

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

LUIZ EVARISTO RICCI VOLPATO

Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do Light-Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico

BAURU

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ EVARISTO RICCI VOLPATO

Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do Light-Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

BAURU

2009

V888a Volpato, Luiz Evaristo Ricci

Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do Light-Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico / Luiz Evaristo Ricci Volpato. – Bauru, 2009.
138 p. : Il. ; 30cm.

Tese. (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UNIC: Projeto de pesquisa aprovado
Protocolo: 0307/179
Data: 29/02/2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIZ EVARISTO RICCI VOLPATO

Dados Curriculares

| | |
|--------------|---|
| Nascimento | 20 de janeiro de 1976 |
| Naturalidade | Cuiabá – MT |
| Filiação | Luiz Volpato Neto Luiza Rios Ricci Volpato |
| 1993 – 1997 | Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Cuiabá/UNIC – Cuiabá – MT |
| 1998 – 1999 | Curso de Especialização em Saúde Pública pela Universidade Federal de Mato Grosso/UFMT – Cuiabá – MT |
| 1998 – 2000 | Curso de Especialização em Odontopediatria pela Universidade de Cuiabá/UNIC – Cuiabá – MT |
| 2001 – 2003 | Curso de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, nível de Mestrado, Área de Saúde e Sociedade, pela Universidade Federal de Mato Grosso/UFMT – Cuiabá – MT |
| 2005 – 2009 | Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Doutorado, Área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – Bauru – SP |

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz e Luiza,

À Maria Carmen,

Às minhas filhas, Maria Luiza e Maria Julia

AGRADECIMENTOS

Este documento representa um período de grande crescimento acadêmico e pessoal em minha vida. Sou grato a todos os que participaram direta ou indiretamente da minha trajetória na Faculdade de Odontologia de Bauru, e da realização desta pesquisa, dentre os quais destaco:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado; mais do que mestra, foi uma amiga verdadeira nestes anos. Seu dinamismo e motivação são contagiantes e cada momento partilhado foi uma lição aprendida.

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira; sua disponibilidade e humildade são qualidades raras de serem encontradas. Esta pesquisa jamais seria realizada sem sua preciosa colaboração.

Prof. Air de Carvalho; obrigado por acreditar em mim e por possibilitar a minha qualificação profissional nesses anos em que estive à frente da Faculdade de Odontologia de Cuiabá.

Ana Thereza, Cintia, Maísa e Fernanda; esta é uma conquista da Odontopediatria da UNIC e de Mato Grosso. Vamos crescer todos juntos. Agradeço por sua confiança em mim.

Kátia, Álvaro, Gilberto e Fernando; as crianças com necessidades especiais estão contempladas neste trabalho. Obrigado por seu companheirismo.

Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso e Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá; agradeço por participarem da viabilização de minha qualificação profissional.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso; agradeço pelo apoio financeiro sem o qual esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

Flávia, Adriana e Camila; seu interesse em aprender e sua vontade de ajudar foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e equipe do CePOF/IFSC/USP; pessoas de grande dinamismo e visão. Obrigado pela orientação e disponibilização do equipamento utilizado neste trabalho.

Prof. Dr. Mariano Martinez Espinosa; sua valiosa contribuição veio no exato momento.

Juliano, Maria Cecília e Andrea; conhecer vocês e poder partilhar de sua amizade sincera foi um dos pontos altos nesses anos de doutorado.

Thiago, Thais, Vivien, Marcelo, Heitor, Adriano, Tiza, Marina, Dafna, Vivi, Ana Paula, Daniela, Dáphine, Simone, Luciana Silva, Luciana Biral, Josilene, Ana Dolores, Isabel, Vanessa, Mariana, Fátima, Lilian, Estela, Márcia, Dona Lia e Cybelle; amigos e colegas dos tempos de Bauru. Espero não perder contato com vocês!

Prof. Ruy, Prof. José Eduardo, Profa. Salete, Prof. Aymar; cada conversa foi um aprendizado. Minha sincera admiração.

Dra. Suely e equipe do Setor de Quimioterapia Infantil e do Departamento de Odontologia do Hospital do Câncer de Mato Grosso. Admiro sua responsabilidade e agradeço pela confiança no meu trabalho.

Danielli, Diurianne e Vivian e equipe do CEOPE, obrigado pelo suporte na condução desta pesquisa.

Pai, Mãe, Mauricio, Constança, Mauricio Jr., Carla, Mauricinho, Maria Paula, Fernando, Cristina, Rosana, Paulo Henrique, Karina, Luzia, João, Guilherme e Frederico; obrigado por estarem sempre presentes nos momentos em que eu precisei estar ausente.

Aelson, Alisson Mateus, Andressa, Beluce Bianca, Bruno, Caroline, Cleiton Renato, Erik Henrique, Giovani, Henrick Cesar, Jean, Jenifer, Jéssica, Kaique Aurélio, Kesia Karen, Lucas, Maria Vanessa, Maria Vitória, Marisa, Mateus Alexandre, Pedro Henrique de Souza, Pedro Henrique Rodrigues, Renata, Sabrina, Simone, Taissa, Thariane Munique, Vitor Douglas, Waleska e Walquiria; agradeço a vocês e a seus familiares pela confiança em mim depositada.

“E há que se cuidar do broto
Pra que a vida nos dê flor e fruto”

Coração de estudante
Wagner Tiso e Milton Nascimento

RESUMO

Avaliou-se o uso do laser de baixa intensidade e do Light-Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico. Para tanto, o estudo foi executado em dois períodos experimentais distintos. No primeiro período, foi realizada a análise da viabilidade de fibroblastos Balb/c 3T3 cultivados sob déficit nutricional irradiados com laser vermelho (660nm, 40mW), laser infravermelho (780nm, 50mW) e LED vermelho (637 ± 15 nm, 40mW) por 4 e 8 segundos através dos ensaios de redução do MTT e captação do vermelho neutro. No segundo período experimental realizou-se ensaio clínico randomizado duplo-cego para avaliar a eficácia do laser vermelho (660nm, 40mW) e do LED vermelho (637 ± 15 nm, 40mW) na redução da incidência e da severidade da mucosite bucal e da dor relacionada em crianças portadoras de câncer submetidas a quimioterapia utilizando-se o sistema de graduação da mucosite bucal da Organização Mundial de Saúde e a Escala de Dor de Faces Revisada associada à escala analógica visual. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de variância do modelo linear geral com nível de significância de 5% ($p = 0,05$). Observou-se com a redução do MTT uma tendência de aumento da proliferação celular relacionado diretamente com o tempo de irradiação, no entanto, não significativo estatisticamente. Após 72 horas, os grupos que apresentaram maior proliferação celular foram: grupo irradiado com laser infravermelho, grupo irradiado com LED, grupo irradiado com laser vermelho, grupo controle positivo e grupo controle negativo. Já através da captação do vermelho neutro, após 72 horas o grupo que apresentou maior proliferação celular foi o grupo controle positivo (cultivado sob condições nutricionais ideais) seguido pelo grupo irradiado com laser infravermelho, grupo controle negativo e grupos irradiados com LED e laser vermelho. Através da análise dos resultados obtidos e considerando os parâmetros e protocolo de fototerapia utilizados, pode-se concluir que a fototerapia com laser de baixa intensidade e diodo emissor de luz (LED) não apresentaram toxicidade em nível celular, vindo mesmo a estimular a proliferação dos fibroblastos cultivados sob déficit nutricional, sobretudo no grupo irradiado com o laser infravermelho (780nm, 50mW). A incidência e a severidade da mucosite bucal, assim como a dor associada, foram

muito baixas nos grupos irradiados com laser vermelho (660nm, 40mW) e LED (637 \pm 15nm, 40mW). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos; A coerência da luz não interferiu no resultado da fototerapia *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Terapia a laser de baixa intensidade. Mucosite. Estomatite. Fototerapia. Quimioterapia. In vitro.

ABSTRACT

Evaluation of the use of low-intensity laser and Light-Emitting Diode (LED) on the behavior of fibroblasts and in reducing the incidence of oral mucositis in children under chemotherapy

The use of low-intensity laser and Light-Emitting Diode (LED) on the behavior of fibroblasts and in reducing the incidence of oral mucositis in children under chemotherapy were evaluated. The study was performed in two separate experiments. In the first moment, the viability of fibroblasts Balb/c 3T3 cultured under nutritional stress irradiated with red laser (660nm, 40mW), infrared laser (780nm, 50mW) and red LED (637 ± 15nm, 40mW) for 4 and 8 seconds was analyzed through the MTT and neutral red assays. The second experiment carried out was a double-blind randomized clinical trial aiming to assess the effectiveness of red laser (660nm, 40mW) and red LED (637 ± 15nm, 40mW) in reducing the incidence and severity of oral mucositis and related pain in children with cancer undergoing chemotherapy using the World Health Organization oral mucositis grading system and the Faces Pain Scale - Revised associated with a visual analogue scale. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis nonparametric test and ANOVA with a significance level of 5% ($p = 0.05$). It was observed with the MTT assay a trend of cell proliferation increase directly related to the irradiation time, however, not statistically significant. After 72 hours, the groups that showed higher cell proliferation were: infrared laser irradiated group, LED irradiated group, red laser irradiated group, positive control group and negative control group. By the neutral red assay, though, after 72 hours the group that showed higher cell proliferation was the positive control (grown under ideal nutritional conditions) followed by the group irradiated with infrared laser, the negative control group and groups irradiated with red laser and LED. By analyzing the results and considering the used parameters and phototherapy protocol, it is plausible to conclude that phototherapy with low-intensity laser and light emitting diode (LED) showed no toxicity at cellular level, even stimulating the proliferation of fibroblasts cultured under nutritional stress, especially in the group irradiated with infrared laser (780nm, 50mW). The incidence and severity of oral mucositis and associated pain, were very low in the groups irradiated with red

Abstract

laser (660nm, 40mW) and LED (637 ± 15 nm, 40mW). There was no statistically significant difference between these groups, the coherence of light did not affect the outcome of phototherapy in vitro and in vivo.

Keywords: Low-Level Laser Therapy. Mucositis, Stomatitis. Phototherapy. Drug therapy. In vitro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 - | Distribuição da energia do Laser e LED por banda espectral..... | 55 |
| Figura 2 - | Células Balb/c 3T3, na quinta passagem, utilizadas na análise da viabilidade celular (fotografia em microscópio de fase invertida DM IRBE / LEICA com aumento de 20x)..... | 65 |
| Figura 3 - | Aparelho de laser de baixa intensidade Twinflex II (MMOptics Ltda – São Carlos, SP) utilizado no estudo..... | 68 |
| Figura 4 - | Aparelho de LED (protótipo CePOF/IFSC/USP – São Carlos, SP) utilizado no estudo..... | 69 |
| Figura 5 - | Manipulação das culturas celulares em capela de fluxo laminar e disposição das placas de 96 poços e garrafas na estufa de CO ₂ | 69 |
| Figura 6 - | Distribuição esquemática dos grupos de estudo na placa de 96 poços..... | 71 |
| Figura 7 - | Máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios individuais que era adaptada à placa de cultura no momento da irradiação..... | 72 |
| Figura 8 - | Fototerapia com o dispositivo de laser com a máscara ajustada à placa de cultura..... | 72 |
| Figura 9 - | Fototerapia com o dispositivo de LED com a máscara ajustada à placa de cultura..... | 72 |
| Figura 10 - | Leitor de fluorescência (Fluostar Óptima – BMG LABTECH)..... | 74 |
| Figura 11 - | Fototerapia utilizando aparelho de LED realizada no próprio leito do voluntário internado, evidenciando os cuidados com a biossegurança..... | 78 |
| Figura 12 - | Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT por grupo de intervenção..... | 84 |
| Figura 13 - | Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT segundo o tempo de exposição às diferentes fontes de luz... | 84 |
| Figura 14 - | Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT de acordo com os períodos experimentais..... | 85 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 - Médias obtidas pela redução do MTT por período experimental e por grupo de intervenção..... | 87 |
| Figura 16 - Interação entre as médias obtidas pela redução do MTT por grupo de intervenção e pelos períodos experimentais (24 e 72 horas)..... | 87 |
| Figura 17 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) por grupo de intervenção..... | 89 |
| Figura 18 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) segundo o tempo de exposição às diferentes fontes de luz..... | 90 |
| Figura 19 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) de acordo com os períodos experimentais... | 91 |
| Figura 20 - Médias obtidas pela captação do vermelho neutro por grupo de intervenção e por período experimental..... | 92 |
| Figura 21 - Interação entre as médias obtidas pela captação do vermelho neutro por grupo de intervenção e pelos períodos experimentais (24, 48 e 72 horas)..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

- TABELAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Variáveis que influenciam na incidência da mucosite bucal induzida pelo tratamento antineoplásico..... | 43 |
| Tabela 2 - | Componentes do meio Dulbecco's MEM..... | 66 |
| Tabela 3 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por grupo (n = 142)..... | 83 |
| Tabela 4 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por tempo de exposição (n = 142)..... | 85 |
| Tabela 5 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por período experimental (n = 142)..... | 85 |
| Tabela 6 - | Tabela de análises da variância do modelo linear da redução do MTT por período experimental e por grupo de intervenção..... | 86 |
| Tabela 7 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por grupo (n = 205)..... | 88 |
| Tabela 8 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por tempo de exposição (n = 205)..... | 89 |
| Tabela 9 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por período experimental (n = 200)..... | 90 |
| Tabela 10 - | Tabela de análises da variância do modelo linear da captação do vermelho neutro (VN) por período experimental e por grupo de intervenção..... | 91 |
| Tabela 11 - | Número de pacientes, média e desvio-padrão das idades, por grupo (n = 30)..... | 93 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabela 12 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em lábio inferior, por grupo (n = 103)..... | 94 |
| Tabela 13 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em lábio superior, por grupo (n = 103)..... | 94 |
| Tabela 14 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa labial superior, por grupo (n = 103)..... | 95 |
| Tabela 15 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa labial inferior, por grupo (n = 103)..... | 95 |
| Tabela 16 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa jugal direita, por grupo (n = 103)..... | 95 |
| Tabela 17 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa jugal esquerda, por grupo (n = 103)..... | 95 |
| Tabela 18 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica no dorso de língua, por grupo (n = 103)..... | 96 |
| Tabela 19 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica na borda lateral de língua, por grupo (n = 103)..... | 96 |
| Tabela 20 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em ventre de língua, por grupo (n = 103)..... | 96 |
| Tabela 21 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em palato duro, por grupo (n = 103)..... | 96 |
| Tabela 22 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em palato mole, por grupo (n = 103)..... | 97 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela 23 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em gengiva, por grupo (n = 103)..... | 97 |
| Tabela 24 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor bucal presente antes da fototerapia nos pacientes, por grupo (n = 103)..... | 97 |
| Tabela 25 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor bucal presente após a fototerapia nos pacientes, por grupo (n = 103)..... | 98 |
| Tabela 26 - | Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor, antes e após a fototerapia (n = 103)..... | 98 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 35 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 39 |
| 2.1 | MUCOSITE BUCAL | 41 |
| 2.1.1 | Definição e características clínicas | 41 |
| 2.1.2 | Incidência | 43 |
| 2.1.3 | Etiologia | 44 |
| 2.1.4 | Patofisiologia | 45 |
| 2.1.5 | Morbidade associada à mucosite | 47 |
| 2.1.6 | Prevenção e tratamento | 48 |
| 2.2 | LASER | 49 |
| 2.2.1 | Interação entre o laser e os tecidos | 50 |
| 2.2.2 | A laserterapia na prevenção e tratamento da mucosite bucal | 51 |
| 2.3 | DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS) | 54 |
| 2.3.1 | Uso de dispositivos de LED na prevenção e tratamento da mucosite bucal | 56 |
| 3 | PROPOSIÇÃO | 59 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 4.1 | ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR | 65 |
| 4.1.1 | Redução do MTT | 73 |
| 4.1.2 | Captação do vermelho neutro (VN) | 73 |
| 4.1.3 | Análise Estatística | 74 |
| 4.2 | ENSAIO CLÍNICO | 75 |
| 4.2.1 | Análise Estatística | 79 |
| 5 | RESULTADOS | 81 |
| 5.1 | ETAPA LABORATORIAL | 83 |
| 5.2 | ETAPA CLÍNICA | 93 |
| 6 | DISCUSSÃO | 99 |
| 7 | CONCLUSÕES | 115 |
| | REFERÊNCIAS | 119 |
| | APÊNDICES | 129 |
| | ANEXOS | 135 |

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia não é um tratamento específico para o tecido canceroso, atuando pela inibição do crescimento das células que se dividem rapidamente, interferindo na divisão celular (SONIS et al., 1989). Assim, como não diferencia as células neoplásicas que se dividem rapidamente, das células normais que apresentam alta taxa de proliferação, como as células da mucosa bucal ou da medula óssea, essa terapia provoca vários efeitos colaterais que se manifestam na cavidade bucal (SONIS et al., 1989; CHILDERS et al., 1993; MENDONÇA et al., 2005; MCCARTHY et al., 1998; PETERSON, 2000; COLLARD; HUNTER, 2001; GLENNY et al., 2004). Além disso, a boca abriga inúmeras bactérias, possibilitando que o rompimento da integridade da mucosa bucal permita a entrada de microorganismos infecciosos no hospedeiro mielossuprimido (SONIS et al., 1989; MENDONÇA et al., 2005; RABER-DURLACHER et al., 2000), podendo levá-lo a óbito (BIRON et al., 2000; ADAMIETZ et al., 1998).

A mucosite bucal é uma importante intercorrência freqüente e debilitante em pacientes submetidos a quimioterapia e radioterapia para tratamento de diversas neoplasias. Com o aumento do uso de protocolos terapêuticos agressivos, a importância da mucosite como uma enfermidade limitante vem aumentando, tornando seu controle uma prioridade na oncologia clínica, fato que poderá contribuir para a melhora da qualidade de vida do paciente oncológico. As últimas décadas trouxeram avanços no conhecimento da patofisiologia dessa alteração, entretanto ainda não existe consenso acerca da efetividade dos diversos agentes sugeridos para a sua prevenção e tratamento (VOLPATO et al., 2007).

Revisões sistemáticas e ensaios clínicos randomizados recentes identificaram intervenções potencialmente efetivas para a prevenção da mucosite, entretanto, o nível das evidências que suportam tais intervenções varia e os benefícios para pacientes com diferentes tipos de câncer são ainda desconhecidos (ARORA et al., 2008; NOTTAGE et al., 2003; GIBSON, 2004; BARASCH; PETERSON, 2003; CLARKSON et al., 2005; PLEVOVÁ, 1999; KOWANKO et al., 1998; WORTHINGTON et al., 2005; JAGUAR et al., 2007), permanecendo a prevenção e o tratamento da mucosite condições ainda não resolvidas, limitando a eficácia da

terapia anti-neoplásica e prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (BIRON et al., 2000; MAYIA et al., 2006).

Dentre as estratégias apontadas para o manejo da mucosite bucal, a terapia utilizando o laser em baixa intensidade tem se destacado como intervenções potencialmente efetivas (BIRON et al., 2000; CLARKSON et al., 2005; PLEVOVÁ, 1999; JAGUAR et al., 2007; BENSADOUN et al., 2001; BENSADOUN et al., 1999; CRUZ et al., 2007; GENOT; KLASTERSKY, 2005; NES; POSSO, 2005; SONIS; CLARK, 1991; SUTHERLAND; BROWMAN, 2001; MELLO; MELLO, 2001; COWEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2007; ANTUNES et al., 2008) e mais recentemente utilizando diodos emissores de luz – Light-Emitting Diodes (LEDs) (WHELAN et al., 2002; CORTI et al., 2006; DESMET et al., 2006; YEAGER et al., 2007; SACONO et al., 2008).

Entretanto, para que a fototerapia seja incorporada na prática clínica para o manejo da mucosite bucal induzida pelo tratamento anti-neoplásico, é necessário que mais estudos bem estruturados sejam conduzidos objetivando a definição de parâmetros ideais para sua aplicação, obtendo melhores resultados clínicos, favorecendo a qualidade de vida dos pacientes sob tratamento do câncer e comprovando a ausência de efeitos colaterais da luz nos parâmetros propostos, sejam eles clínicos ou em nível celular. Outro fator a ser desenvolvido e avaliado com estas pesquisas é a aplicação de novas fontes de luz com custo menor para este tipo de tratamento que não seja a luz laser de baixa intensidade, sendo este um fator que poderá contribuir de forma significativa para a difusão deste tipo de terapia.

Dessa forma, justifica-se a realização de estudo buscando avaliar os efeitos da terapia com laser de baixa intensidade e com outro tipo de luz a base de diodos emissores de luz (LEDs) no tratamento da mucosite bucal em crianças sob tratamento anti-neoplásico. Também se faz pertinente avaliar a ação destas terapias de luz na viabilidade celular através da sua aplicação em culturas de fibroblastos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo foi dividido didaticamente em tópicos pertinentes às condições abordadas neste trabalho.

2.1 MUCOSITE BUCAL

2.1.1 Definição e características clínicas

A mucosite bucal é definida como uma inflamação e ulceração da mucosa bucal (BIRON et al., 2000; ADAMIETZ et al., 1998) com formação de pseudomembrana (SONIS, 1998) e fonte potencial de infecções com risco de morte (BIRON et al., 2000; ADAMIETZ et al., 1998). É um efeito debilitante em consequência de tratamentos do câncer como a radioterapia e a quimioterapia sendo esta alteração tecidual bastante freqüente e dolorosa (BIRON et al., 2000).

A manifestação inicial é o eritema, seguido do desenvolvimento de placas brancas descamativas, que são dolorosas ao contato. Crostas epiteliais e exsudato fibrinoso levam à formação de uma pseudomembrana e ulceração, representando a forma mais pronunciada da mucosite. Os pacientes invariavelmente apresentam sintomatologia dolorosa. A forma mais severa da mucosite é representada pela exposição do estroma do tecido conjuntivo subjacente o qual é abundantemente inervado devido à perda de células epiteliais (PARULEKAR et al., 1998), geralmente ocorrido entre 5 e 7 dias após administração da droga (RABER-DURLACHER, 1999).

A ulceração resulta em dor severa que muitas vezes requer alterações na dieta e administração parenteral de narcóticos para amenizar os sintomas. Em pacientes mielossuprimidos a mucosite ulcerativa pode servir como veículo para a invasão sistêmica de bactérias ou produtos da parede celular bacteriana (SONIS, 1998).

De acordo com Bensadoun et al. (2001), a avaliação patológica da mucosite revela uma úlcera rasa, provavelmente causada pela depleção da camada epitelial

basal, com subsequente denudação. A resposta cicatricial a esta injúria é caracterizada por infiltrado de células inflamatórias, exsudato intersticial, resíduos celulares e de fibrina, produzindo uma pseudomembrana análoga à escara de uma ferida superficial em pele. Quando hidratada pela saliva, tal membrana tem aparência branca ou opaca. Infecção superficial pode tornar sua aparência amarelada ou mesmo esverdeada, especialmente se ulceração profunda estiver presente (SIXOU et al., 1996). A coloração também pode ser alterada por alimentos, bebidas ou medicação tópica. Enquanto a lesão representa uma úlcera, uma inspeção cuidadosa freqüentemente revela a membrana ligeiramente elevada acima do plano da mucosa subjacente. Ela pode ser facilmente confundida com candidíase. Entretanto, um quadro de infecção secundária da úlcera por *Candida albicans* pode estar presente (SONIS, 1998). A membrana pode ser removida por traumas menores, causando sangramento e ulceração posterior. O aumento do tamanho da úlcera permite a formação de uma pseudomembrana confluyente maior que recobre as úlceras adjacentes geograficamente conectadas. A regeneração celular deficiente leva à atrofia do epitélio e ao afilamento da mucosa (PARULEKAR et al., 1998).

Na radioterapia, a reação é confinada à região irradiada, podendo ser freqüentemente visualizada na mucosa como uma margem de eritema intenso (PARULEKAR et al., 1998). Sua severidade depende de vários fatores incluindo a dose administrada, o fracionamento e intervalo das doses, o volume de tecido tratado e o tipo de radiação operada (PARULEKAR et al., 1998; BISWAL et al., 2003), além da exposição prévia à quimioterapia, quimioterapia concomitante, alterações sistêmicas como *diabetes mellitus* ou desordens vasculares (BISWAL et al., 2003). A cicatrização ocorre, na maioria dos pacientes, depois de duas a três semanas após o término da radioterapia fracionada convencionalmente (PARULEKAR et al., 1998).

Vários esquemas têm sido descritos para avaliar os graus de mucosite em pacientes oncológicos com base na presença de sinais como eritema e lesões, isolados ou concomitante a sintomas como dor e dificuldade de deglutição (PARULEKAR et al., 1998; TURHAL et al., 2000).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a mucosite bucal pode ser classificada em cinco graus diversos: grau 0 - indica ausência de mucosite; grau I -

presença de úlcera indolor, eritema ou sensibilidade leve; grau II - presença de eritema doloroso, edema, ou úlceras que não interferem na habilidade do paciente em alimentar-se; grau III - úlceras confluentes que interferem na capacidade do paciente em ingerir alimentos sólidos; e grau IV - sintomas tão severos que o paciente requer suporte enteral ou parenteral (BENSADOUN et al., 2001).

2.1.2 Incidência

A mucosite bucal induzida pelo tratamento antineoplásico é uma complicação freqüente (ADAMIETZ et al., 1998), estando sua incidência influenciada por variáveis associadas ao paciente e ao tratamento a que ele está sendo submetido (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis que influenciam na incidência da mucosite bucal induzida pelo tratamento antineoplásico.

| Variáveis associadas ao paciente | Variáveis associadas ao tratamento |
|----------------------------------|---|
| Diagnóstico | Agente quimioterápico |
| Idade | Dose e freqüência de administração da medicação |
| Nível de saúde bucal | Região irradiada |
| Condição sistêmica | Volume de tecido irradiado |
| | Tipo de radiação ionizante |
| | Dose fracionada e dose cumulativa da radioterapia |
| | Uso concomitante de quimioterapia e radioterapia |

Fonte: VOLPATO et al., 2007.

Em geral, as doenças malignas do sangue, como a leucemia e o linfoma, que por si mesmas causam supressão da medula óssea, tendem a estar associadas a complicações bucais com uma freqüência elevada (SONIS et al., 1989). Esses pacientes desenvolvem problemas bucais duas a três vezes mais freqüentemente que pacientes em tratamento de tumores sólidos (RUTKAUSKAS; DAVIS, 1993). Isto está provavelmente associado à doença, à imunossupressão induzida pelos medicamentos e ao uso freqüente de agentes quimioterápicos específicos ao ciclo celular (SONIS; CLARK, 1991).

De acordo com Childers et al. (1993) e Sonis et al. (1989), quanto mais jovem o paciente, maior a possibilidade de a quimioterapia acometer a cavidade bucal. Enquanto cerca de 40% de todos os pacientes submetidos à quimioterapia apresentam efeitos colaterais na boca, este número eleva-se para mais de 90% em crianças com menos de 12 anos de idade. Parece provável que o índice mitótico elevado das células da mucosa bucal, neste grupo etário, seja um fator adjuvante (SONIS et al., 1989).

Quanto ao tipo de terapia a que o paciente está sendo submetido, Adamietz et al. (1998) relatam que quando a quimioterapia e a radioterapia são aplicadas simultaneamente, a mucosite pode ser observada em quase todos os pacientes.

Parulekar et al. (1998) estimam que a mucosite quimio-induzida varia de 40 a 76% para pacientes tratados com quimioterapia padrão e de alta dose, respectivamente.

Entre os pacientes que recebem radioterapia na região de cabeça e pescoço, virtualmente todos (entre 90 e 97% (RABER-DURLACHER, 1999; TROTTI et al., 2003)) desenvolverão algum grau de mucosite (PARULEKAR et al., 1998). Destes pacientes, tratados apenas com utilização da radioterapia ou em combinação com quimioterapia, entre 34 e 43% serão acometidos por mucosite severa. Esta compromete a qualidade de vida do paciente e está associada com o aumento na frequência de hospitalização, uso de nutrição parenteral total e interrupção do tratamento, com efeito adverso no controle do tumor. Entre 9 e 19% das interrupções de quimioterapia e radioterapia são devidas à mucosite (TROTTI et al., 2003).

2.1.3 Etiologia

A mucosite é a consequência de dois mecanismos maiores: a toxicidade direta da terapêutica utilizada sobre a mucosa e a mielossupressão gerada pelo tratamento. Sua patogênese está ligada à renovação celular diminuída induzida pela quimio e radioterapia nas camadas basais do epitélio, que se torna incapaz de alcançar a renovação adequada das células descamadas (SONIS et al., 1989).

Inicialmente, a cinética da célula influencia na sensibilidade relativa de tecidos normais ao tratamento antineoplásico. Células da orofaringe, do epitélio intestinal e

da medula óssea dividem-se rapidamente e são mais sensíveis à radiação e à quimioterapia do que células que se dividem mais lentamente e células senescentes de outras regiões do organismo. Tanto a radiação como a quimioterapia geram a morte celular interferindo em seus mecanismos de crescimento e diferenciação celulares. Células em divisão são mais sensíveis aos efeitos da terapia antineoplásica (PARULEKAR et al., 1998).

A mucosa bucal é composta de membranas que têm um alto índice mitótico, de renovação celular e de maturação epitelial, tornando-a vulnerável aos efeitos adversos da quimioterapia (MCCARTHY et al., 1998; TURHAL et al., 2000). Este tratamento reduz o índice de renovação das células epiteliais, causando atrofia muscular, ulceração da mucosa localizada ou difusa e inflamação como resultado dos efeitos não-específicos das drogas citotóxicas (CHAN et al., 2003). Além de alterar a integridade da mucosa, a quimioterapia altera também a microbiota que normalmente está presente na cavidade bucal, a quantidade e composição da saliva, e a maturação epitelial (TURHAL et al., 2000). A barreira mucosa comprometida resultante representa um fator de risco para a morbidade de pacientes oncológicos e mortalidade em pacientes mielossuprimidos (MCCARTHY et al., 1998).

Segundo Adamietz et al. (1998), a origem das lesões mucosas induzidas pelo tratamento radioterápico do câncer é de natureza radiobiológica ou tóxica, apesar do desenvolvimento posterior ser estimulado por infecção. O dano à mucosa bucal pode levar a infecções, que são mantidas pelo desequilíbrio do sistema imunológico, especialmente a leucopenia. Danos às glândulas salivares causam redução no fluxo e alterações na composição da saliva e do seu pH, que são seguidas de mudanças na microbiota bucal, elevando o desenvolvimento da infecção. O dano induzido pela quimioterapia difere do dano induzido pela radiação, já que certas regiões danificadas pela radiação são consideradas permanentemente áreas de risco durante toda a vida do paciente (CHAN et al., 2003).

2.1.4 Patofisiologia

Em 1998, foi descrito um novo modelo teórico para a patofisiologia da mucosite induzida por radioterapia. Esse modelo contemplou os conhecimentos da

época acerca da atividade das citocinas, integrando efeitos da imunidade local e da microbiota com a teoria da toxicidade direta e indireta. Assim, a patofisiologia da mucosite bucal foi descrita como quatro fases interdependentes (SONIS, 1998):

1. Fase inflamatória/vascular
2. Fase epitelial
3. Fase ulcerativa/bacteriológica
4. Fase de reparação

A mucosite bucal parece ser a conseqüência de uma série de eventos biológicos que se iniciam na submucosa e progridem em direção ao epitélio (SONIS et al., 2004). Durante tais eventos, fatores de transcrição são ativados pela radioterapia.

Durante a primeira fase, citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina 1 (IL-1) e fator- α de necrose tumoral (TNF- α), são produzidas mediando uma resposta local à terapia seguidas de apoptose e dano celular. A dinâmica cascata biológica resulta em injúria na mucosa, freqüentemente manifestada como ulceração. Um exsudato fibrinoso proliferado por bactérias, também referida como pseudomembrana, encobre a úlcera. Produtos da parede celular, provenientes das bactérias colonizadoras, penetram na submucosa, onde elas ativam macrófagos infiltrados para emanar citocinas adicionais. Estas e outras citocinas relacionadas são responsáveis por causar tanto o dano tecidual direto quanto a dilatação vascular e outros efeitos inflamatórios que aumentam a deposição de drogas citotóxicas à mucosa, e mediam a transição à próxima fase. Também foi sugerido que diferenças genéticas nas respostas inflamatórias seriam responsáveis pela variância na susceptibilidade do paciente à mucosite bucal induzida pela quimioterapia (SONIS, 1998).

A segunda fase (fase epitelial) está relacionada com o modelo anterior de estomatotoxicidade direta, no qual agentes citotóxicos inibem a replicação de células basais do epitélio, levando à depleção da capacidade de renovação tecidual.

Assume-se que a terceira fase (ulceração com infecção associada) derive de trauma no assentamento do epitélio que é estreitado e atrofiado pela quimioterapia. Adicionalmente, é postulado que a colonização bacteriana das superfícies ulceradas

eleva a quantidade de citocinas pró-inflamatórias na mucosa e leva à infecção sistêmica no hospedeiro mielossuprimido.

A fase de reparo tecidual ocorre, então, entre 2 e 3 semanas em pacientes não mielossuprimidos e que não receberam tratamento (SONIS; CLARK, 1991). Infecções secundárias podem contribuir para a demora na cicatrização das lesões mucosas. Úlceras maiores e mais profundas geralmente requerem tempo de cicatrização mais prolongado. A depleção profunda da população de células mesenquimais pode resultar em cicatrização por segunda intenção. Dependendo da extensão da injúria, a mucosa resultante pode parecer pálida, atrófica e menos complacente. Algumas úlceras profundas parecem nunca cicatrizar e podem progredir para necrose de tecido mole ou ósseo. Enquanto estudos clínicos sistemáticos dessas alterações patológicas não têm sido realizados em humanos, a ulceração profunda requerendo cicatrização prolongada provavelmente produz o que são clinicamente notados como efeitos tardios na mucosa. O pico de severidade das lesões é apenas indicativo parcial do grau de depleção das células mesenquimais. A duração da injúria também reflete a magnitude da depleção e o índice de recuperação (BENSADOUN et al., 2001).

Apesar dos avanços conceituais nos últimos anos, alguns processos patofisiológicos que contribuem para o aparecimento da mucosite induzida pela terapia antineoplásica ainda não foram completamente elucidados (PETERSON, 2000; TROTTI et al., 2003; BARASCH; PETERSON, 2003; NICOLATOU-GALITIS et al., 2006a; GENOT; KLASTERSKY, 2005; NICOLATOU-GALITIS et al., 2006b). Estudos celulares e moleculares são de difícil condução em pacientes portadores de câncer. Além disso, modelos animais têm limitações inerentes. Portanto o entendimento da fisiopatologia da mucosite requer que sejam obtidas evidências adicionais abordando epidemiologia e fatores de risco (VOLPATO et al., 2007).

2.1.5 Morbidade associada à mucosite

Lesões nos tecidos bucais podem servir como veículo de entrada para a propagação de infecções bacterianas, fúngicas e virais (CHILDERS et al., 1993; GLENNY et al., 2004; NICOLATOU-GALITIS et al., 2006b; RABER-DURLACHER et al., 2000); principalmente em pacientes submetidos a protocolos quimioterápicos

mielossupressivos ou imunossupressivos para tratamento do câncer. Em muitos centros, pacientes oncológicos sob quimioterapia em altas doses freqüentemente recebem agentes antibióticos e antifúngicos profilaticamente ou durante os períodos de leucopenia induzida pela medicação (RUTKAUSKAS; DAVIS, 1993). Em estudo conduzido por Nicolatou-Galitis (2006b), 29,1% dos pacientes apresentaram infecção pelo vírus da herpes simples, agravando a mucosite bucal ulcerativa induzida por radioterapia.

Este importante efeito colateral clínico agudo da terapia antineoplásica causa desconforto e dor, podendo ainda limitar a nutrição adequada, levando à interrupção ou modificação na administração da medicação, prolongamento do período de internação hospitalar e, em alguns pacientes, infecções com risco de morte consideráveis (SONIS et al., 1989). Além disso, infecções secundárias podem levar a infecções sistêmicas graves (CHILDERS et al., 1993; MENDONÇA et al., 2005; COLLARD; HUNTER, 2001; GLENNY et al., 2004, EPSTEIN et al., 2001, GIBSON, 2004; PARULEKAR et al., 1998; BENSADOUN et al., 2001; BISWAL et al., 2003; NICOLATOU-GALITIS et al., 2006b; GIBSON, 2006; RABER-DURLACHER et al., 2000; BONNAURE-MALLET et al., 1998; BENSADOUN et al., 1999; GRÖTZ et al., 2003). A mucosite pode predispor indivíduos mielossuprimidos a uma bacteremia potencialmente fatal. Todas essas condições podem impossibilitar tratamentos posteriores ou elevar seu custo, colocar em risco a sobrevivência do paciente ou irremediavelmente alterar a sua qualidade de vida e a de suas famílias (CHILDERS et al., 1993; PETERSON, 2000; EPSTEIN et al., 2001; GIBSON, 2004; BENSADOUN et al., 2001; BISWAL et al., 2003; GENOT; KLASTERSKY, 2005; BENSADOUN et al., 1999; NES; POSSO, 2005).

2.1.6 Prevenção e tratamento

Apesar de estudada durante muitos anos, nenhuma estratégia ou abordagem provou-se efetiva na prevenção e/ou tratamento da mucosite bucal. Revisões sistemáticas e ensaios clínicos recentes identificaram intervenções potencialmente efetivas para a prevenção da mucosite que incluem: alopurinol, fatores de crescimento e colutórios à base de povidona, enzimas hidrolíticas, amifostina (ADAMIETZ et al., 1998; GENOT; KLASTERSKY, 2005; CLARKSON et al., 2005)

sulcrafate (NOTTAGE et al., 2003; ETIZ et al., 2000) e antibióticos (GENOT; KLASTERSKY, 2005; CLARKSON et al., 2005; SUTHERLAND; BROWMAN, 2001; LEFEBVRE; DOMENGE, 2002), mel (BISWAL et al., 2003), higiene bucal (CHAN et al., 2003; DJURIC et al., 2006), analgésicos (EPSTEIN et al., 2001) e laser em baixa intensidade (SONIS; CLARK, 1991; PLEVOVÁ, 1999; MELLO; MELLO, 2001; BENSADOUN et al., 2001; SUTHERLAND; BROWMAN, 2001; GENOT; KLASTERSKY, 2005; NES; POSSO, 2005; CLARKSON et al., 2005; JAGUAR et al., 2007; CRUZ et al., 2007; ANTUNES et al., 2007; ANTUNES et al., 2008), entre outros (MCCARTHY et al., 1998; GLENNY et al., 2004; SONIS, 1998; ADAMIETZ et al., 1998; TURHAL et al., 2000; NICOLATOU-GALITIS et al., 2006; GENOT; KLASTERSKY, 2005). No entanto, a força das evidências que suportam tais intervenções varia e os benefícios para pacientes com diferentes tipos de câncer são ainda desconhecidos (NOTTAGE et al., 2003; GIBSON, 2004; BARASCH; PETERSON, 2003; CLARKSON et al., 2005; PLEVOVÁ, 1999; KOWANKO et al., 1998; WORTHINGTON et al., 2005), permanecendo a prevenção e o tratamento da mucosite problemas ainda não resolvidos, limitando a eficácia da terapia antineoplásica e prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (BIRON et al., 2000).

Nas reuniões do Comitê de Mucosite realizadas no ano 2000 (MASCC/ISOO, 2000), uma das maiores preocupações foi o quanto os métodos então utilizados para prevenção e tratamento da mucosite eram empíricos ou não extensivamente estudados. Concluiu-se que seria desafiador obter um protocolo de atendimento em que os pesquisadores pudessem acreditar e executá-lo de forma prática e viável.

2.2 LASER

A palavra “LASER” é um acrônimo de origem inglesa que significa: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (MELLO; MELLO, 2001).

O laser é um tipo de luz cujos fótons são idênticos e, assim, se propagam segundo trajetórias, direção, sentido, amplitude e fase também idênticos. Portanto,

os dispositivos emissores de laser são capazes de emitir luz com comprimento de onda único e definido (ALMEIDA-LOPES, 2004).

As radiações ópticas produzidas pelos diversos dispositivos de laser são semelhantes, pois são geradas através do mesmo princípio, entretanto pode-se trabalhar com o laser buscando resultados clínicos bastante específicos, sendo que o que determina sua interação com o tecido é a densidade de potência óptica do sistema, seu comprimento de onda (BENSADOUN, 2006; ALMEIDA-LOPES, 2004) e o tempo de exposição.

O laser é considerado terapêutico e de baixa intensidade quando apresenta potência igual ou inferior a 500 mW (BRAVERMAN et al., 1989). Considerando tal parâmetro, sob densidades de potência mais baixas, o laser apresenta um efeito modulador sobre as células, enquanto que em densidades de potência mais elevadas, o laser apresenta um efeito inibitório (ARORA et al., 2008).

A biomodulação que ocorre quando o laser é oferecido em uma densidade de energia baixa, mas suficientemente alta para que a célula alvo a utilize de maneira a estimular sua membrana ou suas organelas manifesta-se com o tecido procurando restabelecer o estado de normalidade da região afetada (ALMEIDA-LOPES, 2004).

Por ser uma técnica não-invasiva, simples e atraumática – sem relatos clínicos de toxicidade (BENSADOUN, 2006); a aplicação de luz é ideal para tratamento de tecidos sem risco de prejudicar as células saudáveis, através de procedimentos invasivos (YEAGER et al., 2007).

2.2.1 Interação entre o laser e os tecidos

A terapia com laser de baixa intensidade, ou laserterapia, tem sido investigada em várias áreas da medicina (MIGLIORATI et al., 2006).

A laserterapia corresponde à aplicação local de uma fonte de luz monocromática com alta densidade de fótons (MAIYA et al., 2006). Os efeitos dessa intervenção têm sido confirmados por numerosos estudos *in vitro* (BENSADOUN, 2006). Clinicamente seus efeitos manifestam-se através de ações trófico-regenerativas, antiinflamatórias e analgésicas (ARORA et al., 2008; MAIYA et al.,

2006; BENSADOUN, 2006; BENSADOUN et al., 2001; ANTUNES et al., 2008; ALMEIDA-LOPES, 2004).

Os mecanismos precisos de ação do laser que promovem a cicatrização e redução da inflamação e da dor em nível celular e molecular ainda não foram completamente elucidados, mas algumas hipóteses têm sido levantadas. Já em 1989, Karu defendia que a energia laser seria absorvida na mitocôndria por citocromos, provocando a transmissão de elétrons e levando a um aumento da síntese protéica e ativação da produção de energia (ATP) promovendo o efeito cicatricial.

Arora et al. (2008) observaram a estimulação de rápida epitelização e proliferação de fibroblastos (colágeno) pelos fótons do laser (no comprimento de onda vermelho) em culturas de tecidos humanos e animais. Biron et al. (2000) incluem ainda a divisão celular aumentada e síntese de miofibroblastos.

Jaguar et al. (2007) atribuem o potencial do laser para a melhora na cicatrização e alívio da dor ao aumento da divisão celular e alteração da condução nervosa através da liberação de endorfinas e encefalinas.

Devido ao aumento da vascularização e a re-epitelização do tecido lesionado (MAIYA et al., 2006), o laser tem sido recomendado para estimular o reparo de úlceras de difícil cicatrização (ARORA et al., 2008), como a mucosite bucal induzida pelas terapias anti-neoplásicas.

2.2.2 A laserterapia na prevenção e tratamento da mucosite bucal

Apesar do mecanismo de ação da laserterapia na patobiologia da mucosite permanecer desconhecido (MIGLIORATI et al., 2006), vários autores tem sugerido seu uso tanto preventivo (RABER-DURLACHER et al., 2000; BIRON et al., 2000; ARORA et al., 2008; MAIYA et al., 2006; BENSADOUN et al., 1999; COWEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2007; BARASCH et al., 1995; HASHIEH et al., 1997) como curativo (ARORA et al., 2008; JAGUAR et al., 2007; MAIYA et al., 2006; GENOT; KLASTERSKY, 2005; NES; POSSO, 2005; HASHIEH et al., 1997; SHARON-BULLER; SELA, 2004).

Diferentes estudos avaliaram a utilização da laserterapia na diminuição da mucosite bucal e da dor a ela relacionada induzidas pela quimioterapia e por protocolos de indução para transplante de células hematopoiéticas (TCH) em pacientes com câncer (JAGUAR et al., 2007; CRUZ et al., 2007; NES; POSSO, 2005; COWEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2007; ANTUNES et al., 2008).

Cowen et al., em estudo randomizado multicêntrico publicado em 1997 já apontavam a eficiência do laser em baixa intensidade na prevenção da mucosite bucal induzida pela quimioterapia de condicionamento para transplante de células hematopoiéticas reduzindo a severidade da mucosite bucal nos pacientes tratados. Nesse estudo, o laser foi administrado no grupo de intervenção durante cinco dias de condicionamento até o dia do transplante. Os pacientes do grupo de intervenção apresentaram 33% de redução da mucosite bucal graus 3 e 4 em relação ao grupo controle. Além disso, houve uma redução estatisticamente significativa no tempo de dor bucal em pacientes submetidos à laserterapia, onde o tempo médio de dor foi de 20,3 dias para os pacientes do grupo controle e 12,7 dias para os pacientes do grupo de intervenção, sugerindo ação clínica da laserterapia na prevenção de sintomas subjetivos associados à mucosite bucal (COWEN et al., 1997).

Em trabalho conduzido por Nes e Posso (2005), os autores concluíram que o laser de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados, teve efeito analgésico imediatamente após a sua aplicação em pacientes com mucosite bucal induzida pela quimioterapia do câncer.

Jaguar et al. (2007) também investigaram os efeitos clínicos da laserterapia na prevenção e redução da mucosite bucal induzida em pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas. Nesse estudo, um grupo experimental (n = 24) foi comparado com um controle histórico (n = 25) do sistema de arquivos do Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP. Os resultados do trabalho estão de acordo com os achados de Cowen et al. (1997), apresentando uma diminuição do tempo médio de dor para o grupo intervenção (2,45 dias) em relação ao grupo controle (5,64 dias) (P = 0,04). Assim, a laserterapia promoveu alívio da dor, reduziu a severidade da mucosite bucal e diminuiu a necessidade de administração de morfina nos pacientes (JAGUAR et al., 2007).

Jaguar et al. (2007) argumentam que a mucosite bucal severa em pacientes que não foram submetidos à laserterapia levou mais tempo para cicatrizar, afetando

significativamente sua qualidade de vida. Os autores relacionaram esse fato à condição neutropênica dos pacientes que, ao apresentarem mucosite bucal, ficam predispostos à bacteremia, fungemia e septicemia.

Além disso, o aumento de um ponto na escala de mucosite bucal foi associado com um aumento significativo da dor bucal. Segundo os autores, da perspectiva do paciente, a dor bucal aguda é o efeito mais debilitante da mucosite porque interfere na capacidade de comer, engolir e falar, resultando em um aumento no número de dias de administração de morfina e de nutrição parenteral (JAGUAR et al., 2007).

Cruz et al. (2007) avaliaram o papel do laser de baixa intensidade na prevenção da mucosite induzida por quimioterapia em crianças e adolescentes com câncer. Contrariando os estudos anteriores, as avaliações realizadas nos dias 8 e 15 mostraram prevalência da mucosite bucal quase idêntica nos dois grupos, com uma tendência para mucosite de grau mais elevado no dia 8 no grupo em que foi aplicado o laser. Os autores não encontraram qualquer evidência de benefício do uso profilático do laser de baixa intensidade em pacientes com câncer sob quimioterapia com ótima higiene bucal. Cruz et al. (2007) sugeriram que seus resultados poderiam ir de encontro aos resultados de estudos anteriores realizados em adultos devido ao índice três vezes maior de proliferação das células basais em crianças, o que poderia ajudar doentes mais jovens a curar suas lesões mais rapidamente. Os autores apontaram ainda a possibilidade de um efeito protetor da rigorosa higiene bucal realizada em todos os voluntários anteriormente e durante a realização do estudo.

Em ensaio clínico conduzido por Antunes et al. (2007), novamente foram investigados os efeitos clínicos da laserterapia na prevenção e redução da severidade da mucosite bucal induzida em pacientes submetidos ao condicionamento para TCH. Nesse trabalho, a aplicação do laser teve início no primeiro dia de condicionamento (D-7) e parou no dia de recuperação neutrófila. Apesar de ser esperado um atraso no início da mucosite nos pacientes do grupo de intervenção, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Também não houve diferença estatística observada entre os grupos sobre o tempo total com mucosite. Entretanto, no grupo laser, 94,7% dos pacientes apresentaram mucosite bucal com grau inferior ou igual a dois, incluindo 63,2% com

grau 0 e 1, enquanto que no grupo controle, apenas 31,5% dos pacientes apresentou mucosite bucal com grau inferior ou igual a 2 ($P < 0,001$). Calculando a área total ulcerada, 5,3% do grupo laser apresentou úlceras de 9,1 cm² a 18 cm², enquanto que 73,6% do grupo controle apresentou úlceras de 9,1 cm² a 18 cm² ($P < 0,003$).

Antunes et al. (2008) avaliaram os efeitos clínicos da laserterapia na redução da severidade da mucosite bucal induzida em 11 pacientes sob condicionamento para TCH. Embora a amostra do trabalho tenha sido reduzida, os autores concluíram que a laserterapia é eficiente no tratamento da mucosite bucal, porque, mesmo em pacientes com mucosite nível 4 o tempo de cicatrização das úlceras foi em média de 6 dias e os pacientes não mencionaram qualquer sensação desconfortável enquanto o laser era aplicado. Seus resultados indicaram que a utilização da laserterapia em pacientes sob TCH é um poderoso instrumento no tratamento da mucosite bucal induzida e agora é um procedimento padrão nesse grupo de pacientes em seu hospital.

Como pode ser visto, o uso do laser em baixa intensidade tem apresentado resultados promissores na prevenção e tratamento da mucosite bucal (GENOT; KLASTERSKY, 2005; NES; POSSO, 2005; CLARKSON et al., 2005; SUTHERLAND; BROWMAN, 2001; MELLO; MELLO, 2001; PLEVOVÁ, 1999; BENSADOUN et al., 1999; SONIS; CLARK, 1991; JAGUAR et al., 2007; CRUZ et al., 2007; NES; POSSO, 2005; COWEN et al., 1997; ANTUNES et al., 2007; ANTUNES et al., 2008), entretanto, o laser é uma tecnologia onerosa e muitas vezes distante da realidade dos serviços e da maioria dos pacientes. É neste contexto que os aparelhos de luz não coerente como os dispositivos de diodos emissores de luz (LEDs) surgem como uma alternativa.

2.3 DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS)

O advento do diodo na década de 1970 ampliou a aplicabilidade da emissão de luz em vários setores. O termo “LED” é um acrônimo de Light Emitter Diode (Diodo Emissor de Luz), e corresponde a um diodo, baseado em junções p-n (p – positivo; n – negativo), que, quando energizado, emite luz. Os LEDs tem sido

utilizados na substituição de lâmpadas de sinalização ou como lâmpadas piloto nos painéis de aparelhos e instrumentos variados. As vantagens dos LEDs em relação às lâmpadas incandescentes convencionais são: não possuir filamento, que queima facilmente, proporcionando um tempo de vida útil de 100.000 ou mais horas; são atérmicos e possuem menor consumo energético (CORAZZA, 2005).

O LED é quase um laser, diferenciando-se na formação da luz. Enquanto o diodo de um laser está contido dentro de uma cavidade ressonante, onde promove fótons que são amplificados pela emissão estimulada da luz e proporciona feixes de luz coerentes e colimados, o LED é desprovido dessa cavidade óptica, e a luz emitida não apresenta coerência e colimação, mas produz uma banda de espectro eletromagnético próxima à do laser (CORAZZA, 2005), como visto na Figura 1:

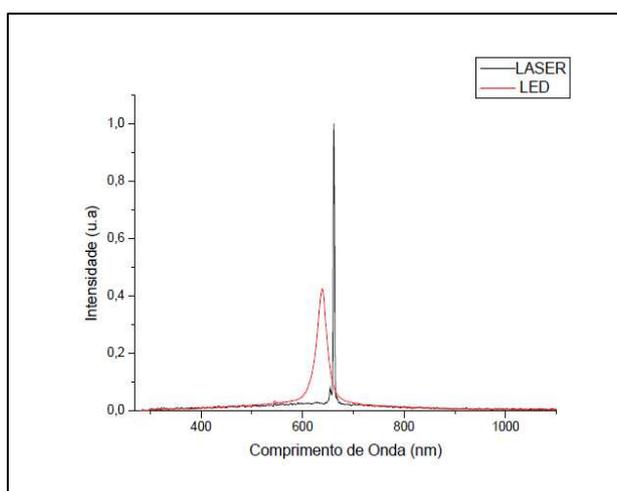


Figura 1 - Distribuição da energia do Laser e LED por banda espectral (CORAZZA, 2005).

Desde a introdução da fotoestimulação na medicina, a efetividade de uma variedade de fontes de luz tem sido avaliada. Na última década, alguns pesquisadores demonstraram a aplicabilidade do LED terapêutico em estudos experimentais e clínicos demonstrando a eficiência fotobiomoduladora celular semelhante à do laser em baixa intensidade (CORTI et al., 2006; SACONO et al., 2008). Diante das evidências demonstradas pela NASA na aplicação do LED, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou testes clínicos da aplicação de LEDs na cicatrização de feridas em humanos, devido ao insignificante risco de lesões na pele (WHELAN, 2001).

O LED pode atingir extensas áreas, mesmo com uma única aplicação através de pontas de grande diâmetro, emitindo luz com intensidade e densidade energética homogêneas. Além de ser uma terapêutica menos onerosa em comparação com laser (SACONO et al., 2008).

Em nível molecular, os LEDs estimulam os processos básicos de energia na mitocôndria, sendo que comprimentos de onda ótimos para melhora na cicatrização de feridas em animais de laboratório e na síntese do DNA em fibroblastos e células musculares incluem 680, 730 e 880 nm (WHELAN et al., 2001).

A razão do aumento de pesquisas buscando comparar os efeitos da fototerapia com o uso de LEDs em substituição ao laser é que, diferentemente do comprimento de onda, a sua coerência ou sua falta não é um fator importante para o efeito biomodulador (SMITH, 2005). Assim, os LEDs apresentam grande potencial de ação, além de serem mais baratos que os lasers. Karu et al. (1983), analisando os resultados clínicos sob o aspecto das diferentes fontes de luz, afirmaram que não se pode concluir que os lasers têm maior potencial terapêutico que os LEDs. Em experimento desenvolvido em nível celular, evidenciou-se que luz coerente e não coerente com o mesmo comprimento de onda, intensidade e tempo de irradiação promoveram o mesmo efeito biológico (KARU et al., 1983). Os autores afirmaram ainda que a propriedade de coerência da luz laser não é importante quando a região irradiada é superficial ou pouco profunda.

2.3.1 Uso de dispositivos de LED na prevenção e tratamento da mucosite bucal

Foi demonstrado que a aplicação do LED antes do tratamento quimioterápico teve forte efeito preventivo no desenvolvimento da mucosite bucal, sendo capaz de reduzir significativamente a dor em pacientes pediátricos submetidos a transplante de medula óssea (WHELAN et al., 2002).

A eficácia da fototerapia com luz não coerente na mucosite induzida por quimioterapia também foi avaliada por Corti et al. (2006). Seus resultados sugerem fortemente que a fototerapia com luz não coerente pode ser utilizada com sucesso no tratamento da mucosite bucal induzida por quimioterapia, aumentando significativamente a taxa de cura, desde que seja aplicado na fase do platô do processo (6-8 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas).

Os autores consideraram que como a fototerapia é indolor e não invasiva, não tem efeitos colaterais, pode ser auto-aplicada pelos próprios pacientes com um dispositivo simples e de baixo custo como o utilizado em seu estudo e, uma vez que poderia ter uma boa relação custo/benefício devido a diminuição das taxas de internação, mais pesquisas sobre o assunto deveriam ser realizadas (CORTI et al., 2006).

SACONO et al. (2008) avaliaram o efeito do LED (comprimento de onda de 630 nm \pm 10 nm, 160mW de potência, 12 J/cm² de densidade energética) sobre a diminuição da incidência e severidade da mucosite induzida por agente quimioterápico associada à lesão superficial em mucosa jugal em modelo animal. Os autores concluíram que uma aplicação única, de 37,5 segundos com dois dias de intervalo totalizando sete aplicações do LED nos parâmetros citados foi eficaz na redução da gravidade da mucosite induzida por quimioterapia e contribuiu para a cicatrização das úlceras bucais, embora sem impedir completamente a sua ocorrência.

Os autores destacaram ainda que, como não existem protocolos bem definidos referentes aos melhores parâmetros terapêuticos dos LEDs, mais estudos são necessários para determinar as doses ideais de irradiação, potência e comprimento de onda, e para investigar os efeitos biológicos resultantes da interação entre a luz LED e o tecido-alvo. (SACONO et al., 2008).

O pequeno número de estudos avaliando os possíveis efeitos benéficos da terapia com LED sobre a diminuição da incidência e da gravidade da mucosite bucal representa um estímulo para investigar o efeito sobre esta modalidade terapêutica na reparação de lesões da mucosa bucal (SACONO et al., 2008).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar:

- a eficácia da utilização de duas fontes de luz, a saber: laser de baixa intensidade e diodo emissor de luz (LED) na redução da incidência e da severidade da mucosite e da dor relacionada em crianças portadoras de câncer submetidas a quimioterapia;
- a toxicidade dessas terapias em nível celular através da cultura de células (fibroblastos).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi executado em dois períodos experimentais distintos. No primeiro período, foi realizada a análise da viabilidade de fibroblastos irradiados com Laser e LED, *in vitro*. No segundo período experimental, realizou-se ensaio clínico para avaliar a eficácia das duas fontes de luz na redução da incidência e da severidade da mucosite bucal em crianças portadoras de câncer submetidas a quimioterapia.

4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Para a realização da análise de viabilidade de fibroblastos irradiados com Laser e LED, *in vitro* foram utilizados os seguintes materiais:

Linhagem celular

Células Balb/c 3T3, uma linhagem estabelecida de fibroblastos de embrião de camundongo, na quinta passagem (Figura 2). Essa linhagem foi gentilmente cedida pela equipe da Profa. Dra. Carmen Verissima do Laboratório de Transdução de Sinal do Instituto de Biologia da Unicamp.

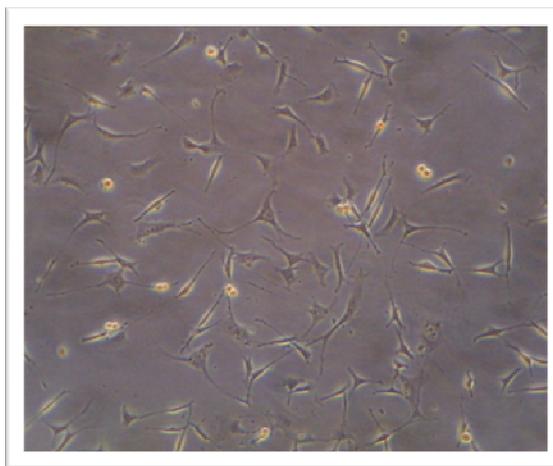


Figura 2 - Células Balb/c 3T3, na quinta passagem, utilizadas na análise da viabilidade celular (fotografia em microscópio de fase invertida DM IRBE / LEICA com aumento de 20x).

Soluções

- Meio de cultura – DMEM (Gibco Co.)

Foi utilizado o meio Dulbecco que é basicamente uma modificação do meio de Eagle incluindo concentrações de aminoácidos maiores, assemelhando-se às concentrações protéicas das células de mamíferos. Este meio tem sido utilizado na cultura de grande variedade de células de crescimento em monocamada e seus componentes podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2 - Componentes do meio Dulbecco's MEM.

| SAIS INORGÂNICOS | (mg/L) |
|--|---------------|
| Cloreto de cálcio (CaCl ₂) (anidro) | 200,00 |
| Nitrato ferroso (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O) | 0,10 |
| Cloreto de potássio (KCl) | 400,00 |
| Sulfato de magnésio (MgSO ₄) | 97,67 |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 6400,00 |
| Fosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) | 125,00 |
| AMINOÁCIDOS | |
| L-Arginina-HCl | 84,00 |
| L-Cistina 2HCl | 62,57 |
| L-Glutamina | 584,00 |
| Glicina | 30,00 |
| L-Histidina HCl·H ₂ O | 42,00 |
| L-Isoleucina | 104,80 |
| L-Leucina | 104,80 |
| L-Lisina-HCl | 146,20 |
| L-Metionina | 30,00 |
| L-Fenilalanina | 66,00 |
| L-Serina | 42,00 |
| L-Treonina | 95,20 |
| L-Triptofano | 16,00 |
| L-Tirosina 2Na 2H ₂ O | 103,79 |
| L-Valina | 93,60 |
| VITAMINAS | |
| D-ca Pantotenato | 4,00 |
| Cloreto de Colina | 4,00 |
| Acido Fólico | 4,00 |
| i-Inositol | 7,00 |
| Niacinamida | 4,00 |
| Piridoxal HCl | 4,00 |
| Riboflavina | 0,40 |
| Tiamina – HCl | 4,00 |
| OUTROS | |
| D-Glucose | 1.000,00 |
| Vermelho de Fenol | 15,90 |
| Piruvato de Sódio | 110,00 |
| Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) | 3.700,00 |

Fonte: DMEM

- Soro Fetal Bovino (SFB)

Para o grupo de controle positivo foi utilizado no meio de cultura 10% de soro fetal bovino, proporcionando condições ideais de proliferação aos fibroblastos. Já os grupos de intervenção e controle negativo foram tratados com 5% de soro fetal bovino, que promove aproximadamente metade do crescimento celular obtido nas condições ideais (DAMANTE, 2007, EDUARDO et al., 2007).

Como o efeito biomodulador da fototerapia age levando ao equilíbrio células que se encontram desequilibradas, entende-se que se as células estiverem em condições ideais de proliferação, a fototerapia terá pouco ou nenhum efeito positivo. Daí a justificativa para utilização do meio de cultura em condição de subnutrição.

- Tampão Salino Fosfato – PBS-A

O tampão salino fosfato (pH 7,4) foi constituído por: 137 mM de cloreto de sódio, 2,68 mM de cloreto de potássio, 1,47 mM de fosfato diácido de potássio e 8,1 mM de fosfato monoácido de sódio. Para as soluções de PBS-Ca⁺² foi acrescentado 1 mM de cloreto de cálcio.

- Tripsina:

Solução de tripsina 0,25% (m/v) preparada em PBS-A contendo 1 mM de EDTA.

As células foram cultivadas em estufa a 37° C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A manutenção da linhagem foi realizada através da troca do meio de cultura por meio fresco todos os dias e a semeadura foi feita em garrafas de estoque ou placas experimentais. As culturas experimentais foram preparadas por inoculação das células em placas descartáveis de 96 poços. Antes da irradiação, o meio de cultura foi substituído pelo meio de cultura com alimentação deficiente suplementada com 5% de soro fetal bovino. As amostras de cada grupo foram tomadas para análise da atividade mitocondrial 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Dispositivos para Fototerapia

Os equipamentos utilizados para a fototerapia foram: um aparelho de laser de baixa intensidade de alumínio gálio índio fósforo – AlGaInP (Twinflex II - MMOptics

Ltda - São Carlos, SP, Brasil), com uma ponteira de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660nm) com potência de 40mW e a outra ponteira emitindo no comprimento de onda infra-vermelho (780 nm) e potência de 50mW (Figura 3); e um aparelho de LED (protótipo do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo – São Carlos, SP, Brasil) emissor de luz vermelha polarizada não coerente com comprimento de onda vermelho visível ($637 \pm 15\text{nm}$) e potência de 40mW desenvolvido especificamente para o presente estudo (Figura 4).

Todos os ensaios de viabilidade celular foram realizados em placas de 96 poços, semeando-se células da linhagem Balb/c 3T3 (na quinta passagem) na densidade de 5×10^2 células/poço (Figura 5).

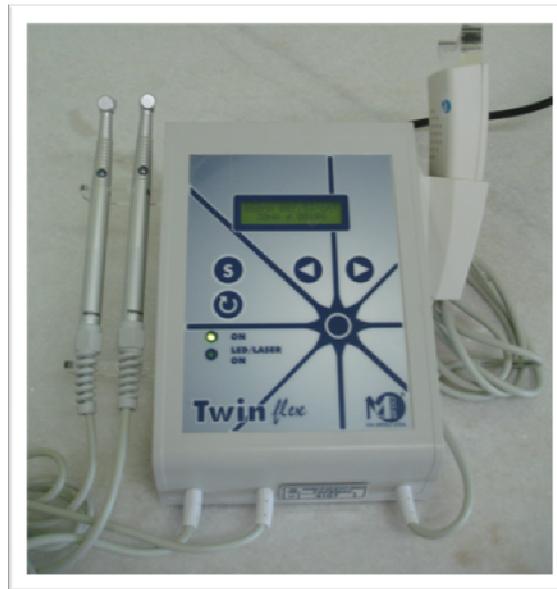


Figura 3 - Aparelho de laser de baixa intensidade Twinflex II (MMOptics Ltda – São Carlos, SP) utilizado no estudo.



Figura 4 - Aparelho de LED (protótipo CePOF/IFSC/USP – São Carlos, SP) utilizado no estudo.

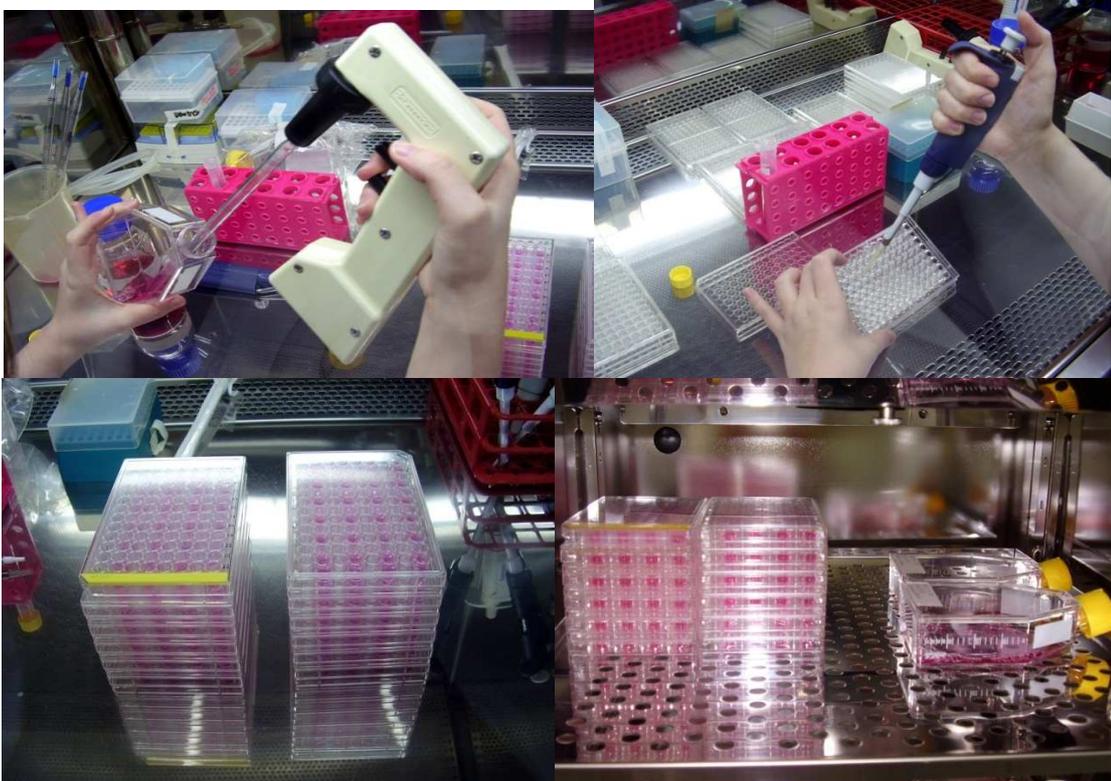


Figura 5 - Manipulação das culturas celulares em capela de fluxo laminar e disposição das placas de 96 poços e garrafas na estufa de CO₂.

Após incubação em estufa de CO₂, foram formados os seguintes grupos:

- Grupo 1: Células sob 5% SFB irradiadas com laser vermelho, comprimento de onda 660nm, potência de 40mW, tempo de 4s.
- Grupo 2: Células sob 5% SFB irradiadas com laser vermelho, comprimento de onda 660nm, potência de 40mW, tempo de 8s.
- Grupo 3: Células sob 5% SFB irradiadas com laser infravermelho, comprimento de onda 780nm, potência de 50mW, tempo de 4s.
- Grupo 4: Células sob 5% SFB irradiadas com laser infravermelho, comprimento de onda 780nm, potência de 50mW, tempo de 8s.
- Grupo 5: Células sob 5% SFB irradiadas com LED, comprimento de onda 637 ± 15nm, potência de 40mW, tempo de 4s.
- Grupo 6: Células sob 5% SFB irradiadas com LED, comprimento de onda 637 ± 15nm, potência de 40mW, tempo de 8s.
- Grupo 7: Células sob 5% SFB, sem intervenção (Controle negativo).
- Grupo 8: Células sob 10% SFB, sem intervenção (Controle positivo).

Dessa forma, dezoito placas de 96 poços foram plaqueadas obedecendo o esquema da Figura 6, sendo seis placas para os grupos irradiados com LED (24h MTT, 48h MTT, 72h MTT, 24h VN, 48h VN, 72h VN); seis placas para os grupos irradiados com laser vermelho (24h MTT, 48h MTT, 72h MTT, 24h VN, 48h VN, 72h VN) e seis placas para os grupos irradiados com laser infravermelho (24h MTT, 48h MTT, 72h MTT, 24h VN, 48h VN, 72h VN). Cada grupo possuía 8 réplicas.

Os poços do grupo “Blank”, visualizados na Figura 6 foram preenchidos com as soluções, porém sem o acréscimo das células, tendo como finalidade apenas a calibração da leitora de microplaca para posterior leitura dos resultados.

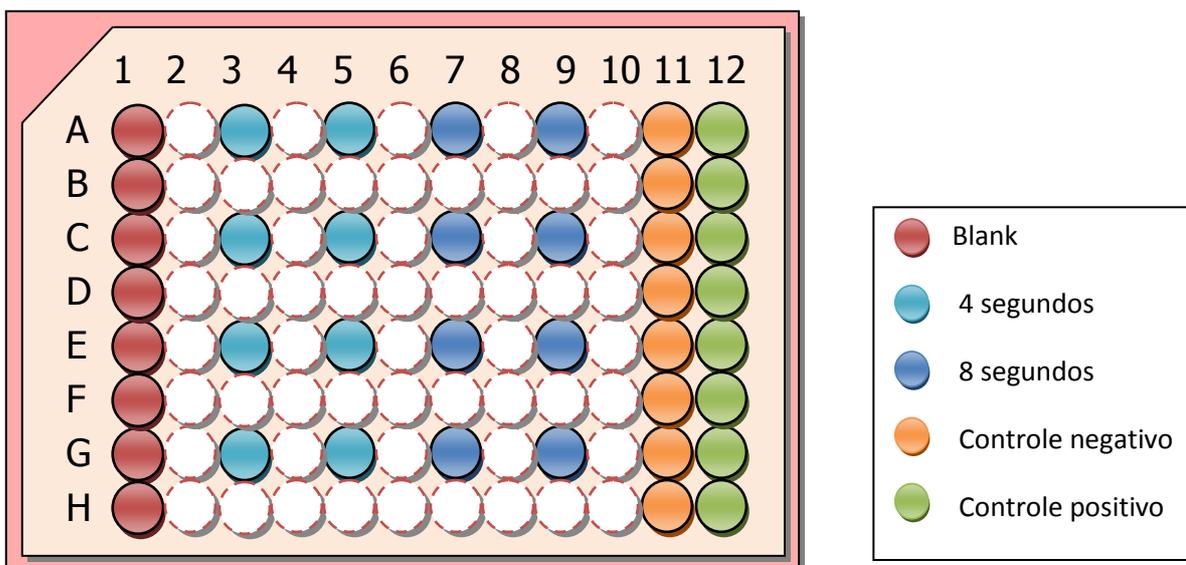


Figura 6 - Distribuição esquemática dos grupos de estudo na placa de 96 poços.

A potência dos aparelhos de laser e LED foi aferida com o LaserCheck Powermeter (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) previamente a cada aplicação.

Todas as amostras sofreram as mesmas induções ambientais como luz, umidade, temperatura e tempo fora da incubadora. A disposição dos poços dos grupos experimentais foi assim determinada (um poço entre cada poço irradiado), para que não houvesse efeito da irradiação dos poços adjacentes.

No momento em que foram realizadas as irradiações com laser e LED, as placas foram envolvidas por uma máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais (Figura 7). Cada orifício era vedado individualmente por uma portinhola também em cartolina negra que permitia que apenas o orifício do poço que estava sendo irradiado permanecesse aberto enquanto todos os outros mantinham-se ao abrigo da luz. Os orifícios da máscara possuíam o diâmetro compatível com a ponta ativa dos dispositivos de laser e LED.

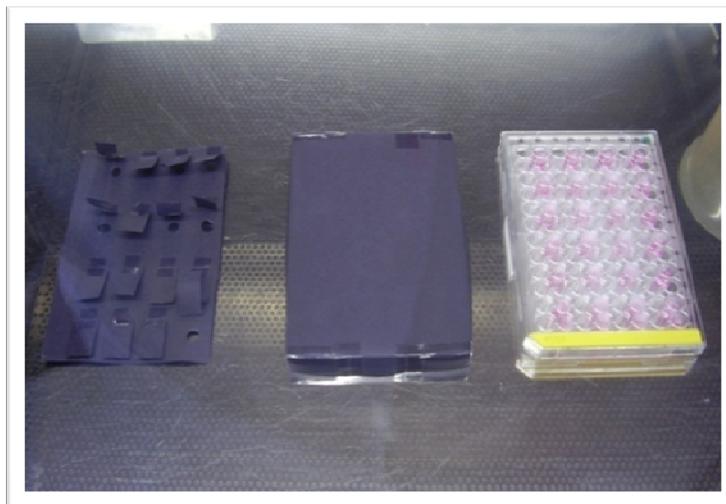


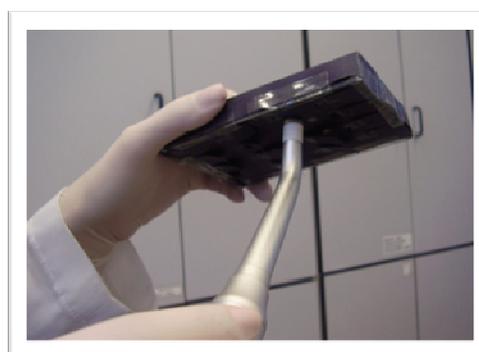
Figura 7 - Máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios individuais que era adaptada à placa de cultura no momento da irradiação.

Sabendo que a distância entre a fonte de luz e a superfície de aplicação é crítica, a aplicação do laser de baixa intensidade e do LED foram feitas através do fundo transparente da placa de 96 poços. Portanto, o raio laser não transpôs o meio de cultura, sendo aplicado diretamente sobre a célula, seguindo a metodologia adotada em outros estudos (AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2007). Além disso, a distância entre o feixe do laser e a monocamada de células foi mantida constante em 1 mm.

No momento da aplicação, as placas foram posicionadas de maneira que a ponta ativa dos aparelhos ficassem totalmente em contato com o fundo dos poços (figuras 8 e 9).



Figuras 8 - Fototerapia com o dispositivo de laser com a máscara ajustada à placa de cultura.



Figuras 9 - Fototerapia com o dispositivo de LED com a máscara ajustada à placa de cultura.

Após a realização da fototerapia, o meio de cultura foi removido nos tempos experimentais pré-determinados (24h, 48h e 72h) e as células lavadas com PBS-A. Então, foram realizados os ensaios de viabilidade celular definidos abaixo.

4.1.1 Redução do MTT

Este ensaio, definido na literatura como apropriado para estimativa de viabilidade celular (HANSEN et al., 1989; SCHWEIKL; SCHMALZ, 1996), baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) têm de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (COSTA et al., 2003; SLETTEN; DAHL, 2003). A atividade mitocondrial foi avaliada, através da incubação das células numa solução de 0,5mg de MTT/ mL de DMEM sem SFB, por 4h, a 37°C; após a remoção da solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em 1mL de etanol/poço, sob agitação suave por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância do extrato alcoólico de cada poço foi mensurado a 570 nm no leitor de fluorescência (Fluostar Óptima – BMG LABTECH – Offenburg, Alemanha) utilizando o programa MARS Data Analysis Software (Figura 10). A função mitocondrial das células viáveis correspondentes a cada tratamento foi calculada em relação ao grupo controle negativo (ausência de tratamento, soro 5%), considerado 100%.

4.1.2 Captação do vermelho neutro (VN)

Este ensaio se baseia na aplicação de um corante (vermelho neutro) que penetra a membrana celular de células vivas, difundindo-se e concentrando-se nos lisossomos. Este ensaio permite a distinção entre células viáveis, danificadas e mortas, baseado na capacidade que os lisossomos celulares têm de absorver o corante. (BORENFREUND; PUENER, 1984). A partir de uma solução estoque de vermelho neutro 0,4% foi obtida uma solução de 50 µg/mL de vermelho neutro em DMEM. A solução obtida permaneceu em estufa 37°C, "overnight" para haver a

precipitação de cristais, sendo então filtrada em filtro Millipore (0,22 μ). As células foram tratadas com essa solução (50 μ g/mL) e as placas incubadas por 3h, a 37°C, para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Elas foram lavadas com PBS-Ca⁺² e o corante extraído numa solução de etanol 50% e ácido acético 1%, colocando-se 1 mL dessa solução/poço. Em seguida, foi determinada a absorbância dos extratos a 540 nm no leitor de fluorescência (Fluostar Óptima – BMG LABTECH – Offenburg, Alemanha) utilizando o programa MARS Data Analysis Software (Figura 10). A viabilidade celular correspondente a cada tratamento foi calculada em relação ao grupo controle negativo (ausência de tratamento, soro 5%), considerado 100%.

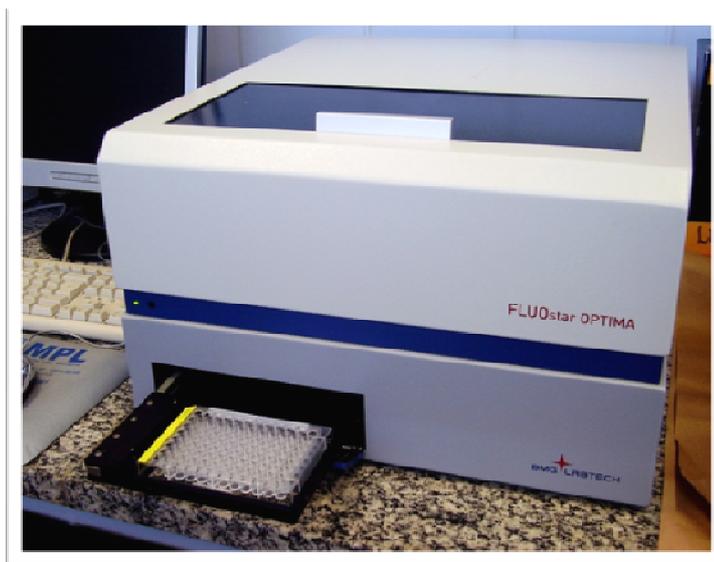


Figura 10 - Leitor de fluorescência (Fluostar Óptima – BMG LABTECH).

4.1.3 Análise Estatística

Os dados obtidos neste período experimental não seguem uma distribuição normal, impossibilitando a realização de comparações de médias. Assim, para sua avaliação, grupos independentes foram comparados utilizando-se a mediana e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. Para avaliar a interação entre as variáveis, realizou-se a análise de variância do modelo linear geral. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5% ($p = 0,05$).

4.2 ENSAIO CLÍNICO

O projeto de pesquisa relacionado ao ensaio clínico realizado neste estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá sob o Registro nº 004/CEP/UNIC/2008 – protocolo nº 0307-179 tendo sido aprovado em 29 de fevereiro de 2008 (ANEXO A).

Esta etapa foi conduzida no Hospital do Câncer de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso. A amostra do estudo foi composta por 30 crianças portadoras de diferentes tipos de neoplasias com idade entre 3 e 18 anos sob tratamento quimioterápico no Setor de Quimioterapia Infantil da unidade hospitalar supracitada no período do estudo cujos pais ou responsáveis tenham aceitado participar da pesquisa e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

Os critérios para exclusão das crianças do estudo foram: não cooperação com o protocolo proposto; estar recebendo drogas ou agentes para prevenir a mucosite bucal; estar envolvido em outros protocolos; estar recebendo agentes fotossensíveis durante o tratamento com laser e LED.

A anamnese foi realizada na presença dos pais e/ou responsáveis e constou de questionamentos sobre a saúde geral do paciente, tipo de câncer, regime terapêutico anti-neoplásico, bem como dados específicos sobre sua condição bucal. Nesse momento foi apresentado aos pais e/ou responsáveis o termo de consentimento para participação no estudo, o qual foi lido e explicado detalhadamente pelo entrevistador. Em caso de aceitação, foi solicitada a assinatura desse documento pelos pais e/ou responsáveis.

Após a realização de cuidadoso exame clínico bucal, quando foi identificada a necessidade de realização de tratamento odontológico cirúrgico ou restaurador, o oncopediatra responsável pelo acompanhamento do voluntário foi consultado para o planejamento do melhor momento para a realização do tratamento. É importante salientar que as crianças que compõem a amostra do estudo estavam sistemicamente debilitadas e, portanto, foram necessários cuidados especiais na realização de procedimentos odontológicos clínicos para evitar ou reduzir a ocorrência de complicações indesejáveis (CHO et al., 2000).

Os tratamentos foram realizados por uma cirurgiã-dentista odontopediatra especificamente designada para o atendimento desses pacientes no Centro Estadual de Odontologia para Pacientes Especiais, instituição vinculada à Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso (ANEXO B).

Previamente a cada consulta para tratamento odontológico as crianças passavam por coleta e exame de sangue e consulta com o oncopediatra. Foi seguida a recomendação de Cho et al. (2000): extração de dentes com prognóstico pobre ou questionável e preenchimento de todas as lesões cariosas com material restaurador provisório.

Foi recomendada higiene bucal diária (BONNAURE-MALLET et al., 1998). Não foi autorizado o uso de antiinflamatórios ou qualquer outra terapia para o tratamento da mucosite bucal. A prescrição de analgésicos, entretanto, foi permitida, mas não nos dois dias anteriores às avaliações (EDUARDO, 2003).

A fototerapia com o laser e LED na etapa clínica seguiu o protocolo proposto por Lizarelli (2005): aplicação preventiva (3 sessões – uma por semana) imediatamente antes do início das terapias oncológicas com comprimento de onda vermelho, potência de saída de 40 mW, densidade de energia de 4,0J/cm² por ponto, através da técnica pontual com ponta convencional durante 5 segundos.

Durante cada sessão, doze áreas anatômicas foram irradiadas: lábio inferior; mucosa labial inferior; lábio superior; mucosa labial superior; mucosa jugal direita e esquerda; bordos laterais da língua; dorso da língua; ventre da língua; palato duro; palato mole e gengiva. Essas áreas foram determinadas devido à maior frequência de aparecimento de mucosite (EDUARDO, 2003). Cada área foi dividida em aproximadamente 10 partes iguais, onde as aplicações foram feitas no ponto central de cada segmento, como estabelecido por Bensadoun (1999).

Os equipamentos utilizados para a fototerapia foram os mesmos utilizados nos ensaios de biocompatibilidade: aparelho de laser de AlGaInP (MMOptics Ltda - São Carlos, SP, Brasil), utilizando apenas a ponteira de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660nm), potência de 40mW; e aparelho de LED (protótipo do Instituto de Física de São Carlos/USP – São Carlos, SP, Brasil) emissor de luz vermelha polarizada não coerente com o comprimento de onda de 637 ± 15 nm e a potência de 40 mW.

Assim, após terem sido considerados aptos para participar do protocolo os voluntários foram distribuídos aleatoriamente, por computador, em dois grupos, a saber:

Grupo I (tratamento com laser): pacientes irradiados com o laser de AlGaInP, com comprimento de onda de 660nm, $2\text{J}/\text{cm}^2$, 40mW de potência, por 5 segundos, com área de $0,5\text{ cm}^2$ na região de focalização e fluência de $4,0\text{ J}/\text{cm}^2$.

Grupo II (tratamento com LED): pacientes submetidos a fototerapia com LED, com comprimento de onda de $637 \pm 15\text{nm}$, 40 mW de potência, por 5 segundos e fluência de $4,0\text{ J}/\text{cm}^2$.

Para tornar o resultado o mais confiável possível, somente o profissional designado para realizar a fototerapia nos pacientes soube de qual grupo o paciente fazia parte.

A fototerapia foi realizada na própria unidade hospitalar onde os pacientes recebiam o tratamento de quimioterapia, no ambulatório do Departamento de Odontologia do Hospital do Câncer de Mato Grosso. Para aqueles pacientes que eventualmente encontravam-se internados no dia previsto para a fototerapia, a mesma era realizada no leito do paciente. A fototerapia foi realizada sempre no período da manhã, respeitando a agenda de tratamento oncológico dos pacientes. Os voluntários permaneceram deitados, dificultando a visualização do equipamento emissor de luz, impedindo-os de saber a qual grupo pertenciam.

Os seguintes princípios de biossegurança foram rigorosamente seguidos: tanto o voluntário como o investigador utilizaram óculos de proteção específicos para o comprimento de onda emitido pelo aparelho, durante todo o tempo em que o laser e o LED permaneceram ligados; do lado de fora da porta do ambulatório em que foi realizada a fototerapia, foi afixado um alerta de que o laser estava sendo utilizado.

Os procedimentos de controle de infecção foram seguidos para proteção de ambos: paciente e investigador. O investigador fez uso de luvas de látex devidamente esterilizadas, a peça de mão e a ponta do laser foram recobertas por filme PVC, no início de cada sessão. Após cada utilização, as peças de mão, mangueiras e o corpo do equipamento foram desinfetados com lenços próprios umedecidos em solução de álcool a 77%.



Figura 11 - Fototerapia utilizando aparelho de LED realizada no próprio leito do voluntário internado, evidenciando os cuidados com a biossegurança.

A avaliação clínica da condição da mucosa bucal dos voluntários foi realizada por um único investigador que desconhecia o grupo a que cada paciente pertencia, evitando interferências em sua avaliação. Os exames clínicos foram realizados semanalmente, por quatro semanas, previamente à fototerapia, e os doze sítios examinados consistiam de: lábio superior, lábio inferior, mucosa labial superior, mucosa labial inferior, mucosa jugal direita, mucosa jugal esquerda, dorso da língua, ventre da língua, lateral da língua, palato duro, palato mole e gengiva.

Para a classificação do tipo de mucosite bucal, utilizou-se o sistema de graduação preconizado pela Organização Mundial de Saúde (BENSADOUN et al., 2001), já apresentado neste trabalho no Capítulo de Revisão de Literatura.

Para avaliar a dor relacionada à mucosite bucal nos voluntários, utilizou-se a Escala de Dor de Faces Revisada (Faces Pain Scale – Revised, FPS-R), juntamente com a escala analógica visual (Visual Analogic Scale, VAS) que quantifica a dor de 0 a 10². A Escala de Dor de Faces Revisada é a escala de dor proposta por Bieri et al. em 1990 (CHAMBERS et al., 1999) para ser utilizada na auto-avaliação de dor em crianças, modificada por Hicks et al. (2001). Com a modificação, a escala que possuía sete rostos, iniciando no rosto que representa uma criança sem dor até o rosto que representa uma criança com muita dor, passou a apresentar seis rostos com o mesmo significado, porém mais fácil de ser ajustada/comparada a escalas do tipo métricas, como a escala analógica visual.

A ficha de avaliação utilizada no presente estudo, com o sistema de graduação da mucosite bucal preconizado pela OMS e a Escala de Dor de Faces Revisada pode ser visualizada no APÊNDICE B.

A pesquisa poderia ser interrompida no caso de toxicidade inaceitável aos tecidos bucais, aumento exacerbado no grau de mucosite, excesso de dor, hemorragias e/ou desejo do paciente.

4.2.1 Análise Estatística

Na análise estatística deste período experimental, novamente grupos independentes foram comparados utilizando-se a mediana e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5% ($p = 0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para que possa haver melhor compreensão, este capítulo abordará as duas etapas realizadas neste estudo separadamente.

5.1 ETAPA LABORATORIAL

Foi verificado que os dados obtidos pela redução do MTT não seguem uma distribuição normal, impossibilitando a realização de comparações de médias. Assim, para sua avaliação, grupos independentes foram comparados utilizando-se a mediana e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5% ($p = 0,05$). Os cálculos deste teste são resumidos nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por grupo (n = 142).

| Grupo | N | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | z | H | p |
|---------------------|-----|---------|--------------------------------|-------|-------|-------|
| Laser infravermelho | 32 | 1,4670 | 86,2 | 2,30 | 15,20 | 0,004 |
| Laser vermelho | 31 | 1,2720 | 86,2 | 2,25 | | |
| LED | 32 | 0,7165 | 55,1 | -2,75 | | |
| Controle negativo | 23 | 1,0180 | 63,8 | -0,99 | | |
| Controle positivo | 24 | 0,9515 | 62,2 | -1,22 | | |
| Total | 142 | | 71,5 | | | |

Observa-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos ensaios utilizando a redução do MTT para os grupos considerados, conforme mostra a Tabela 3. Utilizando um intervalo não paramétrico pareado, foi verificado com 95% de confiança que o grupo em que a cultura celular foi irradiada com o LED é estatisticamente diferente dos grupos irradiados com laser vermelho e laser infra-vermelho. Isto é visualizado na Figura 12.

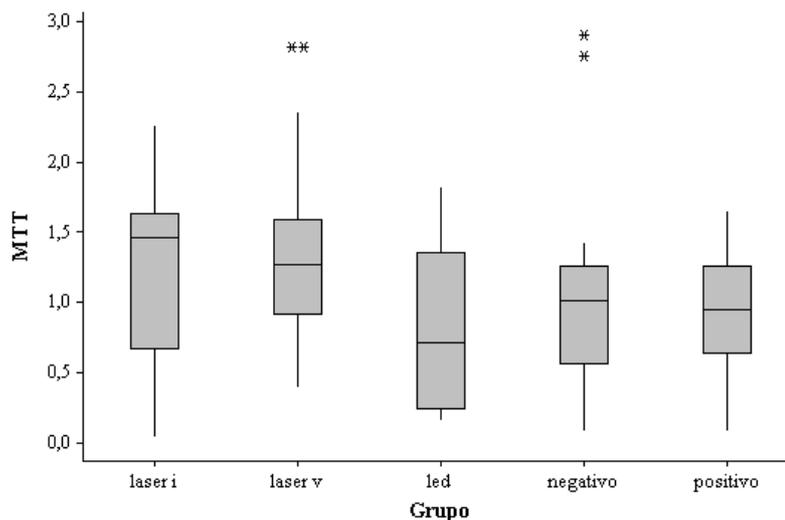


Figura 12 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT por grupo de intervenção.

Na Figura 13 são apresentados os resultados obtidos pela redução do MTT considerando o tempo em que as culturas foram irradiadas pelas diferentes fontes de luz. Nesta figura, observa-se que existe uma tendência de aumento da proliferação celular, demonstrada pelo aumento no escore do MTT, conforme se aumentou o tempo de irradiação de 0 para 4 segundos e para 8 segundos. Este incremento, no entanto, não é estatisticamente significativo, como pode ser observado na Tabela 4.

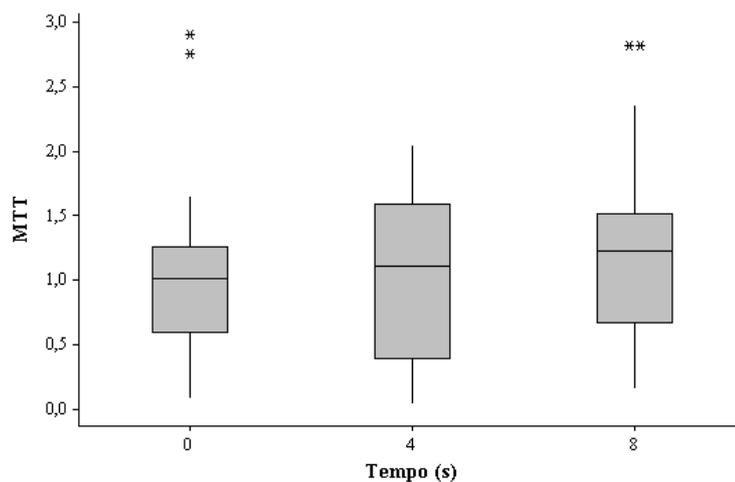


Figura 13 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT segundo o tempo de exposição às diferentes fontes de luz.

Tabela 4 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por tempo de exposição (n = 142).

| Tempo (s) | N | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | z | H | p |
|-----------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| 0 | 47 | 1,009 | 63,0 | -1,74 | 3,69 | 0,158 |
| 4 | 47 | 1,110 | 72,3 | 0,15 | | |
| 8 | 48 | 1,233 | 79,1 | 1,58 | | |
| Total | 142 | | 71,5 | | | |

Tabela 5 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela redução do MTT, por período experimental (n = 142).

| Período experimental (h) | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | z | H | p |
|--------------------------|-----|---------|--------------------------------|-------|-------|--------|
| 24 | 72 | 0,5975 | 50,3 | -6,22 | 38,67 | <0,001 |
| 72 | 70 | 1,2990 | 93,3 | 6,22 | | |
| Total | 142 | | 71,5 | | | |

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram que existe diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos ensaios realizados utilizando a redução do MTT para os períodos experimentais de 24 e 72 horas. Esta diferença pode ser visualizada na Figura 14.

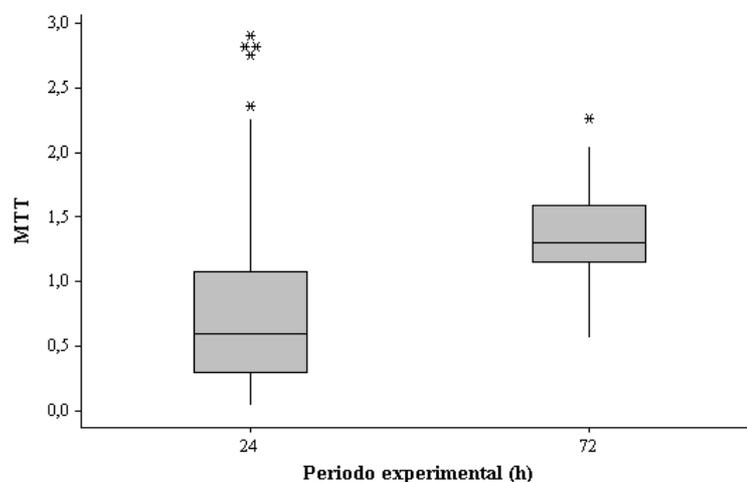


Figura 14 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela redução do MTT de acordo com os períodos experimentais.

A tabela de análises de variância do modelo linear geral para a redução do MTT por período experimental e por grupo de intervenção, assim como a interação entre estes fatores e os valores do desvio padrão do modelo (S) e coeficiente de determinação do modelo (R^2) são apresentados na Tabela 6. Saliente-se que foi verificada a adequação deste modelo utilizando-se uma análise residual.

Tabela 6 - Tabela de análises da variância do modelo linear da redução do MTT por período experimental e por grupo de intervenção.

| Fonte de variação | SQ | GI | SQM | F | P |
|---------------------------------|---------|-----|--------|-------|--------|
| Período experimental | 9,3751 | 1 | 9,3751 | 39,67 | <0,001 |
| Grupo de intervenção | 5,6765 | 4 | 1,4191 | 6,00 | <0,001 |
| Interação entre período e grupo | 7,3056 | 4 | 1,8264 | 7,73 | <0,001 |
| Resíduo | 31,1967 | 132 | 0,2363 | | |
| Total | 53,5539 | 141 | | | |
| S = 0,486147 $R^2 = 41,75\%$ | | | | | |

Os dados apresentados na Tabela 6 demonstram que o aumento na atividade mitocondrial, avaliada pela redução do MTT, depende do período experimental, do grupo de intervenção e da interação destes fatores, sendo que estes efeitos são estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Cabe destacar que, em média, quando o período experimental é analisado separadamente, ao passar de 24 horas para 72 horas, existe um aumento nos valores da redução do MTT, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Observa-se também que, em média, individualmente os valores obtidos pela redução do MTT no grupo irradiado com laser vermelho são os mais elevados ($p < 0,001$) e os valores do grupo irradiado com LED são os mais baixos ($p < 0,001$). As médias obtidas nos ensaios com a redução do MTT para os períodos experimentais de 24 e 72 horas e para os grupos de intervenção (laser infravermelho, laser vermelho, LED, controle positivo e controle negativo) ilustram a Figura 15.

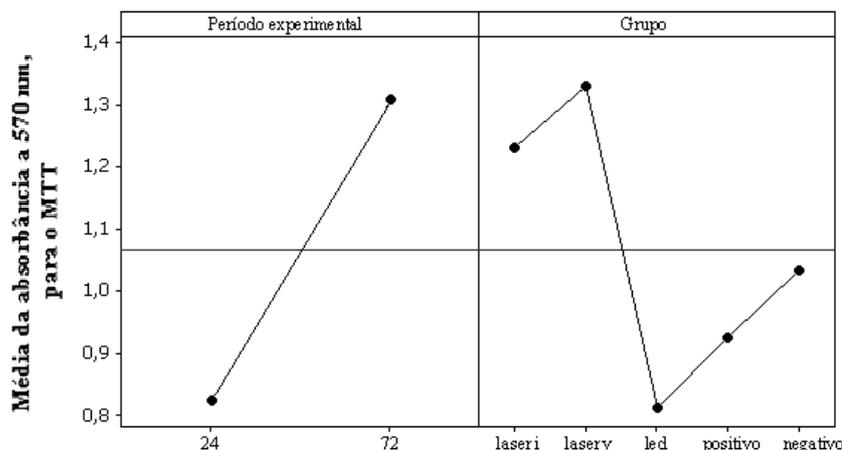


Figura 15 - Médias obtidas pela redução do MTT por período experimental e por grupo de intervenção.

Na Tabela 6 destaca-se uma interação entre os períodos e os grupos considerados, sendo que este efeito foi estatisticamente significativo para o período de 72 horas com o laser infravermelho ($p=0,001$) e com o LED ($p<0,001$), isto é, houve em média um aumento nos valores da redução do MTT; e o laser vermelho causou uma diminuição não estatisticamente significativa com o período de 72 horas ($p=0,137$). A interação entre as médias obtidas para os períodos experimentais de 24 e 72 horas e para os grupos de intervenção (laser infravermelho, laser vermelho, LED, controle positivo e controle negativo) é ilustrada na Figura 16. Cabe observar que neste caso foram considerados como referência o período de 24 horas e o grupo controle negativo.

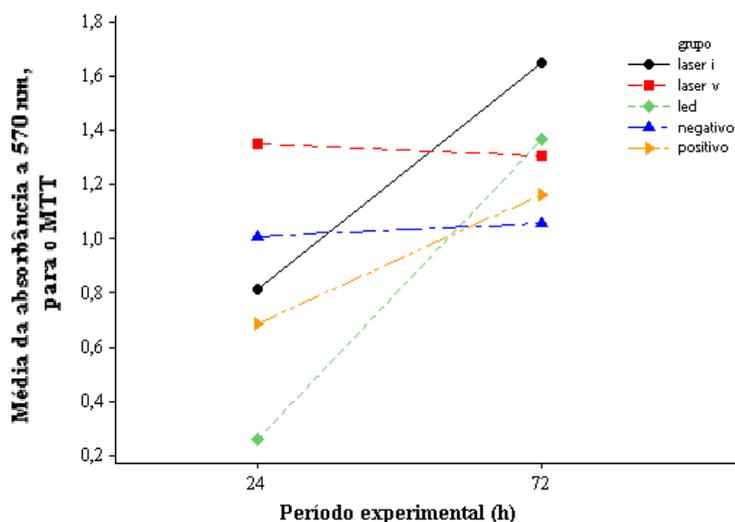


Figura 16 - Interação entre as médias obtidas pela redução do MTT por grupo de intervenção e pelos períodos experimentais (24 e 72 horas).

Assim como os dados obtidos pela redução do MTT, os valores encontrados através da captação do vermelho neutro (VN), também não seguem uma distribuição normal, impossibilitando a realização de comparações de médias. Assim, para sua avaliação, novamente grupos independentes foram comparados utilizando-se a mediana e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre os grupos. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5% ($p = 0,05$). Os cálculos deste teste são resumidos nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por grupo (n = 205).

| Grupo | N | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | z | H | P |
|---------------------|-----|---------|--------------------------------|-------|-------|--------|
| Laser infravermelho | 45 | 0,0520 | 109,1 | 1,13 | 24,86 | <0,001 |
| Laser vermelho | 46 | 0,0325 | 63,5 | -4,94 | | |
| LED | 46 | 0,0480 | 109,3 | 1,18 | | |
| Controle negativo | 33 | 0,0530 | 112,4 | 1,29 | | |
| Controle positivo | 30 | 0,0580 | 117,7 | 1,76 | | |
| Total | 200 | | 100,5 | | | |

Também neste ensaio de viabilidade celular, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos valores para os grupos considerados, conforme mostra a Tabela 7. Utilizando um intervalo não paramétrico pareado, foi verificado com 95% de confiança que o grupo em que a cultura celular foi irradiada com laser no comprimento de onda vermelho é estatisticamente diferente dos outros grupos irradiados com laser infra-vermelho e LED e que os grupos controle positivo e negativo. Isto é ilustrado na Figura 17.

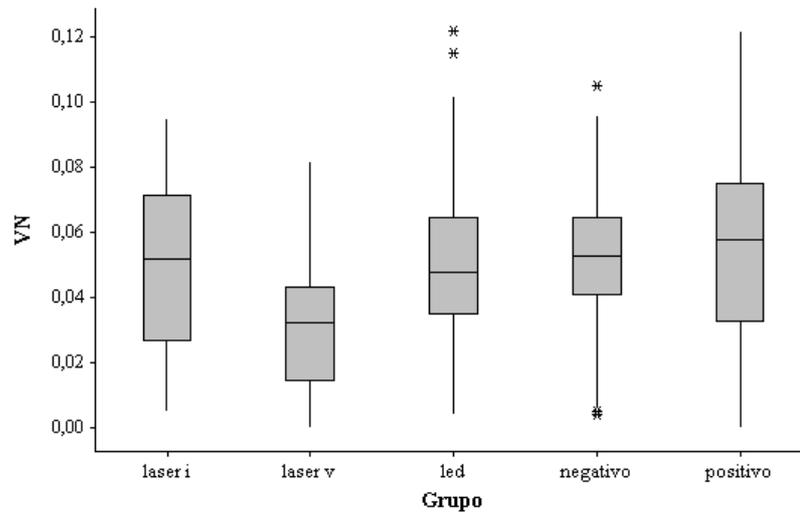


Figura 17 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) por grupo de intervenção.

Os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro considerando o tempo em que as culturas foram irradiadas pelas diferentes fontes de luz são apresentados na Tabela 8. Observa-se que existe uma diminuição na mediana dos valores da captação do vermelho neutro, estatisticamente significativa, conforme se aumenta o tempo de exposição de 0 para 4 segundos e também de 0 para 8 segundos, no entanto este último não é estatisticamente significativo. Isto pode ser visualizado na Figura 18.

Tabela 8 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por tempo de exposição (n = 205).

| Tempo (s) | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-----------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| 0 | 63 | 0,0570 | 114,9 | 2,39 | 6,52 | 0,038 |
| 4 | 68 | 0,0425 | 89,4 | -1,95 | | |
| 8 | 69 | 0,0440 | 98,3 | -0,39 | | |
| Total | 200 | | 100,5 | | | |

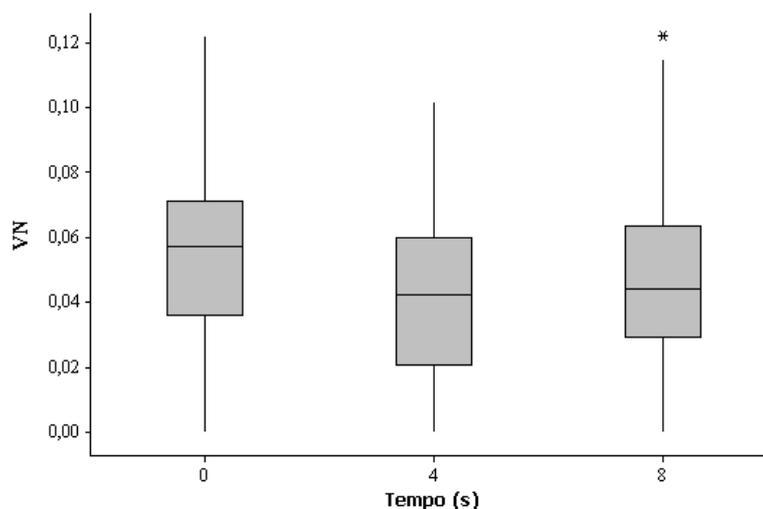


Figura 18 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) segundo o tempo de exposição às diferentes fontes de luz.

A viabilidade celular, avaliada pela captação do corante vermelho neutro nos diferentes períodos experimentais é apresentada na Tabela 9. Observa-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos ensaios realizados para os períodos experimentais quando se passa de 24 horas para 48 e 72 horas, esta diferença pode ser visualizada na Figura 19.

Tabela 9 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela captação do vermelho neutro, por período experimental (n = 200).

| Período experimental (h) | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | z | H | P |
|--------------------------|-----|---------|-----------------------------|-------|-------|--------|
| 24 | 66 | 0,0315 | 73,2 | -4,69 | 22,09 | <0,001 |
| 48 | 66 | 0,0565 | 115,7 | 2,60 | | |
| 72 | 68 | 0,0455 | 112,3 | 2,07 | | |
| Total | 200 | | 100,5 | | | |

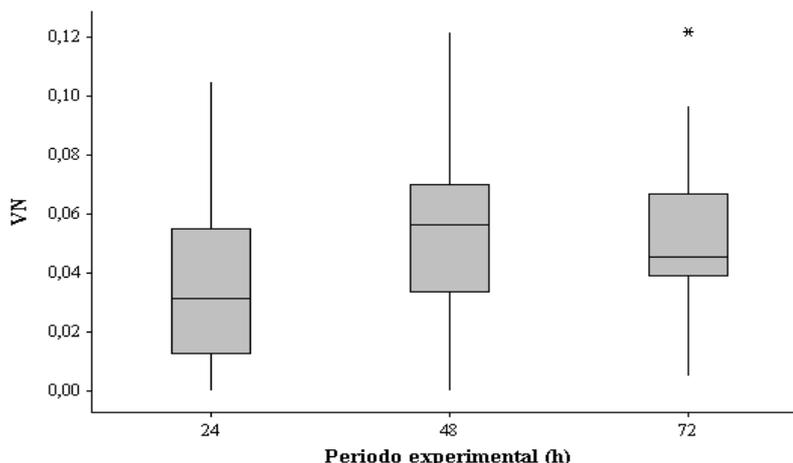


Figura 19 - Box-plots comparando os resultados obtidos pela captação do vermelho neutro (VN) de acordo com os períodos experimentais.

A tabela de análises de variância do modelo linear geral para a captação do vermelho neutro (VN) por período experimental e por grupo de intervenção, assim como a interação entre estes fatores e os valores do desvio padrão do modelo (S) e coeficiente de determinação do modelo (R^2) são apresentados na Tabela 10. Saliente-se que foi verificada a adequação deste modelo utilizando-se uma análise residual.

Tabela 10 - Tabela de análises da variância do modelo linear da captação do vermelho neutro (VN) por período experimental e por grupo de intervenção.

| Fonte de variação | SQ | GI | SQM | F | P |
|---------------------------------|-----------|-----|-----------|-------|--------|
| Período experimental | 0,0152259 | 2 | 0,0068753 | 12,75 | <0,001 |
| Grupo de intervenção | 0,0166907 | 4 | 0,0042604 | 7,90 | <0,001 |
| Interação entre período e grupo | 0,0073416 | 8 | 0,0009177 | 1,70 | 0,100 |
| Resíduo | 0,0997294 | 185 | 0,0005391 | | |
| Total | 0,1389876 | 199 | | | |

S = 0,0232181 $R^2 = 28,25\%$

Os dados apresentados na Tabela 10 demonstram que a atividade lisossômica avaliada pela captação do vermelho neutro (VN) depende estatisticamente ($p < 0,001$) do período experimental e do grupo de intervenção e da interação destes fatores, sendo que estes efeitos conjuntamente não são estatisticamente significantes.

Cabe destacar que, em média quando o período experimental é analisado separadamente, ao passar de 24 horas para 48 e 72 horas, existe um aumento nos valores da captação do vermelho neutro (VN), sendo este aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Observa-se também que, em média, individualmente os valores obtidos pela captação do vermelho neutro no grupo irradiado com o laser vermelho são os mais baixos ($p < 0,001$). As médias obtidas nos ensaios com a captação do vermelho neutro para os períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas e para os grupos de intervenção (laser infravermelho, laser vermelho, LED, controle positivo e controle negativo) ilustram a Figura 20.

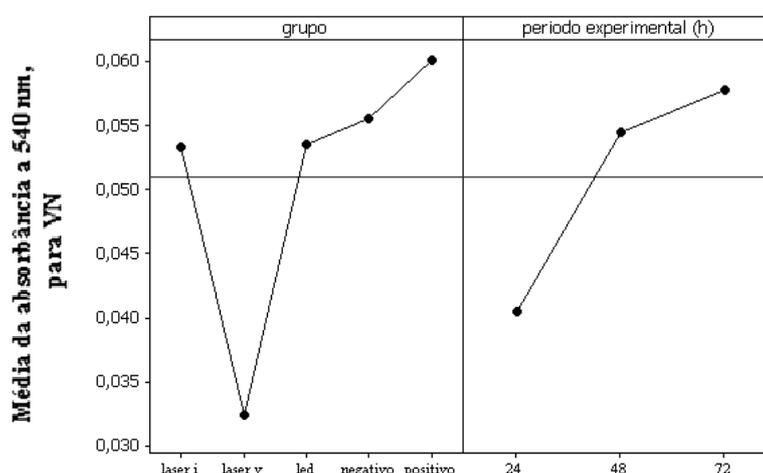


Figura 20 - Médias obtidas pela captação do vermelho neutro por grupo de intervenção e por período experimental.

Como comentado anteriormente, embora seja observado um aumento entre as interações, esse aumento não é estatisticamente significativo. Apenas a interação do período de 48 horas com o grupo irradiado com o LED foi estatisticamente significativa ($p=0,001$), isto é, houve em média um aumento no resultado da captação do vermelho neutro. A interação entre as médias obtidas para os períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas e para os grupos de intervenção (laser infravermelho, laser vermelho, LED, controle positivo e controle negativo) é ilustrada na Figura 21. Cabe observar que também neste caso também foram considerados como referência o período de 24 horas e o grupo controle negativo.

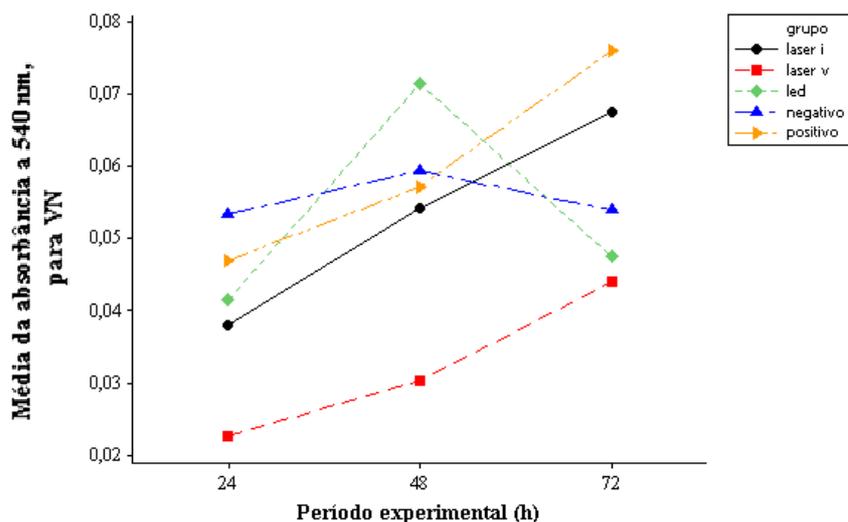


Figura 21 - Interação entre as médias obtidas pela captação do vermelho neutro por grupo de intervenção e pelos períodos experimentais (24, 48 e 72 horas).

5.2 ETAPA CLÍNICA

A amostra dos voluntários que participaram da etapa clínica da pesquisa ($n = 30$) foi composta por 15 meninos e 15 meninas distribuídos entre os grupos de intervenção com laser e LED, sendo que o grupo irradiado com o laser apresentou 8 (53,33%) meninos e 7 (46,67%) meninas e o grupo irradiado com o LED apresentou 7 (46,67%) meninos e 8 (53,33%) meninas.

Tabela 11- Número de pacientes, média e desvio-padrão das idades, por grupo ($n = 30$).

| Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Mínimo-máximo |
|-------|----|-------|---------------|---------|---------------|
| Laser | 15 | 9,77 | 3,68 | 10 | 3-15 |
| LED | 15 | 11,25 | 4,79 | 12 | 4-18 |
| Total | 30 | 10,48 | 4,22 | 10 | 3-18 |

A idade dos pacientes variou de 3 a 18 anos, com média \pm desvio padrão de $10,48 \pm 4,22$ anos e mediana de 10 anos (Tabela 11). A idade média \pm desvio padrão dos pacientes irradiados com o laser foi de $9,77 \pm 3,68$ anos e mediana de 10 anos, dos pacientes irradiados com o LED foi $11,25 \pm 4,79$ anos e mediana de 12 anos.

A análise estatística de cada área anatômica irradiada semanalmente foi feita separadamente e o nível de mucosite bucal apresentado pelos voluntários está apresentado nas tabelas 12 a 23. Vale observar que dois voluntários do grupo irradiado com laser e três voluntários do grupo irradiado com LED foram impedidos de comparecer no dia marcado para fototerapia e análise clínica. Esses pacientes foram excluídos do estudo, os exames clínicos realizados anteriormente à sua exclusão, no entanto, foram considerados e fazem parte dos resultados apresentados a seguir.

A comparação entre os valores obtidos na análise da incidência e severidade da mucosite bucal apresentada pelos voluntários distribuídos nos grupos irradiados com o laser e o LED foi realizada utilizando-se a mediana e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com o nível de significância de 5% ($p = 0,05$), nenhum dos sítios anatômicos apresentou diferença estatisticamente significativa quando irradiado com as diferentes fontes de luz.

Tabela 12 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em lábio inferior, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,0 | -0,35 | 0,12 | 0,727 |
| LED | 51 | 0,000 | 53,0 | 0,35 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 13 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em lábio superior, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,0 | -0,34 | 0,12 | 0,732 |
| LED | 51 | 0,000 | 53,0 | 0,34 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 14 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa labial superior, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 50,5 | -0,51 | 0,26 | 0,607 |
| LED | 51 | 0,000 | 53,5 | 0,51 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 15 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa labial inferior, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 49,5 | -0,87 | 0,75 | 0,386 |
| LED | 51 | 0,000 | 54,6 | 0,87 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 16 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa jugal direita, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 50,5 | -0,51 | 0,26 | 0,607 |
| LED | 51 | 0,000 | 53,5 | 0,51 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 17 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em mucosa jugal esquerda, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,9 | -0,02 | 0,00 | 0,984 |
| LED | 51 | 0,000 | 52,1 | 0,02 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 18 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica no dorso de língua, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,0 | -0,34 | 0,12 | 0,732 |
| LED | 51 | 0,000 | 53,0 | 0,34 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 19 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica na borda lateral de língua, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 49,0 | -1,03 | 1,06 | 0,303 |
| LED | 51 | 0,000 | 55,1 | 1,03 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 20 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em ventre de língua, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,5 | -0,18 | 0,03 | 0,859 |
| LED | 51 | 0,000 | 52,5 | 0,18 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 21 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em palato duro, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 50,0 | -0,69 | 0,47 | 0,493 |
| LED | 51 | 0,000 | 54,0 | 0,69 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 22 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em palato mole, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,5 | -0,17 | 0,03 | 0,864 |
| LED | 51 | 0,000 | 52,5 | 0,17 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 23 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela inspeção clínica em gengiva, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 0,000 | 51,4 | -0,20 | 0,04 | 0,838 |
| LED | 51 | 0,000 | 52,6 | 0,20 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Os resultados relacionados à dor encontrados no estudo utilizando a Escala de Dor de Faces Revisada (HICKS et al., 2001) associada à escala analógica visual estão apresentados nas tabelas 24 a 26. Assim como ocorreu no exame da condição clínica da mucosa bucal dos pacientes, uma vez que a análise da inflamação e a análise da dor eram realizadas conjuntamente, os mesmos pacientes que foram impedidos de serem submetidos à fototerapia ao exame clínico bucal, também o foram da análise da dor, sendo novamente excluídos do estudo. Os dados referentes à dor relatada por esses voluntários obtidos anteriormente à sua exclusão, no entanto, foram considerados e fazem parte dos resultados apresentados a seguir.

Tabela 24 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor bucal presente antes da fototerapia nos pacientes, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 1,000 | 51,1 | -0,30 | 0,09 | 0,767 |
| LED | 51 | 1,000 | 52,9 | 0,30 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Tabela 25 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor bucal presente após a fototerapia nos pacientes, por grupo (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Laser | 52 | 1,000 | 51,0 | -0,33 | 0,11 | 0,742 |
| LED | 51 | 1,000 | 53,0 | 0,33 | | |
| Total | 103 | | 52,0 | | | |

Os dados relativos à dor bucal relatada pelos pacientes antes e após a irradiação com laser e LED são apresentados nas tabelas 24 e 25. Pode ser observado que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, seja antes ou após a fototerapia.

Tabela 26 - Cálculos necessários para realizar o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos pela análise da dor, antes e após a fototerapia (n = 103).

| Grupo | n | Mediana | Posto médio (\bar{R}_i) | Z | H | P |
|-------------|-----|---------|--------------------------------|-------|------|-------|
| Dor inicial | 103 | 1,000 | 103,6 | 0,02 | 0,00 | 0,982 |
| Dor final | 103 | 1,000 | 103,4 | -0,02 | | |
| Total | 206 | | 103,5 | | | |

Da mesma forma, não há diferença estatisticamente significativa entre a dor relatada antes ou após o procedimento de fototerapia.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Desde a introdução da fotobiomodulação na medicina, a eficácia e a aplicabilidade de uma variedade de fontes de luz para o tratamento de diferentes condições clínicas tem sido exaustivamente investigadas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados das pesquisas, no entanto, são extraordinariamente contraditórios. Algumas razões para as contradições são a ampla gama de indicações para a fototerapia, a quantidade de diferentes parâmetros de irradiação utilizados, a impossibilidade de medir os prováveis efeitos pós-irradiação com a necessária objetividade e mesmo a falta de compreensão teórica sobre essa intervenção (VINCK et al., 2003).

Apesar disso, os lasers de baixa intensidade e os díodos emissores de luz (LEDS) são ferramentas terapêuticas bem aceitas no tratamento de feridas infectadas, isquêmicas, hipóxicas e outras alterações em tecido mole (WHELAN et al., 2001). Outras fontes de luz foram propostas como alternativa ao laser, especialmente devido ao custo mais baixo, porém os dispositivos baseados em LEDs têm sido apresentados como a principal alternativa, e, apesar do LED não ser uma fonte monocromática, ele mostra uma emissão em bandas mais restritas, em comparação com as lâmpadas convencionais (CORAZZA et al., 2007).

Esta característica também pode ser interpretada como uma vantagem do LED em relação ao laser, visto que comprimentos de onda combinados não podem ser facilmente reproduzidos com o laser, e a colimação do feixe torna difícil tratar grandes áreas. Além disso, o laser emite uma quantidade de calor, que tem potencial para produzir dano tecidual (DESMET et al., 2006).

Inicialmente desenvolvidos pela NASA (sigla em inglês de *National Aeronautics and Space Administration*; Administração Nacional do Espaço e da Aeronáutica), para experimentos de crescimento de plantas no espaço, os LEDs produzem luz em comprimentos de onda que vão do extremo-vermelho ao infravermelho próximo em ótimas densidades de energia. Os aparelhos podem ser construídos em vários tamanhos para irradiar grandes áreas e não emitem qualquer calor, o que elimina o risco de danos teciduais (DESMET et al., 2006). Além disso, a luz LED terapêutica tem sido considerada de risco não significativo pela FDA (sigla

em inglês de *Food and Drug Administration*; Administração Federal de Alimentos e Medicamentos) e foi aprovada para uso em seres humanos (DESMET et al., 2006).

Ainda não estão disponíveis no mercado brasileiro dispositivos de LED terapêutico para utilização em Odontologia. Por essa razão foi utilizado um protótipo desenvolvido especificamente para este estudo pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo (IFSC/USP) o qual emite luz com características similares às do aparelho de laser também utilizado neste estudo (Twinflex II - MMOptics Ltda), levando em conta o protocolo de aplicação clínica para prevenção de mucosite bucal proposto por Lizarelli (2005).

Como o aparelho de laser Twinflex utilizado no estudo dispõe, além da ponteira de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660 nm) com potência de 40mW (parâmetros indicados para a prevenção da mucosite bucal), de outra ponteira emitindo no comprimento de onda infra-vermelho (780 nm) com potência de 50mW, outro grupo experimental utilizando estes parâmetros foi incluído na etapa experimental de fototerapia nas culturas de fibroblastos.

A terapia com luz em baixa intensidade utilizando-se regiões do espectro que vão do extremo-vermelho ao próximo do infra-vermelho (630nm a 1000 nm) modula numerosas funções celulares (DESMET et al., 2006) e foram demonstrados eficazes no processo de estímulo biológico (WHELAN et al., 2001). Os efeitos positivos da fotobiomodulação incluem aceleração da cicatrização e até melhora na recuperação de lesão isquêmica do coração (WHELAN et al., 2001).

Outro parâmetro que interfere na forma com que a energia luminosa é concentrada no local de aplicação é o diâmetro da ponteira aplicadora. Enquanto lasers são colimados, a luz LED diverge ao deixar a fonte, dificultando a concentração de toda a energia em um mesmo local (BOZKURT; ONARAL, 2004). Tal divergência é apontada como um dos trunfos para o uso do LED em substituição ao laser, pois possibilita cobrir maiores áreas de tecido (sadio ou lesado) com uma única aplicação, diferentemente do laser (SACONO et al., 2008). Além disso, a luz focada tem maior irradiância que a luz não-focada, fazendo com que o prejuízo potencial aumente com a focalização. Também sob esse aspecto, o LED é mais seguro que o laser, oferecendo menor risco aos olhos e à pele (BOZKURT; ONARAL, 2004).

Neste estudo a propriedade de divergência da luz não foi avaliada uma vez que buscou-se assemelhar ao máximo a fototerapia com as duas fontes de luz. Para suprimir a característica de divergência da luz do LED, em ambos os períodos experimentais, tanto o laser como o LED foram aplicados em contato com a superfície; sendo que na etapa laboratorial com o fundo da placa de cultura celular e na etapa clínica com a mucosa dos voluntários. Entretanto, apesar de não ter sido explorada neste estudo, a divergência da luz LED é uma característica que deve ser avaliada em trabalhos futuros.

Apesar dos numerosos exemplos de benefícios clínicos potenciais da fototerapia, os mecanismos intracelulares responsáveis por estes benefícios não foram completamente elucidados. Assim, torna-se crítico analisar a resposta de células epiteliais em cultura à fototerapia utilizando diferentes parâmetros ante diferentes situações de crescimento em um esforço para identificar processos responsáveis pelos benefícios observados (EDUARDO et al., 2007).

Progressos impressionantes estão sendo realizados nas ciências biomédicas no último século, graças aos modelos experimentais *in vitro* (SORAGGI, 2006). Adicionalmente aos interesses científicos envolvidos no desenvolvimento de métodos alternativos nos programas de avaliação de toxicidade, há também as questões éticas, as quais justificam a necessidade da redução do uso de modelos animais em experimentação (WORTH; BALLS, 2002; BOO; HENDRIKSEN, 2005).

As técnicas *in vitro*, utilizando culturas de células e sistemas biológicos modelo constituem-se ferramenta de grande relevância em pesquisa e desenvolvimento (SORAGGI, 2006). Comparando-se com os testes *in vivo*, apresentam vantagens significativas, tais como: simplicidade, rapidez, diminuição dos custos efetivos e minimização do uso de animais e da implicação ética com ele associada (SORAGGI, 2006).

A ISO é uma organização internacional, composta de vários comitês, que visa à padronização de procedimentos. A ISO 10993 é uma combinação de vários documentos de padronização, cujo objetivo é estabelecer um guia para a avaliação da biocompatibilidade e respostas biológicas relevantes de materiais e dispositivos médicos. O primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade (ISO 10993-5, 1999) é a determinação da viabilidade celular *in vitro*. Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e

apresentam melhor reprodutibilidade (SCHMALZ et al., 1994; CHU, 1995; FRESHNEY, 2000).

Habitualmente avalia-se a citotoxicidade basal, isto é, aquela que afeta estruturas e funções comuns a todas as células do organismo, como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as específicas (BARILE, 1994). Os estudos de viabilidade celular se baseiam, portanto, no estudo de parâmetros relacionados às funções celulares basais. Existe um vasto número de testes *in vitro* sendo que cada um consiste basicamente de três componentes: (a) o sistema biológico; (b) o contato célula/material (c) o resultado a ser aferido (“*endpoint*”). Normalmente, o sistema biológico utilizado *in vitro* é o de cultura de células, podendo ser utilizadas células de linhagem permanente ou de cultura primária (SCHMALZ, 1994).

A ISO 10993-5 recomenda a utilização de células de linhagens permanentes para a realização de ensaios de viabilidade celular, visando-se padronizar os ensaios permitindo a sua reprodutibilidade. Esta norma da ISO recomenda algumas linhagens celulares permanentes da “American Type Culture Collection” (ATCC): L-929, Balb/c 3T3, MRC-5, WI-38, Vero, BHK-21 e V-79.

Nos ensaios de viabilidade celular do presente estudo foram utilizadas células Balb/c 3T3, fibroblastos de embrião de camundongo, seguindo a recomendação da norma ISO 10993-5, linhagem viabilizada junto ao Laboratório de Transdução de Sinal do Instituto de Biologia da Unicamp.

Foi postulado que em nível celular, a fototerapia pode modular a adesão e síntese de colágeno e procolágeno, promover a angiogênese, e estimular macrófagos e linfócitos e modular a proliferação de fibroblastos melhorando o metabolismo energético dentro da mitocôndria (DESMET et al., 2006). Outros efeitos do estímulo pelos lasers de baixa intensidade são aumento da taxa de proliferação e migração celular (ZHANG et al., 2009.). Muitos trabalhos destacam o efeito dos lasers de baixa intensidade sobre as mitocôndrias (GAO; XIG, 2009; KAŠŠÁK et al., 2005) e em algumas moléculas sinalizadoras (c-fos, ciclina A, ciclina E e ciclina D1) dos processos de mitose (GAO; XIG, 2009). Nossos resultados parecem confirmar esses trabalhos da literatura uma vez que notamos um efeito positivo (aumento da proliferação, constatados indiretamente pelos testes de MTT e vermelho neutro) nos fibroblastos tratados.

Neste estudo a viabilidade dos fibroblastos foi avaliada pela redução do MTT que indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (COSTA et al., 2003; SLETTEN; DAHL, 2003).

Para simular as condições de stress *in vivo* em que a fototerapia tem mostrado efeito, as células dos grupos submetidos a ela foram cultivadas em déficit nutricional. Esta situação *in vitro* provoca stress que é potencialmente semelhante ao stress *in vivo* (DAMANTE, 2007). Estas condições nutricionais devem não abolir totalmente o crescimento celular, mas só reduzir a taxa de crescimento. Então, o efeito sobre as taxas de crescimento para as células cultivadas sob estas condições podem ser medidas quando as células são expostas à fototerapia (EDUARDO et al., 2007). Os efeitos da fototerapia com laser de baixa intensidade no crescimento de células cultivadas sob tais condições foram descritos anteriormente (AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2007; DAMANTE 2007). Em condição de déficit nutricional, a exposição ao laser parece ser capaz de estimular o crescimento de fibroblastos (EDUARDO et al., 2007).

No presente trabalho, foi observado que, considerando as medianas dos ensaios utilizando a redução do MTT, a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa, sendo que o grupo irradiado com LED apresentou o menor escore, seguido pelo grupo controle positivo, grupo controle negativo, laser vermelho e, com o maior escore, o grupo irradiado com o laser infravermelho. Já considerando o tempo em que as culturas foram irradiadas pelas diferentes fontes de luz, foi observada uma tendência de aumento da proliferação celular relacionado diretamente com o tempo de irradiação (0, 4 e 8 segundos), no entanto, não significativa estatisticamente. Quanto aos períodos experimentais, houve uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos ensaios realizados nos períodos experimentais de 24 e 72 horas, estando nesta o maior escore.

A análise das medianas é importante e necessária visto que os dados obtidos pela redução do MTT não seguem uma distribuição normal, impossibilitando a realização de comparações de médias. Nessa análise, foi particularmente interessante observar a tendência de aumento da proliferação celular com o aumento do tempo de exposição à luz que, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, mostra clara tendência de aumento da proliferação com o aumento do tempo de irradiação (e conseqüente aumento da dose).

Também se observou que, quando a variável período experimental é analisada independentemente, a taxa de proliferação dos fibroblastos é consideravelmente maior no período de 72 horas quando comparada com o período de 24 horas. Isso demonstra que a fototerapia não interferiu negativamente na proliferação celular e que os fibroblastos mantiveram-se viáveis durante todo o período experimental.

Já quando os resultados da redução do MTT são submetidos à análise de variância, observa-se que o aumento na atividade mitocondrial depende do grupo de intervenção, do período experimental e também da interação desses fatores, sendo que esses efeitos são estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Analisados separadamente, novamente ao passar de 24 horas para 72 horas, em média, existe um aumento estatisticamente significativo nos valores da redução do MTT ($p < 0,001$).

Também separadamente, em média, os valores obtidos no grupo irradiado com laser vermelho são os mais elevados ($p < 0,001$) e os valores do grupo irradiado com LED são os mais baixos ($p < 0,001$). Este resultado contrariou a análise realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde o grupo irradiado com laser infravermelho obteve os valores mais elevados. Isto é explicado pela interação encontrada entre os períodos e os grupos considerados, efeito este estatisticamente significativo para o período de 72 horas com o laser infravermelho ($p = 0,001$) e com o LED ($p < 0,001$). Pode ser visualizado na Figura 16 que a razão do grupo irradiado com o LED apresentar a menor média de proliferação é que os valores obtidos no período de 24 horas foram muito baixos, por outro lado, este grupo foi o que apresentou maior acréscimo na proliferação celular do período de 24 para o de 72 horas, apresentando no período de 72 horas score mais elevado que o do grupo irradiado com laser vermelho. O grupo irradiado com laser vermelho, por sua vez, foi o único que apresentou discreta queda na proliferação celular do período de 24 para 72 horas.

Após 72 horas, os grupos que apresentaram maior proliferação celular, avaliada pela redução do MTT foram: grupo irradiado com laser infravermelho, grupo irradiado com LED, grupo irradiado com laser vermelho, grupo controle positivo e grupo controle negativo. Salienta-se que os resultados dos grupos irradiados com LED e com laser vermelho foram bastante semelhantes. Isso sugere que os parâmetros utilizados na irradiação do grupo de intervenção com laser infravermelho

foi mais favorável para a proliferação dos fibroblastos. A semelhança dos resultados dos grupos irradiados com laser vermelho e LED, que utilizaram parâmetros similares, também sugere que a coerência da luz foi um fator que não interferiu na proliferação celular. Finalmente, o fato de os três grupos irradiados apresentarem resultados melhores que os grupos controle positivo e controle negativo após 72 horas nos permite inferir que a fotobiomodulação produzida com as diferentes fontes de luz proporcionou maior proliferação celular que a não intervenção.

Tal conclusão foi baseada no fato de que quando as células são cultivadas em meio de cultura suplementado com concentrações reduzidas de soro fetal bovino (meio de cultura com déficit nutricional), sua taxa de crescimento é diminuída (EDUARDO et al., 2007; AZEVEDO et al., 2006; DAMANTE, 2007). Entretanto, no presente trabalho apenas o grupo controle positivo teve suplementação ideal, sendo que os demais grupos foram suplementadas com soro fetal bovino a 5%, ou seja, com déficit nutricional. Não obstante, todos os grupos irradiados apresentaram maior proliferação fibroblástica que o grupo controle positivo.

Esse resultado vai ao encontro dos estudos de Eduardo et al. (2007) e Azevedo et al. (2006) que demonstraram que a aplicação de laser de baixa intensidade é capaz de aumentar a taxa de crescimento de células epiteliais sob condições nutricionais deficientes.

Entretanto, no estudo de Eduardo et al. (2007), a irradiação com laser não foi capaz de induzir as culturas celulares a atingir sua taxa de crescimento celular potencial para a mesma linhagem cultivada sob condições nutricionais normais enquanto que no presente trabalho, tanto as culturas irradiadas com laser como as irradiadas com LED superaram o crescimento das células cultivadas em condições nutricionais normais do grupo controle positivo.

Resultado semelhante também foi encontrado por Vinck et al. (2003) que analisaram a proliferação de fibroblastos após irradiação com laser e LED nos comprimentos de onda de 950 nm, 660 nm e 570 nm. A taxa de proliferação foi maior ($p < 0,001$) em todos as culturas irradiadas, em comparação com os controles, sugerindo efeitos benéficos da irradiação com LED e laser em nível celular.

Neste trabalho, além do ensaio de redução do MTT, a viabilidade celular também foi avaliada pela capacidade dos lisossomos em absorver o corante vermelho neutro.

Considerando as medianas dos ensaios utilizando a captação do vermelho neutro, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo irradiado com laser no comprimento de onda vermelho e os demais grupos, sendo o valor obtido pelo grupo irradiado com laser vermelho inferior aos demais. Acerca do tempo de irradiação, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na mediana dos valores da captação do vermelho neutro conforme se aumenta o tempo de exposição de 0 para 4 segundos e não significativa de 0 para 8 segundos. Quanto aos períodos experimentais, houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos ensaios realizados nos períodos experimentais de 24 horas. Contudo, para 48 e 72 horas a diferença não foi estatisticamente significativa.

Através dos resultados encontrados, observa-se que o aumento no tempo de exposição às diferentes fontes de luz não proporcionou aumento na atividade lisossômica das células cultivadas. De fato, o tempo de exposição que se destacou dos demais pela maior atividade foi justamente o tempo 0, cujas células não haviam sido irradiadas.

A variável período experimental, analisada independentemente, apresentou atividade lisossômica estatisticamente maior nos períodos de 48 e 72 horas comparativamente ao período de 24 horas, demonstrando que a fototerapia também não interferiu negativamente na atividade dos lisossomos.

Quando os resultados da captação do corante vermelho neutro são submetidos à análise de variância, observa-se que o aumento na atividade lisossômica depende do grupo de intervenção e do período experimental, no entanto, a interação entre essas variáveis não é estatisticamente significativa. Analisados separadamente, novamente ao passar de 24 horas para 48 e 72 horas, em média, existe um aumento estatisticamente significativo nos valores da captação do vermelho neutro ($p < 0,001$).

Na Figura 21 pode ser observado que após 72 horas, a atividade lisossômica de todos os grupos de intervenção foi menor que a do grupo controle positivo, em que as células foram cultivadas em condições nutricionais ideais. Dentre os grupos

cultivados em déficit nutricional, o grupo de laser infravermelho foi o que apresentou maior escore, seguido do grupo controle negativo e dos grupos irradiados com LED e laser vermelho. Da mesma forma que ocorreu com os resultados da redução do MTT, na captação do vermelho neutro após 72 horas os grupos irradiados com laser vermelho e LED, que utilizaram parâmetros similares, novamente apresentaram resultados bastante semelhantes, sendo que novamente o LED apresentou resultados ligeiramente maiores que o laser vermelho. Os resultados sugeriram que a coerência da luz também não interferiu na atividade lisossômica das culturas de fibroblasto.

Utilizando a metodologia da captação do vermelho neutro, o resultado encontrado assemelhou-se ainda mais aos resultados encontrados por Eduardo et al. (2007), em que nenhum dos grupos cultivados sob déficit nutricional alcançou a proliferação celular obtida pelo grupo controle não irradiado cultivado sob condições normais de nutrição. O trabalho de Eduardo et al. (2007), no entanto, aferiu a proliferação celular pela redução do MTT.

A taxa maior de proliferação celular após a fototerapia encontrada pela redução do MTT comparativamente à encontrada pela captação do vermelho neutro pode ser mais um sinal do incremento da atividade mitocondrial relacionado à fotobiomodulação, conforme descrito por outros autores (KARU, 2003; WONG-RILEY et al., 2005; DESMET et al., 2006).

Outra semelhança significativa com o trabalho de Eduardo et al. (2007) é que foi encontrada melhora no crescimento das células após a fototerapia aparentemente independente do comprimento de onda utilizado. No entanto, houve uma tendência para um aumento mais acentuado na taxa de crescimento quando o laser infravermelho (780 nm) foi utilizado. No presente trabalho, nos dois ensaios de viabilidade celular realizados, o laser infravermelho mostrou-se como a intervenção que mais elevou a atividade de mitocôndrias e lisossomos, refletindo em maior proliferação celular. Outros trabalhos da literatura sustentam nossos resultados demonstrando aumento na proliferação celular com a irradiação com lasers de baixa intensidade, em especial os vermelhos e próximos ao infravermelho (GAO; XIG, 2009).

Em estudo conduzido por Corazza et al. (2007), foram comparados os efeitos de fontes de luz coerente e não-coerente sobre a formação vascular e o fechamento

de feridas induzidas, utilizando dois níveis de fluência, 5 e 20 J/cm². Os dispositivos fototerapêuticos utilizados pelos autores foram bastante semelhantes aos utilizados neste estudo: laser diodo emitindo 660 nm e dispositivo de LED emitindo 635 nm. O estímulo produzido pela luz coerente ou não-coerente promoveu alta resposta angiogênica, aumentando o número e o diâmetro dos vasos sanguíneos e, provavelmente, contribuindo para o aumento do fluxo de sangue e fornecimento de melhor perfusão sanguínea, bem como drenagem linfática de resíduos metabólicos da área afetada. Isso levou os autores a concluir que a coerência da luz provavelmente não é um fator relevante no efeito angiogênico fotoinduzido.

Os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade celular, utilizando duas metodologias distintas, sugerem que a proliferação dos fibroblastos seja mais dependente do comprimento de onda e potência do que do fator coerência da luz, semelhante aos resultados obtidos por outros autores (CORAZZA et al., 2007).

É importante ressaltar que a fototerapia realizada sob os parâmetros utilizados neste estudo não apresentou qualquer efeito negativo sobre a proliferação fibroblástica *in vitro*, vindo mesmo a estimular o crescimento celular quando as células são cultivadas em déficit nutricional.

Esse dado é de extrema valia para a aplicação clínica da fototerapia visto que a proliferação celular é um fator preponderante para a cicatrização de feridas (AZEVEDO et al., 2006), e existe uma necessidade crescente de intervenções terapêuticas seguras e eficazes para o tratamento de feridas crônicas (WHELAN et al., 2001).

A oxigenoterapia hiperbárica, tratamento comumente indicado para feridas isquêmicas, hipóxicas e infectadas, não é adequada para todos os pacientes, sendo contra-indicada para pacientes que tenham condições médicas crônicas e pacientes claustrofóbicos. Além disso, devido ao seu custo e à pequena quantidade de centros que contam com esse equipamento, o acesso à oxigenoterapia hiperbárica também pode ser um problema (WHELAN et al., 2001).

A mucosite bucal induzida pelo tratamento do câncer é um exemplo de condição de difícil manejo clínico e alto impacto na qualidade de vida do paciente e mesmo no andamento do tratamento oncológico (ADAMIETZ et al., 1998; BIRON et al., 2000; MAYIA et al., 2006; VOLPATO et al., 2007).

Apesar do mecanismo de ação da fototerapia na patobiologia da mucosite bucal permanecer desconhecido (MIGLIORATI et al., 2006), vários autores tem sugerido o uso do laser em baixa intensidade tanto para sua prevenção (BARASCH et al., 1995; HASHIEH et al., 1997; COWEN et al., 1997; BENSADOUN et al., 1999; RABER-DURLACHER et al., 2000; BIRON et al., 2000; MAYIA et al., 2006; ANTUNES et al., 2007; ARORA et al., 2008) como tratamento (HASHIEH et al., 1997; SHARON-BULLER; SELA, 2004; GENOT; KLASTERSKY, 2005; NES; POSSO, 2005; MAYIA et al., 2006; JAGUAR et al., 2007; ARORA et al., 2008). Recentemente o LED também tem sido sugerido para o manejo clínico da mucosite bucal (WHELAN et al., 2002; CORTI et al., 2006; DESMET et al., 2006; YEAGER et al., 2007; SACONO et al., 2008).

O efeito da fototerapia utilizando laser em baixa intensidade e LED na prevenção da mucosite bucal em crianças sob quimioterapia para tratamento do câncer foi investigado na etapa clínica deste trabalho.

A alocação dos voluntários em cada grupo foi feita de forma aleatória e os grupos irradiados com laser e LED apresentaram-se de forma semelhante quanto ao gênero e idade dos voluntários. Cuidado especial deve sempre ser tomado na alocação dos voluntários nos grupos de intervenção, principalmente com relação à idade, pois foi descrito que ela interfere na incidência da mucosite bucal (CHILDERS et al., 1993; SONIS et al., 1989).

Existem vários trabalhos publicados abordando a laserterapia no manejo da mucosite bucal. Entretanto, há uma grande variação acerca das características relacionadas aos voluntários, aos parâmetros de luz utilizados e ao protocolo de irradiação (COWEN et al., 1997; NES; POSSO, 2005; JAGUAR et al., 2007; CRUZ et al., 2007; ANTUNES et al., 2008).

A opção pela utilização do protocolo de fototerapia preventiva proposto por Lizarelli (2005) neste estudo deveu-se principalmente pelo intervalo semanal preconizado entre as aplicações. No Serviço de Quimioterapia Infantil do Hospital do Câncer de Mato Grosso, as crianças em tratamento de manutenção são avaliadas e medicadas uma vez por semana, respeitando o intervalo de sete dias, salvo em casos em que a criança apresente alguma intercorrência. Assim a fototerapia e a avaliação da mucosa bucal e da dor eram realizadas no mesmo dia em que a criança recebia o tratamento, não havendo a necessidade dela se deslocar em

outros horários para participar da pesquisa. Além da comodidade proporcionada aos voluntários, essa opção veio a minimizar o número de perdas nos grupos.

Ainda assim a amostra total de voluntários sofreu cinco perdas, sendo quatro relacionadas à alta de pacientes oriundos do interior que voltaram para seus municípios de origem e uma devido ao óbito do paciente.

Analisando os resultados da fototerapia neste estudo, independentemente da fonte de luz utilizada, a mucosite bucal em todas as regiões anatômicas irradiadas apresentou baixa incidência, 4,37%.

Isso contraria dados da literatura que apresentam incidência da mucosite bucal entre 40 e 97% (PARULEKAR et al., 1998; RABER-DURLACHER, 1999; TROTTI et al., 2003), sendo mais incidente entre as crianças (CHILDERS et al., 1993; SONIS et al., 1989).

Os resultados encontrados com a análise da dor nos voluntários também foram baixos, como visto nas tabelas 24 a 26. Esse dado é importante, visto que da perspectiva do paciente, a dor bucal aguda é o efeito mais debilitante da mucosite porque interfere na capacidade de comer, engolir e falar, e resulta em um aumento no número de dias de administração de morfina e de nutrição parenteral (JAGUAR et al., 2007).

Jaguar et al. (2007), investigando os efeitos clínicos da laserterapia na prevenção e redução da mucosite bucal induzida em pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, compararam seu grupo experimental com um controle histórico do sistema de arquivos do Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP e concluíram que a aplicação do laser promoveu alívio da dor, reduziu a severidade da mucosite bucal e diminuiu a necessidade de administração de morfina nos pacientes.

Essa inferência não pode ser feita no presente trabalho uma vez que os registros da ocorrência de dor e da mucosite bucal não são realizados de maneira sistematizada no Setor de Quimioterapia Infantil do Hospital do Câncer de Mato Grosso, impedindo a comparação com os resultados obtidos no estudo.

Entretanto, a baixa incidência e baixa severidade das lesões de mucosite bucal encontradas nos voluntários submetidos à fototerapia neste estudo vão ao encontro dos resultados de estudos anteriores em que foram avaliados tanto o laser

(COWEN et al., 1997; BENSADOUN et al., 1999; NES; POSSO, 2005; ANTUNES et al., 2007; JAGUAR et al., 2007; ANTUNES et al., 2008) como o LED (WHELAN et al., 2002; CORTI et al., 2006; SACONO et al., 2008; LANG-BICUDO et al., 2008).

Outro importante achado clínico foi a inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com laser e LED sobre a incidência e a severidade da mucosite bucal em todos os sítios anatômicos. Saliente-se que no ensaio clínico, os dispositivos utilizados para a fototerapia apresentaram parâmetros semelhantes e seguiram o mesmo protocolo de aplicação, diferindo apenas na coerência da luz.

A coerência da luz, no entanto, assim como na etapa laboratorial deste estudo, não interferiu no resultado da fototerapia na etapa clínica, seja na prevenção da mucosite bucal, seja na dor a ela relacionada, corroborando trabalhos anteriores que apontaram o LED como alternativa ao laser em baixa intensidade para biomodulação, alívio da dor e cicatrização tecidual (WHELAN et al., 2002; CORTI et al., 2006; YEAGER et al., 2007; SACONO et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, e considerando os parâmetros e protocolo de fototerapia utilizados, pode-se concluir que:

- A fototerapia estimulou a proliferação dos fibroblastos cultivados sob déficit nutricional. O incremento foi maior no grupo irradiado com o laser infravermelho (780nm, 50mW);
- A incidência e a severidade da mucosite bucal, assim como a dor associada, foram muito baixas nos grupos irradiados com laser vermelho (660nm, 40mW) e LED (637 ± 15nm, 40mW). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos;
- A coerência da luz não interferiu no resultado da fototerapia *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Adamietz IA, Rahn R, Böttcher HD, Schäfer V, Reimer K, Fleischer W. Prophylaxis with povidone-iodine against induction of oral mucositis by radiochemotherapy. *Support Care Cancer* 1998; 6: 373-377.

Almeida-Lopes L. Laserterapia na Odontologia. *Biodonto* 2004 1 (1). 89p.

Antunes HS, Azevedo AMde, Bouzas LFdaS, Adão CAE, Pinheiro CT, Mayhe R, et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood*. 2007; 109: 2250-5.

Antunes HS, Ferreira EM, Matos VD, Pinheiro CT, Ferreira CG. The Impact of low power laser in the treatment of conditioning-induced oral mucositis: A report of 11 clinical cases and their review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13 (3): E189-92.

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

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. *Lasers Med Sci* 2006; 21: 86-89.

Barasch A, Peterson DE, Tanzer JM, et al. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer* 1995; 76: 2550-6.

Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncology* 2003; 39: 91-100.

Barile FA. Mechanisms of cytotoxicology. I. Introduction. In: Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms of cytotoxicology. *Mechanisms and Methods*. Boca Raton, Editora CRC Press. Cap.2, p.27-45, 1994.

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

Bensadoun R-J, Magné N, Marcy P-Y, Demard F. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 481-87.

Bensadoun R-J. Low level laser therapy (LLLT): A new paradigm in the management of cancer therapy-induced mucositis? *Indian J Med Res* 2006; 124: 375-8.

Biron P, Sebban C, Gourmet R, Chvetzoff G, Philip I, Blay JY. Research controversies in management of oral mucositis. *Support Care Cancer* 2000; 8: 68-71.

Biswal BM, Zakaria A, Ahmad NM. Topical application of honey in the management of radiation mucositis. A Preliminary study. *Support Care Cancer* 2003; 11: 242-8.

Bonnaure-Mallet M, Bunetel L, Tricot-Doleux S, Guérin J, Bergeron C, LeGall E. Oral Complications during Treatment of Malignant Diseases in Childhood: Effects of Tooth Brushing *Eur J Cancer* 1998, 34(10): 1588-91.

Boo J de, Hendriksen C. Reduction strategies in animal research: A review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. *ATLA* 2005; 33: 369-77.

Borenfreund E, Puener JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Meth.* 1984; 9: 7-9.

Bozkurt A, Onaral B. Safety assessment of near infrared light emitting diodes for diffuse optical measurements. *BioMedical Engineering OnLine* 2004; 3: 9.

Braverman, B. McCarthy RJ, Ivankovich AD, Forde DE, Overfield M, Bapna MS. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers in Surgery and Medicine* 1989; 9: 50-8.

Chambers CT, Giesbrecht K, Craig KD, Bennett SM, Huntsman E. A comparison of faces scales for the measurement of pediatric pain: children's and parent's ratings. *Pain* 1999; 83: 25-35.

Childers NK, Stinnett EA, Wheeler P, Wright JT, Castleberry RP, Dasanayake AP. Oral complications in children with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 41-7.

Cho SY, Cheng AC, Cheng MCK. Oral care for children with leukaemia. *HKMJ* 2000 6 (2): 203-8.

Chu I. Alternative methods to animal testing: A Canadian health protection branch perspective. *ATLA* 1995; 23: 257-61.

Clarkson JE, Worthington HV, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 2, 2005. Oxford: Update Software.

Collard MM, Hunter ML. Oral and dental care in acute lymphoblastic leukaemia: a survey United Kingdom Children's Cancer Study Group Centres. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2001; 11: 347-51.

Corazza AV. Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos. 2005.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomedicine and Laser Surgery* 2007; 25 (2): 102-6.

Corti L, Chiarion-Sileni V, Aversa S, Ponzoni A, D'Arcais R, Pagnutti S, et al. Treatment of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis with Light-Emitting Diode. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006; 24 (2): 207-13.

Costa CA, Hebling J Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, Sep 2003; 24(21): 3853-8.

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

Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LGN, Castro Jr CG, Brunetto AL. Influence of Low-Energy Laser in the Prevention of Oral Mucositis in Children With Cancer Receiving Chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 435-40.

Damante CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MTT, Henry MM, et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006; 24 (2): 121-8.

DMEM - Low Glucose. Cotia: LGC Biotecnologia Ltda.

Eduardo, FP. Efeitos da radiação laser em baixa intensidade de 650nm e 780nm na prevenção de mucosite oral em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. 2003. Dissertação [Mestrado] - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007; 39: 365-72.

Epstein JB, Truelove EL, Oien H, Allison C, Le ND, Epstein MS. Oral topical doxepin rinse: analgesic effect in patients with oral mucosal pain due to cancer or cancer therapy. *Oral Oncol* 2001; 37: 632-7.

Freshney RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* 4.ed. New York: Wiley-Liss; 2000.

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

Genot M-T, Klastersky J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. *Curr Opin Oncol* 2005, 17: 236-40.

Gibson F. Best practice in oral care for children and young people being treated for cancer: can we achieve consensus? *Eur J Cancer* 2004, 40: 1109-10.

Glenny AM, Gibsonb F, Auldc E, Coulsond S, Clarkstone JE, Craigf JV, et al. A survey of current practice with regard to oral care for children being treated for cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1217-24.

Grötz KA, Genitsariotis S, Vehling D, Al-Nawas B. Long-term oral Candidacolonization, mucositis and salivary function after head and neck radiotherapy. *Support Care Cancer* 2003; 11: 717-21.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989; 119: 203-10.

Hashieh IA, Tardieu C, Franquin JC. Helium-neon laser irradiation is not a stressful treatment: a study on heat-shock protein (HSP70) level. *Lasers Surg. Med.* 1997; 20: 451-60.

Hicks CL, Baeyer CLvon, Spafford PA, Korlaar Ivan, Goodenough B. The Faces Pain Scale – Revised: toward a common metric in pediatric pain measurement. *Pain* 2001; 93: 173-83.

ISO 10993-5 (1999). *Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods.* International Organization for Standardization. Geneva.

Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, Pinheiro MC, Castro D Ode Junior, Cruz Perez DEdaC, et al. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Diseases* 2007; 13: 538-43.

Karu TI, Tiphlova OA, Letokhov VS, Lobko VV. Stimulation of E.coli growth by laser and incoherent red light. *Il Nuovo Cimento* 1983 2 (4): 1138-44.

Karu TI. Cellular mechanisms of low power laser therapy: new questions. In: Simunovic Z. *Lasers in medicine, surgery, dentistry, urology and veterinary*. Vol III. European Medical Laser Association 2003. 79-99.

Karu TI. Photobiology of low power laser effects, *Health Phys.* 1989; 56: 691-704.

Kaššák P, Przygodzki T, Habodászová D, Bryszewska M, Šikurová L. Mitochondrial Alterations Induced by 532 nm Laser Irradiation. *Gen. Physiol. Biophys.* 2005; 24: 209-20.

Kowanko I, Long L, Hodgkinson B, Evans D. The effectiveness of strategies for preventing and treating chemotherapy and radiation induced oral mucositis in patients with cancer [Structured abstract]. 1998: 1-84. Adelaide, S. Australia, Australia: Joanna Briggs Institute for Evidence Based Nursing and Midwifery.

Lang-Bicudo L, Eduardo FP, Eduardo CP, Zzell DM. LED Phototherapy to Prevent Mucositis: A Case Report. *Photomedicine and Laser Surgery* 2008; 26 (6): 609-13.

Lizarelli RFZ. *Protocolos clínicos odontológicos: uso do laser de baixa intensidade*. 2 ed. São Carlos: Bons Negócios Editora, 2005.

MASCC/ISOO Study Section Reports. Mucositis Study Section. *Support Care Cancer* 2000; 8: 440.

Maiya GA, Sagar MS, Fernandes D. Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention & treatment of radiation induced mucositis in head & neck cancer patients. *Indian J Med Res* 2006; 124: 399-402.

McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncology* 1998; 34: 484-90.

Mello JBde, Mello GPSde. *Laser em Odontologia*. São Paulo: Santos, 2001. 174 p.

Mendonça EFde, Carneiro LS, Silva JBe, Silva CMda, Palmeira GBLS. Complicações bucais da quimioterapia e radioterapia no tratamento do câncer. *Rev. ABO Nac.* 2005; 13 (3): 151-7.

Migliorati CA, Oberle-Edwards L, Schubert M. The role of alternative and natural agents, cryotherapy, and/or laser for management of alimentary mucositis. *Support Care Cancer* 2006; 14: 533-40.

Nes AG, Posso MBS. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *International Nursing Review* 2005; 52: 68-72.

Nicolatou-Galitis O, Athanassiadou P, Kouloulias V, Sotiropoulou-Lontou A, Dardoufas K, Polychronopoulou A, et al. Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in radiation-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 2006; 14 (7): 753-62.

Nottage M, McLachlan S-A, Brittain M-A, Oza A, Hedley D, Feld R, et al. Sucralfate mouthwash for prevention and treatment of 5-fluorouracil-induced mucositis: a randomized, placebo-controlled trial. *Support Care Cancer* 2003; 11: 41-7.

Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RCK. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol* 1998; 34: 63-71.

Peterson DE. Oral problems in supportive care: no longer an orphan topic? *Support Care Cancer* 2000; 8: 347-8.

Plevová P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. *Oral Oncol* 1999; 35: 453-70.

Raber-Durlacher JE, Weijl NI, Abu Saris M, Koning Bde, Zwinderman AH, Osanto S. Oral mucositis in patients treated with chemotherapy for solid tumors: a retrospective analysis of 150 cases. *Support Care Cancer* 2000; 8: 366-71.

Raber-Durlacher JE. Current practices for management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer* 1999; 7: 71-4.

Sacono NT, Costa CAS, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FCB. Light-Emitting Diode Therapy in Chemotherapy-Induced Mucositis. *Lasers in Surgery and Medicine* 2008; 40: 625-33.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. *J. Dent.* 1994; 22 Suppl 2: S6-11.

Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur. J. Oral Sci.* Jun 1996; 104 (3): 292-9.

Sharon-Buller A, Sela M. CO2-laser treatment of ulcerative lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 332-4.

Sletten GBG, DAHL JE. Cytotoxicity effects of extract of compomers. *Acta Odontol. Scand.* 2003; 57: 316-22.

Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005; 23 (1): 78-80.

Sonis ST, Clark J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. *Oncology* 1991; 12: 92-5.

Sonis ST, Fazio RC, Fang L. Complicações bucais da quimioterapia do câncer. In: _____. *Medicina Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989: 375-401.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 1998; 34: 39-43.

Soraggi CL. Atividade biológica e citotoxicidade de matriz polimérica com doador de óxido nítrico. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas. 2006.

Sutherland SE, Browman GP. Prophylaxis of oral mucositis in irradiated head-and-neck cancer patients: a proposed classification scheme of interventions and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2001; 49 (4): 917-30.

Turhal NS, Erdal S, Karacay S. Efficacy of treatment to relieve mucositis-induced discomfort. *Support Care Cancer* 2000; 8: 55-8.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 95-9.

Volpato LER, Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2007; 73 (4): 562-8.

Whelan HT, Buchmann EV, Whelan NT, Turner SG, Cevenin V, Stinson H, et al. NASA Light Emitting Diode Medical Applications From Deep Space to Deep Sea. *Space Tech. Appl. Intl. Forum* 2001; 552, 35-45.

Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al. NASA Light-Emitting Diodes for the Prevention of Oral Mucositis in Pediatric Bone Marrow Transplant Patients. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* 2002; 20 (6): 319-24.

Worth AP, Balls M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future purposes. *ATLA Altern Lab Anim* 2002; 30(suppl I): 1-124.

Worthington HV, Clarkson JE, Eden OB. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 2, 2005. Oxford: Update Software.

Yeager RL, Oleske DA, Sanders RA, Watkins III JB, Eells JT, Henshel DS. Melatonin as a principal component of red light therapy. *Medical Hypotheses* 2007; 69: 372-6.

Zhang L, Xing D, Gao X, Wu S. Low-Power Laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J. Cell. Physiol* 2009; 219: 553-62.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANÁLISE DO LIGHT-EMITTING DIODE (LED) E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA PREVENÇÃO DA MUCOSITE BUCAL EM CRIANÇAS SOB QUIMIOTERAPIA E/OU RADIOTERAPIA

Através deste termo, estão sendo fornecidas informações para participação do estudo que objetiva analisar a eficácia da terapia com luz de light-emitting diode (LED) e laser para a prevenção e tratamento de mucosite bucal nas crianças sob tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia no Hospital do Câncer de Mato Grosso.

Serão realizados os seguintes procedimentos: terapia com luz de light-emitting diode (LED) ou laser, de acordo com o grupo que a criança fizer parte, uma vez por semana durante três semanas e avaliação da mucosa bucal da criança semanalmente durante quatro semanas. A terapia com luz não oferece risco algum ao paciente, e todas as normas de segurança serão seguidas, como a utilização de óculos de proteção pela criança e por seu acompanhante.

O paciente que fizer parte do estudo terá a oportunidade de constatar precocemente a existência de alguma alteração bucal, e será encaminhado para o tratamento caso a sua necessidade seja detectada.

Em qualquer fase da pesquisa, você terá acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimento e eventuais dúvidas. O pesquisador responsável é o Prof. Luiz Evaristo Ricci Volpato. Endereço: Rua Almirante Henrique Pinheiro Guedes, 303 Duque de Caxias, telefone: (65) 3622-1538.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento em participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no Hospital do Câncer de Mato Grosso.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Caso você queira se inteirar sobre os resultados parciais das pesquisas, sinta-se à vontade para entrar em contato com os pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Caso seja comprovado qualquer dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e material coletado somente para fins de pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Análise do light-emitting diode (LED) e do laser de baixa intensidade na prevenção da mucosite bucal em crianças sob quimioterapia e/ou radioterapia”. “Discuti com o Dr. Luiz Evaristo Ricci Volpato sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar, ocorrer dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado). Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço”.

_____ Data: _____
Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data: _____
Assinatura da testemunha

Somente para o responsável do projeto:

Declaro, que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste pacientes ou representante legal para a participação do estudo.

_____ Data: _____
Assinatura

APÊNDICE B – FICHA DE PESQUISA DO PACIENTE

Pesquisa: "ANÁLISE DO LIGHT-EMITTING DIODE (LED) E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA PREVENÇÃO DA MUCOSITE BUCAL EM CRIANÇAS SOB QUIMIOTERAPIA E/OU RADIOTERAPIA"

Neoplasia: _____ Data: ___ / ___ / ___

Nome: _____ Nº _____
Idade: _____ Data nasc.: ___ / ___ / _____^a Semana

1. Apresentou alguma alteração de saúde na última semana? Sim () Não ()

1.1 Se sim, qual: _____

1.2 Utilizou algum medicamento na última semana? Sim () Não ()

1.2.1 Se sim, qual: _____

Medico responsável: _____

2. Alterações de tecido mole

| | Lábio inferior | Lábio superior | Mucosa labial superior | Mucosa labial inferior | Mucosa jugal direita | Mucosa jugal esquerda | Dorso da língua | Lateral da língua | Ventre da língua | Palato duro | Palato mole | Gengiva |
|--------|----------------|----------------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|------------------|-------------|-------------|---------|
| Grau 0 | | | | | | | | | | | | |
| Grau 1 | | | | | | | | | | | | |
| Grau 2 | | | | | | | | | | | | |
| Grau 3 | | | | | | | | | | | | |
| Grau 4 | | | | | | | | | | | | |
| N/V | | | | | | | | | | | | |
| N/E | | | | | | | | | | | | |

Grau 0: ausência de mucosite

Grau 1: presença de úlcera indolor, eritema ou sensibilidade leve

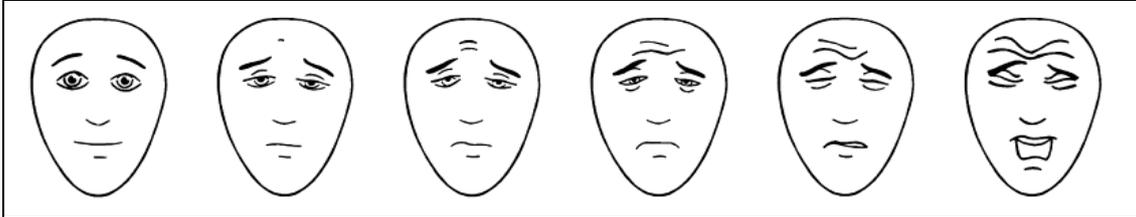
Grau 2: presença de eritema doloroso, edema, ou úlceras que não interferem na habilidade do paciente em alimentar-se

Grau 3: úlceras confluentes que interferem na capacidade do paciente em ingerir alimentos sólidos

Grau 4: sintomas tão severos que o paciente requer suporte enteral ou parenteral.

3. Análise do desconforto/dor

3.1. Análise inicial

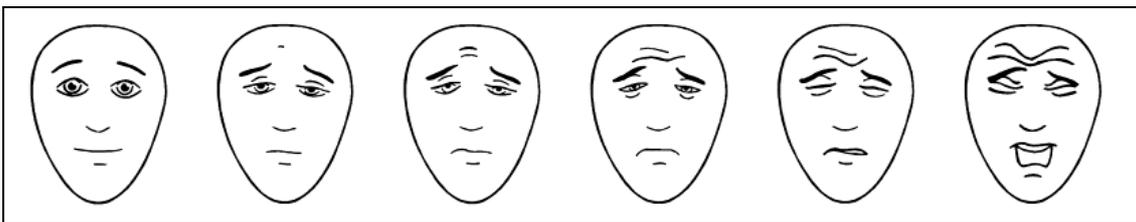


0

100

Nome: _____ Data: ___ / ___ / ___

3.1. Análise final



0

100

ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL GERAL UNIVERSITÁRIO

**ASSOCIAÇÃO DE PROTEÇÃO À MATERNIDADE
E À INFÂNCIA DE CUIABÁ****Entidade Mantenedora****Registro: n° 004/CEP/UNIC/2008 – protocolo n° 0307-179****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNIC****DECLARAÇÃO**

Declaramos, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa: “**Análise do light-emitting díade (LED) e do laser de baixa intensidade na prevenção da mucosite bucal em crianças sob quimioterapia e/ou radioterapia**” do (a) pesquisador (a) **Luiz Evaristo Ricci Volpato** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Cuiabá-MT, 29 de fevereiro de 2008.

Prof. Dra. Bianca Borsatto Galera
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
UNIC/HGU

ANEXO B



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
CENTRO ESTADUAL DE ODONTOLOGIA PARA PACIENTES ESPECIAIS



MISSÃO: Promover a assistência odontológica
ao Paciente Especial com equidade, qualidade e
responsabilidade social.

OFÍCIO Nº 027/GT/CEOPE/2007

Cuiabá, 28 de agosto de 2007

Ilustríssimo Senhor

Prof. Ms. Luiz Evaristo Ricci Volpato

Prezado Senhor,

Considerando a solicitação de disponibilização de um cirurgião-dentista e um consultório odontológico deste centro no período matutino para a realização das consultas às crianças incluídas no estudo de "Alterações bucais imediatas e tardias da terapia antineoplásica em crianças".

Considerando que é de interesse do CEOPE investir e participar de projetos de pesquisa.

Considerando que o CEOPE foi criado para promover a assistência odontológica ao Paciente Especial com equidade, qualidade e responsabilidade social.

Deferimos a solicitação do Prof. Ms. Luiz Evaristo Ricci Volpato, disponibilizando ao mesmo o consultório n.º 06, bem como a cirurgiã-dentista Vivian Braga Louzada no período matutino para participar deste projeto.

Atenciosamente,


DIURIANNE CAROLINE CAMPOS FRANÇA

Gerente Técnica do CEOPE

CENTRO ESTADUAL DE ODONTOLOGIA PARA PACIENTES ESPECIAIS
Av. Rubens de Mendonça 5500, Morada da Serra CEP. 78055-000 - Cuiabá-MT
Fone: (65) 3641-5034 Fax: (65) 3641-1405
e-mail: gtceope@ses.mt.gov.br



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)