaliados 42 espécimes e a presença de escores 0 e 1 (Figura 21a) foi atribuído a 25 espécimes (60% das amostras). Portanto, o número de escores correspondente a inflamações mais severas foi maior, sendo classificados 6 espécimes como escore 2 (Figuras 21b, 21g, 21h); 5 como escore 3 (Figuras 21c, 21f) e 6 como escore 4 (Figuras 21d, 21e).

No Grupo CN os tecidos epitelial e conjuntivo exibiram características de normalidade. O epitélio apresentou-se contínuo, com camada basal íntegra e camada de ceratina delgada como revestimento externo. O tecido conjuntivo subjacente exibiu equilíbrio entre componentes de matriz extracelular e células, sendo notável a presença de tecido muscular íntegro no local (Figuras 22a, 22b). Estes achados histológicos foram representativos das características clínicas determinadas para todos os espécimes deste grupo (Figura 22c).

---

FIGURA 19 – Classificação histológica da mucosite no Grupo I (LED) ao longo dos dias experimentais.

**a – Dia 5, escore 3.** Ampla área de úlcera apresentando reação inflamatória moderada com predomínio de polimorfonucleares (★). Nota-se área de degradação de colágeno e de fibras musculares (➔) associada à presença de vasos sanguíneos dilatados (▶) e regiões hemorrágicas. Ampla área de edema é observada no local (■). H/E, 100x.

**b – Dia 5, escore 1.** Epitélio ceratinizado íntegro com delgada camada de tecido conjuntivo denso subjacente (★). No tecido muscular observam-se vasos sanguíneos dilatados e congestos (▶) associados à discreta reação inflamatória com predomínio de neutrófilos. Áreas de degradação de fibras musculares são observadas (➔). H/E, 200x.

**c – Dia 5, escore 1.** Detalhe da Figura anterior. Observe a presença de células inflamatórias polimorfonucleares sobre as fibras musculares adjacentes à área irradiada. H/E, 400x.

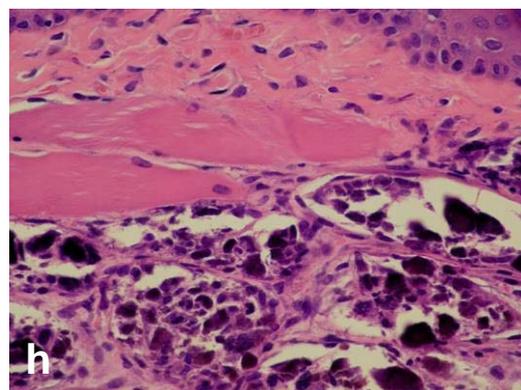
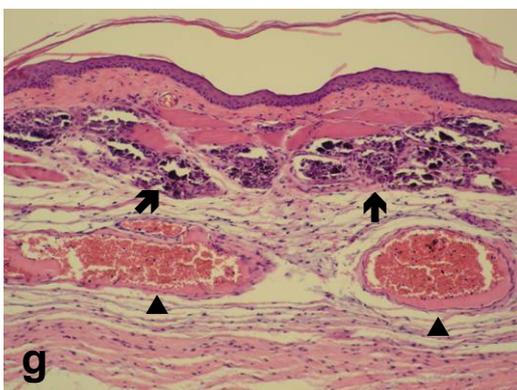
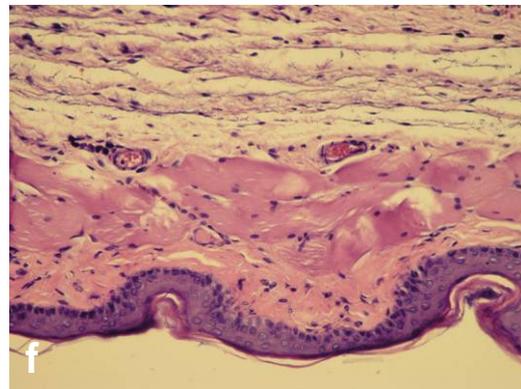
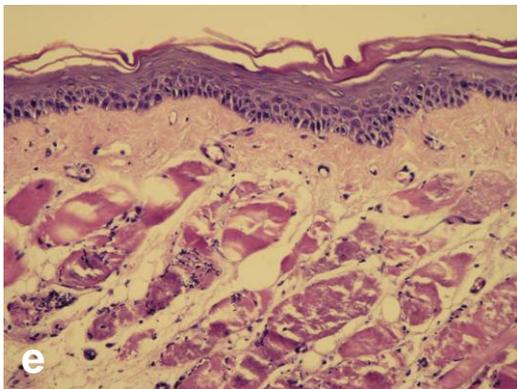
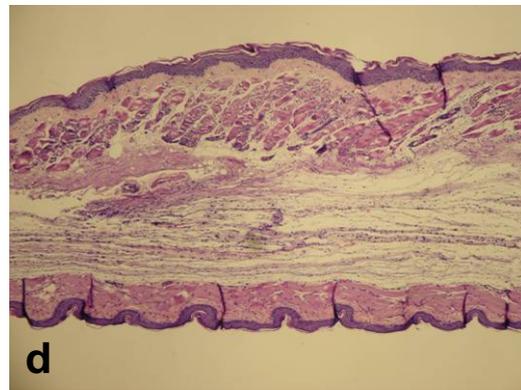
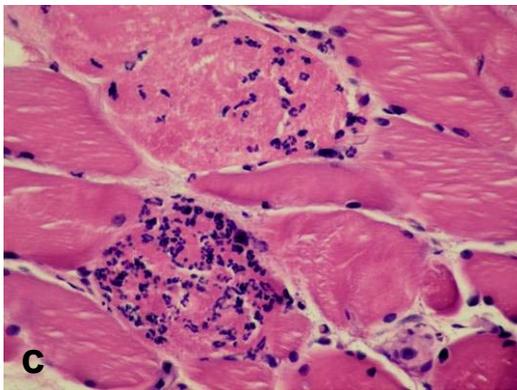
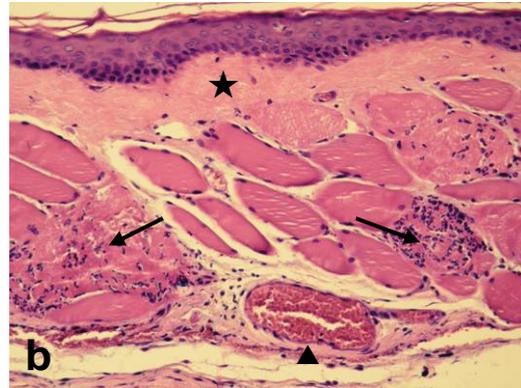
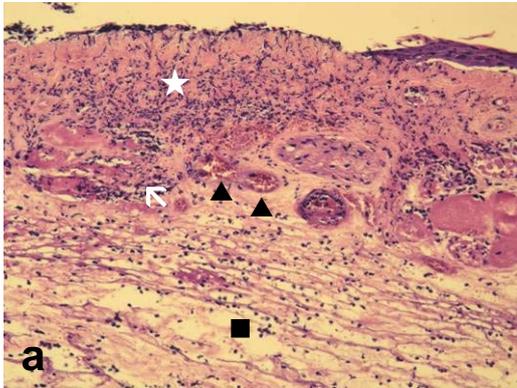
**d – Dia 5, escore 2.** Vista geral onde pode-se observar diferenças entre o tecido conjuntivo subjacente ao epitélio nas duas superfícies da mucosa do animal: superior (tratada) e inferior (não tratada). H/E, 40x.

**e – Dia 5, escore 2.** Detalhe da superfície da mucosa tratada. Apesar da integridade do epitélio e do tecido conjuntivo denso celularizado, está ocorrendo intensa degradação de fibras musculares no tecido subjacente associado à presença de infiltrado inflamatório moderado. H/E, 200x.

**f – Dia 5, escore 2.** Detalhe da superfície da mucosa não tratada, mostrando tecido com características histológicas de normalidade. H/E, 200x.

**g – Dia 9, escore 1.** Região da mucosa onde se observa vasos sanguíneos dilatados e congestos (▶). Apesar do epitélio se apresentar íntegro, grande parte do tecido muscular subjacente está degradado (➔) e com notável presença de células inflamatórias na região. H/E, 100x.

**h – Dia 9, escore 1.** Detalhe da Figura anterior, onde pode-se observar predomínio de macrófagos junto à área de degradação de fibras musculares. H/E, 400x.



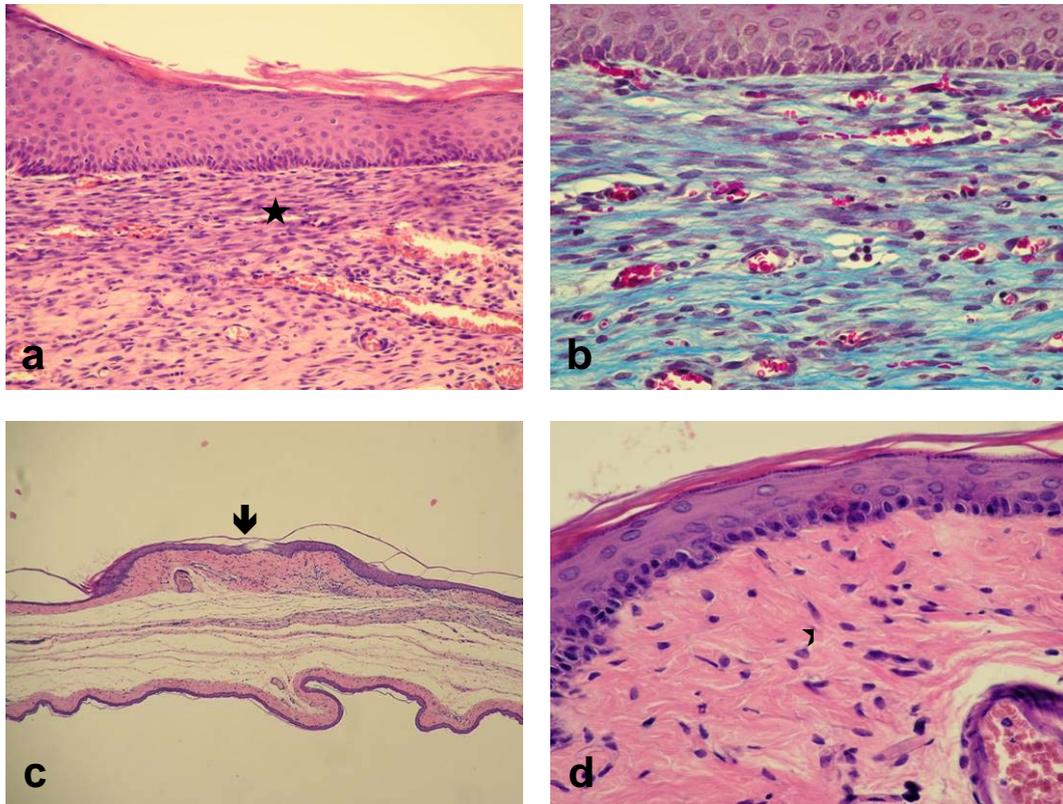


FIGURA 20 – Classificação histológica da mucosite no Grupo I (LED) ao longo dos dias experimentais.

**a – Dia 13, score 1.** Epitélio íntegro com ligeiro espessamento e deposição de ceratina. Subjacente, pode-se observar área de tecido conjuntivo altamente celularizada e rica em colágeno, sugestiva de cicatrização (★). H/E, 200x.

**b – Dia 13, score 1.** Tecido conjuntivo da região sugestiva de cicatrização. Note a intensa proliferação fibroangioblástica em meio à discreta presença de células inflamatórias. Tricrômico de Masson, 400x.

**c – Dia 13, score 1.** Vista geral das duas superfícies da mucosa (tratada - superior e não tratada - inferior). A área superior é sugestiva de tecido em fase de cicatrização (➔). H/E, 40x.

**d – Dia 13, score 1.** Detalhe da área de cicatrização avançada com deposição de denso tecido fibroso em meio a numerosos fibroblastos (★). H/E, 400x.

---

FIGURA 21 – Classificação histológica da mucosite no Grupo II (controle positivo) ao longo dos dias experimentais.

**a – Dia 5, escore 1.** Apesar da presença de epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, nota-se ruptura da camada basal (➡). O tecido conjuntivo subjacente apresenta numerosas células inflamatórias caracterizando um infiltrado inflamatório misto em meio a numerosos vasos sanguíneos congestos (▶). Esta reação inflamatória discreta se estende para região das fibras musculares onde se observa ligeiro edema (★). H/E, 200x.

**b – Dia 5, escore 2.** Área de ruptura do epitélio (➡) com exposição do tecido conjuntivo subjacente. Nota-se infiltrado inflamatório misto moderado na região da úlcera e entre as fibras musculares. H/E, 400x.

**c – Dia 9, escore 3.** Área de úlcera com intenso infiltrado inflamatório em meio às fibras musculares, as quais se apresentam completa ou parcialmente degradadas (➡). H/E, 200x.

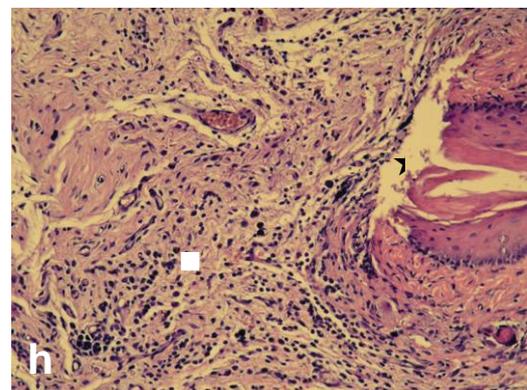
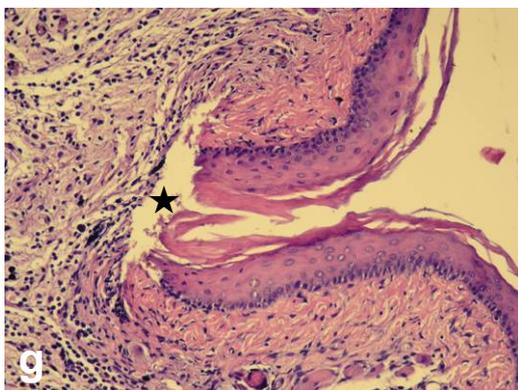
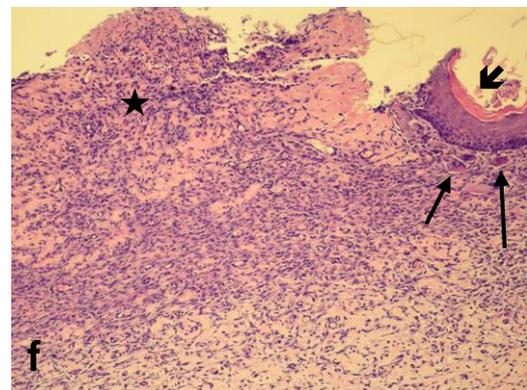
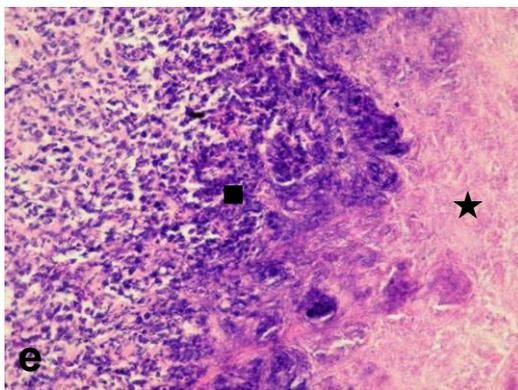
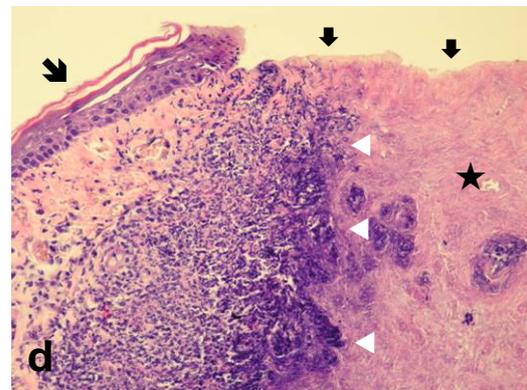
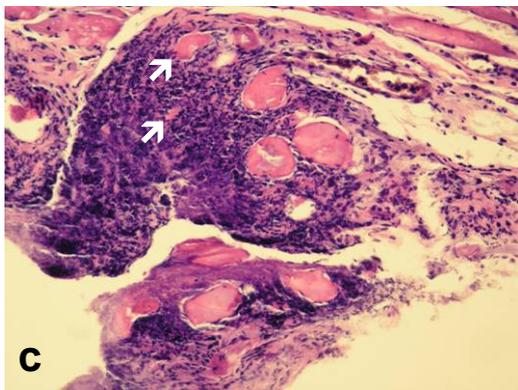
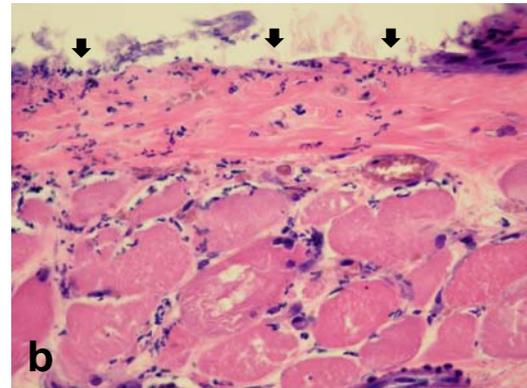
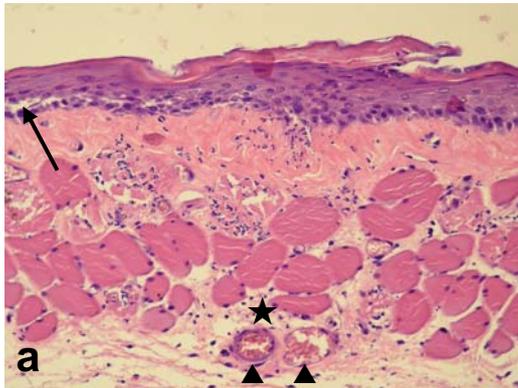
**d – Dia 9, escore 4.** Tecido epitelial contínuo recobre o tecido conjuntivo da parte esquerda da fotomicrografia (➡). Todavia, no lado direito há uma ampla perda de epitélio, evidenciando a área ulcerada (➡). Subjacente à úlcera, nota-se ampla e profunda área de necrose tecidual e abscesso (★), os quais são delimitados do restante da estrutura conjuntiva pela presença de uma camada de tecido caracterizado por apresentar intenso infiltrado inflamatório (▶). H/E, 200x.

**e – Dia 9, escore 4.** Detalhe da Figura anterior da camada de tecido reacional presente entre a área de necrose e abscesso e o tecido conjuntivo não exposto. Adjacente à área de necrose (★) observa-se intenso infiltrado inflamatório misto (■). H/E, 400x.

**f – Dia 13, escore 3.** Ampla área de ruptura do epitélio. Note parte do epitélio ceratinizado na porção direita da fotomicrografia (➡). Subjacente à área de úlcera observa-se intenso infiltrado inflamatório (★) com proliferação fibroangioblástica característico de um processo de reparação tecidual. Macrófagos e células gigantes são observados no local (➡). H/E, 100x.

**g – Dia 15, escore 2.** Área com pequena úlcera (★) associada à moderada reação inflamatória subjacente. H/E, 200x.

**h – Dia 15, escore 2.** Detalhe da Figura anterior. Região mais profunda do tecido conjuntivo, subjacente à área de úlcera (★), exibindo moderado processo inflamatório com predomínio de células mononucleares (■). H/E, 200x.



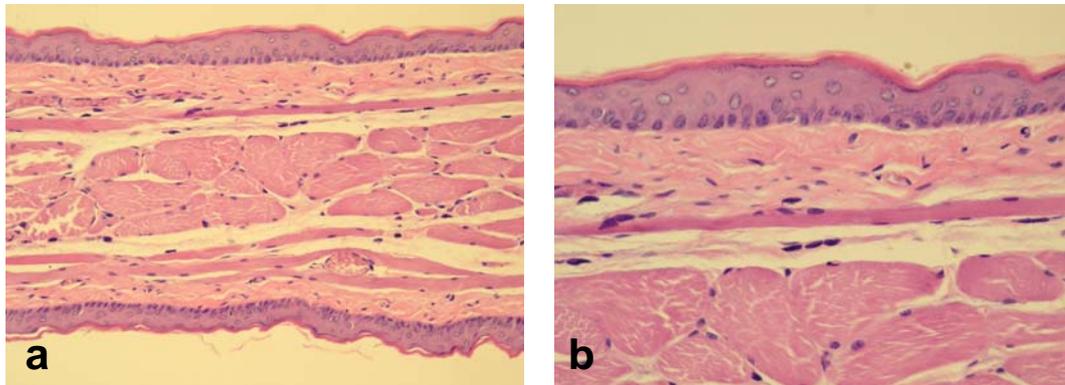


FIGURA 22 – Classificação histológica da mucosite no Grupo III (controle negativo).

**a – Escore 0.** Biópsia de tecido normal. Vista geral da mucosa do animal, a qual exhibe características histológicas de normalidade. H/E, 200x.

**b – Escore 0.** Detalhe da Figura anterior. Observe detalhes do epitélio pavimentoso estratificado íntegro, o qual está recoberto por delgada camada de ceratina. O tecido conjuntivo subjacente apresenta espessa camada de fibras colágenas com numerosos fibroblastos e pequenos vasos sanguíneos. Imediatamente abaixo, fibras musculares íntegras estão presentes. H/E, 400x.

## 5.4 Correlações

Para verificar a correlação existente entre os pesos e os escores clínico e histológico, a correlação de Kendall foi calculada (Hollander, Wolfe<sup>32</sup>, 1999). Para que houvesse um número de observações iguais para todas as variáveis (peso, escore clínico e histológico) foram utilizados somente os pesos e os escores clínicos referentes ao dia do sacrifício (5, 9, 13 e 15) dos Grupos LED e CP. A correlação para o Grupo CN não foi realizada, pois não existe variabilidade inerente ao escore já que, para todos os espécimes, foi atribuído escore clínico e histológico 0. O método de “bootstrap” foi novamente utilizado para a obtenção do intervalo de confiança de 95%, com 7000 replicações (Efron, Tibshirani<sup>21</sup>, 1994). O comportamento da variável peso foi analisado com relação ao exame clínico e histológico e o resultado está apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Correlação entre peso dos animais e escores para os exames clínico e histológico. (LI: limite inferior, LS: limite superior do intervalo de 95%)

Exame	Tratamento	$\kappa$	LI	LS	$\hat{\sigma}_{\kappa}$
Clínico	CN	-	-	-	-
	CP	-0,725	-0,826	-0,584	0,059
	LED	-0,400	-0,594	-0,166	0,107
Histopatológico	CN	-	-	-	-
	CP	-0,557	-0,712	-0,367	0,088
	LED	-0,282	-0,483	-0,057	0,107

A correlação entre os pesos e os escores clínico e histológico é significativa (uma vez que entre os limites LI e LS não está

presente o valor 0) para todos os grupos e esta correlação é negativa, indicando que enquanto uma medida cresce, a outra tende a decrescer.

As curvas com as correlações são apresentadas na Figura 23.

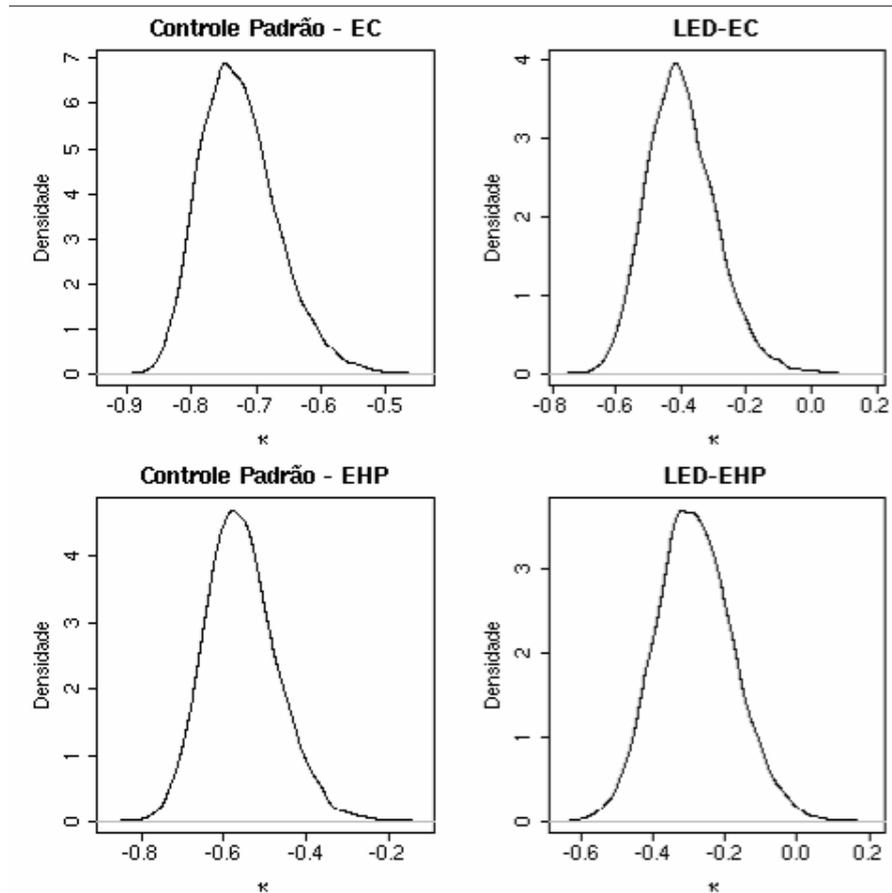


FIGURA 23 - Densidade das correlações estimadas pelo método bootstrap para o exame clínico (EC) e histológico (EHP).

### 5.5 Mapeamento térmico da mucosa jugal dos animais

Todas as informações coletadas durante o mapeamento térmico da mucosa jugal dos animais constam no Anexo 12.

A Figura 24 mostra a variação de temperatura da mucosa dos animais durante as quatro aplicações de LED, protegido com filme de PVC.

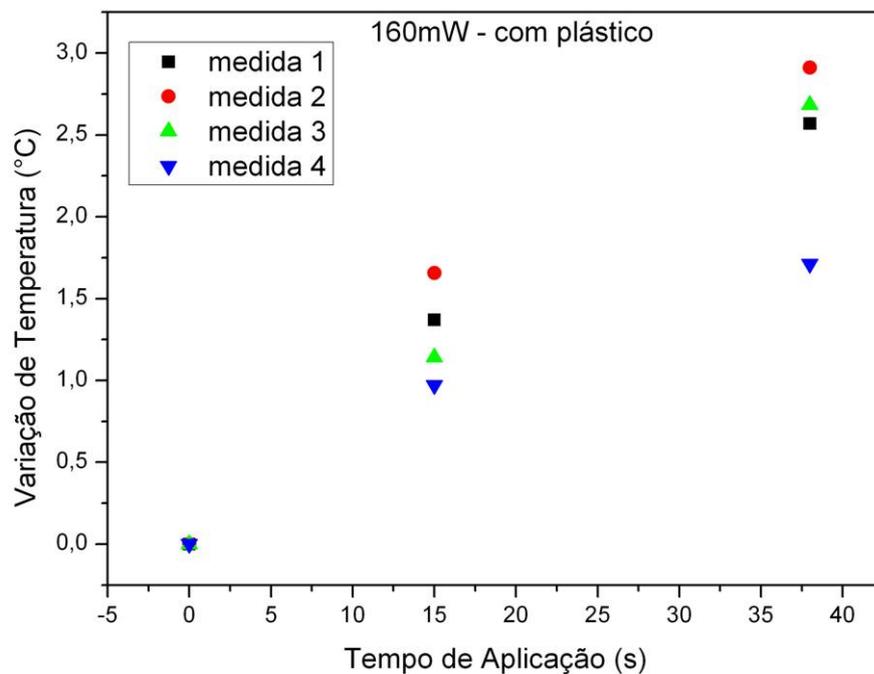


FIGURA 24 – Variação de temperatura atingida pela mucosa durante as aplicações de LED com proteção.

Para verificar se existem diferenças de temperatura devido à utilização de filme de PVC para proteção da ponta do aparelho, a variação de temperatura da mucosa dos animais também foi mensurada durante a aplicação do LED sem proteção (Figura 25).

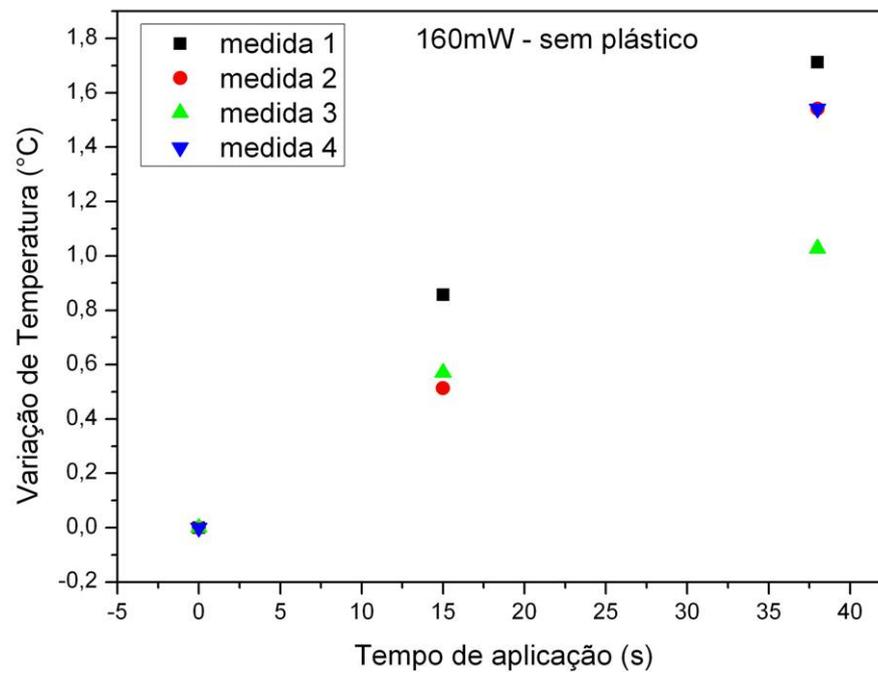


FIGURA 25 – Variação de temperatura atingida pela mucosa durante as aplicações de LED sem proteção.



## Discussão



## 6 Discussão

A cavidade oral é freqüentemente exposta a forças friccionais durante o processo de alimentação. O alimento é quebrado em pequenos pedaços, mastigado e umidificado pela saliva para ser deglutido e digerido pelo trato gastrointestinal. Para promover uma barreira de proteção contra agentes agressores externos, a mucosa mastigatória é revestida por epitélio escamoso estratificado que pode ser queratinizado ou não queratinizado, dependendo da região. Em áreas menos expostas aos efeitos da mastigação, como mucosas jugal e labial, assoalho da boca, palato mole e superfícies ventral e lateral da língua, o epitélio é considerado não queratinizado pela ausência da camada de ceratina como revestimento de proteção (Squier, Kremer<sup>70</sup>, 2001; Duncan, Grant<sup>19</sup>, 2003). Conseqüentemente, estas regiões são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da quimioterapia. Porém, em nosso estudo foi encontrada uma fina camada de ceratina revestindo o epitélio da mucosa oral dos hamsters (Figura 20a; Figura 21a; Figura 22b), fato este concordante com os achados histológicos de Morvan et al.<sup>47</sup> em 2004. Provavelmente a presença de ceratina se deva aos hábitos e tipo de alimentação dos animais utilizados para este estudo, que se alimentam exclusivamente de ração e, normalmente, armazenam pedaços inteiros do alimento em bolsas situadas nas bochechas. Estas bolsas constituem a mucosa jugal dos animais e, portanto, a áspera ração permanece em contato direto com o epitélio, promovendo uma maior fricção com o tecido

e estimulando a deposição de ceratina como barreira de proteção. No entanto, a fina camada de ceratina não foi um empecilho ao desenvolvimento de mucosite.

Durante o processo de alimentação, diversas camadas do epitélio são removidas e deglutidas juntamente com o bolo alimentar. Portanto, deve haver constante reposição das células epiteliais para que ocorra a restituição anatômica e funcional do tecido. O epitélio da cavidade oral é constituído por células lábeis ou estáveis, isto é, células que possuem a capacidade de se regenerar durante toda a vida (Junqueira, Carneiro<sup>33</sup>, 2004). A proliferação celular é contínua e o epitélio da mucosa bucal é constantemente renovado de 4 a 8 dias (Morvan et al.<sup>47</sup>, 2004).

Os primeiros sinais clínicos da mucosite ocorrem de 4 a 5 dias após o início da quimioterapia (Sonis<sup>59</sup>, 1998), coincidindo com o período de renovação epitelial da mucosa devido a ação dos agentes quimioterápicos que atuam diretamente sobre as células do epitélio oral, reduzindo a taxa de proliferação celular (Sonis<sup>59</sup>, 1998; Sonis et al.<sup>66</sup>, 2000; Squier, Kremer<sup>70</sup>, 2001). Como consequência, o epitélio se torna mais delgado já que a regeneração fisiológica não ocorre e continua havendo o processo de descamação da mucosa. Nesse momento, até mesmo traumas funcionais como a mastigação e a deglutição podem ocasionar ruptura do epitélio oral e franca ulceração da mucosa, instalando-se, então, o quadro de mucosite oral.

Porém, no modelo de experimentação animal adotado para esta pesquisa, o trauma funcional foi provocado já que a mucosa do hamster não permanece em contato direto com os dentes do animal. Quando não estão armazenando alimento na boca, a mucosa jugal dos animais fica retraída e, de certa forma, protegida das agressões externas durante a mastigação. Portanto, a indução da mucosite em hamsters possui uma etapa essencial, a escarificação da mucosa, que mimetiza os traumas funcionais. Sem esse procedimento, as lesões orais provavelmente não se desenvolveriam. Na literatura são descritas diversas maneiras de se realizar essa escarificação, dentre elas a utilização de agulhas (Sonis et al.<sup>62</sup>, 1990; Loury et al.<sup>40</sup>, 1999) e de fresas em baixa rotação (Morvan et al.<sup>47</sup>, 2004). Para este estudo, a escarificação da mucosa jugal foi realizada com um dispositivo confeccionado com fio ortodôntico, de maneira a arranhar a região central da mucosa sem, no entanto, causar ruptura do epitélio. Para melhor padronização do procedimento, a escarificação foi realizada por um único operador, previamente treinado, para manter uma força semelhante em todas as mucosas. Como este dispositivo é menos agressivo que a agulha, quatro escarificações consecutivas foram necessárias para promover eritema no tecido. Após anestesia, a mucosa jugal dos animais foi evertida e fixada em uma mesa de isopor com duas agulhas de insulina. O próprio ato de fixação constitui uma agressão à mucosa. Porém, pela própria anatomia da mucosa, a fixação das agulhas recaía,

aproximadamente, na mesma área de uma avaliação clínica para outra. Quando houve surgimento de lesões próximas a essas áreas (extremidades da mucosa), estas não eram consideradas como mucosite já que o grau de agressão provocado foi muito maior que um trauma funcional que, promove, no máximo, uma abrasão do tecido por fricção, sem, no entanto, romper efetivamente o epitélio. Todavia, poucos animais desenvolveram lesão nesses locais, não constituindo um fator de interferência no estudo.

O modelo de indução de mucosite por quimioterapia em hamsters foi utilizado neste estudo por ser um protocolo simples, rápido e já estabelecido na literatura (Sonis et al.<sup>62</sup>, 1990). O agente quimioterápico administrado foi o 5-fluoruracila (5-FU), freqüentemente utilizado em tumores de cabeça e pescoço e em neoplasias hematológicas e está dentre os agentes mais relacionados ao desenvolvimento de mucosite oral durante o tratamento quimioterápico (Pico et al.<sup>53</sup>, 1998). Porém, a dose e o esquema quimioterápico apresentados foram estabelecidos a partir de observações de estudos conduzidos previamente e após a realização de estudo piloto e verificação de baixa mortalidade associada. A utilização de hamsters para o estudo da mucosite oral já se tornou consagrada, com várias pesquisas que se baseiam nesse modelo (Sonis et al.<sup>61-67</sup>; Loury et al.<sup>40</sup>, 1999; Clarke et al.<sup>12-13</sup>; Morvan et al.<sup>47</sup>, 2004; Sonis<sup>60</sup>, 2004; Lima et al.<sup>38</sup>, 2005; Leitão et al.<sup>37</sup>, 2007). A escolha desses animais justifica-se pelo fato de

apresentarem mucosa jugal ampla e elástica, facilitando a realização dos procedimentos experimentais. Com esse protocolo, conseguiu-se induzir mucosite oral nos animais de forma similar à relatada na literatura, com surgimento dos primeiros sinais de 4 a 5 dias após o início da quimioterapia (Scully et al.<sup>57</sup>, 2006). O pico da mucosite foi observado entre os dias 9 e 13 do experimento, o que está de acordo com estudos descritos anteriormente (Sonis et al.<sup>62</sup>, 1990; Sonis et al.<sup>67</sup>, 1997; Morvan et al.<sup>47</sup>, 2004).

O protocolo para realização da anestesia seguiu as recomendações do Guia de Experimentação Animal do Conselho Canadense de Proteção ao Animal<sup>51</sup> (CCAC) que preconiza a associação do anestésico geral ketamina, para produzir rigidez muscular e tornar o animal alheio ao ambiente externo, ao relaxante muscular xilazina, para melhorar a analgesia e reduzir o tônus muscular. Já a dosagem desses medicamentos especificamente para hamsters foi baseada nas normas da Fundação Oswaldo Cruz<sup>10</sup> (FIOCRUZ) de 2005 e condiz com a dosagem utilizada por Sonis et al.<sup>62</sup> em 1990 no desenvolvimento do modelo animal de indução de mucosite. A injeção intramuscular deste tipo de anestesia é contra-indicada em hamsters pela possibilidade de provocar necrose muscular. Portanto, a via de administração escolhida para este estudo foi a intraperitoneal, também aplicada por Sonis et al.<sup>61-63</sup>; Sonis et al.<sup>65-66</sup> nos trabalhos envolvendo a utilização deste tipo de animal. Durante o período de anestesia, os animais permaneciam com os olhos abertos

devido ao relaxante muscular. Tal fato implicou em alguns cuidados como a utilização de compressas de gaze esterilizadas umedecidas em soro fisiológico durante os procedimentos experimentais para evitar o ressecamento das córneas.

Alguns estudos utilizam anestésicos inalatórios como agentes voláteis derivados de éter (dietil éter, isoflurano, entre outros) (Sonis et al.<sup>67</sup>, 1997; Clarke et al.<sup>13</sup>, 2002). A metabolização desses agentes pelo organismo é mínima, uma vez que são exalados pelo pulmão e, assim que se remove o anestésico da narina dos animais, o efeito cessa em poucos segundos. Este tipo de procedimento é utilizado quando se requer anestésias diárias dos animais já que a anestesia com ketamina e xilazina necessita de certo tempo para completa metabolização e eliminação pelo organismo. Além disso, para utilização de anestésicos inalatórios, é necessário haver uma infra-estrutura adequada para garantir a correta administração e monitoramento dos animais. Como o procedimento anestésico dos animais durante este estudo era realizado, de maneira geral, a cada dois dias, optou-se em utilizar anestesia intraperitoneal pela maior facilidade na realização.

A maioria das pesquisas para o tratamento de mucosite oral estuda medidas paliativas e, tendo em vista a importância clínica dessa complicação no tratamento antineoplásico, a busca por terapias que tragam não só o alívio dos sintomas, mas também atuem de forma preventiva e curativa, tornou-se imprescindível. Alguns estudos utilizam

agentes com ação específica no epitélio da mucosa oral no intuito de diminuir a incidência e a severidade da mucosite (Sonis et al.<sup>61</sup>, 1992; Sonis et al.<sup>63</sup>, 1995; Sonis et al.<sup>67</sup>, 1997; Hejna et al.<sup>31</sup>, 2001; Spielberger et al.<sup>68</sup>, 2004). A utilização da terapia com luz também faz parte dos estudos que pesquisam agentes que atuem diretamente sobre a mucosa oral. O laser terapêutico tem sido pesquisado como alternativa de tratamento da mucosite (Barasch et al.<sup>5</sup>, 1995; Cowen et al.<sup>15</sup>, 1997; Migliorati et al.<sup>46</sup>, 2001; Sandoval et al.<sup>56</sup>, 2003; Nes, Posso<sup>50</sup>, 2005) uma vez que já está comprovada a sua eficácia no tratamento de úlceras e feridas de diversas etiologias (Karu<sup>34</sup>, 1989). Os estudos obtiveram resultados positivos tanto com relação à redução da severidade quanto à prevenção da mucosite.

Outra fonte promissora no processo de fotobioestimulação é o LED (*light emitting diode*), que pode atingir, em uma única aplicação, extensas áreas de feridas, mantendo intensidade e densidade de energia homogêneas (Sommer et al.<sup>58</sup>, 2001) por meio da utilização de pontas com diâmetros maiores. Constitui uma alternativa menos onerosa que o laser e, segundo Whelan et al.<sup>74</sup> (2002) exerce os mesmos efeitos curativos em feridas de mucosa e é uma terapia que pode ser utilizada para o tratamento da mucosite oral. Entretanto, encontramos na literatura somente dois trabalhos que pesquisaram o LED para este fim. Além do mais, essas pesquisas foram realizadas em pacientes, requerendo estudo em animais para um melhor entendimento de todos os processos

biológicos presentes durante o tratamento da mucosite com LED. Esses fatos constituíram um estímulo para a realização deste trabalho.

Em nosso estudo utilizamos um protótipo de LED que produz luz com comprimento de onda de  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  situado na faixa de luz vermelha dentro do espectro eletromagnético. Em um estudo piloto prévio (Sacono et al.<sup>55</sup>, 2005), verificou-se que os efeitos clínicos do LED vermelho (630nm) e infravermelho (880nm) foram semelhantes, com ambos os comprimentos de onda sendo efetivos para a redução da severidade da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters. Conseqüentemente, há fortes evidências de que ambos os comprimentos são apropriados para o tratamento da mucosite. No entanto, optou-se pelo comprimento de onda de 630nm tendo como base os resultados descritos por Whelan et al.<sup>74</sup> em 2002 e Corti et al.<sup>14</sup> em 2006, os quais relataram que o LED vermelho foi capaz de reduzir a incidência e a duração da mucosite em pacientes submetidos à quimioterapia.

Esses trabalhos utilizaram densidades de energia bem mais baixas quando comparados ao presente estudo:  $4\text{ J/cm}^2$  (Whelan et al.<sup>74</sup>, 2002) e  $0.99\text{ J/cm}^2$  (Corti et al.<sup>14</sup>, 2006). Entretanto, as aplicações foram diárias e no estudo que utilizou  $0.99\text{ J/cm}^2$  de densidade o LED foi aplicado três vezes ao dia. A densidade de energia utilizada neste trabalho foi de  $12\text{ J/cm}^2$  a cada dois dias e baseou-se em pesquisa conduzida anteriormente (Ferrari<sup>23</sup>, 2005), porém, que utilizou o laser para o tratamento da mucosite em hamsters ao invés do LED. No entanto, o

estudo piloto realizado previamente (Sacono et al.<sup>55</sup>, 2005) demonstrou que o LED aplicado com essa densidade de energia foi igualmente eficaz na cura das lesões orais sem causar danos à mucosa, o que justifica a manutenção da mesma densidade para este trabalho. Além disso, densidades bem maiores já foram utilizadas na mucosa de pacientes (35 J/cm<sup>2</sup>) por Nes, Posso<sup>50</sup> em 2005. A variação da densidade de energia capaz de bioestimular a mucosa tanto de seres humanos quanto de hamsters talvez se deva às diferenças biológicas desses organismos.

A aplicação do LED era feita em contato com a mucosa para minimizar possível reflexão da luz e aumentar a quantidade de energia absorvida pelo tecido. A região central da mucosa era irradiada até o momento do surgimento das primeiras alterações clinicamente visíveis. Quando as lesões surgiam, o LED era aplicado diretamente sobre a pior lesão, que era acompanhada por meio das fotografias realizadas durante o exame clínico da mucosa. Esse procedimento era realizado para garantir que a lesão que seria biopsiada recebesse, efetivamente, a aplicação do LED já que o diâmetro da ponta do aparelho é de 0,8 cm sendo insuficiente para cobrir toda a área da mucosa com uma única aplicação. Entretanto, segundo Gutknecht, Eduardo<sup>29</sup> em 2004, o feixe de luz possui comportamento gaussiano, o que confere uma irradiação além dos limites da ponta do aparelho, embora com uma potência menor. A Figura 4 ilustra esse fenômeno de divergência do feixe, porém, numa dimensão subestimada da realidade devido ao fato de a

máquina fotográfica ter filtrado grande parte da luz. Mesmo sabendo desse fato, optamos por deslocar o feixe de luz para as regiões mais afetadas com o intuito de aplicar a máxima densidade de energia sobre as lesões que seriam avaliadas.

No presente estudo, o grupo tratado com LED desenvolveu mucosite menos severa quando comparado ao grupo não tratado (Tabela 7), o que está de acordo com Corti et al.<sup>14</sup> em 2006. Observando-se a Figura 11, pode-se especular certo efeito preventivo quando se utilizou o LED, já que existe um número maior de animais que não desenvolveram mucosite, representado pela maior quantidade de escores 0 no grupo tratado com LED. Porém, esse efeito foi parcial já que a maior parte dos animais desse grupo desenvolveu mucosite, mesmo que com menor severidade. Esses resultados condizem com os achados de Whelan et al.<sup>74</sup> em 2002 que relataram incidência de 53% de mucosite nos pacientes tratados com LED contra a taxa esperada de 70 a 90%, comprovando o efeito preventivo do LED.

Com relação ao desenvolvimento da mucosite ao longo do período experimental, verifica-se que a média diária dos escores para o grupo controle positivo é sempre superior ao grupo tratado com LED (Figura 13), o que confirma a redução da severidade das lesões com a utilização do LED. Essa redução foi estatisticamente significativa entre os dias 5 e 9 do experimento (Tabela 9) que foram os dias de crescente aumento do grau de severidade da mucosite para o grupo não tratado. Ou

seja, o LED parece ter atuado favoravelmente na fase em que as lesões iriam piorar e depois, seguiu um comportamento semelhante ao grupo não tratado durante a fase de recuperação/cicatrização da mucosite, porém com menor severidade das lesões.

Para facilitar a alimentação dos animais que apresentaram mucosite, além da ração na forma normal (em pedaços) era ofertada ração em pó. Administrava-se, também, analgésico via oral para diminuir a sintomatologia dolorosa provocada pelas úlceras com o objetivo de eliminar possíveis fatores que pudessem interferir no processo de alimentação. Mesmo assim, houve diminuição de peso. A correlação entre os pesos e os escores clínico e histológico para o grupo tratado e não tratado foi negativa, ou seja, enquanto uma medida crescia, a outra decrescia (Tabela 15). Isto ocorre porque o peso tende a diminuir conforme a severidade da mucosite aumenta. Os animais deixam de se alimentar e o peso, conseqüentemente diminui. Este fato pode ser observado pela análise da evolução das médias dos pesos (Figura 15), que acompanhou a evolução da severidade clínica da mucosite (Figura 13). Os menores pesos foram registrados nos dias em que os animais apresentaram os maiores escores clínicos de mucosite (dias 9 e 13 do experimento).

A taxa de mortalidade encontrada para os grupos tratado e não tratado parece também estar relacionada à maior severidade da mucosite. O grupo tratado com LED apresentou uma taxa de 12,5 % de

mortalidade contra 25 % do grupo controle não tratado, que apresentou mucosite com maior severidade. A mortalidade também foi associada ao grau de debilidade do animal. Segundo o National Institute of Health<sup>49</sup> (1989) os pacientes submetidos a terapias contra o câncer podem desenvolver mielo e imunossupressão devido à ação do agente quimioterápico nas células da medula óssea. Durante o experimento, foi observado que, alguns animais se apresentaram muito mais debilitados que os outros, com quadros de alopecia, infecção associada à mucosite e rápida perda de peso, fatos estes, provavelmente relacionados à quimioterapia. Diante da possível imunossupressão causada pela quimioterapia, as úlceras induzidas nos animais constituíram uma porta de entrada para microrganismos, podendo levar a casos de infecções secundárias e até mesmo septicemia generalizada. Diante disto, a limpeza das caixas onde os animais ficavam durante o período experimental foi realizada a cada três dias, procedendo-se todas as etapas necessárias para uma correta desinfecção (lavagem com água, sabão e hipoclorito de sódio e uso de álcool 70%).

A avaliação histológica da mucosa dos animais também apresentou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo tratado e o não tratado (Tabela 13), mostrando redução da severidade de inflamação com a utilização do LED. A média diária dos escores foi menor entre os dias 5 e 13 do experimento com diferença significativa para o dia 9, dia de pico da mucosite para o grupo não tratado (Figura 18 e Tabela

13). Esses resultados demonstraram que o grau de inflamação da mucosa também diminuiu com a utilização do LED. No entanto, o efeito preventivo da inflamação não existiu, pois a quantidade de escores 0 foi praticamente igual para o grupo tratado e não tratado. Muitos animais que tiveram a mucosa classificada como saudável clinicamente, na realidade possuíam um grau de inflamação na mucosa, porém, discreto. Isto é comprovado pela diminuição da quantidade de escores 0 e aumento de escores 1 quando comparado ao grupo não tratado (Figura 16). Portanto, algumas alterações na mucosa são identificadas somente durante o exame histológico, sem apresentar quaisquer sinais clínicos perceptíveis.

Durante a avaliação histológica, além da comprovação da diminuição da severidade da inflamação com a utilização do LED, foi possível constatar também, seu efeito na cicatrização das lesões. A análise da Figura 20 nos mostra que o LED foi efetivo na cicatrização das úlceras presentes na mucosa. Até mesmo animais que possuíam o pior grau de mucosite clínica (escore 5), representado por completa ulceração da mucosa, apresentaram cicatrização dessas lesões.

Um achado histopatológico que merece atenção especial em nosso estudo foi a presença de degradação muscular somente no grupo tratado com LED (Figuras 19d, 19e, 19g, 19h). Nenhum trabalho encontrado na literatura relata resultados semelhantes, mesmo nas pesquisas envolvendo o laser. A degradação envolveu 18% das amostras e não estava relacionada à severidade da mucosite, pois a

alteração estava presente mesmo nos animais que receberam escores baixos tanto para a mucosite clínica quanto para o grau de inflamação do tecido. Os animais que apresentaram degradação muscular da mucosa não chegaram a desenvolver lesões ulcerosas propriamente dita em nenhum momento do experimento, o que talvez pudesse explicar essa degradação muscular pelo fato da perda da continuidade do epitélio o que promove uma maior exposição a possíveis agressões do meio externo. Portanto, há fortes evidências de que essa degradação esteja relacionada exclusivamente à aplicação do LED sobre o tecido. Na Figura 19d podemos observar melhor esse fato. A parte superior do tecido foi tratada com LED e, apesar da integridade do epitélio, observa-se intensa degradação das fibras musculares. Já a parte inferior não foi tratada e apresentou normalidade histológica sem nenhum grau de degradação de fibras musculares, as quais se mantiveram íntegras.

Segundo Danhof<sup>16</sup>, 2000 (apud Gutknecht, Eduardo<sup>29</sup>, 2004), após a absorção da energia da luz laser pelo tecido, ocorre um processo de transformação gerando duas formas de reação: calórica e acalórica. A reação acalórica é responsável por transformações bioquímicas relacionadas aos efeitos analgésicos, antiinflamatórios e proliferativos, ou seja, aos efeitos de biomodulação do laser. Já a reação calórica pode provocar efeitos diretos sobre os tecidos absorvedores e adjacentes. Como o LED é uma fonte de luz com características semelhantes ao laser (porém não totalmente colimada e coerente), esse

mecanismo de interação luz-tecido também pode ser aplicado a ele. Tendo em vista esses conhecimentos, pode-se especular que houve um aumento de temperatura no tecido durante a aplicação do LED, gerando calor suficiente para provocar uma agressão à mucosa, no caso, a degradação muscular. Portanto, é pertinente medir-se, então, a variação de temperatura na mucosa durante a aplicação dessa fonte de luz.

Após o surgimento dessa questão, resolveu-se investigar esse fato por meio do mapeamento térmico da mucosa dos animais mediante a utilização do LED. Entretanto, verificou-se que a variação de temperatura foi muito baixa, promovendo um aumento de temperatura de, no máximo, 3° C (Figura 24). Um fato interessante observado durante este procedimento foi a interferência da proteção utilizada na ponta do aparelho na variação de temperatura. O filme de PVC promoveu um maior aumento da temperatura na mucosa, talvez interferindo no processo de transmissão de calor ou dissipação do calor pelo tecido. Durante o mapeamento térmico realizamos quatro aplicações consecutivas do LED e pôde-se observar (Figuras 24 e 25) que a variação de temperatura foi aumentando gradativamente a cada aplicação, o que indica que o tecido não foi capaz de dissipar o calor em tão pouco tempo favorecendo, então, um acúmulo de calor na mucosa jugal dos animais. Todavia, este fato não ocorreu durante o experimento já que o LED foi aplicado uma única vez nos dias de tratamento. Se considerarmos as temperaturas medidas somente para a primeira aplicação do LED no tecido, a variação de

temperatura máxima encontrada cai para, no máximo, 2° C. Especula-se que uma variação tão baixa não seja capaz de causar agressão à mucosa.

Talvez a degradação muscular não tenha sido inerente somente ao aumento de temperatura da mucosa, pois no estudo piloto previamente realizado (Sacono et al.<sup>55</sup>, 2005) não foi observada degradação muscular em nenhuma amostra. O mapeamento térmico foi realizado tanto para o protótipo utilizado neste estudo quanto para o aparelho de LED utilizado no estudo piloto e a variação de temperatura foi muito similar (resultados não apresentados), promovendo um aumento de temperatura em torno de 3° C.

No estudo piloto utilizou-se o Fisi(LED), um aparelho comercialmente disponível que emite ondas com 630 nm ± 10 nm de comprimento. No presente estudo, a potência do aparelho de LED foi aumentada de 100 mW para 160 mW em comparação ao estudo piloto. As demais características do aparelho foram mantidas para ambos os estudos. A mesma densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada diminuindo-se, portanto, o tempo de irradiação do LED tendo em vista sua maior potência. A modificação da potência do aparelho não implicou somente na diminuição do tempo de irradiação, mas também no aumento da intensidade luminosa, aspecto este não muito explorado nos trabalhos científicos que utilizam o laser ou o LED para o tratamento de feridas.

A intensidade de luz (expressa em  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) é a potência de saída do aparelho por unidade de área e é utilizada para medir danos microtérmicos aos tecidos (Gutknecht, Eduardo<sup>29</sup>, 2004). Baseados na seguinte equação:  $I = P/A$ , onde  $I$  é a intensidade da luz,  $P$  a potência do aparelho e  $A$  a área do feixe de luz que corresponde à área da ponta do aparelho, encontramos que, com o aumento da potência, houve um aumento considerável da intensidade do LED de  $127 \text{ mW}/\text{cm}^2$  (estudo piloto) para  $318 \text{ mW}/\text{cm}^2$  (presente estudo). Portanto, pode-se suspeitar que a degradação muscular também possa estar relacionada à intensidade do aparelho utilizado, um parâmetro importante que deve ser considerado durante as terapias fotônicas.

Segundo Somer et al.<sup>58</sup>, 2001, os parâmetros densidade de energia e intensidade são claramente independentes, ou seja, a alteração de um parâmetro não interfere no valor do outro. Quando um fabricante aumenta a potência do aparelho para diminuir o tempo de aplicação da luz e gerar maior praticidade no tratamento, mesmo se o usuário mantiver a densidade de energia considerada efetiva pela literatura, pode haver um aumento considerável na intensidade da luz e, de acordo com nosso estudo, gerar algum tipo de dano ao tecido irradiado. Outras reações, que não dependentes exclusivamente do calor, devem estar envolvidas no processo de degradação muscular observada no grupo tratado com LED. Mais estudos devem ser conduzidos para melhor entender os efeitos da potência, da intensidade e do aumento de

temperatura provocados pelo LED no tecido. Os mecanismos de ação do LED em tecidos biologicamente ativos ainda não está totalmente esclarecido, constituindo linhas de pesquisa potenciais nessa área.



**Conclusão**



## **7 Conclusão**

A aplicação do LED com comprimento de onda de 630 nm, 160 mW de potência, densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup> e aplicação única durante 37,5 segundos foi efetiva na redução da severidade da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters e na cicatrização das lesões orais, embora não tenha prevenido completamente o surgimento das mesmas.



## Referências



## 8 Referências\*

1. Adamietz IA, Rahn R, Böttcher H, Schäfer V, Reimer K, Fleischer W. Prophylaxis with povidone-iodine against induction of oral mucositis by radiochemotherapy. *Support Care Cancer*. 1998; 6: 373-7.
2. Alloui A, Chassaing C, Schmidt J, Ardid, D, Dubray C, Cloarec A, et al. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002; 443(1-3): 71-7.
3. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001; 29: 179-84.
4. Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol*. 2003; 39: 91-100.
5. Barasch A, Peterson DE, Tanzer JM, D'ambrosio JÁ, Nuki K, Schubert MM, et al. Helium-Neon laser effects on conditioning - induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer*. 1995; 76: 2550-6.

---

\* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

6. Bensadoun RJ, Ciais G. Radiation and chemotherapy-induced mucositis in oncology: results of multicenter phase III studies. *J Oral Laser Applications*. 2002; 2: 115-20.
7. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 1999; 7: 244-52.
8. Berger A, Henderson M, Nadoolman W, Duffy V, Cooper D, Saberski L, et al. Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy/radiation therapy. *J Pain Symptom Manage*. 1995; 10: 243-8.
9. Bondi A, Baroni A, Prete A, Gatti M, Carrassi A, Lodi G, et al. Local antimicrobial therapy of oral mucositis in paediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Oral Oncol*. 1997; 33: 322-6.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Curso de manipulação de animais de laboratório. Brasília; 2005.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

12. Clarke J, Edwards B, Srpek L, Regester G. Evaluation of bovine lactoferrin as a topical therapy for chemotherapy-induced mucositis in the golden Syrian hamster. *Oral Oncol.* 1999; 35: 197-202.
13. Clarke J, Butler R, Howard G, Read L, Regester G. Exposure of oral Mucosa to bioactive milk factors reduces severity of chemotherapy-induced mucositis in the hamsters. *Oral Oncol.* 2002; 38: 478-85.
14. Corti L, Chiarion-Sileni V, Aversa S, Ponzoni A, D'Arcais R, Pagnutti S, et al. Treatment of chemotherapy-induced oral mucositis with light emitting diode. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 207-13.
15. Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. Low energy helium-neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 38: 697-703.
16. Danhof G. Biological effects of the laser beam. In: Simuzovic Z. *Lasers in medicine and dentistry: Basic science and up-to-date clinical application of low-energy level laser therapy-LLLT.* Rijeka: Vitagraf; 2000. p. 127-52 apud Gutknecht N; Eduardo P. *A odontologia e o laser. Atuação do laser na especialidade odontológica.* São Paulo: Quintessence; 2004.

17. Development Core Team. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, 2006 [cited 2006 out. 20]. Available from: <http://www.R-project.org>.
18. Dodd MJ, Miaskowski C, Cho M, Greenspan D. A comparison of the affective state of patients who do and do not develop chemotherapy-induced oral mucositis. *J Pain Symptom Manage*. 2001; 21: 498-505.
19. Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 18: 853-74.
20. Efron B, Tibshirani J. An introduction to bootstrap. New York: CRC Press; 1994.
21. Epstein JB, Schubert MM. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88: 273-6.
22. Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94: 39-44.
23. Ferrari JCL. Efeito do laser terapêutico na mucosite induzida por 5-fluoruracila (5-FU) em hamsters [Tese de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.

24. Ferreti GA, Ash RC, Brown AT, Largent BM, Kaplan A, Lillich TT. Chlorhexidine for prophylaxis against oral infections and associated complications in patients receiving bone marrow transplants. *J Am Dent Assoc.* 1987; 114: 461-7.
25. Fleiss JL, Cohen J, Everitt BS. Large sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychol Bull.* 1969; 72: 323-27.
26. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical methods for rates and proportions.* New York: John Wiley & Sons; 2003.
27. Gamer M. irr: Various Coefficients of interrater reliability and agreement. 2006. R package version 0.62 [cited 2006 out. 25]. Available from: <http://www.r-project.org>.
28. Guggenheimer J, Verbin RS, Appel BN, Schmutz J. Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1997; 44: 58-63.
29. Gutknecht N; Eduardo P. *A odontologia e o laser. Atuação do laser na especialidade odontológica.* São Paulo: Quintessence; 2004.
30. Harkness JE, Wagner J. *Biologia e clínica de roedores.* São Paulo: Livraria Roca; 1993.
31. Hejna M, Köstler WJ, Raderer M, Steger GG, Brodowicz T, Scheithauer W. Decrease of duration and symptoms in chemotherapy-induced oral mucositis by topical GM-CSF: results of a prospective randomized trial. *Eur J Cancer.* 2001; 37(16): 1994-2002.

32. Hollander M, Wolfe DA. Nonparametrics statistical methods. New York: John Wiley & Sons; 1999.
33. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
34. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. Health Phys. 1989; 56: 691-704.
35. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. J Photochem Photobiol B. 1999; 49(1): 1-17.
36. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. J Photochem Photobiol B. 1995; 27: 219-23.
37. Leitão RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EAL, Macedo FDB, Silva LR, Oriá RB, et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamsters. Cancer Chemother Pharmacol. 2007; 59: 603-12.
38. Lima V, Brito GAC, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BAA, Augusto RF. Effects of the tumor necrosis factor- $\alpha$  pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. Eur J Oral Sci. 2005; 113: 210-7.
39. Lizarelli RFZ. Ablação a laser de esmalte, dentina e resinas compostas dentais [Tese de Doutorado]. São Carlos: Instituto de Física da USP; 2002.

40. Loury DJ, Embree JR, Steinberg DA, Sonis ST, Fiddes JC. Effect of local application of the antimicrobial peptide IB-367 on the incidence and severity of oral mucositis in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87: 544-51.
41. Malik IA, Moid I, Haq S, Sabih M. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial to evaluate the role of tetrachlorodecaoxide in the management of chemotherapy-induced oral mucositis. *J Pain Symptom Manage.* 1997; 14(2): 82-7.
42. McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol.* 1998; 34: 484-90.
43. McGuire D. Mucosal tissue injury in cancer therapy: more than mucositis and mouthwashes. *Cancer Pract.* 2002; 10: 179-91.
44. Mealey BL, Semba SE, Halmom WW. Dentistry and the cancer patient: part 1- oral manifestations and complications of chemotherapy. *Compendium.* 1994;15:1252, 1254, 1256 passim; quiz 1262.
45. Mezdari TJ, Tomás VA, Amaral VLL. *Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental.* Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.
46. Migliorati C, Massumoto C, Eduardo FP, Muller KP, Carrieri T, Haypek P, et al. Low-energy laser therapy in oral mucositis. *J Oral Applications.* 2001; 1(2): 97-101.

47. Morvan FO, Baroukh B, Ledoux D, Caruelle JP, Barritault D, Godeau G, et al. An engineered biopolymer prevents mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Am J Pathol.* 2004; 164: 739-46.
48. Mueller BA, Millheim ET, Farrington EA, Brusko C, Wiser TH. Mucositis management practices for hospitalized patients: national survey results. *J Pain Symptom Manage.* 1995; 10: 510-20.
49. National Institute of Health. National Institutes of Health consensus development conference statement: oral complications of cancer therapies: diagnosis, prevention, and treatment. *J Am Dent Assoc.* 1989; 119: 179-83.
50. Nes AG, Posso MBS. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *Int Nurs Rev.* 2005; 52(1): 68-72.
51. Olfert ED; Cross BM; McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. 1993 [cited 2006 jun. 16]. Available from: <http://www.ccac.ca>.
52. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RCK. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol.* 1998; 34(1): 63-71.
53. Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist.* 1998; 3: 446-57.

54. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*. 2004; 100(9 Suppl): 2026-46.
55. Sacono NT, Ferrari JCL, Abreu-e-Lima FCB. Uso do LED vermelho e infravermelho para o tratamento da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters. In: *Anais da 22ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO; 2005 set. 3-7; Águas de Lindóia (SP). São Paulo: SBPqO; 2005. p. 219.*
56. Sandoval RL, Koga DH, Buloto LS, Sukuzi R, DIB LL. 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: 337-41.
57. Scully C, Sonis ST, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis*. 2006; 12: 229-41.
58. Sommer AP, Pinheiro ALB, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimularoty in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA'S light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001; 19(1): 29-33.
59. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol Eur J Cancer*. 1998; 34(1): 39-43.

60. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 277-84.
61. Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74: 749-55.
62. Sonis, ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 69: 437-43.
63. Sonis ST, Muska A, O'Brien J, VanVugt A, Langer-Safer P, Keith J. Alteration in the frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995; 31B: 261-6.
64. Sonis ST, Lindquist L, Vugt AV, Stewart AA, Stam K, Qu GY, et al. Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3. *Cancer Res*. 1994; 54: 1135-8.
65. Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, Cocks D, et al. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol*. 2004; 40: 170-6.
66. Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the

- progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol.* 2000; 36: 373-81.
67. Sonis ST, Van Vugt AG, McDonald J, Dotoli E, Schwertschlang U, Szklut P, et al. Mitigating effects of interleukin 11 on consecutive courses of 5-fluoruracil-induced ulcerative mucositis in hamsters. *Cytokine.* 1997; 9: 605-12.
68. Spielberger R, Stiff O, Besinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2004; 351(25): 2590-8.
69. Spijkervet FKL, Sonis ST. New frontiers in the management of chemotherapy-induced mucositis. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10 (Suppl 1): S23-7.
70. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001 (29): 7-15.
71. Stokman MA, Spijkerevet FKL, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JLN, de Vries EGE. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *J Dent Res.* 2006; 85: 690-700.
72. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2): 95-9.

73. Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT. Effect of NASA Light-Emitting Diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21(2): 67-74.
74. Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al. NASA Light-Emitting Diode for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patient. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20: 319-24.
75. Wong SF, Wilder-Smith P. Pilot study of laser effects on oral mucositis in patients receiving chemotherapy. *Cancer J.* 2002; 8: 247-54.
76. Worthington HV, Clarkson JE. Prevention of oral mucositis and oral candidiasis for patients with cancer treated with chemotherapy: cochrane systematic review. *J Dent Educ.* 2002; 66: 903-11.



**Anexos**



## Anexo 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



*Proc. CEEA nr. 23/2006*

Araraquara, 22 de novembro de 2006

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em *22/11/2006*, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "*Uso de LED terapêutico para o tratamento da mucosite induzida por quimioterapia em hamsters*" (Proc. CEEA nr. 23/2006) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL** em **SETEMBRO/2007**.

Atenciosamente.

  
Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira  
Coordenadora do CEEA

Ao  
Prof. Dr. FABIO CESAR BRAGA DE ABREU-E-LIMA  
DD. Pesquisador Responsável  
C.D. NANCY TOMOKO SACONO  
Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA  
DD. Pesquisadores Colaboradores  
Nesta

## Anexo 2 – Atestado de sanidade animal fornecido pela AniLab

  
ANIMAIS DE LABORATÓRIO CRIAÇÃO E COMÉRCIO LTDA.  
CGC 05.440.612/0001-40  
F. EST. 513.020.551.116

Paulínia, 12/07/2006

**ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL**

Atesto para os devidos fins que os **hamsters** procedentes deste estabelecimento, estão em *perfeitas condições de saúde e livres de doenças infecto-contagiosas*, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas.

Atenciosamente,



RONAN DE ALMEIDA LEITE  
MÉDICO VETERINÁRIO  
CRMV/SP 6381

RUA SERVIDÃO QUATRO, 292 - FONE/FAX (019) 874-4538 - BAIRRO SÃO DOMINGOS - CEP 13.140-000 - PAULÍNIA - SP

Anexo 3 - Dados referentes à classificação clínica da mucosite induzida no Grupo I

Amostra	Grau de mucosite (Grupo I - LED)									
	Dia									
	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15
1	1	2								
2	2	2								
3	2	2								
4	0	0								
5	1	0								
6	0	0								
7	0	0								
8	2	0								
9	0	2								
10	0	2								
11	0	0								
12	0	0								
13	2	2								
14	0	0								
15	0	0								
16	0	0								
17	1		2	3	3					
18	1		2	3	3					
19	0		0	0	0					
20	0		0	0	0					
21	1		2	2	0					
22	0		0	2	0					
23	1		2	1	0					
24	0		2	3	4					
25	1		2	0	2					
26	1		0	0	0					
27	1		0	2	2					
28	0		0	0	0					
29	1		2	2	2					
30	0		2	2	2					
31	1		2	2	3					
32	1		0	2	3					
33	1		0	0		0	0	0		
34	0		0	1		5	4	3		
35	1		2	3		4	5	5		
36	0		2	2		4	4	4		
37	1		3	4		4	5	5		
38	0		2	3		3	3	4		
39	1		3	3		3	0	0		
40	0		0	3		0	0	0		
41	1		3	3		0	0	0		
42	0		4	4		4	3	0		
43	1		2	3		4	4	3		
44	0		3	3		4	3	0		
45	1		2	0		0	0		0	0
46	0		0	0		0	0		0	0
47	1		2	0		0	0		0	0
48	0		1	0		0	0		0	0
49	1		2	2		2	0		0	0
50	0		0	0		0	0		0	0
51	0		3	0		0	0		0	0
52	0		2	0		0	0		0	0
53	0		2	3		2	0		0	0
54	0		0	0		0	0		0	0
55	1		3	5		5	5		0	0
56	0		3	5		5	5		3	0
<b>Média</b>	<b>0.536</b>	<b>0.750</b>	<b>1.550</b>	<b>1.775</b>	<b>1.500</b>	<b>2.042</b>	<b>1.708</b>	<b>2.000</b>	<b>0.250</b>	<b>0.000</b>

Anexo 4 - Dados referentes à classificação clínica da mucosite induzida no Grupo II

Amostra	Grau de mucosite (Grupo II - controle positivo)									
	Dia									
	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15
1	1	2								
2	1	2								
3	0	2								
4	1	2								
5	2	3								
6	2	4								
7	1	2								
8	2	3								
9	1	2								
10	0	0								
11	0	3								
12	0	2								
13	0	0								
14	0	2								
15	1	2								
16	1	2								
17	1		3	5	5					
18	0		5	5	5					
19	0		3	5	5					
20	1		4	5	5					
21	0		3	5	5					
22	1		5	5	5					
23	0		3	4	5					
24	0		2	3	5					
25	0		1	1	1					
26	0		1	4	5					
27	1		2	3		2	2	0		
28	2		4	3		2	1	0		
29	1		1	3		4	5	5		
30	0		3	5		5	5	3		
31	1		4	5		5	5	5		
32	0		3	5		5	5	4		
33	0		2	0		0	0	0		
34	0		1	0		0	0	0		
35	0		0	0		0	0	0		
36	0		3	2		0	0	0		
37	1		4	5		5	5	5		
38	0		5	5		5	5	5		
39	0		0	0		0	0		0	0
40	0		0	0		0	0		0	0
41	0		0	0		0	0		0	0
42	0		0	0		0	0		0	0
43	0		0	0		0	0		0	0
44	0		0	0		0	0		0	0
45	0		2	5		5	5		5	4
46	2		4	5		5	5		4	3
47	1		3	2		0	0		0	0
48	1		3	2		0	0		0	0
<b>Média</b>	0.542	2.063	2.313	2.875	4.600	1.955	1.955	2.250	0.900	0.700

Anexo 5 - Dados referentes à classificação clínica da mucosa no Grupo III (controle negativo)

<b>Amostra</b>	<b>Grau de mucosite Dia 5</b>
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
<b>Média</b>	0

Anexo 6 – Peso em gramas dos animais do Grupo I ao longo do experimento

Peso em gramas (Grupo I - LED)													
Dia													
Amostra	0	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15
1	110	100	100	100	100								
2	105	100	100	100	100								
3	100	110	90	95	95								
4	105	100	100	100	95								
5	110	105	100	100	100								
6	110	110	100	100	100								
7	110	110	100	100	100								
8	100	100	90	95	90								
9	100	100	100	100		90	90	90					
10	100	100	100	100		90	90	80					
11	120	120	110	110		110	100	100					
12	100	100	100	90		90	75	70					
13	110	100	100	95		90	80	70					
14	110	100	100	100		90	90	80					
15	105	100	95	100		90	90	90					
16	110	110	100	100		90	80	80					
17	100	100	95	95		85	80		70	60	60		
18	120	110	110	110		100	90		80	70	70		
19	110	105	100	100		95	100		100	100	105		
20	100	100	100	100		90	90		90	95	95		
21	105	110	95	95		85	80		70	65	60		
22	105	100	100	100		90	90		90	90	90		
23	100	100	90	90		90	80		80	80		90	90
24	100	100	100	100		100	100		100	110		110	110
25	110	110	110	110		110	110		110	110		115	115
26	105	100	100	100		100	100		90	100		100	100
27	105	110	100	100		100	105		110	105		110	110
28	100	100	90	90		90	90		90	90		100	100
Média	105.9	103.9	99.1	99.1	97.5	93.8	90.5	82.5	90.0	89.6	80.0	104.2	104.2

Anexo 7 – Peso em gramas dos animais do Grupo II ao longo do experimento

Peso em gramas (Grupo II - controle positivo)													
Dia													
Amostra	0	2	3	4	5	6	8	9	10	12	13	14	15
1	110	110	100	100	100								
2	105	100	100	90	90								
3	120	120	110	110	110								
4	120	110	110	105	100								
5	110	110	100	100	95								
6	120	110	105	100	100								
7	110	110	110	110	110								
8	110	110	100	100	100								
9	115	110	100	100		90	90	80					
10	115	115	110	105		100	90	80					
11	115	110	110	105		100	95	90					
12	110	110	100	100		90	80	80					
13	110	110	100	100		90	80	80					
14	110	110	100	100		90	80		70	70	70		
15	115	110	100	100		100	90		80	80	70		
16	115	110	105	105		100	100		110	110	100		
17	110	110	100	100		100	100		100	100	100		
18	115	110	110	100		100	90		85	85	90		
19	115	110	110	110		110	110		110	115		110	120
20	110	110	105	105		100	105		110	110		110	110
21	115	110	110	110		105	110		110	110		110	110
22	110	100	100	95		90	85		80	80		85	90
23	110	110	100	100		100	100		100	110		110	110
24	115	110	110	110		100	105		105	110		110	115
<b>Média</b>	<b>112.9</b>	<b>109.8</b>	<b>104.4</b>	<b>102.5</b>	<b>100.6</b>	<b>97.8</b>	<b>94.4</b>	<b>82.0</b>	<b>96.4</b>	<b>98.2</b>	<b>86.0</b>	<b>105.8</b>	<b>109.2</b>

Anexo 8 – Peso em gramas dos animais do Grupo III (controle negativo) no dia do sacrifício

Amostra	Peso dos animais (g)
	Dia 5
1	110
2	100
3	100
4	110
5	110
6	110
<b>Média</b>	<b>106.67</b>

Anexo 9 – Dados referentes à classificação histológica da mucosite induzida no Grupo I

	Dia			
	5	9	13	15
Grau de inflamação Grupo I (LED)	0	1	4	1
	0	1	4	1
	1	0	0	0
	1	1	1	0
	1	1	1	0
	3	1	1	0
	1	2	0	0
	1	4	2	0
	1	1	1	0
	0	1	0	1
	2	4		0
	2	0		1
	1	0		
	1	1		
	1	1		
	0			
<b>Média</b>	1.000	1.267	1.400	0.333

Anexo 10 – Dados referentes à classificação histológica da mucosite induzida no Grupo II

	Dia			
	5	9	13	15
Grau de inflamação Grupo II (controle positivo)	1	3	3	0
	0	0	0	0
	1	3	0	0
	0	4	1	0
	1	4	0	0
	2	2	2	0
	3	4		2
	1	4		0
	1	4		0
	2	4		0
	1			1
	2			
	1			
	1			
	3			
	<b>Média</b>	1.333	3.200	1.000

Anexo 11 – Dados referentes à classificação histológica da mucosa no Grupo III (controle negativo)

Amostra	Grau de inflamação Dia 5
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
<b>Média</b>	<b>0</b>

Anexo 12 – Dados referentes ao mapeamento térmico da mucosa jugal dos animais, com proteção da ponta do LED (filme de PVC) e sem proteção

<b>Com proteção</b>												
Tempo	R1	T1	VT1	R2	T2	VT2	R3	T3	VT3	R4	T4	VT4
0	1.16	28.31	0	1.13	29.85	0	1.13	30.02	0	1.11	31.05	0
15	1.14	29.68	1.37	1.11	31.5	1.66	1.11	31.16	1.14	1.1	32.02	0.97
37,5	1.12	30.88	2.57	1.08	32.76	2.91	1.08	32.7	2.68	1.08	32.76	1.71
<b>Sem proteção</b>												
Tempo	R1	T1	VT1	R2	T2	VT2	R3	T3	VT3	R4	T4	VT4
0	1.17	27.85	0	1.17	27.85	0	1.15	29.11	0	1.14	29.56	0
15	1.15	28.71	0.86	1.16	28.36	0.51	1.14	29.68	0.57	--	--	--
37,5	1.14	29.56	1.71	1.14	29.39	1.54	1.13	30.13	1.03	1.11	31.1	1.54

R1, R2, R3 e R4 são os valores de resistência elétrica medidos com o multímetro digital.

T1, T2, T3 e T4 são as temperaturas calculadas segundo a calibração do termistor:  $(T (^{\circ}\text{C}) = 94,6 - 57,1 \times R)$ .

VT1, VT2, VT3 e VT4 são as variações de temperatura: temperatura final - temperatura inicial.

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2007.

NANCY TOMOKO SACONO