



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INDUÇÃO DE MUCOSITE  
ORAL POR RADIAÇÃO EM *HAMSTERS*. PREVENÇÃO E  
TRATAMENTO POR *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA**

**Vivian Cunha Galletta**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre Profissional em *Lasers* em  
Odontologia.**

**Orientadora:**

Profa. Dra. Denise Maria Zezell

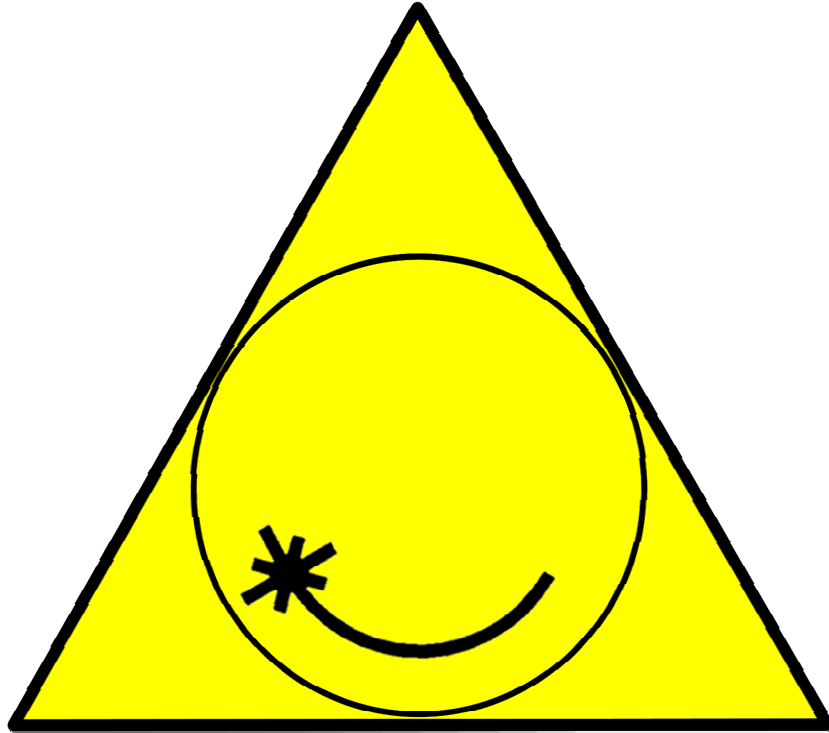
**Co-Orientadora:**

Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares



São Paulo  
2006

**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE**  
**LASERS EM ODONTOLOGIA**





**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INDUÇÃO DE MUCOSITE  
ORAL POR RADIAÇÃO EM *HAMSTERS*. PREVENÇÃO E  
TRATAMENTO POR *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA**

**Vivian Cunha Galletta**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre Profissional em *Lasers* em  
Odontologia.**

**Orientadora:**

Profa. Dra. Denise Maria Zezell

**Co-Orientadora:**

Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares



São Paulo  
2006

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meus pais, razão e força de meu aprendizado acadêmico, doutores na arte da sensibilidade, com a qual tento exercer minha profissão. A Domingos e Maria Leonor Galletta, certamente presentes em mais esta etapa importante de minha vida.*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiro a meus pais Paulo e Silvia, e a meu irmão Gilberto, pelo apoio integral à minha opção de seguir na universidade, e por haverem entendido a motivação que me levou a escolher o tema desta dissertação. Ao Jorge, meu namorado, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e pela alegria ao compartilhar este momento. À amiga Melissa Folgosi-Corrêa, a minha eterna gratidão pela dedicação com que me auxiliou, e por fim participou efetivamente deste trabalho.

Meu agradecimento aos professores e a equipe do IPEN e do LELO – Elza, Andréa, Lili, Haroldo e Joelma, por fazerem estes dois anos de estudo e convivência tão prazerosos. Especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Denise Maria Zzell e minha co-orientadora Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares, por confiarem no trabalho proposto e me conduzido na tarefa árdua, mas compensadora, de um trabalho experimental. Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo pelo exemplo de compromisso com a ética e com o desenvolvimento de uma odontologia renovadora.

À Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo, que me acompanhou desde o princípio desta jornada, ainda recente, e me ensina todos os dias o valor do trabalho compartilhado. Ao Prof. Dante Migliari, meu agradecimento pela oportunidade de conhecer o trabalho desenvolvido entre a disciplina de Semiologia e o LELO.

Aos engenheiros Carlos e Bete, que me abriram as portas do Centro de Tecnologia das Radiações, e estiveram sempre disponíveis a colaborar para a melhora do trabalho. Ao Prof. Moacir Novelli e a Profa. Luciana Corrêa, por haverem colaborado imensamente com o meu conhecimento de histologia, com muita paciência e generosidade. Agradeço à Neide do biotério do Ipen, pela delicadeza com que me orientou nos primeiros passos do tratamento dos animais.

Desde já, agradeço à todos que de forma direta ou indireta estiveram presentes durante o desenvolvimento deste trabalho, e àqueles a quem este trabalho possa ser útil.

# DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INDUÇÃO DE MUCOSITE ORAL POR RADIAÇÃO EM *HAMSTERS*. PREVENÇÃO E TRATAMENTO POR *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA

Vivian Cunha Galletta

## RESUMO

Apesar dos benefícios advindos da radioterapia para o prognóstico dos pacientes tratados, a mesma pode causar efeitos colaterais locais, como a mucosite oral. Trata-se de uma condição patológica das mucosas afetadas pela radiação ionizante, com sintomatologia dolorosa passível de alterar e até interromper a terapia antineoplásica, diminuindo a possibilidade de controle do tumor.

A mucosite oral pode ser tratada de diversas maneiras, porém persiste como um problema à medida que as terapias disponíveis são insuficientes para uma melhora significativa deste processo inflamatório. Soluções de diversos grupos farmacológicos são utilizadas (antiinflamatórios, antibióticos, anti-sépticos, agentes lubrificantes) como tratamento paliativo para redução dos sintomas da mucosite oral. O tratamento com *laser* vem sendo utilizado como opção, mas faltam estudos para verificar como se dá o processo da terapia *laser* em mucosite oral causada pela radiação ionizante.

Este trabalho propôs o acompanhamento da evolução da mucosite oral, comparando as terapias de benzidamina e *laser* em um modelo animal. Para o desenvolvimento de mucosite oral, quarenta e dois animais foram irradiados em cabeça e pescoço em dose única de 30 Grays, por meio de uma fonte de  $\text{Co}^{60}$ . Após a irradiação, os tratamentos foram aplicados diariamente, uma vez ao dia, durante 20 dias, nos quais a severidade das lesões foi classificada clinicamente por dois examinadores calibrados. Foi realizada avaliação histológica descritiva e quantitativa da mucosa labial afetada, buscando possíveis alterações dos tecidos tratados com *laser* e a benzidamina.

Após análise dos dados coletados, e estudo estatístico correspondente aos mesmos, pode-se verificar que o tratamento com *laser* é mais eficaz que o tratamento com a benzidamina, diminuindo a severidade e a duração das lesões de mucosite oral causadas por radiação ionizante.

**DEVELOPMENT OF ORAL MUCOSITIS MODEL INDUCED BY RADIATION IN  
HAMSTERS. PREVENTION AND TREATMENT WITH LOW POWER *LASER***

**Vivian Cunha Galletta**

**ABSTRACT**

Despite the benefits for the prognosis of patients treated with radiotherapy for oral cancer treatment, it might cause local side effects such as oral mucositis. The oral mucositis is a pathological condition that may appear in affected oral mucosa by ionizing radiation, and the pain related can alter and even stop the antineoplastic treatment, decreasing tumor control rates.

Oral mucositis has several treatment modalities, although it remains as a problem since therapies available are not enough to treat efficiently this inflammatory process. Many pharmacological solutions (anti-inflammatory, antibiotics, antiseptic, lubricant agents) are used to alleviate oral mucositis symptoms. *Laser* treatment has been used as an option, but there is lack of studies to verify the process of laser therapy in oral mucositis caused by ionizing radiation.

This work accomplishes follow-up of oral mucositis evolution, comparing *laser* and benzidamine therapies in an animal model. Forty-two animals were irradiated at head and neck in a single dose of 30 Grays, by means of a Co<sup>60</sup> source. After irradiation, treatments were applied daily, once a day, for 20 days, in which severity of lesions were clinically classified by two calibrated examiners. Histological evaluation was performed to search for mucosal alterations at treated tissues.

Statistical analysis of data showed that *laser* treatment was more efficient than benzidamine treatment, diminishing severity and duration of oral mucosal lesions caused by ionizing irradiation.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>3.1. Radioterapia</b> .....	16
<b>3.2. Mucosite oral induzida por radiação ionizante em modelo animal</b> .....	18
<b>3.3 Benzidamina</b> .....	20
<b>3.4 Laser</b> .....	21
<b>3.5 Mastócitos</b> .....	21
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	24
<b>4.1 Fase I - Indução da mucosite</b> .....	24
4.1.1 Animais.....	24
4.1.2 Estudo Piloto.....	24
4.1.3 Irradiação .....	25
<b>4.2 Fase II - Terapia</b> .....	25
<b>4.3 Fase III - Histologia</b> .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5.1 Fase I - Indução da mucosite</b> .....	29
<b>5.2 Fase II - Terapia</b> .....	31
5.2.1 Experimento e avaliação clínica .....	31
5.2.2 Avaliação histológica .....	34
5.2.2.1 Análise histológica descritiva .....	34
5.2.2.2 Análise histológica quantitativa .....	36
<b>5.3 Avaliação estatística</b> .....	38
5.3.1 Dados clínicos.....	38
5.3.2 Dados histológicos.....	39
5.3.2.1 Celularidade, colágeno e espaço vazio.....	39
5.3.2.2 Mastócitos .....	43
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>8 ANEXOS</b> .....	48
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifostato

BDF<sub>1</sub>: Espécie de camundongo

C<sub>3</sub>H/Neu: Espécie de camundongo

cGy: Centigray

Co<sup>60</sup>: Cobalto sessenta

COX-2: Enzima ciclooxygenase 2

DNA: Ácido desoxirribonucléico

GaAlAs: Galium Aluminum Arsenide (arseneto de gálio e alumínio)

Gy: Gray

H/E: Hematoxilina – Eosina

He-Ne: Hélio-Neônio

IL-1 $\beta$ : Interleucina um beta

IL-2: Interleucina dois

IL-6: Interleucina seis

IL-8: Interleucina oito

KGF: Keratinocyte Grow Factor (fator de crescimento de queratinócitos)

*LASER*: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)

LILT: Low Intensity *Laser* Therapy (terapia *laser* em baixa intensidade)

min: Minutos

nm: Nanometro

NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição

PCR: Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

pH: Potencial hidrogênico

rad: Radiano

ROS: Espécie reativa de oxigênio

RT: Radioterapia

T1: Primeiro estágio de neoplasia maligna, segundo classificação OMS

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa

TGF- $\beta$ : Tumor Grow Factor Beta (fator de crescimento de tumores beta)

ml: Mililitros

mg: Miligrama

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento para a neoplasia maligna de cavidade oral está fundamentado em uma avaliação multidisciplinar que determinará um plano terapêutico, seja por ressecção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia, visando melhores chances de cura e a preservação do órgão bucal.

Cerca de 95% dos tumores de boca correspondem a carcinomas espinocelulares, os quais possuem comportamento biológico mais ou menos agressivos de acordo com seu aspecto clínico e localização. No entanto, comumente invadem os tecidos adjacentes e tendem a apresentar metástases linfáticas, comprometendo a expectativa de cura e a qualidade de vida para o paciente após o tratamento <sup>1</sup>.

A preservação do órgão e manutenção de funções como a fala, a deglutição, são levados em conta na eleição da estratégia terapêutica a ser utilizada no combate ao câncer de boca. Evitar ou diminuir a ressecção cirúrgica é um objetivo da radioterapia pré-operatória, combinada ou não com a quimioterapia. A radioterapia pode ser terapia exclusiva para tumores em estadiamento inicial (T1), ou ainda ser uma modalidade terapêutica no pós-operatório de esvaziamento dos linfonodos cervicais, visando evitar metástases através da microcirculação regional <sup>1,2</sup>.

A radioterapia é amplamente indicada nos casos de neoplasias malignas localizadas em cavidade bucal, e cuidados básicos e precauções devem ser levados em conta antes e durante o tratamento. Entre as complicações que esta terapia pode causar ao paciente estão a xerostomia, reações cutâneas, osteorradionecrose e a mucosite <sup>3</sup>.

A mucosite oral é uma complicação decorrente da toxicidade da terapia antineoplásica de cabeça e pescoço, seja esta radioterapia ou quimioterapia. Ambas as modalidades terapêuticas são inespecíficas, pois interferem não somente na homeostasia de células malignas, mas também de células normais.

A radiação ionizante interfere no crescimento e na diferenciação celular. Células portadoras de alto turnover como as da mucosa oral e as do trato gastrointestinal são especialmente atingidas, pois se proliferam rapidamente <sup>4</sup>. A divisão de células basais da mucosa oral é inibida devido à terapia citotóxica, resultando em um epitélio atrófico, susceptível a ulcerações traumáticas ou espontâneas <sup>5</sup>. Depois de recebida a dose cumulativa de 30 Gy (grays) durante a radioterapia, a mucosite pode ser desencadeada <sup>3,10</sup>.

A incidência de mucosite é maior em pacientes sob condicionamento para transplante de medula óssea, terapia de infusão contínua para câncer de mama e cólon, e em terapia para tumores da cabeça e pescoço. Toda a mucosa oral pode ser acometida pela mucosite, no entanto tecidos não queratinizados, como mucosa labial, mucosa jugal, assoalho bucal, ventre de língua e palato mole, são os mais afetados pela enfermidade <sup>4</sup>.

A indução da mucosite oral consiste em uma cascata de eventos. Até há pouco tempo pensava-se que progressão da mucosite era dividida em quatro fases: fase inflamatória ou vascular, fase epitelial, fase ulcerativa ou bacteriológica, fase curativa <sup>6</sup>.

Atualmente, a patobiologia desta enfermidade é mais bem esclarecida em 5 fases. Na primeira fase, de iniciação, a quimio ou radioterapia iniciam a quebra de fitas de DNA e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Apesar de a mucosa parecer absolutamente normal nesta fase, sua destruição será provocada por uma cascata de eventos que ocorrem na lâmina própria. A fase de resposta de dano primário, segunda fase deste processo, consiste na ativação de fatores de transcrição (i.e. NF- $\kappa$ B) e produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) por produtos da fase anterior. Danos ao tecido conjuntivo e ao endotélio reduzem a oxigenação epitelial, resultando em dano e morte de células epiteliais. A fase seguinte, de amplificação de sinal, promove um feedback positivo das citocinas inflamatórias e amplificam o dano iniciado pela radiação ou agente quimioterápico. Segue então a fase ulcerativa, quando há perda da integridade da mucosa. Estas lesões extremamente dolorosas são de grande importância, pois funcionam como porta de entrada para bactérias, principalmente em pacientes com neutropenia. Finalmente, a fase de cura corresponde à migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais, caracterizando a resolução das lesões na mucosa oral <sup>7,8</sup>.

Clinicamente, a mucosite inicia com manifestação de eritema, seguida de descamação do epitélio e ulceração do mesmo. Eventualmente, com a presença de exudato fibrinoso, há formação de uma pseudomembrana sobre a úlcera. A perda do epitélio expõe o tecido conjuntivo subjacente, causando dor e desconforto ao paciente durante o tratamento antineoplásico <sup>4</sup>.

A sintomatologia dolorosa decorrente da mucosite oral ulcerativa interfere na qualidade de vida e nutrição do indivíduo acometido, assim como a perda significativa de peso, por vezes tornando necessário o emprego de sonda nasoenteral ou gastrotomia para a alimentação enteral. A disrupção da barreira da mucosa aumenta o risco de infecções e é dose-limitante para a terapia, a qual pode ser alterada em sua intensidade ou mesmo ser interrompida em casos severos de mucosite, prejudicando no controle local da neoplasia

maligna e no prognóstico do paciente <sup>3, 4, 9</sup>. O aumento da morbidade e do custo operacional do tratamento tornam necessária a terapia efetiva no controle da mucosite oral.

Ainda permanece o consenso na comunidade científica de que não há uma terapia aprovada para a mucosite. À medida que estudos recentes evoluem para o entendimento de sua complexa biopatologia, a mucosite é alvo de diversas terapias em potencial. No entanto, muitas vezes pretende-se a redução dos sintomas, como o alívio da dor, utilizando analgésicos narcóticos <sup>10, 11, 12, 13</sup>.

As terapias farmacológicas utilizadas atualmente para a mucosite oral incluem citoprotetores <sup>14, 15, 16</sup>, fatores de crescimento celular <sup>17, 18, 19</sup>, vitamina E <sup>20</sup>, suplementos metabólicos <sup>21</sup>, antibióticos <sup>22, 23, 24</sup>, antimicrobianos <sup>25, 26</sup>, agentes lubrificantes <sup>27</sup>, antiinflamatórios <sup>28, 29, 30</sup>, e até terapia gênica <sup>31</sup>.

A amifostina (Ethyol) é um citoprotetor direto e tem se mostrado eficiente para reduzir a mucosite induzida por quimio ou radioterapia. Sua prescrição tem como desvantagem o fato de ser uma droga sistêmica, de administração EV, além de possuir fortes efeitos colaterais de náuseas, vômitos e hipotensão, para os quais deve ser administrada uma droga antiemética concomitante <sup>14, 15</sup>.

Outra droga de interesse na terapia para mucosite oral, a palifermina (Kepivance<sup>®</sup>) é um fator de crescimento de queratinócitos (KGF) desenvolvido em laboratório, responsável por estimular a proliferação, migração e diferenciação do epitélio. O KGF endógeno, normalmente produzido por fibroblastos, é expresso exclusivamente em células epiteliais em uma variedade de tecidos. Portanto, ainda é questionável a ação deste fármaco em células neoplásicas malignas, apesar dos estudos serem favoráveis <sup>17, 18, 19</sup>.

O uso de bochechos com clorexidina, antibiótico de amplo espectro, ainda não foi totalmente elucidado em mucosite induzida por radioterapia. Outras soluções para bochecho associadas aos cuidados de higiene oral são usadas em pacientes com alto risco para o desenvolvimento de infecções das lesões presentes na cavidade oral. Apesar de promoverem maior conforto do paciente, são regimes paliativos porque não possuem efeito significativo na mucosite. Estudos divergem sobre o uso destas soluções, mas são favorecidos por conta da facilidade de obtenção, modos de uso e baixos custos <sup>22, 23, 24, 25, 26, 27</sup>.

A benzidamina é um antiinflamatório não esteroideal indicado para atenuação de uma série de condições inflamatórias, incluindo mucosite oral induzida por radiação antineoplásica ou quimioterapia. Estudos in vivo constataram a redução dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pela ação da benzidamina. Estas citocinas são encontradas

em excesso na mucosa acometida pela mucosite e em infecções por *Candida albicans*, principal microorganismo agravante da mucosite oral. Por ser considerada um eficiente analgésico e antiinflamatório supressor de citocinas, pode ser usado para atenuação da dor e severidade da mucosite oral <sup>28, 29, 30</sup>.

Estudos clínicos da irradiação com *laser* em baixa intensidade para prevenção e tratamento da mucosite oral, verificam ser esta uma terapia promissora <sup>32, 33, 34</sup>. Resultados verificam não somente a diminuição da intensidade da dor, como a diminuição da severidade da mucosite, sem apresentar efeitos colaterais <sup>35, 36</sup>. Os efeitos biológicos induzidos por luz dependem de todos os parâmetros de irradiação (comprimento de onda, dose, intensidade, tempo de irradiação, modo de operação), assim como das propriedades ópticas do tecido alvo.

O *laser* em baixa intensidade quando absorvido nos tecidos biológicos pode ter efeitos biomoduladores, especialmente no tratamento de úlceras, feridas superficiais e inflamações. Uma cascada de eventos nas mitocôndrias e na membrana lipoprotéica provoca o aumento do pH intracelular e da produção de ATP celular, regulando o fator de proliferação das células irradiadas <sup>37</sup>.

O efeito local da terapia em baixa intensidade (LILT – low intensity *laser* therapy) é maior em situação adversa de baixa concentração de oxigênio e de pH e na deficiência de nutrientes. Nestas condições, a proliferação celular é diminuída e o *laser* age como um sinal para o aumento das mitoses celulares <sup>37</sup>. Talvez este fato explique em parte a eficiência desta terapia, já que estudos para o tratamento da mucosite buscam atenuar a produção de espécies ativas – e deletérias - de oxigênio (ROS) por agentes estomatotóxicos <sup>10</sup>. Os efeitos sistêmicos da LILT, como o alívio da dor, devem-se ao fato da luz laser atuar em células excitáveis (i.e. neurônios), aumentando seu potencial de ação <sup>37</sup>.

Outro aspecto relevante para o tratamento de mucosite induzida pela radioterapia é o entendimento de seu mecanismo de ação no epitélio sadio oral. A radiação ionizante  $\gamma$  interfere no crescimento e diferenciação celular, causando a morte durante o processo de mitose. A irradiação de células com luz vermelha pode protegê-las do dano provocado pela radiação ionizante  $\gamma$ , caracterizando uma provável propriedade radioprotetora do laser de He-Ne <sup>4,38,39</sup>.

A laserterapia para a mucosite oral é realizada com comprimentos de onda que compreendem o vermelho e o infravermelho próximo, em fontes de luz variadas, sendo mais freqüentemente usados os lasers de He-Ne (vermelho) ou diodos de GaAlAs (vermelho ou infravermelho) <sup>38</sup>.

A possibilidade de tratamento de mucosite oral com lasers em baixa intensidade já apresenta resultados positivos, e pode ser um aliado para pacientes em tratamento quimioterápico, debilitados pela enfermidade e pela terapia. Porém ainda não há estudos em animais que analisem a LILT em lesões produzidas pela radioterapia. A proposta deste trabalho é avaliar se esta fonte emissora de luz também é eficaz em mucosite induzida pela radiação ionizante  $\gamma$  de uma fonte  $\text{Co}^{60}$ , visando ampliar as indicações dos lasers na área da saúde.

## 2 OBJETIVOS

- Estabelecer um protocolo de indução de mucosite oral por radiação ionizante com fonte de  $\text{Co}^{60}$  em hamsters.
- Comparar por meio de análise clínica e histológica um grupo controle com o grupo terapêutico para a mucosite oral em hamsters:
  1. Terapia com laser em baixa intensidade (780 nm)
  2. Grupo controle - terapia com benzidamina de uso tópico

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1. Radioterapia

A maioria das neoplasias malignas é iniciada por uma única célula, a qual passou por transformação maligna. A consequência desta transformação é um grupo de células que se reproduzirá exponencialmente, e a falta de controle de sua proliferação caracteriza o processo maligno.

A radioterapia pode ser definida como o uso da radiação ionizante, seja ela raios X ou raios gama, para tratar a neoplasia maligna. Os vários tipos de radiação, produzidos e administrados de maneiras diferentes, têm por resultado final o dano ao DNA. O dano proveniente da radiação ionizante ocorre principalmente através da produção de espécies químicas altamente reativas denominadas radicais livres. Os radicais livres danificam as moléculas de DNA, comprometendo a replicação da célula maligna, e por final, interferindo no processo normal de sua divisão celular.

Em uma população celular em crescimento, células individuais passam por uma seqüência de alterações descritas como ciclo celular. O ciclo celular contém dois eventos principais: a fase S e a mitose. A fase S pode ser facilmente reconhecida, pois durante esta fase DNA está sendo sintetizado e o conteúdo intracelular dobra de quantidade. A fase mitose pode ser reconhecida morfológicamente, pois corresponde à divisão do conteúdo anteriormente duplicado. Há dois intervalos dentro deste ciclo: a fase G1, anterior a fase S, e a fase G2, entre a fase S e a mitose. A maioria das células possui estas fases em constante duração. No entanto, podem ocorrer grandes variações na duração da fase G1 e é o que caracteriza distintos ciclos celulares entre os vários tipos de célula.

A sensibilidade das células à radiação depende da fase do ciclo celular em que se encontram. Células em G2 ou em mitose são mais radiosensitivas que células em G1 ou na fase S. Uma dose única de radiação eliminará de maneira selecionada células em divisão, na fase G2 ou em mitose. Logo, a radioterapia tem como alvo danificar células em fases do ciclo vulneráveis à radiação. Assim, terá maiores efeitos em grupos celulares que estão em constante divisão, como o epitélio da mucosa oral.

O maior fator limitante para qualquer terapia citotóxica é a tolerância dos tecidos normais. Para drogas citotóxicas (presentes na quimioterapia), os tecidos normais relevantes são aqueles que proliferam: medula óssea, epitélio de pele e mucosa. Para a radioterapia, os tecidos normais relevantes são aqueles adjacentes ao tumor, principalmente se possuem rápida proliferação. Danos a células normais são aceitos como consequência

normal da terapia, mas o resultado ideal da terapêutica é a reparação mais rápida do tecido normal e falha na reparação do tecido do tumor. Assim, em uma terapia eficiente, o tumor seria eliminado com uma taxa mais alta do que o tecido normal, o qual se repararia mais rápido.

As unidades de dose de radiação são baseadas no grau de energia depositado no tecido pela radiação. O Gray é a unidade de medida utilizada pelo Sistema Internacional de Unidades (SI) e substituiu o radiano (rad). Um Gray é igual a 100 rad. O centigray (cGy) é uma unidade prática, já que está incluída no SI, mas significa o mesmo que o radiano: um cGy é equivalente a um rad.

Na radioterapia clínica há a distinção entre dose de regime paliativo e dose radical. A dose paliativa tem como função a diminuição dos sinais do tumor, evitando produzir efeitos colaterais. Neste tipo de tratamento, as frações são administradas para minimizar o desconforto para o paciente (ex: 25 Gy em 5 frações, durante 1 semana, ou então 30 Gy em 10 frações durante 2 semanas). A dose radical provê a erradicação do tumor com um grau de toxicidade tolerável aos tecidos normais. Neste caso, a dose total prescrita varia por exemplo de 50-57 Gy em 16-20 frações, durante 3-4 semanas, ou 60-70 Gy em 30-35 frações durante 6-7 semanas <sup>40</sup>.

Por convenção, o fracionamento da radioterapia nos EUA utiliza tipicamente doses diárias entre 1.8 e 2.0 Gy por dia. Os protocolos de irradiação são direcionados de acordo com a radiosensibilidade dos tumores em questão e dos tecidos normais adjacentes. Estes protocolos buscam danificar o máximo de células malignas em sua fase sensível do ciclo celular, durante a irradiação <sup>41</sup>.

As células tumorais possuem propriedades inatas que irão determinar sua resposta à irradiação, sendo a mais importante, a susceptibilidade ao dano e a habilidade ao reparo deste dano. Dentro do grupo dos carcinomas epiteliais da cabeça e pescoço, há uma faixa ampla de radiosensibilidade, demonstrada por técnicas *in vitro* que mensuraram a curva de sobrevivência à irradiação de 200 cGy (2 Gy) entre outros parâmetros radiobiológicos.

Os carcinomas e os tecidos normais irradiados respondem de maneiras diferentes à radiação ionizante devido a radiosensibilidade de cada um. As neoplasias malignas de origem epitelial não diferem muito em comportamento: o controle destes tumores é alcançado com doses similares de irradiação. No entanto, os sarcomas de tecidos moles (neoplasias malignas de origem mesenquimal) não respondem bem à radioterapia como única terapia. Ainda assim, ela é utilizada como terapia coadjuvante à cirurgia destes tumores, na tentativa da preservação de estruturas vitais.

Apesar da taxa de regressão do tumor à radioterapia ser um dado importante para a terapêutica, notou-se que tumores de rápida resposta à terapia eram tratados com subdose, isto é, com dose insuficiente para eliminá-los, levando a recorrência destas neoplasias. Assim, para a maioria das lesões malignas de origem epitelial, a dose total prescrita é baseada no volume total do tumor primário <sup>42</sup>.

Para o planejamento da radioterapia também se deve levar em conta a anatomia local da região de cabeça e pescoço, assim como as características clínicas da lesão maligna. Em um plano terapêutico completo, a equipe médica deve traçar a terapia adequada para o tratamento do tumor primário e dos nódulos linfáticos adjacentes, estes, passíveis de metástase. Lesões exofíticas ou vegetantes regredem mais rapidamente, enquanto lesões infiltrativas de tecidos profundos possuem baixa taxa de regressão à irradiação. Nódulos linfáticos metastáticos regredem menos que tumores primários. A terapêutica portanto deve ser planejada de acordo com a provável resposta do tumor e do hospedeiro, avaliando-se custos e benefícios.

Em geral, a cirurgia é indicada sobre as seguintes circunstâncias: em tumores radioresistentes, em tumores recidivantes em áreas já irradiadas, em situações em que os efeitos colaterais da irradiação podem ser mais severos que os defeitos cirúrgicos, e em neoplasias envolvendo osso, nódulos linfáticos e glândulas salivares <sup>43</sup>. Entretanto, se o tratamento do tumor primário é a ressecção cirúrgica, o esvaziamento cervical é realizado - com ou sem complementação radioterápica - dependendo do risco de metástase. No caso de radioterapia utilizada nos tumores primários, os nódulos linfáticos são incluídos dentro da área a ser irradiada <sup>41</sup>.

A radioterapia, além de ser amplamente utilizada na terapia antineoplásica, é a terapia de eleição sempre que possível, já que é eficiente na maior parte dos casos e não possui as desvantagens de outras modalidades terapêuticas. A cirurgia de neoplasias malignas orais é muitas vezes mutilante e comprometedora da cosmética e da função de estruturas importantes como o lábio, língua, mandíbula e maxila, enquanto que a quimioterapia possui baixa taxa de resposta de tumores orais malignos de origem epitelial e freqüentemente produz severos efeitos colaterais sistêmicos <sup>43</sup>.

Atualmente, busca-se o melhor regime radioterápico para a cura de malignidades de cavidade oral. Os protocolos de fracionamento e de dose variam, na tentativa de tornar a terapia mais eficaz, preservando o máximo as estruturas normais.

### 3.2. Mucosite oral induzida por radiação ionizante em modelo animal

Os modelos animais de indução de mucosite oral por radiação ionizante apresentados na literatura internacional variam com a espécie do animal, local de exposição, dose total de irradiação (seja esta fracionada ou única), e fonte de radiação. Modelos foram bem estabelecidos em hamsters Sírios e em camundongos BDF<sub>1</sub> ou C<sub>3</sub>H/Neu<sup>8, 44, 45, 46, 47, 48, 49</sup>.

Em camundongos C<sub>3</sub>H/Neu irradiados em ventre de língua, utilizando raios X como fonte, o tempo latente da formação de úlceras e a duração das mesmas foi independente do gênero<sup>48</sup>. Entretanto, parece haver uma pequena diferença de radiosensibilidade entre as espécies BDF<sub>1</sub> e C<sub>3</sub>H/Neu<sup>47</sup>. Apesar de estudos estatísticos inconclusivos, sabe-se que as taxas de proliferação da mucosa oral são maiores em camundongos BDF<sub>1</sub> e que o tempo de latência de úlceras, assim como suas durações, são menores nesta espécie. Por outro lado, a radiosensibilidade dentro de cada espécie não varia com a dose total de irradiação. O tempo de latência de úlceras, isto é, o tempo compreendido entre o dia da irradiação até o dia do aparecimento das lesões (cerca de 11,6 dias para a espécie C<sub>3</sub>H/Neu, e 5,6 dias para a espécie BDF<sub>1</sub>), é independente da dose total, considerando as doses de 6, 9, 11, 13 e 16 Gy. A duração das úlceras também é independente da dose total de irradiação (cerca de 2,8 dias para a espécie C<sub>3</sub>H/Neu, e 2,4 dias para a espécie BDF<sub>1</sub>), considerando as doses de 6, 9, 11, 13 e 16 Gy. A re-epitelização completa das lesões foi verificada em torno do dia 16 para as duas espécies, para qualquer dose total. Porém, é importante a informação de que a incidência de úlceras é altamente dose dependente, ou seja, quanto maior a dose total de exposição à radiação ionizante, maior os efeitos deletérios desta<sup>46</sup>.

Outros trabalhos utilizando aparelhos de raios X para indução da mucosite oral foram realizados em hamsters Sírios. Para o desenvolvimento da mucosite oral foi necessária a irradiação direta sobre o tecido da mucosa jugal, com dose total entre 35 e 40 Gy, com distância focal entre vinte e um a cinquenta centímetros. A manifestação da mucosite oral foi observada cerca do dia 12, independente da dose total, e com pico da severidade das lesões ao redor do dia 15<sup>8, 49</sup>. Os animais foram avaliados dia 0 (dia da irradiação) até o dia 22, com sacrifícios para avaliação histológica nos dias 2, 10, 16 e 21. Através de coloração com azul de toluidina notou-se o aumento do número de células exibindo apoptose entre os dias 12 e 15. A análise imunohistoquímica revelou um padrão a respeito da inflamação no tecido irradiado. Houve um aumento significativo da intensidade do infiltrado inflamatório no dia 12 e diminuição deste no dia 18, e o aumento da

expressão da interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) em submucosa nos dias 12 e 15, com níveis vistos no dia 18 iguais aos vistos no dia 1 pós irradiação. Por fim, foi verificado por análise de PCR o aumento da quantidade de citocinas pré-inflamatórias IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  no dia 12, com redução a partir do dia 15<sup>8</sup>.

A incidência da mucosite oral em hamsters pode ter sido atrasada em relação aos estudos com camundongos por diferença do animal utilizado no experimento ou devido à taxa de dose (Gy/min) empregada, pois é sabido que o aumento desta implica em modificações na incidência e severidade da mucosite oral *in vivo*.

### 3.3 Benzidamina

O hidrocloreto de benzidamina é um analgésico não esteroidal, de propriedades antiinflamatórias, analgésicas, anestésicas e antimicrobianas. Este medicamento possui indicação para condições inflamatórias diversas, pois é um inibidor da produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , presente abundantemente no processo de sinalização da mucosite oral.

O modo de ação deste fármaco - ao interferir no metabolismo celular durante a inflamação - ainda não está completamente elucidado, mas quando investigado *in vitro*, em células humanas e de ratos, a benzidamina inibe a produção do TNF- $\alpha$ , e em quantidade menor, de IL-1 $\beta$ , embora não tenha ação sobre a IL-6 e a IL-8<sup>29,30</sup>.

Em um estudo clínico utilizando a fonte de Co<sup>60</sup> para a radioterapia, considerou-se uma amostra tratada com a dose cumulativa de 50 Gy (5000 cGy). Para o grupo tratado com solução de benzidamina a 0,15%, foram realizados bochechos com 15 ml da solução, durante 2 minutos, 4 a 8 vezes ao dia, antes, durante e após 2 semanas da finalização da RT. Em casos de ocorrência de ardência bucal (46%), foi permitida a diluição da solução. Analgésicos também foram utilizados, em caso de dor de duração de mais de 6 horas, considerado o nível de algesia máximo permitido na amostra. A benzidamina produziu 26,3% de redução no escore médio para mucosite oral, porém foi ineficiente em pacientes que receberam altas doses diárias (acima de 220 cGy). Neste estudo foi constatado o efeito profilático da benzidamina para a mucosite oral em pacientes que receberam a RT convencional. Áreas de risco da orofaringe permaneceram com baixos escores (sem ulcerações) e ocorreu atraso significativo na necessidade do uso de analgésicos sistêmicos.

Outros trabalhos clínicos apresentam resultados positivos para o tratamento da mucosite oral com a benzidamina, especialmente na redução de infecções secundárias. No entanto esta terapia tópica apresenta limitações devido a efeitos colaterais (dor, ardência e

náuseas) e eficiência baixa quando a radioterapia alcança maiores taxas de dose de irradiação<sup>50, 51</sup>.

### 3.4 Laser

A indicação da terapia *laser* em baixa potência para a mucosite oral decorrente da terapia antineoplásica está associada ao atraso no tempo de latência das lesões, atenuação do pico de severidade da mucosite e a diminuição da duração das lesões. O reparo tecidual e o alívio da dor estão relacionados a achados microscópicos e moleculares, como o aumento da divisão celular e a modificação da condução neural por meio da liberação de endorfinas e encefalinas. O aumento da quantidade de fibroblastos e do metabolismo mitocondrial favorece o aumento da deposição de uma matriz fibrilar no tecido conjuntivo da área irradiada, acelerando o processo de reparação<sup>33</sup>.

A regeneração tecidual por meio de irradiação *laser* também pode ser explicada pela rápida transformação de fibroblastos em miofibroblastos. É provável que fatores de crescimento de fibroblastos participam ativamente do reparo epitelial e da citoproteção. Por outro lado, há relatos consistentes na literatura de que a irradiação *laser* pode reduzir a formação de radicais livres produzidos durante a quimio e a radioterapia, caracterizando o potencial antiinflamatório e analgésico do efeito do *laser* em mucosite oral<sup>52</sup>.

A terapia com *laser* vem sendo investigada principalmente para a prevenção de mucosite oral induzida por quimioterapia ou em pacientes recebendo condicionamento quimioterápico para transplante de medula óssea. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados na prevenção e tratamento de mucosite oral conseqüente da radioterapia<sup>52</sup>. Ainda assim, vislumbram-se bons resultados clínicos. Em um estudo duplo-cego, pacientes em regime de radioterapia intensa (dose total de 65 Gy, taxa de dose 2 Gy/fração, 5 frações por semana) apresentaram escores significativamente mais baixos para dor e grau de mucosite quando comparados com o grupo controle, nos quais também era simulada irradiação *laser*<sup>52</sup>.

Ao analisar trabalhos publicados na literatura, pode-se concluir além da ação preventiva do *laser* para a mucosite oral durante o tratamento antineoplásico, há evidências clínicas de que a irradiação *laser* pode reduzir significativamente a dor causada por estas lesões, diminuir sua progressão e acelerar o reparo da mucosa irradiada.

### 3.5. Mastócitos

Mastócitos são células secretoras presentes no leito microvascular da mucosa oral, em proximidade com a membrana basal das células endoteliais e nervosas, porém capazes de migrar para outros tecidos. Os mastócitos podem estar envolvidos em diversas atividades fisiológicas, e seus mediadores participam do controle vascular em caso de injúria e reparo tecidual, e também da propagação da resposta inflamatória nos tecidos danificados. Atualmente, há um aumento no interesse sobre as possibilidades de interação entre estas células e outros componentes da resposta imunológica em infecções bacterianas, assim como na sua participação da patogênese de condições inflamatórias crônicas, como a periodontite e a mucosite oral<sup>8, 53</sup>.

O conteúdo citoplasmático dos mastócitos consiste em mediadores químicos, armazenados em grânulos secretores e liberados por meio de desgranulação celular, responsáveis pela inflamação nos tecidos circundantes. Entre os mediadores da inflamação há aqueles pré-formados, como a histamina, proteoglicanas e proteinases, enquanto os mediadores recém-gerados são os metabólitos do ácido aracdônico e uma variedade de citocinas inflamatórias, como a o fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>54, 55</sup>.

As citocinas são um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes inflamatórias. São proteínas ou peptídeos, ligadas ou não a moléculas de açúcar (denominadas glicoproteínas). As interleucinas são produzidas principalmente pelas células T e estão envolvidas na indução de divisão e diferenciação de outras células. Os fatores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) são citocinas importantes nas reações inflamatórias e citotóxicas.

Estudos demonstram que o derivado TNF- $\alpha$  induz a expressão endotelial da E-selectina, uma molécula de adesão presente nas células endoteliais e é requisitada para a adesão de neutrófilos, linfócitos T, monócitos e outros leucócitos nos vasos sanguíneos. A E-selectina é expressa em uma variedade de lesões inflamatórias da mucosa oral, incluindo líquen plano, gengivite, e inflamação periapical. Especula-se que a síntese e a secreção crônica de TNF- $\alpha$  pelos mastócitos pode ser responsável pela manutenção de altos níveis da expressão da E-selectina, e portanto promovendo a cronicidade da migração de leucócitos para os tecidos orais<sup>55</sup>.

Outras publicações apresentam controvérsias a respeito da presença de mastócitos na inflamação da mucosite oral. Ocorre que, as citocinas inflamatórias (ex. TNF- $\alpha$ , IL-8) indutoras da síntese de E-selectina, são secretadas também por outras células da resposta imune, como os fagócitos mononucleares e os linfócitos T<sup>56</sup>. Finalmente, a molécula de

adesão E-selectina tem sua expressão ativada somente quando os mastócitos se encontram desgranulados, isto é, não intactos <sup>55</sup>. Porém, a quantificação de somente mastócitos desgranulados exclui a possibilidade de atividade dos mastócitos íntegros, e por outro lado pode incluir na contagem mastócitos “desgranulados” devido trauma mecânico ou alterações de temperatura <sup>57</sup>. Para a verificação da atividade inflamatória destas células, existem outras técnicas complementares de processamento histológico mais adequadas e representativas. Exames de imunohistoquímica ou exames de PCR possibilitam uma análise mais precisa do processo inflamatório, pois utilizam marcadores para as citocinas pró inflamatórias (ex. TNF- $\alpha$ , IL-1), e quantificam níveis de RNA de cada citocina, respectivamente <sup>8</sup>. No entanto, o alto custo destes exames e a dificuldade da técnica, se comparada ao processamento e avaliação rotineiros, limitam sua utilização.

## 4 METODOLOGIA

O projeto para esta dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN, parecer nº 3/2006.

O estudo foi dividido em duas partes sucessivas e distintas.

### 4.1 Fase I – Indução da mucosite

A primeira parte consistiu em desenvolver um protocolo de indução da mucosite oral em hamsters através de irradiação ionizante, orientado por trabalhos previamente realizados na literatura com radiação  $\gamma$  provenientes de outras fontes <sup>8, 17, 18, 40, 41</sup>.

#### 4.1.1 Animais

Para o estudo piloto e o experimento foi utilizado o total de 50 hamsters sírios dourados (Golden Syrian Hamsters), provenientes do Centro de Bioterismo da FFM (Fundação Faculdade de Medicina USP) e mantidos no biotério do IPEN – CNEN/SP. Os animais selecionados eram machos, com idade entre 8-12 semanas, com massa aproximada de 150 mg <sup>17</sup>. Os hamsters foram separados em 4 animais por gaiola. Comida e água foram disponíveis aos animais ad libitum. A pesquisa seguiu os princípios éticos de experimentação animal, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base em normas internacionais, que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal baseando-se em três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

#### 4.1.2 Estudo Piloto

Previamente ao experimento, foi realizado um estudo piloto, no qual o total de 8 hamsters foram irradiados em três parâmetros distintos para verificação do surgimento e evolução da mucosite oral. A primeira irradiação foi realizada em 2 animais numa distância de 30 cm em 13 min e 07 segundos, com dose total de 15 Gy (taxa de dose de 68,7 Gy/hora). A segunda irradiação foi realizada também em 2 animais, porém com dose total aumentada para 20 Gy, durante 17 minutos e 42 segundos, na mesma distância (taxa de dose de 68,0 Gy/hora). Para esta irradiação foi realizado o teste de atenuação da madeira. Na terceira irradiação foram utilizados 4 animais, a 30 cm da fonte, durante 27 minutos e 6 segundos, com dose total de 30 Gy (taxa de dose de 66,5 Gy/hora). Foi verificado o dia de estabelecimento das lesões de mucosite oral como sendo o dia 8, a sua localização em mucosa labial, assim como o “pico” de severidade destas lesões no dia 10 e

o tempo de cura de cerca de 10 dias. Os resultados deste estudo permitiram estabelecer a metodologia de tratamento pretendida pelo projeto, a dose de radiação necessária para o surgimento da mucosite oral e a seleção dos dias de sacrifício dos animais para análise histológica.

#### 4.1.3 Irradiação

Antes de ser iniciada a irradiação, os animais foram climatados por mínimo de 48 horas no biotério, com a intenção de minimizar o estresse da locomoção até o local.

Para a irradiação, os hamsters foram sedados e anestesiados com a associação de quetamina (Vetanarcol<sup>®</sup>) 100 mg/ml e xilazina (Copazine<sup>®</sup>) 20 mg/ml. Após a sedação, os animais foram posicionados no sentido vertical com um suporte plano ajustável de fórmica. Blocos de chumbo de quatro centímetros de espessura foram posicionadas anteriormente ao suporte para bloqueio do corpo à radiação, sendo exposta somente a cabeça dos animais durante a radiação (Anexo I). O procedimento foi realizado no CTR (Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN/CNEN), com um irradiador panorâmico de fonte de Co<sup>60</sup>, com distância focal de 30 cm e dose de 30 Gy (taxa de dose de 66,5 Gy/hora) .

## 4.2 Fase II - Terapia

Nesta fase, 40 hamsters irradiados conforme descrito previamente, foram separados aleatoriamente em dois grupos, com total de 20 animais por grupo de tratamento. Outros 2 animais foram irradiados e imediatamente sacrificados após a irradiação para verificação do efeito da radiação ionizante logo após a irradiação com a fonte de Co<sup>60</sup>.

Após a irradiação dos animais, considerada o dia 0 da terapia, os protocolos terapêuticos foram iniciados.

A terapia *laser* (grupo I) foi realizada durante 20 dias para os 20 animais do grupo *laser*, com intervalo de 24 horas entre cada sessão. Em cada dia foi feita somente uma sessão de irradiação na mucosa labial dos animais deste grupo. O aparelho utilizado é um *laser* de diodo de GaAlAs, modelo Twinlaser (MM Optics, Brasil), com feixe de 4 mm<sup>2</sup> de área, e comprimento de onda de 780nm, correspondendo à região do infravermelho no espectro eletromagnético e portanto, invisível ao olho humano. O comprimento de onda foi selecionado de acordo com o entendimento mais recente da patobiologia da mucosite oral, processo iniciado no tecido conjuntivo <sup>7</sup>. Logo, o comprimento de 780 nm seria mais adequado para o tecido em questão por ter maior penetração comparado com o comprimento de onda vermelho.

Os parâmetros de irradiação seguem: potência de 50 mW, dose de 6 J/cm<sup>2</sup>, durante 5 segundos. A irradiação foi pontual, de oito pontos distribuídos em aproximadamente 2,5 cm de extensão de mucosa labial por cerca de 0,5 cm de altura (Anexo I). Durante a irradiação *laser*, normas de segurança foram obedecidas, como a utilização de óculos de proteção para operador e assistentes. Antes de iniciar cada irradiação, a potência foi aferida com um medidor de potência e energia modelo Fieldmaster (Coherent, EUA) para mensuração da potência do feixe de saída.

A partir do dia 0, correspondente ao dia da irradiação da fonte de Co<sup>60</sup>, o grupo II também recebeu a terapia com benzidamina durante 20 dias para os 20 animais do grupo, com intervalo de 24 horas entre cada aplicação. A aplicação tópica foi realizada em lábio, com 0,25 ml de benzidamina a 0,15%, de nome comercial Benzitrat<sup>®</sup> (Biolab/Sanus Farmacêutica, Brasil), embebida em algodão de hastes flexíveis, uma vez ao dia.

A severidade da mucosite oral do grupo I foi analisada e comparada clinicamente em relação ao mesmo sítio da mucosa oral do grupo II. Para análise histopatológica os animais foram sacrificados em uma câmara de gás CO<sub>2</sub> disponível no biotério do IPEN. A área biopsiada correspondeu à região central de lábio inferior.

Foram sacrificados quatro animais de cada grupo em 5 momentos diferentes, desde o dia zero, correspondente à irradiação, até a regressão total das lesões<sup>17,44</sup>.

A severidade das lesões em mucosa labial foi classificada de acordo com um escore determinado na literatura, no qual o critério utilizado é puramente clínico<sup>4</sup>. A classificação foi determinada por dois observadores calibrados previamente. Este sistema de graduação é dividido em 5 pontos a seguir:

0. sem alteração de mucosa
1. discreto eritema (< 25%)
2. severo eritema
3. mucosite (> 50%)
4. mucosite confluyente

No Anexo II encontram-se os graus de mucosite considerados na calibração dos observadores.

Para a classificação clínica da mucosite oral também foram consideradas a morbidade e função oral do animal, como a ingestão de ração ao longo do estudo. A associação entre o aspecto clínico da mucosa e o estado geral do animal corresponde a três graduações de mucosite oral: leve, moderada ou severa.

### 4.3 Fase III - Histologia

Exames histopatológico de amostras da mucosa jugal foram obtidos nos dias consecutivos à irradiação. Foi retirado 1 fragmento de cada animal, na região anatômica correspondente ao vermelhão do lábio e à mucosa labial. Como amostra de mucosa labial para futura análise histológica, foi selecionada aleatoriamente a região central de lábio inferior. Foram realizadas três incisões com o auxílio de um bisturi nº15, sendo duas paralelas verticais e outra horizontal, unido-as e destacando a peça (Figura 1).



Figura 1- Excisão de amostra em lábio inferior.

Os fragmentos foram imersos em formol a 10% e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes com 4 mm de espessura foram feitos e corados em hematoxilina e eosina (H/E) e em azul de toluidina. Para a análise histológica foram considerados os seguintes pontos:

- morfologia dos tecidos (análise descritiva histológica)
- celularidade do tecido conjuntivo adjacente à camada basal do epitélio
- quantidade de fibras colágenas
- quantidade de espaços brancos, correspondentes a líquido de edema, espaços vasculares ou artefatos de técnica
- contagem de mástocitos, secretores da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  <sup>54, 55</sup>

Para quantificação das estruturas histológicas, o campo microscópico foi digitalizado por meio de câmera tipo CCD (Sony) acoplada a microscópio de luz convencional (Laborval). A imagem digitalizada foi então transferida para software de

morfometria digital ImageLab 2000, por intermédio de placa digitalizadora (Captivator) acoplada a microcomputador HP Pentium II, 128RAM, 10 Gb HD. No ImageLab eram quantificados os tons azuis, referentes aos núcleos celulares, os tons róseos, referentes às fibras colágenas, e os tons brancos, referentes aos espaços brancos encontrados. Foram quantificados entre 5 a 10 campos histológicos da lâmina própria (com aumento final de 400X), de acordo com a extensão de epitélio de revestimento presente nos espécimes. A quantificação foi realizada em porcentagem, proporcional a um campo de área fixa, definida pelo software.

Para a análise descritiva e a quantificação da celularidade do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio da mucosa labial os espécimes foram corados com hematoxilina/eosina. (H/E).

Para a quantificação dos mastócitos, foi feita contagem manual das células coradas em azul de toluidina, tendo-se como referência a camada basal do epitélio como campo histológico mais superficial. Foram quantificados de 5 a 10 campos de área fixa, com aumento de 400x, no sentido horizontal.

A análise descritiva e quantitativa dos cortes histológicos foi feita na disciplina de Patologia Geral e no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia, ambos localizados na FOU SP.

Os dados histológicos foram submetidos à análise estatística posterior.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fase I – Indução da mucosite

Para a validação do protocolo de irradiação do experimento, foram averiguados os resultados da irradiação do estudo piloto. Durante os experimentos, a irradiação foi aferida pelo Laboratório de Dosimetria em Processos de Irradiação por meio de dosímetro Gafchromic Batch 7654-09 (Isp Technologies Inc, EUA). O objetivo deste teste foi averiguar a atenuação da irradiação de dois anteparos: o posicionador de fórmica utilizado para a estabilização dos animais, e o bloqueio de chumbo utilizado para a proteção do corpo dos mesmos. O dosímetro possui sensibilidade à irradiação e muda de cor de acordo com a dose incidente. Por meio de um Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, foi averiguado o comprimento de onda emitido pelo dosímetro após a irradiação. O espectrofotômetro utilizado possui sensibilidade para comprimentos de onda entre 190 e 1100 nm, enquanto a sensibilidade do dosímetro (de 633nm) variou com doses entre 10 e 40 Gy. De acordo com os resultados das dosimetrias, a atenuação da fórmica não foi significativa e o bloqueio de chumbo apresentava atenuação de 88% da dose total. O valor de atenuação do chumbo foi classificado como adequado para o experimento pretendido neste trabalho.

Para o experimento, os animais foram mantidos a 30 centímetros de distância da fonte em todas as irradiações. Nas duas primeiras irradiações, de dose total de 15 Gy e 20 Gy respectivamente, não foram observadas alterações significativas na mucosa oral dos animais, durante os 15 dias de acompanhamento.

Já para a terceira irradiação, foi considerado o aumento da dose total para 30 Gy, parâmetro para o qual foi observado no dia 8 após a irradiação, algum sinal clínico de processo inflamatório da mucosa labial de 3 animais no grupo (n=4). Neste dia foi verificado eritema distribuído em mucosa labial, além de halitose dos animais e umedecimento dos pêlos da região ao redor da boca. Nos dias seguintes ao dia 8, o eritema labial se intensificou, assim como os sinais de halitose e umedecimento de pêlos. Algumas áreas de necrose epitelial em lábio puderam ser observadas, ocorrendo a queda de pêlos da região de face e eventualmente do corpo. Estes sinais tornaram-se mais evidentes no dia 10 após a irradiação. Os animais nesta fase apresentaram morbidade notável, tornando-se necessária a mudança da alimentação utilizando uma ração mais gordurosa e de fácil ingestão. Nos oito dias seguintes ao dia 10 (dia 10 a dia 18), as lesões regrediram progressivamente, sendo notada melhora significativa no dia 18. No dia 20 as lesões orais

apresentaram regressão total e os animais estavam mais ativos, se alimentando normalmente (Figura 2). Na região perioral onde houve queda de pêlos, novos pêlos estavam em crescimento, no entanto notou-se a falta de pigmentação destes, os quais apresentavam-se de coloração branca.

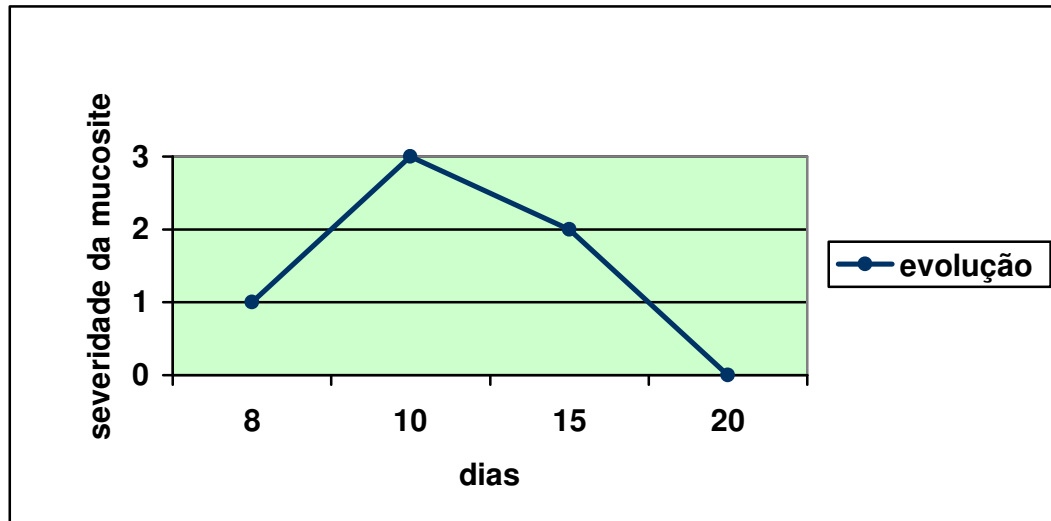


Figura 2- Evolução da severidade da mucosite no estudo piloto em função do tempo.

Com os resultados do estudo piloto, foram determinadas as condições para a realização do experimento. A dose total estabelecida foi de 30 Gy para a fonte de  $\text{Co}^{60}$ , a qual foi entregue no tempo de 27,1 minutos, com taxa de dose de 66,5 Gy/min. Com este parâmetro de irradiação foi possível observar um padrão na evolução da mucosite e foram definidos os dias para sacrifício dos animais: dias 8, 10, 15, 18 e 20. Comparando com os estudos previamente analisados para o desenvolvimento do estudo piloto, a dose total de 30 Gy é um valor entre os valores apresentados por outros trabalhos, os quais variam entre 15,3 e 40 Gy – fracionados ou em sessão única – dependendo do tipo de animal do estudo, da fonte de radiação utilizada (ex.  $\text{Cs}^{137}$ , Raios X) e da localização da mucosite oral (ex. mucosa jugal, ventre de língua ou lábio). No entanto, segundo Pabst 2003, apesar da incidência de ulcerações na mucosite oral ser dose dependente, o tempo latente (7 a 10 dias) e a duração da úlcera (cerca de 3 dias) são independentes da dose de radiação <sup>46</sup>. Os resultados do surgimento, “pico” e duração da mucosite obtidos em nosso estudo piloto foram compatíveis aos resultados descritos na literatura.

Um exemplo dos vários graus de mucosite obtidos e considerados para calibração dos observadores encontra-se no Anexo II.

## 5.2 Fase 2 – Terapia

### 5.2.1 Experimento e avaliação clínica

Primeiramente, 2 animais foram irradiados e imediatamente sacrificados após a irradiação, definidos como grupo G0. Os animais apresentavam ausência de sinais de alteração de mucosa oral e a avaliação histológica deste grupo tem como objetivo verificar possíveis alterações microscópicas e comparar com o exame histológico dos grupos com sinais clínicos visíveis de mucosite oral.

Foram estabelecidos dois grupos de acordo com o tratamento aplicado, sendo 20 animais do grupo *laser*, e 20 do grupo benzidamina. Os animais receberam tratamento todos os dias seguintes à irradiação. Entre os grupos, os animais foram separados aleatoriamente em subgrupos de quatro, de acordo com o dia de sacrifício após o dia de irradiação, considerado o dia 0 (Tabela 1).

**Tabela 1- Subgrupos de acordo com o dia de coleta de peça para avaliação histológica**

Subgrupo	Tratamento	Dia de Sacrifício
G8L	<i>laser</i>	dia 8 após irradiação
G8B	benzidamina	dia 8 após irradiação
G10L	<i>laser</i>	dia 10 após irradiação
G10B	benzidamina	dia 10 após irradiação
G15L	<i>laser</i>	dia 15 após irradiação
G15B	benzidamina	dia 15 após irradiação
G18L	<i>laser</i>	dia 18 após irradiação
G18B	benzidamina	dia 18 após irradiação
G20L	<i>laser</i>	dia 20 após irradiação
G20B	benzidamina	dia 20 após irradiação

O grau de mucosite oral foi determinado por dois observadores calibrados durante o estudo piloto. Segundo a classificação clínica eleita para a mucosite oral, a presença e intensidade de lesões foram analisadas e quantificadas para cada grupo. A Tabela 2 apresenta na segunda coluna a média obtida entre os dois observadores.

Tabela 2-. **Grau de mucosite, mediana, média e desvio padrão (DP).**

Subgrupo	Grau de Mucosite	Número de Animais	Mediana	Média	Desvio Padrão
G0	0	2	0	0	0
G8L	0	3	0	0,5	1
	2	1			
G8B	0	2	0,5	0,75	0,95743
	1	1			
	2	1			
G10L	0	2	0,5	1	1,41421
	1	1			
	3	1			
G10B	0	1	1,5	1,5	1,29099
	1	1			
	2	1			
	3	1			
G15L	0	1	1	1	0,8165
	1	2			
	2	1			
G15B	1	1	2	2	0,8165
	2	2			
	3	1			
G18L	0	2	0,5	0,5	0,57735
	1	2			
G18B	2	4	2	2	0
G20L	0	4	0	0	0
G20B	0	1	1	0,75	0,5
	1	3			

Grau de mucosite de 0 – 3 (0: ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa)

Os subgrupos que receberam o tratamento de *laser* de baixa potência para a mucosite oral apresentaram menor frequência da lesão em lábio, assim como a severidade/grau da mucosite foi menor quando comparado com os subgrupos tratados com benzidamina de uso tópico. (Tabela 2 e Figura 3).

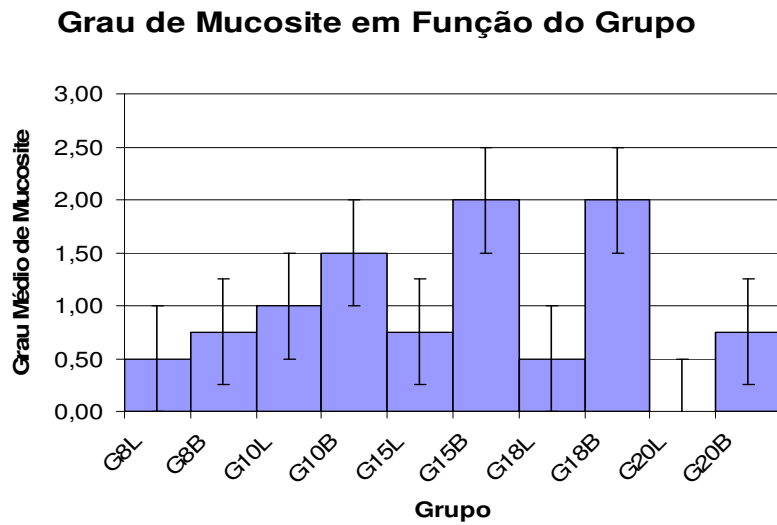


Figura 3 - Grau de mucosite de 0 – 3 (0: ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa) de acordo com o grupo de tratamento/ dia de análise histológica.

A Figura 4 expõe o número de amostras em função do tipo de tratamento e do grau de mucosite observado em cada amostra. Esta figura representa, no eixo das ordenadas, o número de animais. As cores das colunas representam a gravidade da mucosite observada em cada animal por grupo de tratamento. Cada subdivisão das ordenadas equivale a um animal.

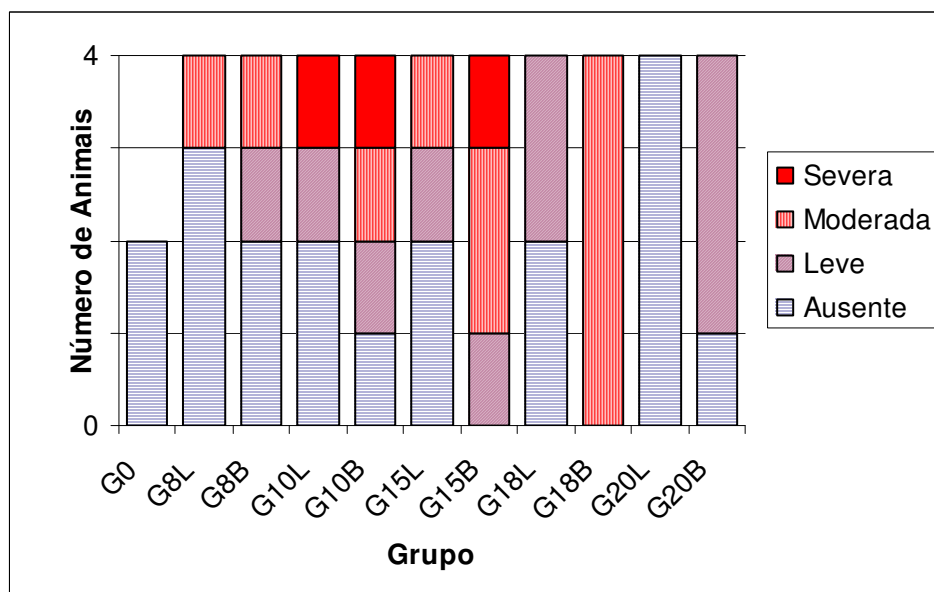


Figura 4 - Grau de mucosite de acordo com o grupo de tratamento e dia de análise histológica.

## 5.2.2 Avaliação histológica

### 5.2.2.1 Análise histológica descritiva

#### G 0

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, exibindo hiperplasia da camada basal, hipercromatismo nuclear, inversão de polaridade e núcleos em paliçada. Na camada espinhosa verificam-se algumas células exibindo degeneração hidrópica. Na lâmina própria verifica-se moderado infiltrado inflamatório crônico difuso pela presença de linfócitos e áreas focais de líquido de edema, completando o quadro de mucosite oral.

#### G 8 Benzidamina

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado, com áreas de hiperqueratinização, áreas de atrofia epitelial e área focal de úlcera, com necrose fibrinóide e formação de microabcessos na superfície epitelial. A camada basal apresenta áreas hiperplásicas, hipercromatismo nuclear, inversão de polaridade e núcleos em paliçada. Na camada espinhosa verificam-se algumas células exibindo degeneração hidrópica. Na lâmina própria verifica-se moderado infiltrado inflamatório crônico difuso, hiperemia vascular e extensas áreas de líquido de edema.

#### G 8 *Laser*

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, exibindo hiperplasia da camada basal, hipercromatismo nuclear, inversão de polaridade e núcleos em paliçada. Na camada espinhosa verificam-se algumas células exibindo degeneração hidrópica. Na lâmina própria verifica-se moderado a intenso infiltrado inflamatório crônico e áreas focais de líquido de edema, completando o quadro de mucosite oral.

#### G 10 Benzidamina

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso, estratificado hiperqueratinizado, com camada basal preservada. Na lâmina própria verifica-se moderado infiltrado inflamatório difuso, com deposição de fibras colágenas recentes, indicativas de processo recente de reparação. Em uma lâmina houve

presença de áreas focais de necrose no epitélio e microabcessos, indicativos de possível ulceração.

#### G 10 *Laser*

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com atrofia intensa e hiperplasia da camada basal, bem como hiperchromatismo nuclear nessa mesma camada. Na lâmina própria verifica-se intenso infiltrado inflamatório crônico, ausência de edema e intensa proliferação de fibras colágenas organizadas, caracterizando fibrose tecidual.

#### G 15 Benzidamina

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com atrofia intensa; na camada basal do epitélio nota-se hiperplasia e hiperchromatismo nuclear. Na lâmina própria verifica-se moderado a intenso infiltrado inflamatório crônico, extensas áreas de edema e presença de proliferação de fibras colágenas recém-formadas, não modeladas.

#### G 15 *Laser*

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado, exibindo intensa degeneração hidrópica das células epiteliais, e camada basal com hiperplasia e hiperchromatismo nuclear. Na lâmina própria verifica-se moderado infiltrado inflamatório crônico, áreas de edema e presença de fibras colágenas organizadas, caracterizando fibrose tecidual.

#### G 18 Benzidamina

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado. O epitélio apresenta-se homogêneo, plano e de espessura fina, indicativo de reparo recente possivelmente em área ulcerada. Na lâmina própria verifica-se discreto infiltrado inflamatório crônico e presença de fibras colágenas modeladas, caracterizando fibrose tecidual.

#### G 18 *Laser*

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado. O epitélio apresenta-se homogêneo, plano e

de espessura fina, indicativo de re-epitelização recente possivelmente em área ulcerada. Na lâmina própria verifica-se discreto infiltrado inflamatório crônico e presença de fibras colágenas organizadas, caracterizando fibrose tecidual.

#### G 20 Benzidamina

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (quantidade normal de queratina). O epitélio apresenta ondulações restabelecidas, como em tecido normal de mucosa labial. Em uma lâmina foram notadas áreas de intensa atrofia epitelial, indicativa de re-epitelização recente. Na lâmina própria verifica-se discreto infiltrado inflamatório crônico e presença de fibras colágenas organizadas, caracterizando fibrose tecidual.

#### G 20 Laser

Os cortes histológicos revelam fragmentos de mucosa revestidos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (quantidade normal de queratina). O epitélio apresenta ondulações restabelecidas, como em tecido normal de mucosa labial. Na lâmina própria verifica-se discreto infiltrado inflamatório crônico e presença de fibras colágenas organizadas, caracterizando fibrose tecidual.

#### 5.2.2.2 Análise histológica quantitativa

A quantificação de elementos relevantes para a análise dos subgrupos foi realizada em porcentagem. Três aspectos da lâmina própria foram levados em conta: a celularidade, presença de fibras colágenas e espaço vazio.

A celularidade pode ser representada principalmente por células inflamatórias, células endoteliais ou fibroblastos. O espaço vazio pode corresponder ao espaço interior de vasos sanguíneos, edema, artefato de técnica ou a matriz extracelular composta por proteoglicanas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e água. Segundo pôde ser verificado na análise histológica descritiva, tanto a presença de células endoteliais, quanto o espaço relativo aos vasos sanguíneos foram homogêneos – em quantidade e tamanho – em mucosa labial para todos os subgrupos. Portanto, foram considerados os fibroblastos e as células inflamatórias como possíveis responsáveis pela variação da celularidade. Para os espaços vazios, foi desconsiderado para a análise o espaço interior dos vasos sanguíneos.

De posse dos resultados, foram calculados a média aritmética e o desvio padrão individualmente em todos subgrupos. Os animais foram individualizados com a finalidade de obter-se uma média final, que leve em conta não somente a distribuição estatística dos dados, como também as características individuais de cada animal (Tabela 3 e 4).

**Tabela 3 – Quantificação da celularidade, colágeno e espaço do grupo benzidamina: média e desvio padrão.**

Grupo	Benzidamina								
	Celularidade Média			Colágeno Média			Espaço Média		
G8	(1,55	±	0,11)%	(42,8	±	1,7)%	(53,6	±	1,8)%
G10	(0,773	±	0,044)%	(65,17	±	0,90)%	(33,53	±	0,86)%
G15	(0,620	±	0,048)%	(56,58	±	0,78)%	(42,50	±	0,78)%
G18	(1,908	±	0,081)%	(72,25	±	0,68)%	(24,10	±	0,84)%
G20	(1,473	±	0,064)%	(66,6	±	1,4)%	(31,5	±	1,5)%

**Tabela 4 – Quantificação da celularidade, colágeno e espaço do grupo laser: média e desvio padrão.**

Grupo	Laser								
	Celularidade Média			Colágeno Média			Espaço Média		
G8	(2,007	±	0,076)%	(65,6	±	1,6)%	(31,3	±	1,7)%
G10	(1,10	±	0,10)%	(77,6	±	1,0)%	(19,48	±	0,83)%
G15	(1,84	±	0,10)%	(54,2	±	1,4)%	(43,3	±	1,4)%
G18	(0,852	±	0,044)%	(65,52	±	0,46)%	(33,47	±	0,47)%
G20	(1,317	±	0,062)%	(60,4	±	1,3)%	(38,0	±	1,4)%

### 5.3 Avaliação estatística

#### 5.3.1 Dados clínicos

Para este trabalho, assumiu-se que há uma incerteza de 0,5 em cada ponto da escala utilizada, já que a classificação clínica é uma medida subjetiva dependente do observador. Isto equivale a dizer que há pequenas diferenças entre dois casos distintos, mesmo eles sendo classificados com a mesma nota.

De posse da Tabela 2, foi obtida uma média da nota atribuída a cada amostra. A média não é considerada um valor representativo da medida em questão, apenas representa o quanto o tratamento aplicado influenciou em cada amostra. Uma média de valor mais elevado equivale a dizer que à maioria das amostras foi atribuída uma nota mais elevada, portanto o tratamento não foi efetivo e o grupo, em média, apresenta mucosite mais severa do que aquele grupo com uma média mais baixa.

A incerteza de cada amostra foi devidamente propagada para obter-se uma incerteza final na média. Por fim, foram comparadas as médias e suas respectivas incertezas para os dois tratamentos propostos e para o intervalo de confiança de 95%. No caso de dados biológicos é largamente utilizado um intervalo de confiança de 95% (ou uma diferença de 5%) o que é obtido acrescentando um fator multiplicativo de aproximadamente 1,645.

Tabela 5 – **Compatibilidade dos resultados de grau de mucosite entre os subgrupos**

Grupos	Grau de mucosite
G8L G8B	NÃO
G10L G10B	NÃO
G15L G15B	SIM
G18L G18B	SIM
G20L G20B	SIM

No caso dos grupos G8 e G10 nota-se que há ligeira melhora no tratamento com *laser* em relação ao tratamento com benzidamina, porém, não há diferença estatisticamente significativa entre eles, logo podemos concluir que: dentro do intervalo de significância de 5%, os dados referentes à G8L e G8B, assim como à G10L e G10B, não são diferentes entre si.

A análise estatística do grupo G15 mostra uma grande melhora no tratamento com *laser* em relação ao tratamento com benzidamina e há diferença estatisticamente significativa entre eles. Assim, podemos concluir que dentro de um intervalo de significância de 5%, os dados referentes à G15L e G15B são diferentes entre si.

Os dados estatísticos da análise clínica coincidem com a análise histológica descritiva, a qual verificou que o tecido conjuntivo correspondente aos grupos G10L e G15L apresentou maior número de fibras colágenas modeladas, provavelmente devido à estimulação da atividade dos fibroblastos pelo *laser*. A disposição das fibras colágenas observada desde o dia 10 sugere reparação mais avançada da lâmina própria, e contração mais rápida da ferida. No grupo benzidamina G10B o colágeno ainda se apresentava escasso, disposto em fibras espaçadas, indicando uma provável causa para o atraso da reparação observada no dia 15 em relação ao grupo *laser*. É possível que a diferença da regeneração do tecido conjuntivo entre os dois grupos se dê pela diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos no tecido irradiado com o *laser* de baixa potência, facilitando a regeneração do epitélio adjacente.

A análise dos grupos G18 e G20 também mostrou melhora nos grupos *laser* em relação aos grupos benzidamina, sendo esta diferença estatisticamente significativa para o intervalo de significância de 5%. Apesar da diferença dos resultados clínicos, a análise histológica descritiva para estes grupos foi similar.

### 5.3.2 Dados histológicos

#### 5.3.2.1 Celularidade, colágeno e espaço vazio

A partir dos valores médios de cada animal foi feita uma análise por  $\chi^2$  para a obtenção de uma média final e sua respectiva incerteza em cada grupo estudado (Tabelas 3 e 4). Esta análise leva em conta não somente a média aritmética obtida para cada animal, mas também o erro padrão associado, a este atribuindo um peso maior a valores que possuam uma incerteza menor, e vice versa. Para verificar a compatibilidade dos dados, foi calculado o valor de “p”, considerando o intervalo de significância de 0,5% ( $p < 0,05$ ) entre os dados em cada subgrupo (Tabela 6).

Tabela 6 - **Compatibilidade dos resultados entre os subgrupos para celularidade, colágeno e espaço vazio.**

Grupos	Celularidade	Colágeno	Espaço
G8L G8B	SIM	SIM	SIM
G10L G10B	SIM	SIM	SIM
G15L G15B	SIM	NÃO	NÃO
G18L G18B	SIM	SIM	SIM
G20L G20B	NÃO	SIM	SIM

A celularidade foi significativamente maior nos grupos *laser* para os G8, G10 e G15, se comparados com os grupos tratados com a benzidamina. Através da análise histológica descritiva dos subgrupos, não foi verificada diferença relevante entre os infiltrados inflamatórios entre eles, e sim entre a quantidade e qualidade das fibras colágenas. Provavelmente este resultado está relacionado com a maior atividade fibroblástica nos espécimes histológicos destes grupos, sendo os fibroblastos as células responsáveis pelo aumento da celularidade dos grupos *laser* nestes tempos. Inversamente, há valores significativamente maiores relativos à quantidade de espaço vazio nos grupos benzidamina para os G8 e G10, explicado pela presença de edema e pela degradação da matriz extracelular pela atividade da enzima colagenase. (Figuras 5 e 6).

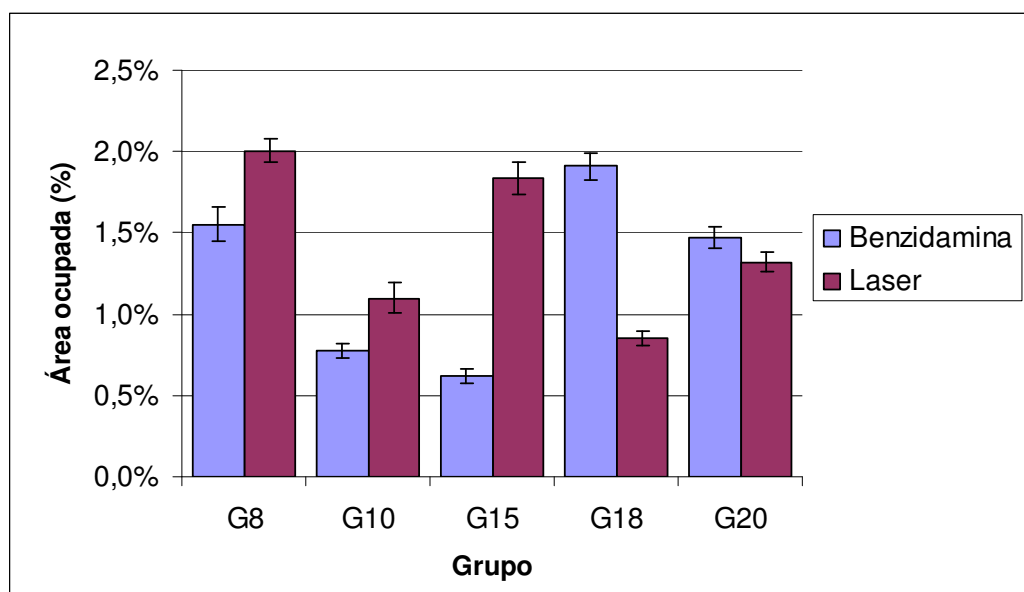


Figura 5 – **Celularidade: porcentagem de células em função de cada subgrupo.**

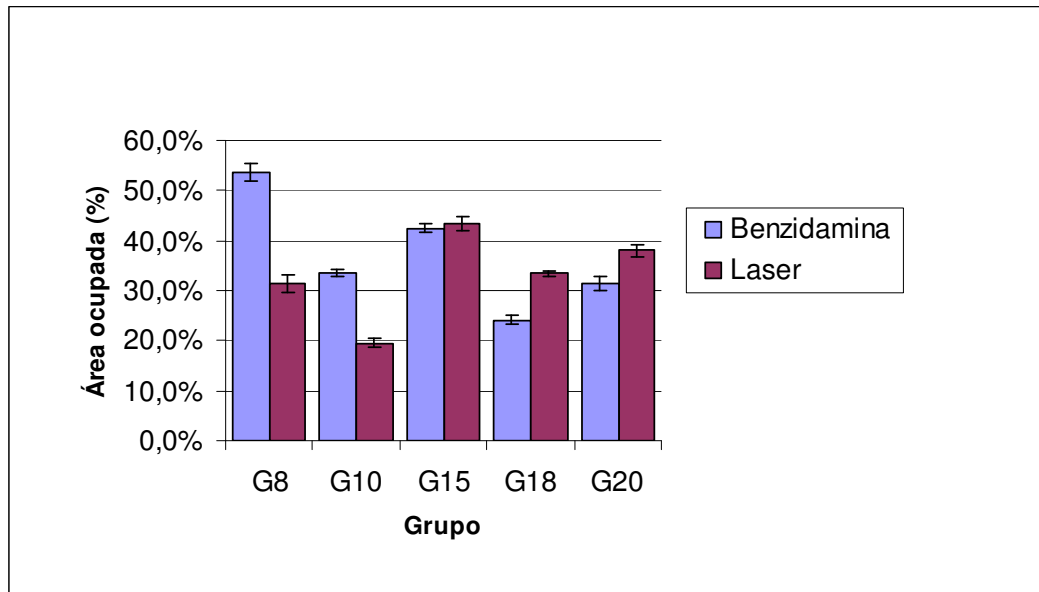


Figura 6 – Porcentagem de espaço vazio em função de cada subgrupo.

Pode ser observado também que os níveis de celularidade do G15L são alcançados pelo grupo benzidamina somente no G18B. Este dado informa que a quantidade de fibroblastos na lâmina própria do grupo tratado com a benzidamina, e a formação de fibras colágenas organizadas é atrasada em relação ao *laser*, que exibe melhor reparo tecidual verificado clinicamente no dia 15.

O espaço significativamente maior para os grupos G18L e G20L deve corresponder ao espaço deixado pela reorganização das fibras colágenas nestes grupos. Os cortes histológicos destes grupos revelaram um colágeno disposto mais paralelamente, adjacente à camada basal, com espaços localizados abaixo deste colágeno. Pode-se supor que este fenômeno deve-se a maior diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, a qual seria estimulado pela irradiação *laser*. A atividade dos miofibroblastos provocaria então a maior contração do tecido conjuntivo, acelerando seu processo de reparação epitelial.

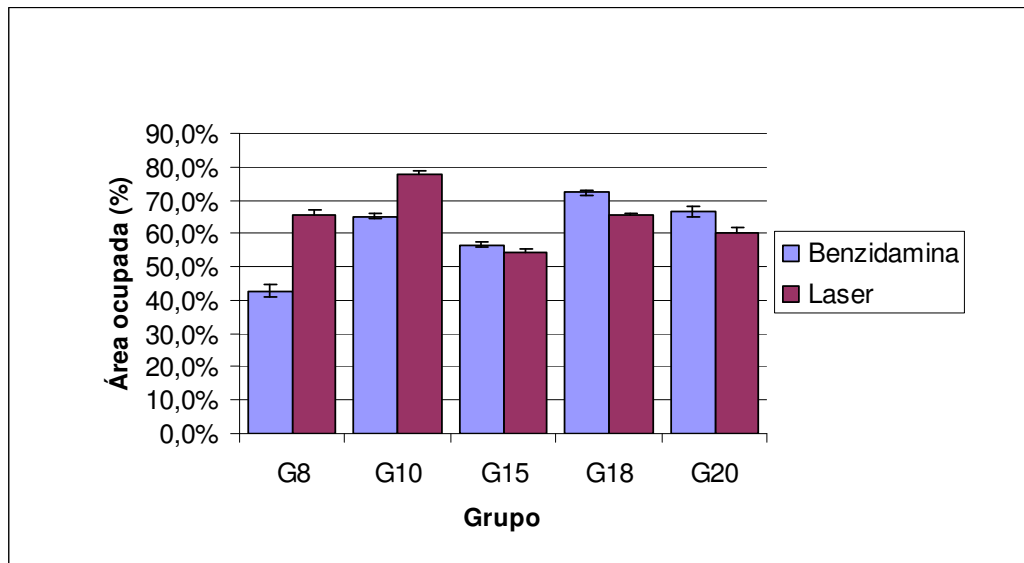


Figura 7 – Colágeno: porcentagem de colágeno em função de cada subgrupo.

A presença de colágeno nos grupos G8L e G10L foi verificada ser significativamente maior que nos grupos G8B e G10B, devido à intensa produção de fibras colágenas no processo de reparação (Figura 7). Somente a partir do G15B é observado o aumento da produção de colágeno no grupo tratado com a benzidamina, a níveis similares aos grupos G8L e G10L. A diminuição da quantidade deste componente nos grupos *laser* a partir do G18L converge com os resultados a respeito do espaço vazio e da análise descritiva: o colágeno neste grupo e no grupo seqüente (G20L) apresenta-se reorganizado, mais concentrado próximo à camada basal.

Segundo Suntharalingan, 2000, a resposta histológica à radiação ionizante precede a resposta clínica, tanto em modelo animal quanto em pacientes. Após a dose total de 20 Gy, é notada a alteração na contagem de células a partir do dia 8, mas a média de tempo de latência para o diagnóstico clínico da mucosite é observada somente a partir do dia 11<sup>41</sup>. Esta constatação também pode ser observada quando são comparados os dados clínicos e os histológicos dos resultados aqui apresentados. Isto pode ser mais bem compreendido através do estudo da patobiologia da mucosite oral. Os sinais clínicos da mucosite não são notados nas primeiras fases do processo de formação das lesões. Didaticamente, desde a primeira fase (iniciação) até a regressão completa da mucosite oral, as úlceras podem ser visualizadas somente em tempos próximos a penúltima fase, quando na realidade o processo de reparação já está em andamento. Daí a importância de se identificar em um estudo piloto os dias clínicos interessantes para realizar a biópsia.

De acordo com a literatura, as amostras de tecido irradiadas com radiação ionizante são obtidas segundo a metodologia empregada no trabalho. Para contagem de mastócitos e avaliação da presença de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , Sonis, 2000 utilizou espécimes referentes aos dias 5, 8, 10, 15, 19 e 20 após a irradiação (dia 0) <sup>8</sup>. Porém, em outro trabalho, o mesmo autor definiu os dias de sacrifício como 2, 10, 16, 21, para a análise da expressão da COX-2 nos tecidos. Os tempos definidos para a avaliação histológica desta tese (0, 8, 10, 18 e 20) viabilizaram a diferenciação satisfatória entre os processos de reparação tecidual em animais tratados com *laser* e benzidamina.

### 5.3.2.2 Mastócitos

A análise estatística avaliou a densidade de mastócitos dos subgrupos, calculando a média aritmética para cada um e as respectivas incertezas (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – **Mastócitos: média aritmética e incertezas para os grupos benzidamina.**

Grupo	Média (unidade de densidade)	
G8B	1,47	-16
G10B	2,45	-30
G15B	1,59	-21
G18B	0,59	-12
G20B	1,63	-17

Tabela 8 – **Mastócitos: média aritmética e incertezas para os grupos *laser*.**

Grupo	Média (unidade de densidade)	
G8L	0,85	-20
G10L	1,51	-18
G15L	0,82	-21
G18L	0,85	-14
G20L	1,37	-15

Para verificar a compatibilidade dos dados, foi calculado o valor de “p”, considerando o intervalo de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) entre os dados em cada subgrupo (Tabela 9).

**Tabela 9 – Compatibilidade dos resultados entre os subgrupos para a densidade de mastócitos.**

Grupos	Mastócitos
G8L G8B	SIM
G10L G10B	SIM
G15L G15B	SIM
G18L G18B	NÃO
G20L G20B	NÃO

Os resultados da densidade de mastócitos presentes na lâmina própria, adjacente ao epitélio submetido à radiação ionizante, revelaram que houve maior concentração destas células nos grupos benzidamina para os dias 8, 10 e 15 do que nos grupos *laser* relativos aos mesmos dias. Para os grupos dos dias 18 e 20 não houve a diferença significativa entre os subgrupos (Figura 8).

Comparando estes resultados com a análise descritiva histológica, não seria adequado afirmar que o aumento de mastócitos nos grupos G8B, G10B e G15B se deve ao aumento da inflamação local, o qual manteve níveis similares entre os grupos de acordo com os resultados da classificação do infiltrado inflamatório. Presume-se que se houvesse o aumento significativo da secreção de citocinas pré-inflamatórias pelos mastócitos, estas estimulariam o recrutamento mais intenso de leucócitos para a região no grupo benzidamina, o que não foi verificado. Ainda assim, deve ser considerado o fato de que a liberação da histamina produz reação vascular, induzindo a alterações na passagem transcapilar promovendo o edema<sup>58</sup>. Esta informação pode corresponder com a quantificação de espaços verificada acima, já que nas fases iniciais da mucosite (G8, G10) o suposto edema apresentar-se-ia aumentado nos grupos tratados com a benzidamina, coincidentemente com o aumento significativo da densidade de mastócitos.

Com base nos estudos histológicos descritivo e quantitativos, a alteração da densidade de mastócitos poderia estar relacionada com o processo de reparação do conjuntivo, de acordo com a presença de maior quantidade de colágeno no grupo *laser*. A

histamina, além de vaso dilatador em processos inflamatórios, estimula a formação de colágeno e a reparação quando presente em doses pequenas<sup>57</sup>. No entanto, a densidade de mastócitos se apresentou aumentada nos grupos benzidamina até o dia 15, quando há reversão deste aumento para o grupo *laser*, o qual obteve melhor reparação tecidual e maiores níveis de colágeno nos dias 8 e 10. Por este mesmo motivo, ainda há a possibilidade de que a densidade de mastócitos no grupo *laser* foi suficiente para estimular a formação de colágeno, pois se manteve em níveis baixos, enquanto que no grupo benzidamina isso poderia ter acontecido somente entre os dias 15 e 18.

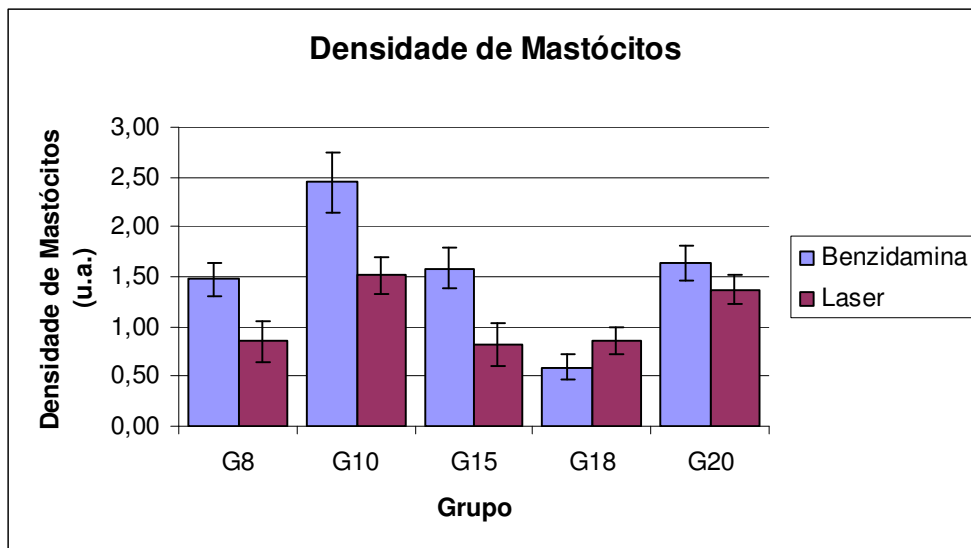


Figura 8 – Densidade de mastócitos em função de cada subgrupo.

É interessante observar que apesar das diversas possibilidades sobre o processo patológico e a densidade de mastócitos, a variação dos níveis modifica (inverte) também no dia 15, assim como foi verificado nos outros itens histológicos quantificados.

Em seu trabalho, Sonis quantificou mastócitos em lâminas processadas com azul de toluidina e observou o aumento na média aritmética dos mastócitos entre os dias 8 e 15. Porém não foi constatada diferença significativa entre o grupo tratado e o controle em nenhum momento avaliado. Ao mesmo tempo, foi realizado exames de imunohistoquímica e de PCR para presença de IL-8 e TNF- $\alpha$  respectivamente. A IL-8 encontrou-se aumentada com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na lâmina basal entre os dias 12 e 15, diminuindo no dia 18 para níveis observados no dia 1. A quantificação de TNF- $\alpha$  permitiu concluir que houve redução significativa dos níveis da citocina no grupo tratado a partir do dia 12, atingindo valor maior no dia 15. A análise destes resultados associa o aumento das citocinas

inflamatórias quantificadas com a curva da classificação clínica da mucosite oral. A quantificação de mastócitos e do infiltrado inflamatório através de processamentos rotineiros não revelou diferenças significativas naquela publicação, nem permitiu o aprofundamento da análise do processo de desenvolvimento e cura da mucosite oral <sup>8</sup>.

Para a elucidação da participação dos mastócitos no processo da mucosite oral no experimento relatado nesta dissertação, sugere-se a futura realização de exames de imunohistoquímica para avaliar possíveis variações nos níveis das citocinas inflamatórias ou a variação nos níveis dos diferentes tipos de colágeno (I, II e III). Apenas a imunohistoquímica fornecerá informações que permitirão esclarecer o papel dos mastócitos na reparação de mucosite oral induzida por radiação ionizante.

## CONCLUSÕES

A terapia com *laser* de baixa potência (780 nm) para a mucosite oral induzida pela radiação ionizante com fonte de  $\text{Co}^{60}$  em hamsters, diminuiu a severidade das lesões, e foi eficaz para uma reparação mais rápida se comparada ao tratamento com benzidamina.

## ANEXO 1 - IRRADIAÇÕES



Figura 9 - Posicionamento dos animais para a irradiação com  $\text{Co}^{60}$



Figura 10 - Irradiação com *laser* de baixa potência ( $\lambda=632 \text{ nm}$ )

**ANEXO 2 - Graus de mucosite considerados na calibração dos observadores.**



**Figura 11 - Mucosite grau 0**



**Figura 12 - Mucosite grau 1**

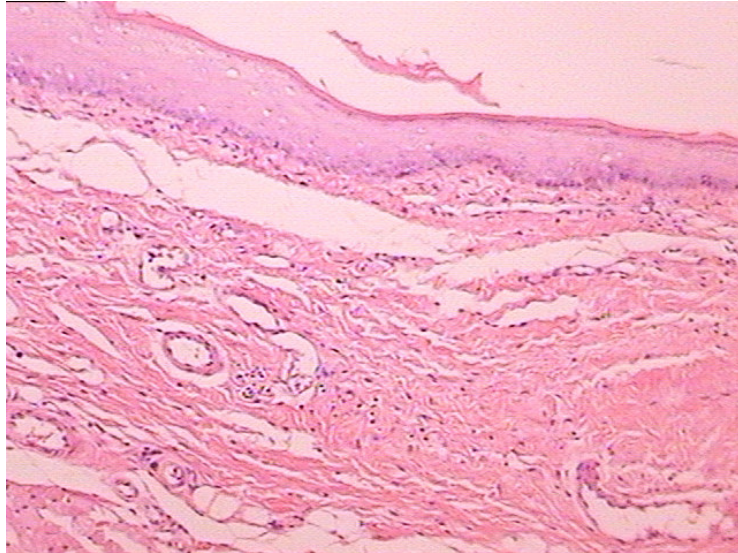


**Figura 13 - Mucosite grau 2**

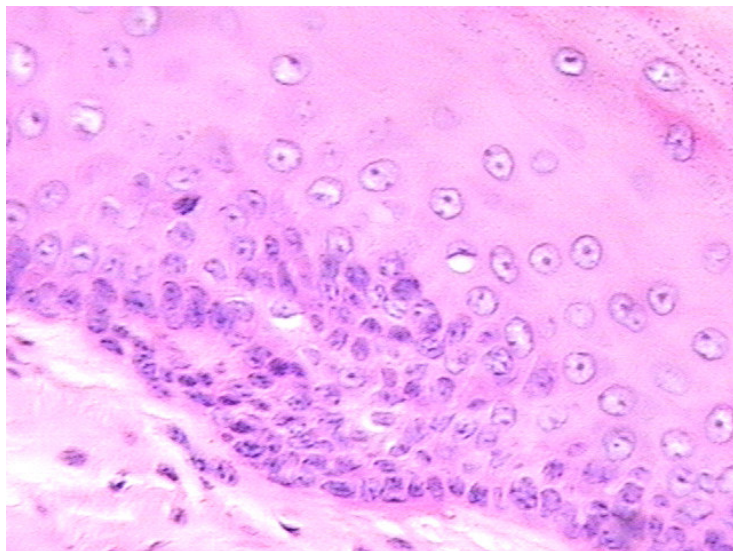


**Figura 14 - Mucosite grau 3**

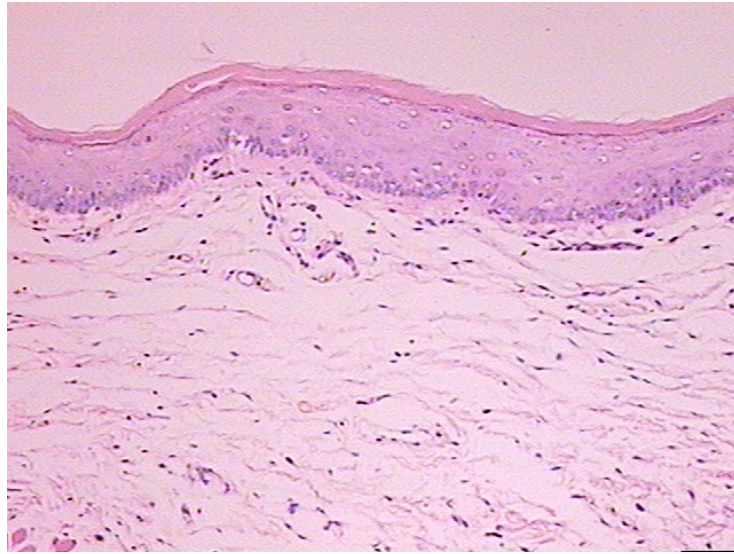
**ANEXO 3 - Exemplos de cortes histológicos de mucosa labial dos hamsters, segundo o grupo experimentado.**



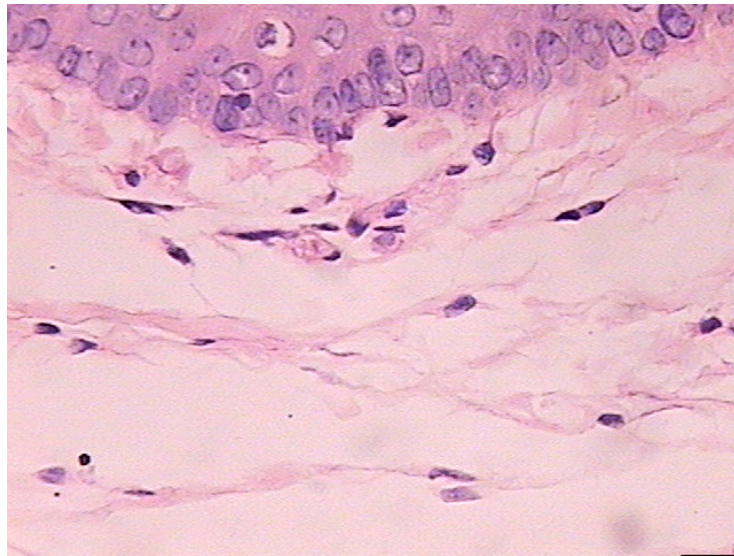
**Figura 15 - G0 (aumento original de 100x)**



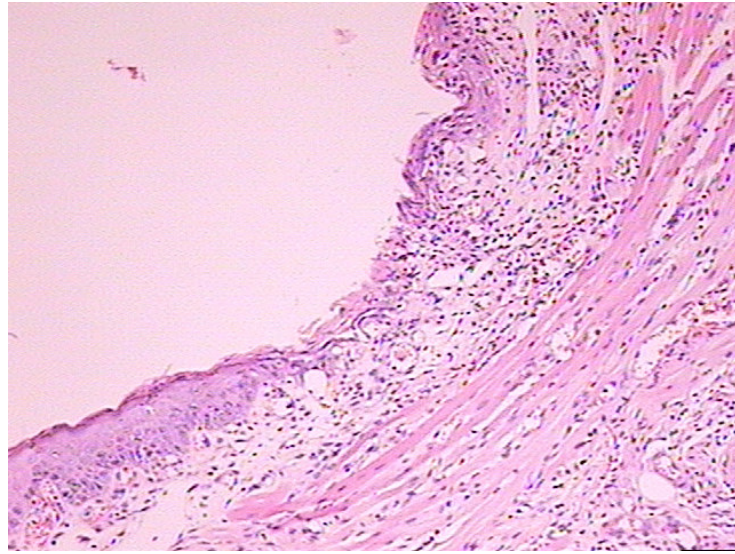
**Figura 16 - G0 (aumento original de 400x)**



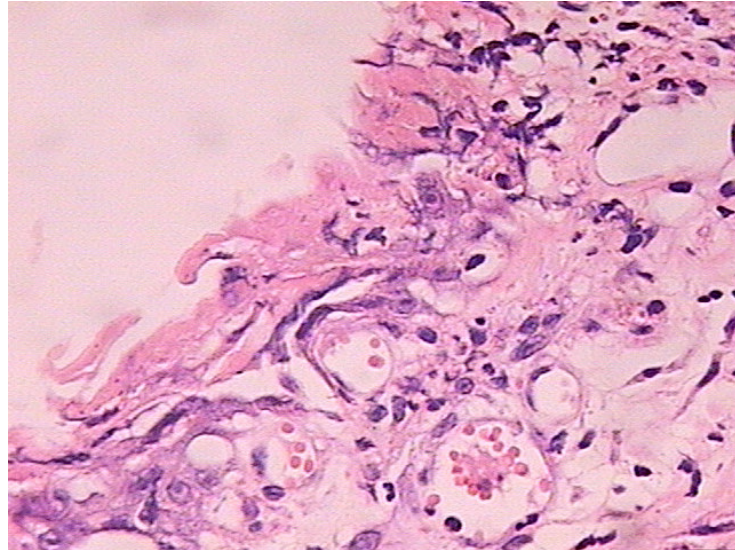
**Figura 17 - G8 benzidamina (aumento original de 100x)**



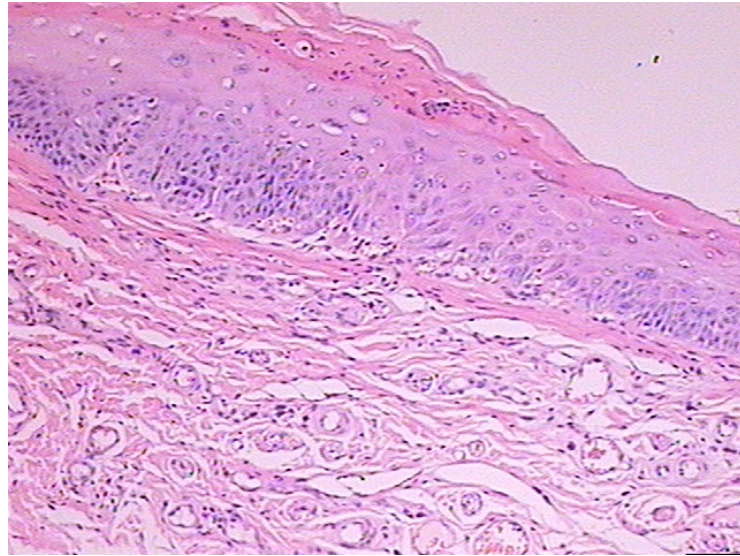
**Figura 18 - G8 benzidamina (aumento original de 400x)**



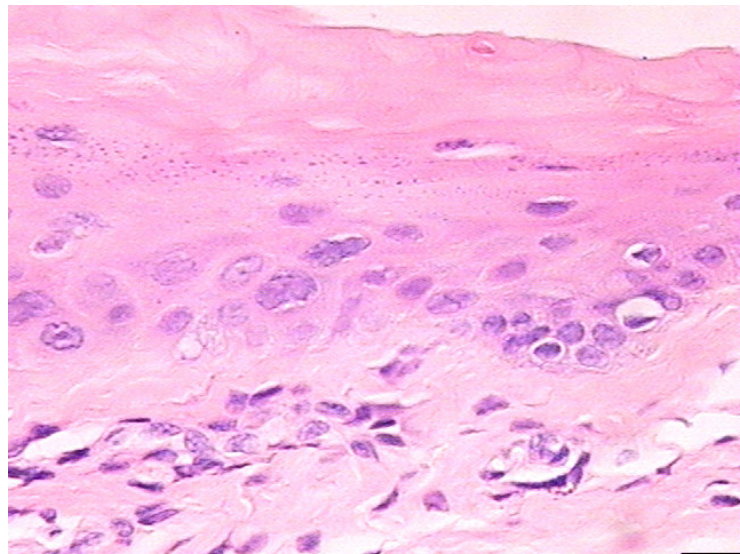
**Figura 19 - G8 benzidamina – úlcera (aumento original de 100x)**



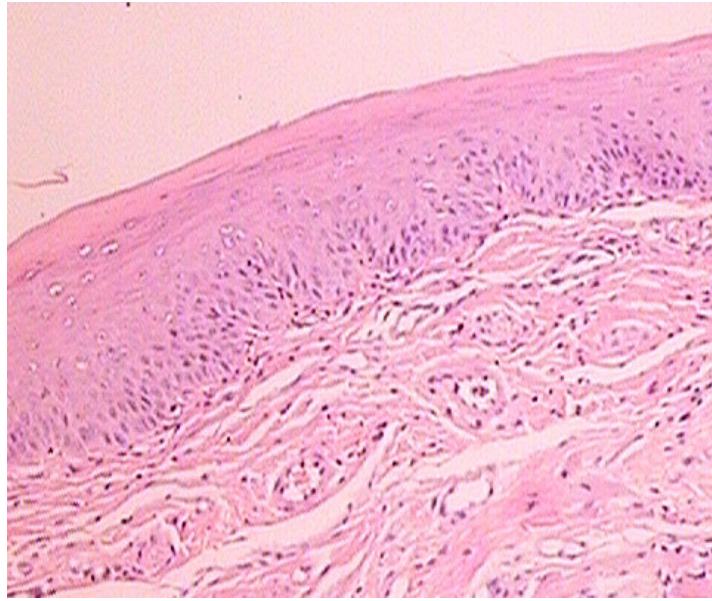
**Figura 20 - G8 benzidamina – úlcera (aumento original de 400x)**



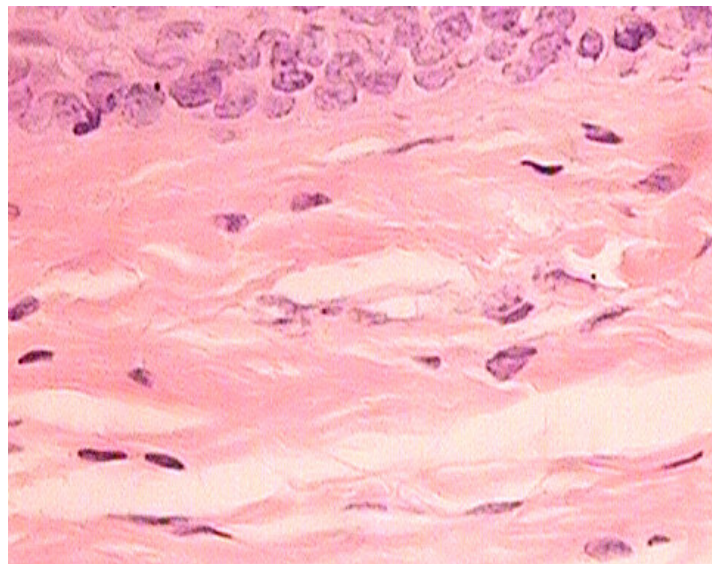
**Figura 21 - G8 *laser* (aumento original de 100x)**



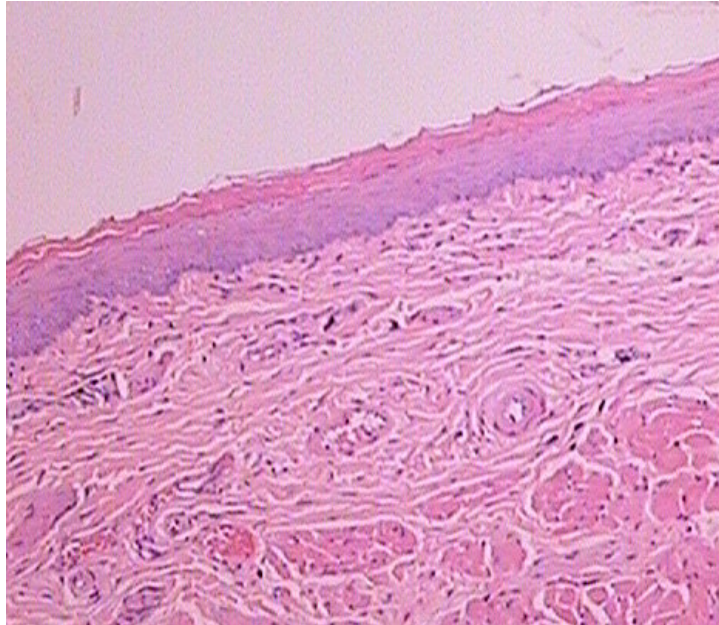
**Figura 22 - G8 *laser* (aumento original de 400x)**



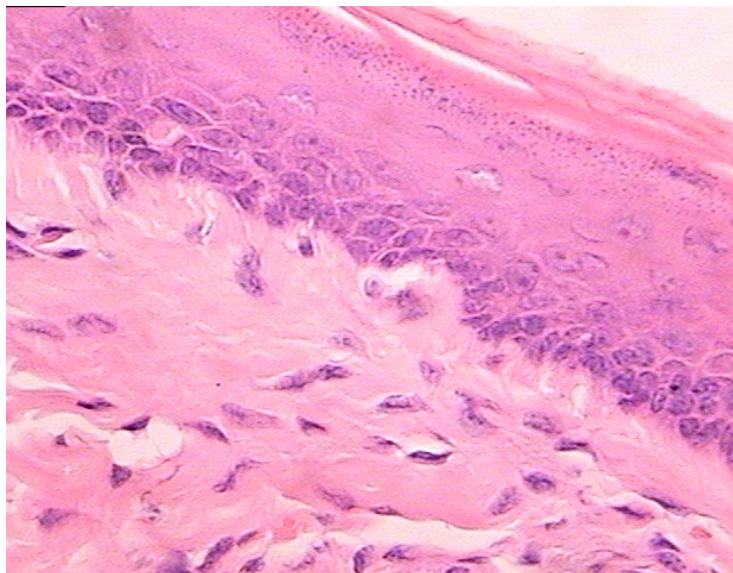
**Figura 23 - G10 benzidamina (aumento original de 100x)**



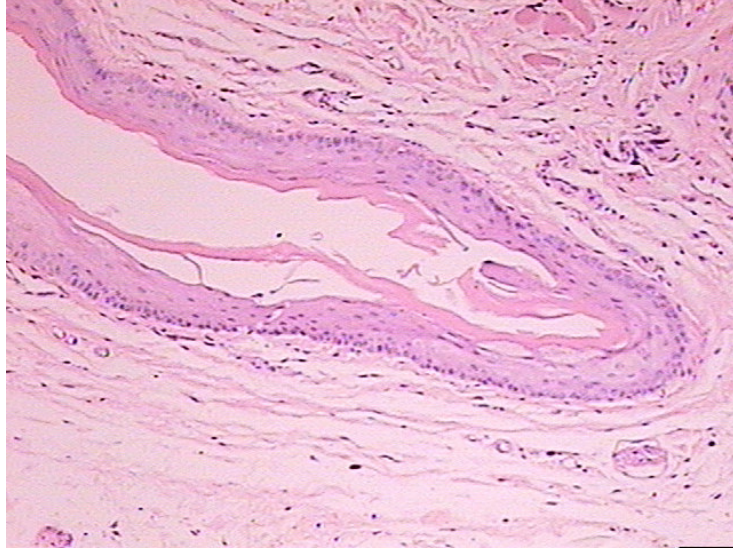
**Figura 24 - G10 benzidamina (aumento original de 400x)**



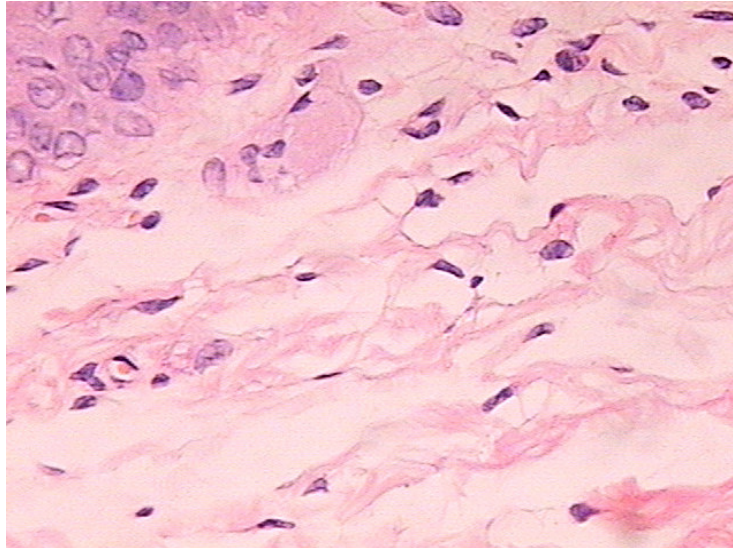
**Figura 25 - G10 *laser* (aumento original de 100x)**



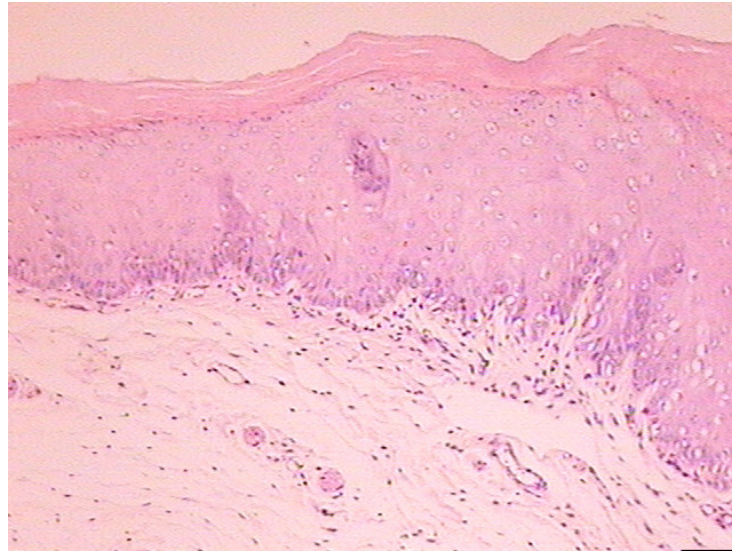
**Figura 26 - G10 *laser* (aumento original de 400x)**



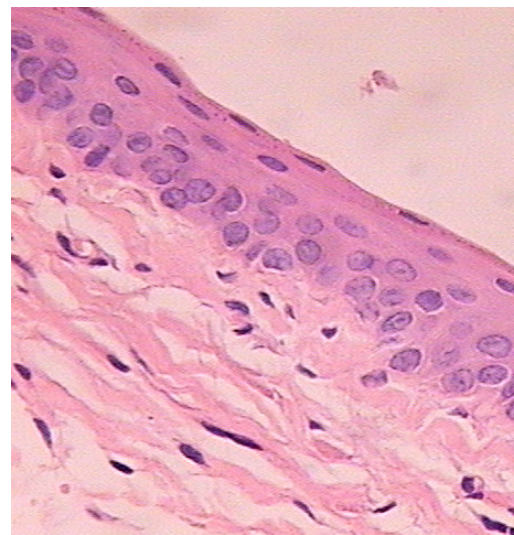
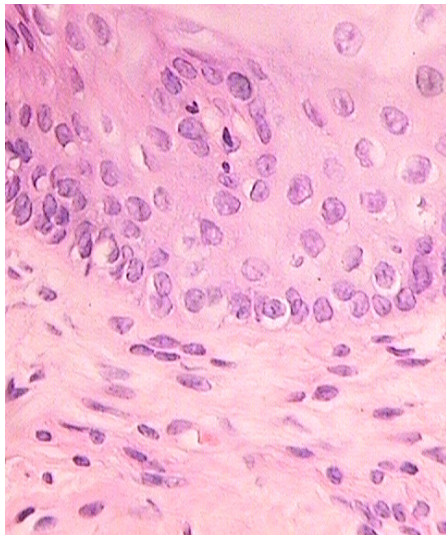
**Figura 27 - G15 benzidamina (aumento original de 100x)**



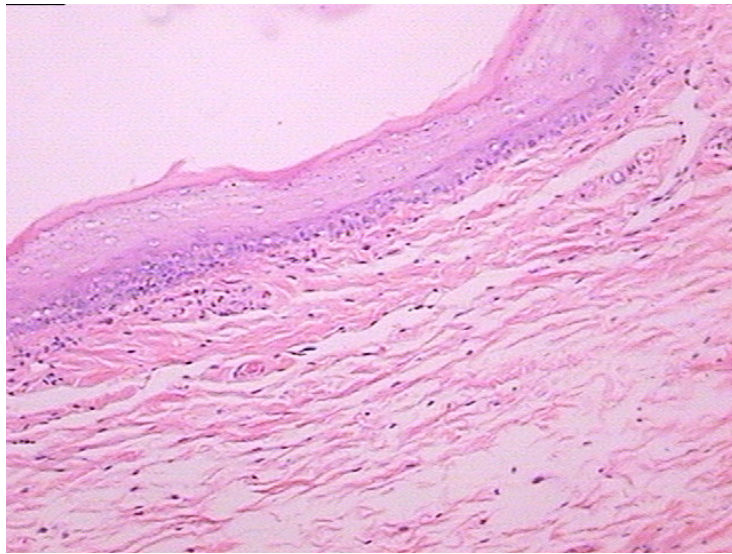
**Figura 28 - G15 benzidamina (aumento original de 400x)**



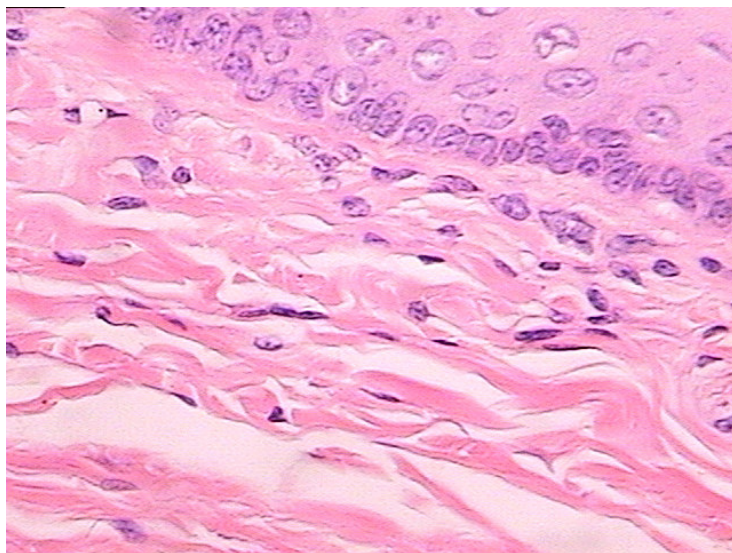
**Figura 29 - G15 *laser* (aumento original de 100x)**



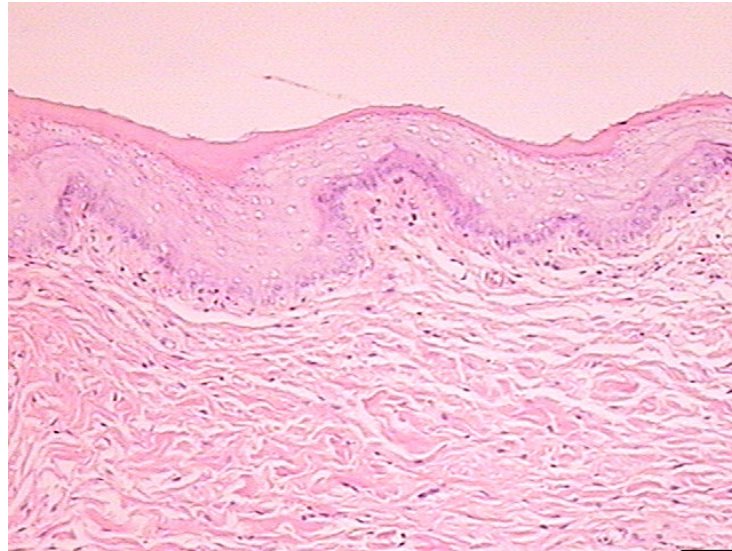
**Figura 30 - G15 *laser* (aumento original de 400x)**



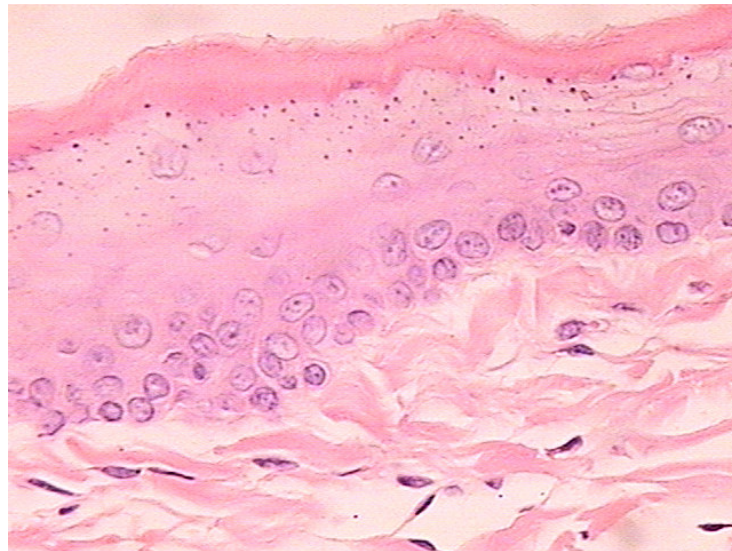
**Figura 31 - G18 benzidamina (aumento original de 100x)**



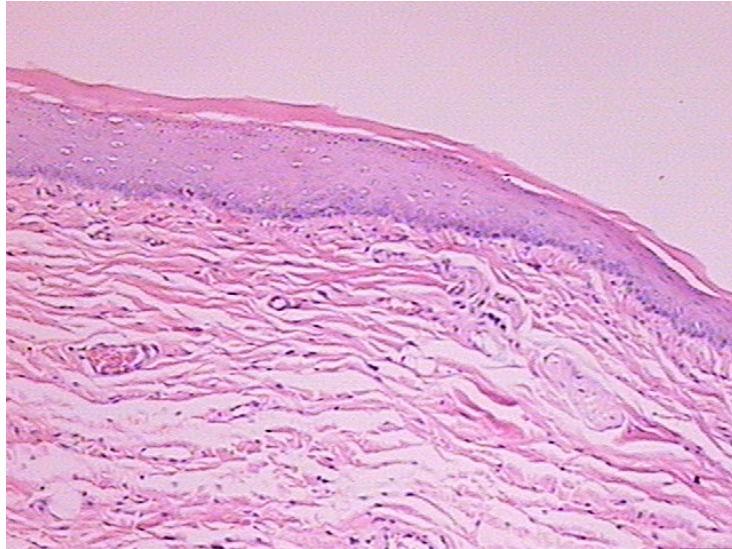
**Figura 32 - G18 benzidamina (aumento original de 400x)**



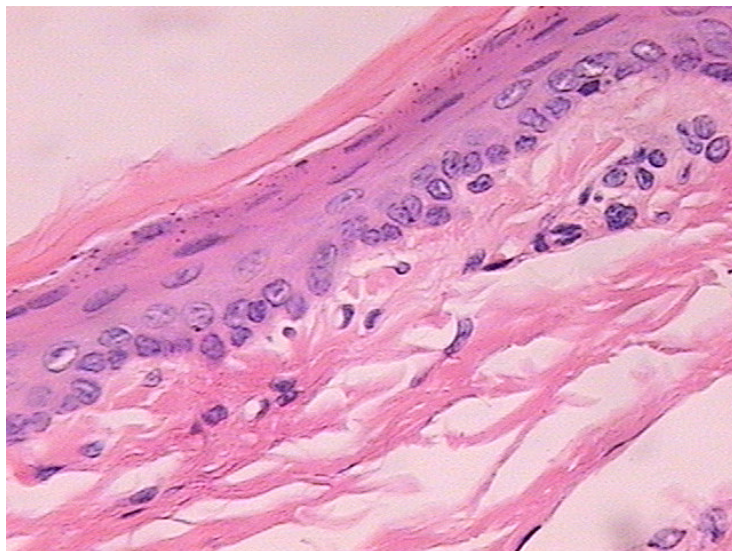
**Figura 33 - G18 *laser* (aumento original de 100x)**



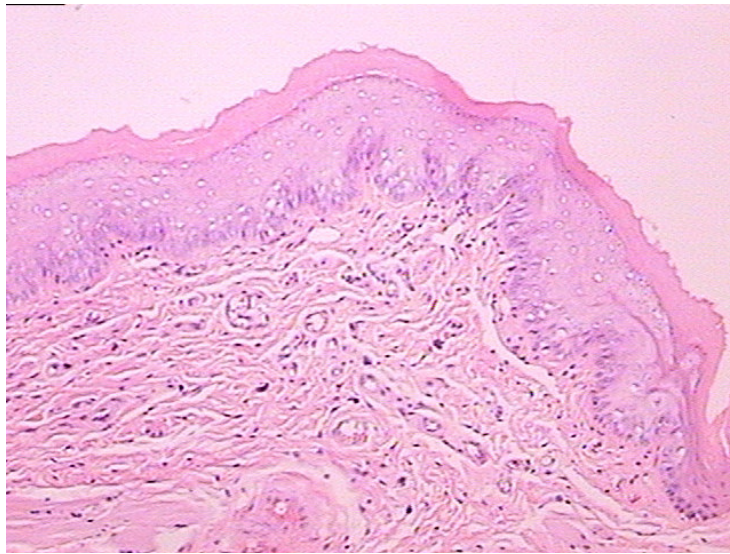
**Figura 34 - G18 *laser* (aumento original de 400x)**



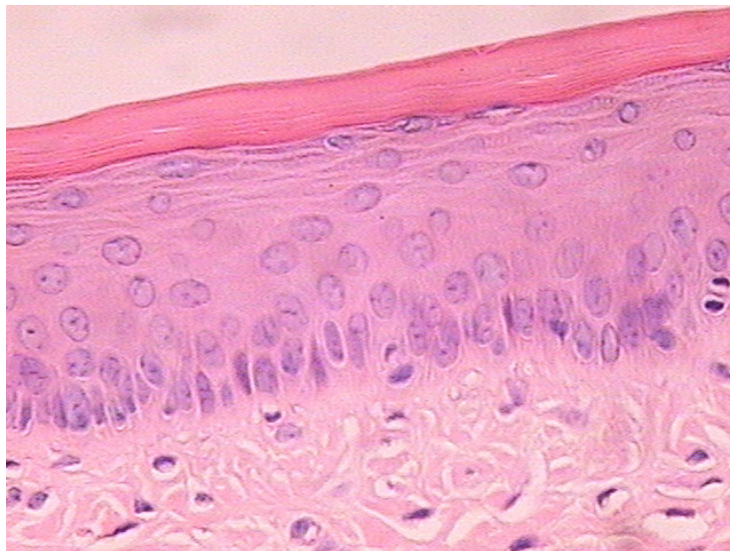
**Figura 35 - G20 benzidamina (aumento original de 100x)**



**Figura 36 - G20 benzidamina (aumento original de 400x)**



**Figura 37 - G20 *laser* (aumento original de 100x)**



**Figura 38 - G20 *laser* (aumento original de 400x)**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CERNEA, C.R.; HOJAIJ, F.C. Fatores Prognósticos IN. **Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos**. Parise, O. Jr. p.101-106, 1.ed. Sarvier, 2000. Brasil.
2. MARQUES, R.J. Estratégia Terapêutica Multidisciplinar IN. **Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos**. Parise, O. Jr. p.117-119, 1.ed. Sarvier, 2000. Brasil.
3. ABREU, C.E.V.; SILVA, J.L.F. Teleterapia IN. **Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos**. Parise, O. Jr. p.153-159, 1.ed. Sarvier, 2000. Brasil.
4. PARULEKAR, W.; MACKENZIE, R.; BJARNASON, G.; JORDAN, R.C.K. Scoring oral mucositis. **Oral Oncology**. v.34, p.63-74, 1998.
5. LOURY, D.J.; EMBREE, J.R.; STEINBERG, D.A.; SONIS, S.T.; FIDDES, J.C. 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**. v.87(5), p.544-551, 1999.
6. SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology**. v.34, p.39-43, 1998.
7. SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. v.4, p.277-284, 2004.
8. SONIS, S.T. et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncology**. v.36, p.373-381, 2000.
9. TROTTI, A. et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother Oncol**. v.66, p.253-262, 2003.
10. SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D. et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**. v.100, suppl 9, p.1995-2025, 2004.

11. PETERSON, D.E.; CARIELLO, A. Mucosal damage: a major risk factor for severe complications after cytotoxic therapy. **Seminars in Oncology**. v.31(3), suppl 8, p.35-44, 2004.
12. DUNCAN, M.; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**. v.18(9), p.853-874, 2003.
13. PLEVOVÁ, P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. **Oral Oncology**. v.35, p.453-470, 1999.
14. CASSATT, D.R.; FAZENBAKER, C.A.; KIFLE, G.; BACHY, C.M. Subcutaneous administration of amifostine (Ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. **Int J Rad Oncol Biol Phys**. v.57(3), p.794-802, 2003.
15. CHAUNCEY, T.R.; GOOLEY, T.A.; LLOYD, M.E.; SCHUBERT, M.M.; LILLEBY, K.; HOLMBERG, L.; BENSINGER, W.I. Pilot trial of cytoprotection with amifostine given with high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Am J Clin Oncol**. v.23(4), p.406-411, 2000.
16. CARTER, D.; HEBERT, M.E.; SMINK, K.; LEOPOLD, K.A.; CLOUGH, R.L.; BRIZEL, D.M. Double blind randomized trial of sucralfate vs placebo during radical radiotherapy for head and neck cancers. **Head & Neck**. v.21(8), p.760-766, 1999.
17. DORR, W.; SPEKL, K.; FARRELL, C.L. Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. **Int J Rad Oncol Biol Phys**. v.54(1), p.245-251, 2002.
18. DORR, W.; SPEKL, K.; FARRELL, C.L. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. **Cell Prolif**. v.35 (suppl 1), p.86-92, 2002.
19. NING, S.; SHUI, C.; KHAN, W.B.; BENSON, W.B.; LACEY, D.L.; KNOX, S.J. Effects of keratinocyte growth factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. **Int J Rad Oncol Biol Phys**. v.40(1), p.177-187, 1998.
20. WADLEIGH, R.G.; REDMAN, R.S.; GRAHAM, R.N.; KRASNOW, S.H.; ANDERSON, A.; COHEN, M.H. Vitamin E in the treatment of chemotherapy-induced mucositis. **Am J Med**. v.92, p.481-484, 1992.

21. JEBB, S.A.; OSBORNE, R.J.; MAUGHAN, T.S.; MOHIDEEN, N.; MACK, P.; MORT, D.; SHELLEY, M.D.; ELIA, M. 5-Fluorouracil and folinic acid-induced mucositis: no effect of oral glutamine supplementation. **Br J Cancer**. v.70, p.732-735, 1994.
22. SYMONDS, R.P.; McILROY, P.; KHORRAMI, J.; PYPER, E.; ALCOCK, S.R.; McCALLUM, I.; SPEEKENBRINK, A.B.J.; McMURRAY, A.; LINDEMANN, E.; THOMAS, M. The reduction of radiation mucositis by selective decontamination antibiotic pastilles: a placebo-controlled double-blind trial. **Br J Cancer**. v.74, p.312-317, 1996.
23. FOOTE, R.L.; LOPRINZI, C.L.; FRANK, A.R.; O'FALLON, J.R.; GULAVITA, S.; TEWFIK, H.H.; RYAN, M.A.; EARLE, J.M.; NOVOTNY, P. Randomized trial of a chlorhexidine mouthwash for alleviation of radiation-induced mucositis. **J Clin Oncology**. v.12(12), p.2630-2633, 1994
24. SPIJKERVET, F.K.L.; vanSAENE, H.K.F.; PANDERS, A.K.; VERMEY, A.; van SAENE, J.J.M.; MEHTA, D.M.; FIDLER, V. Effect of chlorexidine rinsing on the oropharyngeal ecology in patients with head and neck cancer who have irradiation mucositis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v.67(1-3), p.154-161, 1989.
25. DONNELLY, J.P.; BELLM, L.A.; EPSTEIN, J.B., SONIS, S.T.; SYMONDS, R.P. Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis. **Lancet Infect Diseases**. v.3(7), p.405-412, 2003.
26. SPIJKERVET, F.K.L.; vanSAENE, H.K.F.; vanSAENE, J.J.M.; PANDERS, A.K.; VERMEY, A.; MEHTA, D.M. Mucositis prevention by selective elimination of oral flora in irradiated head and neck cancer patients. **J Oral Pathol Med**. v.19(6-10), p.486-489, 1990.
27. EPSTEIN, J.B.; EMERTON, S.; LE, N.D.; STEVENSON-MOORE, P. A double-blind crossover trial of Oral Balance gel and Biotene<sup>®</sup> toothpaste versus placebo in patients with xerostomia following radiation therapy. **Oral Oncol**. v.35(2), p.132-137, 1999.
28. EPSTEIN, J.B.; SILVERMAN, S.Jr; PAGGIARINO, D.A.; CROCKETT, S.; SHUBERT, M.M.; SENZER, N.N.; OCKHART, P.B.; GALLAGHER, M.J.; PETERSON, D.E.; LEVEQUE, F.G. Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis. **Cancer**. v.92(4), p.875-885, 2001.

29. SIRONI, M.; POZZI, P.; POLENTARUTTI, N.; BENIGNI, F.; COLETTA, I.; GUGLIELMOTTI, A.; MILANESE, C.; GHEZZI, P.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. Inhibition of inflammatory cytokine production and protection against endotoxin toxicity by benzydamine. **Cytokine**. v.8(9), p.710-716, 1996.
30. SIRONI, M.; MILANESE, C.; VECCHI, A.; POLENZANI, L.; GUGLIELMOTTI, A.; COLETTA, I.; LANDOLFI, C.; SOLDI, L.; MANTOVANI, A.; PINZA, M. Benzydamine inhibits the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemotactic protein-1 by *Candida albicans*-stimulated human peripheral blood cells. **Int J Clin Lab Res**. v.27, p.118-122, 1997.
31. GREENBERGER, J.S.; EPPERLY, M.W.; GRETTON, J.; JEFFERSON, M.; NIE, S.; BERNARDING, M.; KAGAN, V.; GUO, H.L. Radioprotective gene therapy. **Cur Gene Ther**. v.3, p.183-195, 2003.
32. BARASH, A.; PETERSON, D.E.; TANZER, D.E.; D'AMBROSIO, J.A.; NUKI, K.; SCHUBERT, M.M.; FRANQUIN, J.C.; CLIVE, J.; TUTSCHAKA, P. Helion-Neon *laser* effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **Cancer**. v.76(12), p.2550-2556, 1995.
33. SANDOVAL, R.L.; KOGA, D.H.; BULOTO, L.S.; SUZUKI, R.; DIB, L.L. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy *laser*: initial results of A. C. Camargo Hospital. **J Appl Oral Sci**. v.11(4), p.337-341, 2003.
34. BENSADOUN, R.J.; FRANQUIN, J.C.; CIAIS, G.; DARICOURT, V.; SCHUBERT, M.M.; VIOT, M.; DEJOU, J.; TARDIEU, C.; BENEZERY, K.; NGUYEN, T.D.; LAUDOYER, Y.; DASSONVILLE, O.; POISSONNET, G.; VALLICIONI, J.; THYSS, A.; HAMDY, M.; CHAUVEL, P.; DEMARD, F. 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**. v.7(4), p.244-252, 1999.
35. EDUARDO, F.P. **Efeitos na radiação *laser* em baixa intensidade de 650 nm e 780 nm na prevenção de mucosite oral em pacientes submetidos a transplante de medula óssea**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Autarquia Associada à Universidade de São Paulo). São Paulo, 2003.

36. MIGLIORATI, C.; MASSUMOTO, C.; EDUARDO, F.P; MULLER, K.P.; CARRIERI, T.; HAYPEK, P.; EDUARDO, C.P. Low-energy *laser* therapy in oral mucositis. **J Oral Laser Applic.** v.1(2), p.97-101, 2001.
37. KARU, T. Molecular Mechanism of the therapeutic effect of low-intensity *laser* radiation. **Lasers Life Sci.** v.2(1), p.53-74, 1988.
38. KARU, T. Photobiology of low-power *laser* effects. **Health Phys.** v.56(5), p.691-704, 1989.
39. KARU, T. Low-Power *laser* therapy IN. **Biomedical Photonics Handbook.**
40. MUNRO, A. Principles of radiotherapy and chemotherapy. IN. **Management of Oral Cancer.** Stafford, N.; Waldron, J. p.40-68. Oxford, NY. Oxford University, 1989.
41. SUNTHARALINGAM, M. Principles and complications of radiation therapy. IN. **Oral Cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation and prevention.** Ord, R.A; Blanchaert R.H. p.111-122. Chicago, IL. Quintessence, 2000.
42. PARSONS, J.T. Time-dose-volume relations in radiation therapy. IN. **Management of Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach.** Million, R.R.; Cassisi, N.J. p. 203-243. Philadelphia. J.B. Lippincott Company, 1994.
43. GALANTE, M.; PHILLIPS, T.L.; SILVERBERG, I.J.; CARTER, S.K.; CADMAN, E.C. Treatment. IN. **Oral Cancer.** Silverman, Jr.S. 2 ed. New York. American Cancer Society, 1985.
44. SONIS, S.T.; O'DONNELL, K.E.; POPAT, R.; BRAGDON, C.; PHELAN, S.; COCKS, D.; EPSTEIN, J.B. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral Oncology.** v.40(2), p.170-176, 2004.
45. WARDLEY, A.M.; BOOTH, D.; ROBERTS, S.A.; SCARFFE, J.H.; POTTEN, C.S. A quantitative histometric murine in vivo model of radiation-induced oral mucositis. **Arch Oral Biol.** v.43, p.567-577, 1998.
46. PABST, S.; SPEKL, K.; DÖÖR, W. Changes in the effect of dose fractionation during daily fractionated irradiation: studies in mouse oral mucosa. **Int J Radiation Oncology Biol Phys.** v.58(2), p. 485-492, 2003.

47. DÖRR, W.; BRANKOVIC, K.; HARTMANN, B. Repopulation in mouse oral mucosa: changes in the effect of dose fractionation. **Int J Radiat Biol.** v 76(3), p. 383-390, 2000.
48. DÖRR, W.; SPEKL, K.; MARTIN, M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. **Cell Prolif.** v.35(Suppl 1), p.60-67, 2002.
49. ALVAREZ, E.; FEY, E.G.; VALAX, P.; YIM, Z.; PETERSON, J.D.; MESRI, M.; JEFFERS, M.; DINDINGER, M M.; TWOMLOW, N.; GHATPANDE, A.; LAROCHELLE, W.J.; SONIS, S.T.; LICHENSTEIN, H.S. Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis. **Clin Cancer Res.** v.9, p. 3454-3461, 2003.
50. KIM, J.H.; LAKSHMI, V. Benzydamine HCl, a new agent for the treatment of radiation mucositis of the oropharynx. **Am J Clin Oncol.** v.9(2), p. 132-134, 1986.
51. SAMARANAYAKE, L.P.; ROBERTSON, A.G.; MacFARLANE, T.W.; HUNTER, I.P.; MacFARLANE, G.; SOUTAR, D.S.; FERGUSON, M.M. The effect of chlorhexidine and benzydamine mouthwashes on mucositis induced by therapeutic irradiation. **Clin Radiol.** v.39, p.291-294, 1988.
52. GENOT, M.T.; KLASTERSKY, J. Low-level *laser* for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. **Curr Opin Oncol.** v.17, p.236-240, 2005.
53. BATISTA, A.C.; RODINI, C.O.; LARA, V.S. Quantification of mast cell in different stages of human periodontal disease. **Oral Diseases.** v.11, p.249-254, 2005.
54. NAKAE, S.; SUTO, H.; KAKURAI, M.; SEDGWICK, J.D.; TSAI, M.; GALLI, S.J. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. **PNAS.** v.102(18), p.6467-6472, 2005.
55. WALSH, L.J.; DAVIS, M.F.; XU, L.J.; SAVAGE, N.W. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Med.** v.24, p.266-272, 1995.
56. MALE, D. Migração celular e inflamação. IN. **Imunologia.** Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. 6 ed. Manole, 2003.
57. PINHEIRO, A.L.B.; BROWNE, R.M.; FRAME, J.W.; MATTHEWS, J.B. Mast cells in *laser* and surgical wounds. **Bras Dent J.** v.6(1), p.11-15, 1995.

58. SILVEIRA, L.B. Verificação do comportamento de mastócitos na parede não mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação *laser* de baixa intensidade. **Dissertação de Mestrado - MPLO**. São Paulo, 2001.