



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE

NAIADJA DE SANTANA CERQUEIRA

**EXPRESSÃO DE MASTÓCITOS EM MUCOSITES QUIMIOINDUZIDAS
E SUBMETIDAS A FOTOBIMODULAÇÃO A LASER:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM UM MODELO ANIMAL**

Salvador
2020

NAIADJA DE SANTANA CERQUEIRA

**EXPRESSÃO DE MASTÓCITOS EM MUCOSITES QUIMIOINDUZIDAS
E SUBMETIDAS A FOTOBIMODULAÇÃO A LASER:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM UM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia e Saúde com área de concentração em Diagnóstico.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Maria P. Ramalho

Salvador
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cerqueira, Naiadja de Santana
Expressão de mastócitos em mucosites
quimioinduzidas e submetidas a fotobiomodulação a
laser: estudo experimental em um modelo animal /
Naiadja de Santana Cerqueira. -- Salvador, 2020.
66 f. : il

Orientadora: Luciana Maria Pedreira Ramalho.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em
Odontologia e Saúde) -- Universidade Federal da
Bahia, Faculdade de Odontologia, 2020.

1. Mastócitos. 2. Mucosite Oral. 3. Fotobiomodulação
a laser. I. Ramalho, Luciana Maria Pedreira. II.
Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE**

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. NAIADJA DE SANTANA CERQUEIRA

**“EXPRESSÃO DE MASTÓCITOS EM MUCOSITES
QUIMIOINDUZIDAS E SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO A
LASER: ESTUDO EXPERIMENTAL EM UM MODELO ANIMAL”**

BANCA EXAMINADORA:

Luciana M. Pedreira Ramalho

Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Viviane Palmeira da Silva

Profa. Dra. Viviane Palmeira da Silva (Examinador Interno)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (Examinador Externo)
Professor da Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho àquela criança que sempre soube que precisava estudar muito pra garantir um futuro promissor, mas que nunca acreditou muito em si. Fazia porque precisava fazer, mas sem acreditar que conseguiria. Àquela menina que, aos 17 anos, entrou nesta mesma Universidade na graduação e passou meses achando que algo daria errado na matrícula em algum semestre e o sonho acabaria, porque era inacreditável que ela tinha chegado até ali. A mesma mulher que ao passar na seleção do mestrado não acreditava que tinha sido tão bem colocada e tentava, constantemente, achar justificativas para desmerecer a sua conquista. A insegurança e a falta de autoconfiança tem sido companheiras fieis há bastante tempo, mas é chegada a hora de soltar sua mão e seguir um caminho diferente. Nessa caminhada aprendi o quanto preciso me amar, ser mais gentil comigo e acreditar em mim. Não é fácil, mas sigo tentando. Pra quem não me conhece pode parecer vaidade, mas quem me conhece sabe que isso significa tirar amarras, subir degraus... Então, sim, tem um enorme significado dedicar esse trabalho a mim, a tudo que sou (e estou começando a reconhecer) e nunca acreditei que seria. Assim como à todas as mulheres pretas que crescem achando que não podem e não conseguem (porque é isso que nos fazem acreditar). Nós podemos, conseguimos e somos muito mais do que imaginamos! Escrevi essa dedicatória e apaguei porque achei que eu precisava dedicar a outras pessoas. Mas voltei atrás porque eu já sofri muito por não ter amor próprio. Nunca é tarde para (re)começar.

"It always seems impossible until it's done."

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Sou incondicionalmente grata ao meu **Criador**. Um Ser grandioso que está ao meu lado constantemente, em cada passo dado. Concedeu-me o dom da vida, me colocou na melhor família do mundo, me presenteou com as melhores pessoas nessa caminhada, e sempre ouve as minhas orações e ilumina os meus caminhos.

Dos presentes da minha vida, eu preciso começar pela minha princesinha, lutadora e dançarina. **Maria**, obrigada por tanto amor e por ser a pessoinha que me impulsiona a querer ser sempre mais e melhor. Obrigada por dar sentido a cada esforço. Te amo pucuthuca da mãe!

À minha mãe **Sílvia**, mulher forte que arrasou na criação de duas filhas sem a presença de um companheiro (porém com o apoio de uma família sensacional). Foi mãe e pai, deu sangue e suor para que pudéssemos ter uma boa educação; e hoje é a **Vó Sílvia** tão amada. Obrigada por todo esforço e amor dispensados sobre nós. Você é boca de zero nove! Te amo, mãe!

À minha queridíssima **Família Santana** pelos valores, exemplos, por todo amor, união e todo esforço em conjunto por nossa criação e educação. Vocês me ensinaram a importância de AMAR e de estudar, são a melhor família desse mundo inteiro. Aos meus avós: **Marina**, por cada vela acesa pra iluminar meus caminhos e **Francisco** por me ensinar sobre a vida, sobre a espiritualidade e torcer tanto por mim, além de serem os responsáveis por essa família maravilhosa; minhas tias **Sônia**, **Selma**, **Silvane** e tio **Sandro**, meus grandes exemplos de professores e de pessoas, e **Suely** pelo exemplo de pesquisadora, de mulher que luta e que resiste. Obrigada por todo incentivo! Aos meus primos, e à minha irmã **Jéssica** sou grata por todo companheirismo, amor e torcida. E agradeço ao meu padrasto **Rejan** por tanta doação por nós desde que entrou em nossas vidas. Eu sou porque nós somos. UBUNTU! Eu amo vocês!

Adler, se não fosse todo seu apoio, compreensão e amor, hoje eu não estaria aqui, conquistando e vencendo mais uma etapa tão importante da minha vida. Obrigada por tanto amor, pela paciência, por todas as conversas e conselhos. Além de companheiro, você é um grande amigo. Te amo muito!

Ao meu padrinho **Wilson Roberto** pelo grande apoio desde a graduação e pelo exemplo na docência, bem como na valorização e na luta pelos nossos.

Aos meus amigos, muito obrigada pela torcida. Posso falhar em citar nomes, mas não posso deixar de agradecer ao meu queridíssimo grupo “**As de Sempre**” (**Abil e Moni**) por tantas conversas a qualquer hora e dia, conseguindo, até nos momentos mais difíceis, me arrancar umas gargalhadas. Vocês são parte de mim! **Amandinha**, minha amiga, companheira e concunhada sou grata por cada vez que você vibra com as minhas vitórias e por ser uma parceira de vida. **Liu e Mille** obrigada pelas palavras de incentivo, por toda torcida, amor e por estarem sempre prontas pra me ouvir e aconselhar. **Mili e Ane** obrigada por todo amor e todas as orações, minhas amigas, não há melhor presente nessa vida. **Ari e Pablo** sou grata por todo cuidado, amor e amizade que superam a distância física.

Aos meus sogros **Rosélia e Arival**, minha eterna gratidão por todo apoio nesses dois anos. Sem vocês teria sido muito mais difícil. Especialmente à minha sogra... O que seria de mim sem o seu suporte? Gratíssima pela ajuda, pelo abrigo, por tanto amor e cuidado com minha Maria.

Algumas pessoas acabaram de chegar e caminharam de mãos dadas comigo... **My Love**, você foi meu presente de 2018. Sem você a caminhada teria sido muito mais árdua. Obrigada por tanto. Cada café, cerveja, desabafo, tornou a caminhada mais leve. **Vivi**, eu nem tenho palavras pra te agradecer. Você é um ser humano ímpar, de coração enorme. Levo daqui uma amiga e exemplo. Sou sua fã! **Ju**, obrigada por cada momento, cada conversa e por todo apoio nesses dois anos. É um prazer poder contar com você nessa caminhada. **Livinha**, sou muito grata por todas as vezes que gritei por socorro e você sempre esteve disposta a me ajudar. Sempre muito solícita, você é uma pessoa doce e incrível! Aos colegas de turma, muito obrigada pelos momentos de descontração, de compartilhamento de ideias, e (por que não?) de desespero! Rs!

Prof. Dra. Luciana Ramalho, a você um agradecimento especial. Uma professora que faz qualquer aluno ficar vidrado em suas aulas, uma pesquisadora portadora de uma inteligência brilhante, uma inspiração. Obrigada por acreditar em mim desde a graduação, por me dar a honra de seguir ao seu lado por essa trajetória, agregando sempre mais à minha formação e por me fazer acreditar que posso sempre mais. É um prazer tê-la como orientadora desde a iniciação científica. Espero que sigamos juntas.

Prof. Dra. Tânia Tavares o que seriam dos nossos experimentos sem seu cuidado, suporte e carinho? Muito grata por toda dedicação em ensinar e todo apoio técnico científico.

Prof. Dra. Flávia Caló, muito obrigada pela sua disponibilidade e paciência em transmitir seus conhecimentos e contribuir com as nossas análises.

Prof. Dra. Maria Cristina Cangussu pela grande ajuda e paciência. Sua colaboração foi muito importante nesse trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Odontologia e Saúde o meu muito obrigada por cada conhecimento transmitido e pela inspiração. Tenho cada vez mais certeza de que a docência é o meu caminho.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da UFBA, especialmente **Sr. Edilson Amancio** pela enorme ajuda com a parte laboratorial e **Srt^a Sueli Paixão** por todo suporte e paciência nesses dois anos.

Agradeço ao apoio da equipe de oncologia da clínica **NOB – Núcleo de Oncologia da Bahia (Grupo Oncoclínicas)**, na pessoa da **Dra. Clarissa Mathias**, pela contribuição, apoiando e acreditando que nosso trabalho pode trazer benefícios para os pacientes oncológicos.

À **Capes** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que, mesmo em tempos difíceis, concedeu-me a bolsa de Mestrado, investimento em prol da ciência e do meu crescimento profissional.

Ao **ICS/UFBA** (Instituto de Ciências da Saúde da UFBA) por ceder o espaço para a realização do experimento deste trabalho.

À **FOUFBA** (Faculdade de Odontologia da UFBA) por me acolher novamente e se tornar, mais uma vez, a minha casa.

Por fim, assim como Nelson Mandela o fez... “agradeço a todos os heróis e heroínas deste país e do resto do mundo que se sacrificaram de diversas formas e deram as suas vidas para que nós pudéssemos ser livres”.

A todos vocês a minha sincera GRATIDÃO!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CÂNCER E O TRATAMENTO ONCOLÓGICO	17
2.2 MUCOSITE ORAL	18
2.3 INFLAMAÇÃO E MASTÓCITOS	23
2.4 FOTOBIMODULAÇÃO A LASER	25
2.4.1 <i>Modo de ação e parâmetros da laserterapia</i>	25
2.4.2 <i>Laserterapia em mucosite oral</i>	28
2.4.3 <i>Influência da fotobimodulação nos mastócitos</i>	31
3 PROPOSIÇÃO	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	34
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	34
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.4 QUIMIOTERAPIA E INDUÇÃO DA MUCOSITE ORAL	36
4.5 FOTOBIMODULAÇÃO A LASER	37
4.6 PROCEDIMENTOS DE ANESTESIA, MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	39
4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	40
4.8 ANÁLISE DOS DADOS	43
5 RESULTADOS	44
5.1 ANÁLISE INTRAGRUPO	44
5.2 ANÁLISE INTERGRUPO	50
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1:** Distribuição dos animais nos grupos experimentais de acordo com o procedimento experimental e tempo de morte.
- Quadro 2:** Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação
- Quadro 3:** Critérios utilizados para análise histológica
- Quadro 4:** Critérios utilizados para análise da degranulação dos mastócitos
- Tabela 1:** Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos sem tratamento em diferentes tempos.
- Tabela 2:** Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos submetidos a irradiação com laser vermelho em diferentes tempos.
- Tabela 3:** Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos submetidos a irradiação com laser infravermelho em diferentes tempos.
- Tabela 4:** Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 7 dias
- Tabela 5:** Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 11 dias
- Tabela 6:** Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 15 dias

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Patogênese da mucosite oral
- Figura 2:** Injeção intraperitoneal
- Figura 3:** Quimioterápico
- Figura 4:** Ranhuras
- Figura 5:** Aparelho de laser
- Figura 6:** Irradiação com laser vermelho (660nm)
- Figura 7:** Irradiação com laser infravermelho (780nm)
- Figura 8:** Irradiação laser
- Figura 9:** Pontos de irradiação
- Figura 10:** Animal anestesiado
- Figura 11:** Peça encaminhada para processamento histológico
- Figura 12:** Mastócitos em degranulação
- Figura 13:** Mastócitos intactos
- Figura 14:** Percentual de degranulação de mastócitos no grupo M ao longo do tempo
- Figura 15:** Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo M.
- Figura 16:** Percentual de degranulação de mastócitos no grupo LV ao longo do tempo.
- Figura 17:** Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo LV.
- Figura 18:** Percentual de degranulação de mastócitos no grupo LI ao longo do tempo
- Figura 19:** Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo LI.
- Figura 20:** Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 7 dias.

Figura 21: Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 11 dias.

Figura 22: Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 15 dias.

Figura 23: Média e desvio padrão dos grupos em seus diferentes tempos experimentais

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFBA	Universidade Federal da Bahia
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
M	Mucosite quimioinduzida sem tratamento
LV	Laser vermelho
LI	Laser infravermelho
MO	Mucosite Oral
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
GaAlAs	Arseneto de gálio-alumínio
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetros
mW	Miliwatts
t	Tempo
cm ²	Centímetros quadrados
s	Segundos
D	Densidade de energia
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
MASCC	Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer
ISOO	Sociedade Internacional de Oncologia Oral
ATP	Adenosina-trifosfato
RT	Radioterapia
QT	Quimioterapia

RQT	Radioquimioterapia
TCTH	Transplante de Células Tronco hematopoiéticas
5FU	5-flurouracil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NFκB	Fator nuclear kappa B
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
MC	Mastócito
PAF	Fator de ativação plaquetária
NAALT	Associação Norte-Americana de Laserterapia
WALT	Associação Mundial de Laserterapia
NIR	Infravermelho próximo
IR	Infravermelho
CCO	Citocromo c oxidase
ON	Óxido nítrico
HE	Hematoxilina-eosina
®	Marca registrada
DP	Desvio Padrão
SAEF	<i>Spatial Average Energy Influence</i> (Densidade de energia média espacial)

RESUMO

A mucosite oral (MO) é uma das complicações agudas mais comuns da terapia oncológica, provocada pelos efeitos citotóxicos da quimioterapia ou radioterapia de cabeça e pescoço. Tem sido sugerido que o efeito da fotobiomodulação a laser na microcirculação ocorre em virtude do estímulo da degranulação dos mastócitos e consequente aumento da permeabilidade celular. Este estudo teve o objetivo de avaliar a influência da fotobiomodulação a laser na expressão e degranulação de mastócitos em lesões de MO quimioinduzidas. Trinta e seis hamsters da raça Syrian (*Mesocricetus auratus*) da linhagem dourada, adultos e machos, foram aleatoriamente distribuídos em três grandes grupos de acordo com o procedimento experimental a que foram submetidos: Mucosite sem tratamento (M), Mucosite com Laser Vermelho (LV) (GaAIs, $\lambda 660\text{nm}$, 40mW, $0,04\text{cm}^2$, $t=30\text{s}$, $D=1.2\text{J}/\text{cm}^2$, *Twin Flex Evolution*, MMOptics®, São Carlos, SP) e Mucosite com Laser Infravermelho (LI) (GaAIs, $\lambda 780\text{nm}$, 40mW, $0,04\text{cm}^2$, $t=30\text{s}$, $D=1.2\text{J}/\text{cm}^2$, *Twin Flex Evolution*, MMOptics®, São Carlos, SP). Os grupos foram subdivididos em 3 subgrupos de acordo com o tempo de morte dos animais: grupos de 7, 11 e 15 dias (M-7, M-11, M-15, LV-7, LV-11, LV-15, LI-7, LI-11 e LI-15). As lesões de MO foram provocadas através da confecção de ranhuras na bolsa jugal direita de cada animal e, imediatamente após o procedimento, foram submetidas à irradiação, que se repetiu a cada 48 horas, até a morte dos animais. Os espécimes foram processados e corados usando as técnicas de Hematoxilina-eosina e Azul de Toluidina. Os resultados demonstraram que entre os grupos irradiados, o LV-7 apresentou maior média de expressão de mastócitos ($38,28 \pm 19,05$) ($p < 0,001$). Quanto à degranulação, o grupo com maior quantidade de campos com mais de 50% de mastócitos degranulados foi o M-11 ($p < 0,001$) e, dentre os irradiados, o LV-11 ($p = 0,008$). A irradiação com laser, em ambos os comprimentos de onda, diminuiu o percentual de degranulação dos mastócitos. O grupo irradiado com laser infravermelho revelou menor expressão de mastócitos e menor percentual de mastócitos em degranulação. Observou-se predomínio de inflamação crônica discreta. De modo geral, não foi possível observar importante expressão de mastócitos degranulados nos grupos irradiados, o que sugere que a luz laser pode acelerar o processo inflamatório e avilta uma análise futura em grupos com menor tempo experimental.

Palavras-chave: mucosite oral, mastócitos, laserterapia.

ABSTRACT

Oral mucositis (OM) is one of the most common acute complications of cancer therapy, caused by the cytotoxic effects of head and neck chemotherapy or radiotherapy. It has been suggested that the effect of laser photobiomodulation on microcirculation occurs due to stimulation of mast cell degranulation and consequent increase in cell permeability, as these cells produce and release a wide range of chemical mediators associated with different biological processes. The aim this study was to evaluate the influence of laser photobiomodulation on mast cell expression and degranulation in chemoinduced oral mucositis lesions. Thirty-six Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) of the golden lineage, adult and male, were randomly assigned to four large groups according to the experimental procedure: Untreated Mucositis (M), Mucositis with Red Laser (LV) (GaAlAs, $\lambda 660\text{nm}$, 40mW, 0.04cm², t = 30s, D = 2.4J / cm², Twin Flex Evolution, MMoptics®, São Carlos, SP) and Infrared Laser Mucositis (LI) $\lambda 780\text{nm}$, 40mW, 0.04cm², t = 30s, D = 2.4J / cm², Twin Flex Evolution, MMoptics®, São Carlos, SP). The groups were subdivided into 3 subgroups according to the time of death of the animals: 7, 11 and 15 day groups (M-7, M-11, M-15, LV-7, LV -11, LV-15, LI-7, LI-11, and LI-15). OM injuries were caused by making grooves in the right cheek pouch of each animal and, immediately after the procedure, they were subjected to irradiation, which was repeated every 48 hours, until the animals died. The specimens were processed and stained using Hematoxylin-eosin and Toluidine Blue techniques. The results showed that among the irradiated groups, LV-7 presented the highest mean mast cell expression (38.28 ± 19.05) ($p < 0.001$). Regarding degranulation, the group with the largest number of fields with more than 50% of degranulated mast cells was M-11 ($p < 0.001$) and, among the irradiated ones, LV-11 ($p = 0.008$). Laser irradiation at both wavelengths decreased the percentage of mast cell degranulation. The group irradiated with infrared laser showed lower expression of mast cells and lower percentage of mast cells in degranulation. There was a predominance of mild chronic inflammation. In general, it was not possible to observe significant expression of degranulated mast cells in the irradiated groups, which suggests that laser light may accelerate the inflammatory process and proposes future analysis in groups with shorter experimental time.

Key-words: oral mucositis, mast cell, Low-Level Laser Therapy.

1 INTRODUÇÃO

A mucosite oral (MO) é um importante efeito adverso da terapia antineoplásica, causado pelos efeitos citotóxicos da quimioterapia e radioterapia para a região de cabeça e pescoço. Esta condição compromete seriamente a qualidade de vida dos indivíduos, impactando na morbimortalidade, em virtude do comprometimento da capacidade de falar e, principalmente, de se alimentar, podendo levar à desnutrição dos pacientes. Em alguns casos pode haver a necessidade de redução da dosagem medicamentosa planejada para o paciente, ou até interrupções no tratamento do câncer, o que pode prejudicar seriamente os resultados e o prognóstico do tratamento. Em adição, a lesão de MO pode servir como porta de entrada para microrganismos, ocasionando em infecção local ou sistêmica, elevando a morbidade da condição (SONIS, 1998; STRINGER & LOGAN, 2015). Desta forma, é de suma importância a intervenção para promover um controle eficaz da dor, e, conseqüentemente, uma nutrição adequada ao paciente oncológico.

Em virtude do impacto da MO na qualidade de vida e prognóstico do indivíduo em tratamento oncológico, se faz necessário o uso de medidas terapêuticas para o efetivo controle desta condição. Em 2014, a Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer (MASCC) e a Sociedade Internacional de Oncologia Oral (ISOO) recomendaram a fotobiomodulação a laser para prevenir e tratar a MO (LALLA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2017). Sabe-se que as fototerapias oferecem efeitos positivos ao processo de reparo tecidual, aumentando a velocidade de cicatrização, além de melhorar a nutrição celular e a qualidade do tecido neoformado (MEDRADO *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2011). O aumento na produção de fibroblastos e fibras colágenas, bem como a estimulação da angiogênese e da diferenciação miofibroblástica nas fases iniciais da cicatrização, também são efeitos, já reconhecidos, da fotobiomodulação a laser (MELO *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2012).

O efeito do laser é obtido pela conversão da luz, por meio de efeitos fotofísicos e bioquímicos, em energia útil para a célula. Cromóforos presentes na mitocôndria absorvem a luz, ocasionando uma elevação na produção de adenosina trifosfato (ATP), proporcionando um aumento na síntese proteica e, conseqüente, proliferação celular (KARU, 1989).

Um processo de cinco estágios envolvendo a regulação de citocinas pró-inflamatórias e o consequente dano tecidual, caracteriza o desenvolvimento da MO. Diferentes tipos celulares participam do processo inflamatório e dentre eles, desempenhando um importante papel, estão os mastócitos (STRINGER & LOGAN, 2015). Exercendo sua fundamental função no processo inflamatório e no reparo de feridas, os mastócitos produzem e liberam mediadores químicos associados à vasodilatação, além de otimizar o processo inflamatório. Em união com as células endoteliais, os mastócitos produzem enzimas proteolíticas que provocam a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, contribuindo para a migração celular e angiogênese (PEREIRA *et al.*, 2010; PARAGUASSU, 2014).

Estudos anteriores sugerem que os mastócitos, como células secretoras, reagem ao aumento dos níveis de ATP causados pela luz e, assim, a fotobiomodulação a laser pode influenciar no número e na degranulação de mastócitos (TSYGANOVA, 1973; PEREIRA *et al.*, 2010; DE CARVALHO MONTEIRO *et al.*, 2011; PARAGUASSU, 2014). Entretanto, na literatura não existem estudos que analisem a expressão e degranulação de mastócitos em lesões de MO.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da fotobiomodulação a laser na expressão e degranulação de mastócitos em lesões de MO quimioinduzidas em um modelo animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER E O TRATAMENTO ONCOLÓGICO

O câncer é um importante problema global de saúde pública (SIEGEL; MILLER, 2019). De acordo com os dados da GLOBOCAN, em 2018 ocorreram mais de 18 milhões de novos casos e mais de 9 milhões de óbitos por câncer no mundo (GLOBOCAN, 2018).

O tratamento dos pacientes portadores de câncer pode variar desde uma intervenção cirúrgica à administração de radioterapia (RT), quimioterapia (QT) ou transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Algumas vezes torna-se necessário combinar mais de uma dessas modalidades terapêuticas (FIGUEIREDO et al., 2013; INCA 2017). O uso de medicamentos contra o câncer (quimioterapia, hormônios e terapias biológicas) tem sido a escolha atual para o tratamento de cânceres metastáticos, uma vez que eles são capazes de se disseminar através da corrente sanguínea (PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). O estadiamento do tumor é um dos principais fatores considerados para definir o tipo de tratamento ideal para cada caso (LEMOS-JUNIOR, 2013).

Quase a totalidade dos pacientes portadores de câncer avançado de cabeça e pescoço sofrem complicações do tratamento com RT ou radioquimioterapia (RQT). Observa-se um aumento na frequência e severidade dos efeitos colaterais quando há uma combinação da QT com regimes de RT acelerados ou hiperfracionados (ZECHA et al., 2016).

Esses tratamentos podem fazer com que um número significativo de pacientes apresente complicações orais adversas de curto ou longo prazo, que interferem diretamente na sua qualidade de vida (PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Dentre as complicações agudas estão mucosite, dor, disfagia, infecções (bacterianas, virais ou fúngicas), alterações salivares, disgeusia e dermatite. As complicações crônicas mais comuns incluem xerostomia, atrofia da mucosa, desmineralização dentária, doenças periodontais, osteonecrose, disfagia, trismo, linfedema, dermatite, desenvolvimento de distúrbios e disfunção nas glândulas

salivares e alterações de voz e fala (HONG et al., 2010; EPSTEIN, 2012; ZECHA *et al.*, 2016). A MO é um dos efeitos secundários mais importantes da terapia oncológica (CAUWELS & MARTENS, 2011).

Existe também uma interação potencial entre o microambiente oral e o desenvolvimento de mucosite. Durante a terapia oncológica ocorrem alterações na flora bucal e é possível que essas alterações possam influenciar no desenvolvimento da toxicidade da mucosa associada ao tratamento do câncer (STRINGER & LOGAN, 2015).

2.2 MUCOSITE ORAL

Mucosite é uma lesão inflamatória que ocorre como efeito colateral da quimioterapia e/ou radioterapia, e pode acometer tanto a cavidade bucal, quanto outras mucosas do trato gastrointestinal (LALLA *et al.*, 2014). Enquanto a quimioterapia pode provocar o surgimento da mucosite em qualquer ponto da mucosa gastrointestinal, a radioterapia, por ser um tratamento local, leva ao seu desenvolvimento apenas na área irradiada, sendo assim, a radioterapia de cabeça e pescoço é responsável pelo surgimento da MO (SONIS, 1998; SONIS, 2004; LALLA *et al.*, 2014).

As terapias anticâncer, em sua maioria, usam agentes danosos ao DNA, projetados para atingir preferencialmente células cancerígenas, devido à sua alta taxa de proliferação e à sua baixa capacidade de reparar danos no DNA. No entanto, como essas terapias também eliminam células que se dividem rapidamente, elas podem diminuir profundamente as respostas imunes, além de influenciar diretamente na renovação celular constante que existe na mucosa bucal, contribuindo para o surgimento da MO (GHIRINGHELLI; APETOH, 2014). Os agentes quimioterapêuticos que possuem maior associação com o surgimento desta condição são o 5-fluorouracil (5FU) e metotrexato. O tratamento com o uso simultâneo da radio e quimioterapia eleva a incidência de mucosite (SONIS, 1998; SONIS, 2004; LALLA *et al.*, 2014; MALLICK, BENSON, RATH, 2015; STRINGER & LOGAN, 2015).

A MO é uma das complicações agudas mais comuns, dolorosas e debilitantes provocada pelos efeitos citotóxicos destas terapias (SONIS, 1998; SONIS, 2004; STRINGER & LOGAN, 2015). Trata-se de um dano que ocorre no revestimento mucoso da cavidade oral podendo levar a formação de úlceras, geralmente associadas a dor intensa, requerendo, muito comumente, a utilização de analgésicos opioides para um efetivo controle desta dor. Em virtude dessa sintomatologia dolorosa, há um importante comprometimento da qualidade de vida desses pacientes, uma vez que estes apresentam dificuldade para falar, mastigar e se alimentar – principalmente devido à odinofagia e/ou disfagia –, podendo ocasionar em desnutrição e provocando um aumento da necessidade de nutrição parenteral. Além disso, estas lesões podem atuar como porta de entrada para microrganismos, elevando o risco de infecção local e/ou sistêmica. Esses aspectos, além de tornarem árdua a terapia oncológica, elevam a necessidade de internamento hospitalar e, conseqüentemente, os custos do tratamento (SONIS, 1998; SONIS, 2004; LALLA *et al.*, 2014; BENSADOUN, 2018; ZADIK *et al.*, 2019).

A frequência geral da MO é variável e depende, principalmente, das doses e frequência de administração da terapia antineoplásica, da higiene bucal, do diagnóstico e idade do paciente. Estima-se que entre 20 e 40% dos pacientes submetidos à dose padrão de quimioterapia; 80 e 100% dos que recebem quimioterapia em altas doses como condicionamento para transplante de células tronco hematopoiéticas; e praticamente todos os pacientes que recebem radioterapia de cabeça e pescoço, desenvolvam a MO (SONIS, 1998; LALLA *et al.*, 2014; STRINGER & LOGAN, 2015; ZADIK *et al.*, 2019).

Cerca de metade dos indivíduos que desenvolvem estas lesões, as apresentam em tal gravidade que podem requerer a necessidade de modificações, interrupções indesejadas ou até a suspensão completa do tratamento do câncer, o que pode comprometer seriamente o controle da doença e o prognóstico do tratamento destes pacientes (SONIS, 1998; MALLICK, BENSON, RATH, 2015; BENSADOUN, 2018).

Embora o processo de desenvolvimento da MO seja iniciado a partir de um dano celular direto provocado pela quimioterapia e/ou radioterapia, evidências sugerem que a patogênese desta condição não se resume a esse dano, mas compreende um modelo de cinco estágios, envolvendo espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias, subprodutos metabólicos derivados da colonização por

microrganismos e o dano tecidual resultante que ocorre pela apoptose e necrose tecidual (LALLA *et al.*, 2014; STRINGER & LOGAN, 2015; ZECHA *et al.*, 2017; BENSADOUN, 2018; HONG *et al.*, 2019).

Conforme observa-se na figura 1, a administração de quimioterapia (ou radioterapia) inicia danos no DNA (primeiro estágio), resultando em danos às células. Nesse primeiro estágio ocorre um aumento do estresse oxidativo (em virtude da geração de espécies reativas de oxigênio [ROS]) e ativação da resposta imune inata. Esse processo envolve a ativação dos principais fatores de transcrição pró-inflamatórios, incluindo o fator nuclear- κ B (NF- κ B), com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias chave (por exemplo, fator de necrose tumoral- α [TNF- α], interleucina [IL] -1 β e IL-6) resultando na ruptura do tecido conjuntivo. Observam-se, ainda, aumentos locais nas cinases que danificam os tecidos. A amplificação do sinal (terceiro estágio) ocorre quando o TNF- α e IL-1 β , com NF κ B, também são ativados em outras células, resultando em lesão progressiva do tecido e levando à manifestação clínica da ulceração. A colonização do tecido ulcerado por bactérias resulta em uma lesão ativa pois os produtos da parede celular bacteriana são capazes de ativar macrófagos para estimular e potencializar uma resposta inflamatória. A quarta etapa é mais significativa para o paciente, pois resulta em lesões dolorosas e debilitantes (STRINGER & LOGAN, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2019). A fase final é caracterizada por migração, diferenciação e proliferação celular, quando ocorre o reparo tecidual. Caso não haja complicações locais ou sistêmicas, esse reparo ocorre espontaneamente de alguns dias a algumas semanas após a interrupção do tratamento (SONIS, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2016).

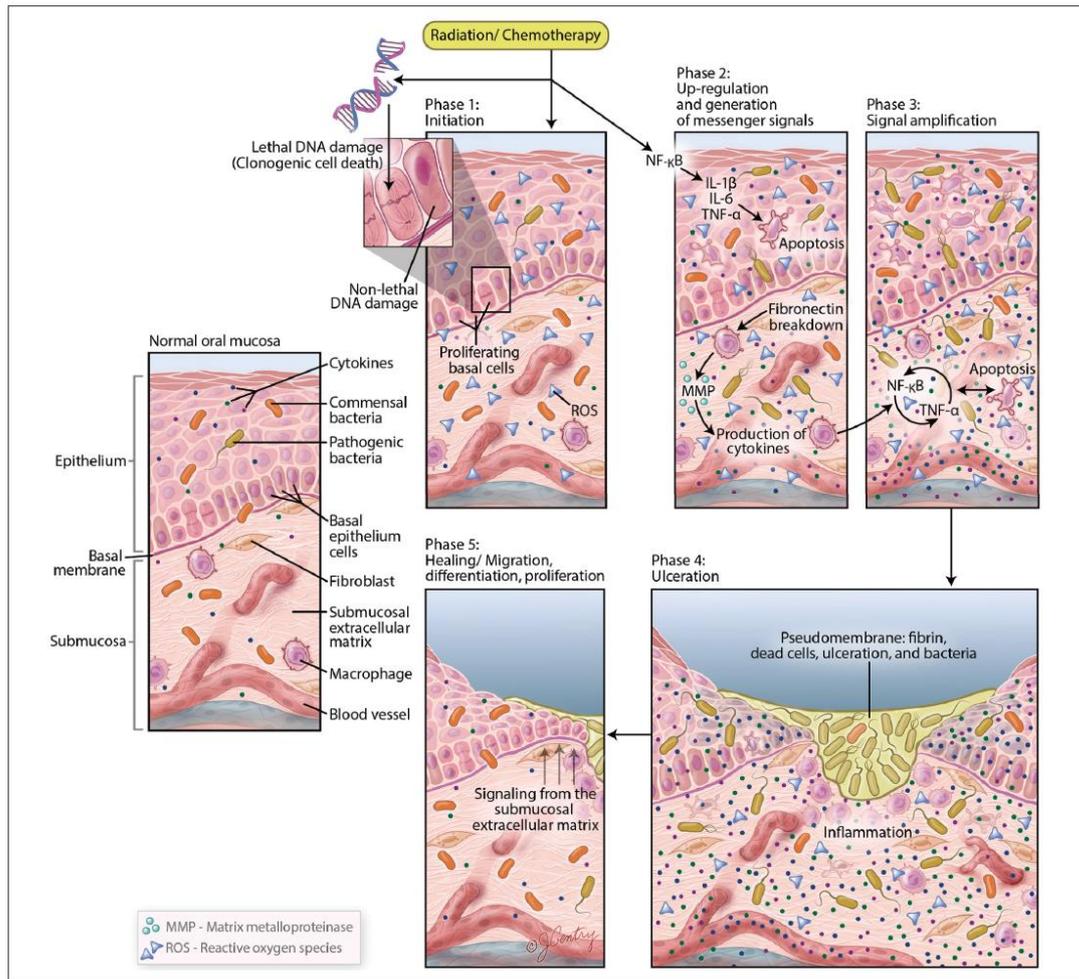


Figura 1: A progressão da MO pode ser resumida em 5 estágios: iniciação, mensagens e sinalização, amplificação, ulceração e cura. Com base nesse modelo, a inflamação, juntamente com a apoptose, leva à perda da integridade da barreira mucosa, promovendo a translocação das bactérias.

Adaptado de: Vasconcelos, Sanfilippo, Paster, Kerr, Ramalho, Queiroz, Smith, Sonis, Corby, 2016.

O entendimento atual da patogênese da MO é amplamente baseado em modelos animais, que documentam a natureza multifatorial dessa condição inflamatória e implicaram uma cascata de eventos inter-relacionados em múltiplos compartimentos teciduais (BENSADOUN, 2018). O modelo animal de pesquisa da MO, com a utilização de hamsters e do 5-FU foi determinado por Sonis *et al.* (1990). Os autores referiram que essa escolha foi baseada no grande volume mucoso facilmente observado das bolsas jugais dos hamsters e na capacidade dos animais de tolerar doses de 5-FU produtoras de mucosite sem mortalidade significativa. No estudo em que o modelo animal foi sugerido, foi possível observar características histológicas e clínicas semelhantes às encontradas em seres humanos que receberam quimioterapia. Dentre os achados estavam a degeneração do colágeno, grandes áreas de descamação, ruptura epitelial e ulceração que caracterizaram o quadro clínico de mucosite grave. Além disso, o achado histológico de microrganismos no tecido conjuntivo subjacente à ulceração, reforçou o conceito de que a ruptura da integridade do epitélio oral pode servir como porta de entrada para microrganismos no paciente em tratamento oncológico (SONIS *et al.*, 1990).

Existem, na literatura, algumas possibilidades terapêuticas para a mucosite (RANNA *et al.*, 2019), entretanto, as opções realmente eficazes ainda são escassas e o controle da dor geralmente é inadequado (ZECHA *et al.*, 2017; BENSADOUN, 2018). As diretrizes para o seu manejo incluem desde cuidados bucais básicos, até o uso de medicamentos (anti-inflamatórios, antimicrobianos, anestésicos, analgésicos), de citocinas e fatores de crescimento, agentes naturais, crioterapia e fotobiomodulação a laser (SONIS, 1998; RANNA *et al.*, 2019). Apesar do desenvolvimento de diretrizes para o manejo da mucosite, esta continua sendo um grande problema para pacientes submetidos à terapia do câncer (STRINGER & LOGAN, 2015).

2.3 INFLAMAÇÃO E MASTÓCITOS

O processo inflamatório representa um mecanismo de defesa do organismo em decorrência de agressões físicas, químicas e biológicas. Na maioria dos casos, a inflamação atua de forma inespecífica, sobre qualquer tipo de agressor, independente da sua natureza. É um processo que ocorre apenas no tecido conjuntivo, pois depende de vasos sanguíneos. Os vasos permitem a passagem de células sanguíneas e substâncias plasmáticas para o local lesado, para que atuem sobre o agressor, eliminando-o e controlando a agressão local para, posteriormente, promover a reparação da área (CONSOLARO, 2015).

Diferentes tipos celulares estão envolvidos na inflamação e, dentre eles, os mastócitos tem um papel fundamental (WALSH, 2003). Os mastócitos (MCs) são células móveis, secretoras do sistema imunológico, que se originam da medula óssea. Essas células circulam no sangue periférico, e, em suas formas maduras, são encontrados em todos os tecidos conjuntivos, particularmente distribuídas nos espaços perivasculares, próximas à membrana basal de células endoteliais (WALSH, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; PARAGUASSU *et al.*, 2014). Possuem como principal função estocar mediadores químicos em seus grânulos secretores, e atuam tanto na resposta vascular, quanto na resposta celular da inflamação. Esses grânulos citoplasmáticos são ricos em aminas vasoativas (como a histamina), glicosaminoglicanos sulfatados (como a heparina), leucotrienos e citocinas (como TNF e IL-1 a IL-6) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; CONSOLARO, 2015).

Frente a um estímulo apropriado, os MCs produzem e liberam esses mediadores químicos associados a diferentes processos biológicos responsáveis pela proliferação celular e vascular, vasodilatação no microambiente de uma lesão, reparo tecidual e mecanismos de defesa do hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; PARAGUASSU *et al.*, 2014). Além disso, há evidências de que estas células desempenham um papel essencial na formação da matriz de colágeno e tecido de granulação durante a cicatrização de feridas. Os MCs são críticos no início do desenvolvimento da inflamação da mucosa oral e na transição da inflamação aguda para a crônica (CORREIA *et al.*, 2016).

Segundo Consolaro (2015) os mastócitos são as células responsáveis por iniciar a inflamação. O autor sugere que o desencadeamento do processo inflamatório

se dá a partir da interação das proteínas teciduais livres – decorrentes da agressão tecidual – com a superfície dos mastócitos, o que induz o seu processo de degranulação.

Assim que o tecido recebe a agressão, ou seja, o estímulo para o início da inflamação, os mastócitos degranulam e liberam os mediadores químicos que alteram a microcirculação local, aumentando a permeabilidade vascular. Essa permeabilidade é causada, mais especificamente, pela liberação da histamina. Em adição, produzem, ainda, enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; PARAGUASSU *et al.*, 2014; CONSOLARO, 2015). Essa liberação de histamina, ao induzir a vasodilatação, proporciona maior aporte de oxigênio e nutrientes ao tecido lesado, possibilita a chegada de mais fibrinogênio (compartimentalizando a inflamação) e promove, ainda, juntamente com as prostaglandinas D2 e o fator de ativação plaquetária - PAF (ambos também produzidos nos mastócitos) o afastamento das células endoteliais, fator muito importante na resposta celular da inflamação (ABBAS, 2015).

Além disso, ressalta-se que os mastócitos também produzem as substâncias necessárias para o recrutamento de leucócitos, que incluem selectinas, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos (PARAGUASSU *et al.*, 2014). Nesse recrutamento de glóbulos brancos, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da inflamação, pois são as células imunológicas circulantes mais abundantes no corpo humano (ABBAS, 2015). Os neutrófilos, assim como as células endoteliais, sofrem mudanças na sua superfície, e passam a expressar proteínas que possibilitam a ligação entre elas. As selectinas e as integrinas são as proteínas mais atuantes nesse processo. Uma vez circulantes nos vasos sanguíneos, os neutrófilos, em virtude dessas proteínas, passarão mais próximos da parede do vaso, etapa conhecida como marginação. Quando aderidos à parede do endotélio, tem início um fenômeno conhecido como rolamento, no qual os neutrófilos começam a rolar pelo vaso. Há um momento em que os neutrófilos param de rolar e se prendem ao endotélio com ainda mais força, e nesse momento é que ocorrerá a diapedese, evento no qual o neutrófilo migra do vaso sanguíneo para o tecido, para atuar, juntamente com as células dendríticas e os macrófagos, na eliminação do agente agressor, através da fagocitose (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; ABBAS, 2015; BRASILEIRO FILHO, 2016)

A partir desse fenômeno, os MCs contribuem ativamente na quimiotaxia e na formação de novos vasos, auxiliando na amplificação e progressão do processo inflamatório (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; PARAGUASSU *et al.*, 2014; CONSOLARO, 2015).

Segundo Santos *et al.* (2010) é possível observar a presença de mastócitos tanto na reação inflamatória aguda quanto na crônica. Nas reações agudas eles sofrem degranulação, liberando mediadores, como a histamina, e nas reações inflamatórias crônicas podem produzir citocinas que contribuem para a fibrose. Os autores trazem ainda que os mastócitos raramente são vistos degranulando naturalmente em doenças autoimunes ou em processos inflamatórios, e que o fato de estarem envolvidos em doenças inflamatórias, sem causar choque anafilático, se dá justamente através da liberação "seletiva" ou "diferencial" de mediadores sem que haja degranulação. Entretanto, esse papel dos MCs na inflamação crônica ainda não está completamente elucidado.

2.4 FOTOBIMODULAÇÃO A LASER

2.4.1 Modo de ação e parâmetros da laserterapia

A laserterapia de baixa intensidade atua induzindo uma reação fotoquímica na célula, processo conhecido como bioestimulação ou fotobiomodulação (CHUNG *et al.*, 2012). A fotobiomodulação a laser surgiu após a invenção do laser de rubi (1960) e do laser Hélio-Neônio (1961), mais precisamente em 1967, quando Endre Mester descreveu o efeito biomodulador dos lasers (PANDESHWAR *et al.*, 2015).

Refere-se à terapia de luz utilizada, principalmente, para modulação da inflamação, promoção do reparo tecidual e controle da dor (PANDESHWAR *et al.*, 2015; ZECHA *et al.*, 2016). Esses tratamentos foram originalmente descritos como uso de "laser de baixo nível" por se tratar de uma luz de baixa intensidade em comparação com outras formas de tratamento médico a laser. Entretanto, em 2014, na conferência conjunta da Associação Norte-Americana de Laserterapia (NAALT) com a Associação Mundial de Laserterapia (WALT), foi sugerido que o termo fotobiomodulação seria o ideal, sendo definido como "O uso terapêutico da luz [por

exemplo: visível, infravermelho próximo (NIR), infravermelho (IR)] absorvido pelos cromóforos endógenos, desencadeando reações biológicas não térmicas, não citotóxicas e biológicas através de eventos fotoquímicos ou fotofísicos, levando a alterações fisiológicas” (ZECHA *et al.*, 2016).

Em suma, a fotobiomodulação é uma aplicação clínica não invasiva, em comprimento de onda vermelho (600-700 nm) ou infravermelho próximo (780-950 nm), em baixas densidades de energia (em comparação a outras formas de uso do laser, como corte, coagulação térmica e ablação). Ademais, é importante enfatizar que os efeitos da fotobiomodulação nos tecidos dependem do tipo de célula presente, estado redox da célula, parâmetros de irradiação e tempo de exposição (HUANG *et al.*, 2009; BENSADOUN & NAIR, 2012; PANDESHWAR *et al.*, 2015).

A laserterapia de baixa intensidade atua nos níveis molecular, celular e tecidual. É um mecanismo não ablativo de efeito fotoquímico pelo qual a luz é absorvida e exerce uma alteração química nas células. O efeito primário ocorre dentro da célula, mais precisamente nas mitocôndrias, quando a luz é absorvida pelo Citocromo C Oxidase (CCO), que, por sua vez, reage aumentando a produção de Adenosina Trifosfato (ATP) e reduzindo o estresse oxidativo (KARU, 1989).

As ERO (espécies reativas de oxigênio) são moléculas que desempenham um importante papel na ativação de vias secundárias de sinalização celular, ativação enzimática e síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Ao promover a indução de fatores de transcrição, as ERO provocam síntese proteica que, por sua vez, desencadeia a modulação nos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, além de promover um aumento da oxigenação tecidual e na proliferação e migração celular (CHUNG *et al.*, 2012).

A observação de que o óxido nítrico (ON) é liberado das células durante a fotobiomodulação levou a especulações de que a laserterapia de baixa intensidade possa causar fotodissociação de ON do CCO. A respiração celular é regulada negativamente pela produção de ON. Nas mitocôndrias, especialmente de células estressadas ou hipóxicas, o óxido nítrico (ON) se liga ao CCO deslocando competitivamente o oxigênio, inibindo a respiração celular e diminuindo a produção de ATP. Ao dissociar o ON do CCO, a fotobiomodulação reverte a inibição mitocondrial da respiração e a geração de ERO, e resulta em aumento da produção de ATP. Essa mudança no potencial redox geral das células causa a ativação de fatores de

transcrição sensíveis ao redox, levando à expressão de uma variedade de produtos gênicos que impedem a apoptose e a morte celular, estimulam a proliferação de fibroblastos, a migração e a síntese de colágeno, modulam a resposta inflamatória e antioxidante e estimulam a angiogênese e o reparo tecidual. Além disso, o ON é fotodissociado de outros estoques intracelulares, como a hemoglobina nitrosilada e a mioglobina nitrosilada, causando vasodilatação. De uma forma geral, o resultado é o aumento do metabolismo energético e uma melhor viabilidade celular (KARU, 1999; ANTUNES et al., 2004; KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005; ZHANG et al., 2009).

A fotobiomodulação a laser tem sido utilizada com os principais intuitos de promover a cicatrização e o reparo tecidual; modular a inflamação, reduzindo o edema devido a lesões ou doenças crônicas; e promover analgesia (CHUNG, 2012). Acredita-se que ela atua nas três fases do processo de cicatrização de feridas: fase inflamatória, na qual ocorre a quimiotaxia de células imunes, melhorando a mobilidade dos leucócitos; fase proliferativa, que resulta em uma elevação na quantidade de fibroblastos e macrófagos; e na fase de remodelação, promovendo a deposição colagênica, induzindo a neovascularização e a reconstruindo da matriz extracelular (THOMAS *et al.*, 1995). Esse processo ocorre em virtude da liberação local de citocinas, quimiocinas e outros modificadores de resposta biológica (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005).

Os lasers em geral são classificados com base em diferentes propriedades e, para a fotobiomodulação, podem ser utilizados diferentes comprimentos de onda, potência de saída e modos de emissão de onda (contínua ou pulsada). Os comprimentos de onda utilizados para a fotobiomodulação encontram-se em uma "janela" que vai do comprimento de onda vermelho ao infravermelho próximo (600-1070 nm). A penetração efetiva do tecido é maximizada nessa faixa, pois em comprimentos de onda menores que 600nm ocorre uma alta absorção pelos principais cromóforos do tecido (hemoglobina e melanina), impossibilitando maior penetração do feixe. Dessa forma, comprimentos de onda na faixa de 600 a 700 nm são usados para tratar tecidos superficiais, e comprimentos de onda mais longos na faixa de 780 a 950 nm, que penetram ainda mais, são usados para tratar tecidos mais profundos (CHUNG *et al.*, 2012).

As doses comumente usadas nos comprimentos de onda vermelho para tratamento de lesões razoavelmente superficiais tendem a estar em torno de 4 J/cm²,

com um intervalo de 1 a 10 J/cm². A potência normalmente usada pode variar amplamente, estando no intervalo de 1 a 1000 mW, dependendo do objetivo da aplicação. Evidências sugerem que tanto a densidade de energia quanto a densidade de potência são parâmetros de suma importância para a eficácia da laserterapia (CHUNG *et al.*, 2012). Caso seja administrada uma dosagem menor que a ideal pode-se ter um efeito diminuído, enquanto doses maiores podem resultar em efeitos negativos (ZECHA *et al.*, 2016). Estudos mostraram que doses relativamente altas de luz podem induzir apoptose em diferentes tipos celulares por meio de vias de sinalização mediadas por ERO (HUANG *et al.*, 2011).

Dessa forma, para se obter resultados positivos com a fotobiomodulação, é necessário que os parâmetros de irradiação, incluindo a energia fornecida, densidade de potência, forma de emissão do pulso, entrega no local anatômico apropriado (efeito dependente do operador), tempo e repetição adequados ao tipo do tratamento estejam dentro da janela de dose bioestimulatória (ZECHA *et al.*, 2016).

Como já se sabe que o efeito bioestimulador da laserterapia é cumulativo, dessa forma, sugere-se que doses repetidas em intervalos adequados, relativamente curtos, oferecem uma melhor resposta. Ou seja, baixas doses repetidas em intervalos de 1 a 7 dias induzem melhores efeitos que a mesma dose total administrada em um único tratamento (CHUNG *et al.*, 2012).

2.4.2 Laserterapia em Mucosite Oral

A MO (MO) é uma complicação debilitante da radioterapia de cabeça e pescoço e da quimioterapia. Esta condição pode estar associada a dor intensa, aumentando o consumo de opioides, afetando as funções orais e a nutrição do paciente, acarretando um aumento da necessidade de nutrição parenteral, além de poder resultar na descontinuidade do tratamento e elevar o risco de bacteremia nesses pacientes. Atualmente, os estudos mostram resultados benéficos da fotobiomodulação na prevenção, alívio da dor e diminuição da gravidade da MO (GAUTAM *et al.*, 2012; PANDESHWAR *et al.*, 2015; ZADIK *et al.*, 2019).

A fotobiomodulação inclui uma gama de fontes de luz não ionizantes, no espectro visível e no infravermelho próximo em doses não térmicas muito baixas. Esta

fotobiomodulação provoca eventos fotofísicos e fotoquímicos, envolvendo várias vias biológicas que fornecem resultados terapêuticos benéficos, em virtude da ativação de cromóforos endógenos, estimulando assim a promoção de processos como cicatrização, regeneração e respostas imunes, além de mediar a inflamação, dor e respostas imunes aberrantes (ARANY, 2016; ZECHA *et al.*, 2016; ZADIK *et al.*, 2019).

Os pesquisadores sugerem que a fotobiomodulação pode reduzir os níveis de ERO, substância que contribui para a patogênese da MO, além de melhorar a atividade enzimática e a síntese proteica nas células, melhorando a resposta imune na região local (PANDESHWAR *et al.*, 2015). Estudos tem demonstrado o aumento da circulação sanguínea, aumento na proliferação, maturação e locomoção de fibroblastos e fibras colágenas, bem como na produção de fatores de crescimento de procolágeno e colágeno e a estimulação da diferenciação miofibroblástica nas fases iniciais da cicatrização (RIBEIRO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2011; PANDESHWAR *et al.*, 2015).

Worthington *et al.* (2011) realizaram uma meta-análise e relataram que cinco dos estudos por eles analisados, compreendendo um total de 234 pacientes, compararam o laser com um placebo de simulação da aplicação do laser ou controle sem tratamento, para as três categorias de mucosite e constataram que houve uma redução estatisticamente significativa de 80% na incidência de mucosite grave no grupo laser comparado ao controle simulado ou sem tratamento ($p=0,006$).

Esta meta-análise (Worthington *et al.*, 2011) e uma revisão sistemática com meta-análise de 11 ensaios clínicos randomizados realizada por Bjordal *et al.* (2011) concluíram que havia evidências consistentes de que a laserterapia de baixa intensidade aplicada com doses de 1 a 6 J por ponto na área orofaríngea em pacientes com câncer que recebem quimioterapia ou radioterapia é efetiva tanto na prevenção de ocorrências como na redução da gravidade, duração e dor associada à MO.

Outra meta-análise, incluindo ensaios clínicos randomizados em diferentes contextos de tratamento do câncer, mostrou que a fotobiomodulação a laser reduziu o risco de MO, além de diminuir sua gravidade e duração. A eficácia pareceu semelhante tanto para o comprimento de onda vermelho (630-670nm) quanto para o infravermelho próximo (780-830nm), embora as doses ótimas parecessem variar entre esses comprimentos de onda. Outrossim, uma revisão sistemática com metanálise de

18 ensaios clínicos randomizados relataram que fotobiomodulação profilática reduziu a MO grave e a dor associada em pacientes tratados por câncer de cabeça e pescoço ou submetidos a TCTH (ZECHA *et al.*, 2017; BENSADOUN, 2018).

Alguns desses estudos resultaram na formação um grupo de pesquisa sobre mucosite da Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer (MASCC) e na Sociedade Internacional de Oncologia Oral (ISOO) em 2012, objetivando publicar uma revisão sistemática sobre o manejo da MO. Como produto das suas pesquisas, duas novas diretrizes foram desenvolvidas: uma recomendação do uso da laserterapia de baixa intensidade para prevenção de MO em pacientes adultos que recebem quimioterapia em altas doses como condicionamento para TCTH; e uma “sugestão” desta mesma terapia para prevenção de MO em pacientes submetidos à radioterapia isolada de cabeça e pescoço. Essas recomendações foram publicadas nas diretrizes do MASCC / ISOO em 2014 (LALLA *et al.*, 2014; PANDESHWAR *et al.*, 2015; ZECHA *et al.*, 2017; BENSADOUN, 2018).

Em 2019 este mesmo grupo de estudos da MASCC/ISOO publicou uma atualização das diretrizes para o manejo da MO, a qual identificou evidências para apoiar diretrizes de prática clínica para três indicações clínicas específicas: reforçou a recomendação de 2014 da fotobiomodulação a laser para a prevenção da MO em pacientes submetidos ao TCTH, entretanto ampliando as possibilidades de protocolos aplicáveis; reiterou a utilização desta fototerapia para a prevenção da MO em pacientes tratados com RT de cabeça e pescoço isolada (sem quimioterapia associada); e sugeriu uma nova diretriz, a qual recomenda a utilização da Laserterapia de baixa intensidade na prevenção da MO em pacientes submetidos ao tratamento de radioterapia de cabeça e pescoço em associação com a quimioterapia (ZADIK *et al.*, 2019).

Os parâmetros de fotobiomodulação a laser relatados para prevenção e tratamento da MO, na maioria das vezes, transita na faixa de comprimento de onda vermelho e infravermelho próximo (600–1000nm), com uma densidade de potência entre 5 e 150 mW/cm² e com tempo de 30–60 segundos por ponto. O efeito terapêutico é ditado pela densidade de energia medida em J/cm² (ZECHA *et al.*, 2016). Bjordal *et al.* (2011), em uma revisão sistemática, e Bensadoun & Nair (2012), em uma metanálise, recomendaram a fotobiomodulação com laser vermelho (630–670 nm) ou infravermelho (780–830 nm) com potência entre 10 e 100 mW na dose de 2–3 J/cm²

para profilaxia e 4 J/cm², com aplicação pontual para efeito terapêutico, como terapia diária ou em dias alternados, ou no mínimo três vezes por semana até a resolução das lesões (PANDESHWAR *et al.*, 2015).

2.4.3 Influência da fotobiomodulação nos mastócitos

Pesquisas anteriores demonstraram que o tratamento a laser em tecidos irradiados resulta em uma exacerbação da resposta inflamatória aguda nos primeiros dias, com aumento de células polimorfonucleares, mastócitos e vasodilatação, acelerando o processo inflamatório e resultando em uma reparação mais rápida (PEREIRA *et al.*, 2014; PARAGUASSU *et al.*, 2014).

As células imunes, parecem ser fortemente afetadas pela luz laser. Os mastócitos, que desempenham um importante papel no recrutamento de leucócitos, são de considerável importância na inflamação. É sugerido que os mastócitos, como células secretoras, reagirão ao aumento dos níveis de ATP causados pela luz (CHUNG *et al.*, 2012; PARAGUASSU *et al.*, 2014). Ou seja, comprimentos de onda de luz específicos são capazes de desencadear a degranulação de mastócitos, e, conseqüentemente, promover a liberação das citocinas pró-inflamatórias pelas células. Esse evento culmina no aumento da infiltração dos tecidos pelos leucócitos (CHUNG *et al.*, 2012).

Sabe-se que a fotobiomodulação a laser possui efeitos positivos na microcirculação, induzindo a vasodilatação *in vivo*. Foi sugerido que esse efeito da laserterapia na microcirculação ocorre graças ao estímulo da degranulação dos mastócitos e conseqüente aumento da permeabilidade celular (PARAGUASSU *et al.*, 2014).

Em um estudo com ratos submetidos à fototerapia laser com densidade de 10,2 J/cm², Tsyganova (1973) observou que o número total de mastócitos 2 horas após a irradiação aumentou em 24% em comparação com os animais controle. E permaneceu aumentando gradualmente. No sétimo dia após a primeira irradiação, sua porcentagem relativa foi 187% maior do que no controle. Após 10-20 dias, o número de mastócitos era menor do que no período anterior após a irradiação, mas ainda era

94% maior que o controle. Foi possível observar, ainda que com o aumento na densidade de irradiação para 48 J/cm², 2 horas após a irradiação, a maioria dos mastócitos apresentou citoplasma degranulado e eram quatro vezes mais numerosos do que no grupo controle. E era visível a presença dos grânulos agrupados fora das células, no tecido conjuntivo.

Deste modo, a aceleração da ativação dos mastócitos e da resposta inflamatória resultaria em um processo de reparo mais rápido, o que é de grande importância para a redução da morbidade e debilidade dos pacientes portadores de MO. Todavia, apesar de haver estudos que revelem a ação da laserterapia sobre o número e a ativação de MCs, a literatura ainda carece de estudos envolvendo a ação da fotobiomodulação sobre os MCs em lesões de MO.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da fotobiomodulação a laser na expressão e degranulação de mastócitos em lesões de MO quimioinduzidas em um modelo animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão e degranulação de mastócitos em MO quimioinduzida nos grupos: mucosite, irradiados com laser vermelho ($\lambda 660\text{nm}$) e infravermelho ($\lambda 780\text{nm}$) nos tempos de 7, 11 e 15 dias.

- Avaliar o tipo e a intensidade da inflamação no local e a sua relação com a degranulação de mastócitos em diferentes tempos experimentais.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA) e aprovado, n.105/2016 (em anexo). Todo o experimento seguiu as normas de experimentação animal desta instituição e das Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais, recomendada pela Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Para realização desta pesquisa foram utilizados 36 hamsters da raça Syrian (*Mesocricetus auratus*) da linhagem dourada, adultos, peso médio de 150 gramas, machos, clinicamente saudáveis, com 6 a 8 semanas de vida, obtidos do Biotério da Faculdade de Veterinária da UFBA.

Os animais foram mantidos e submetidos aos experimentos no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Permaneceram em gaiolas plásticas apropriadas forradas com maravalha, contendo 4 hamsters em cada, ou seja, um grupo por gaiola.

Os hamsters foram alimentados de forma controlada com a ração Labina® (Purina, São Paulo, Brasil) e hidratados com água *ad libitum*. Foram, ainda, pesados regularmente.

As gaiolas foram mantidas limpas e lavadas com água e sabão neutro, a cada dois dias, quando também a maravalha era trocada, para manutenção da higiene e bem-estar dos animais.

Os hamsters permaneceram em período de aclimação durante 7 dias e apenas após esse período a fase experimental foi iniciada. Ou seja, o dia 8 pós aclimação correspondeu ao dia 0 do período experimental.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em nove grupos, com 4 animais cada, e avaliados em três tempos experimentais (7, 11 e 15 dias), de acordo com a administração do quimioterápico, a indução da MO e com o protocolo de irradiação (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição dos animais nos grupos experimentais de acordo com o procedimento experimental e tempo de morte.

GRUPO		PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	MORTE
M	7	Mucosite Quimioinduzida sem tratamento	7 dias
	11	Mucosite Quimioinduzida sem tratamento	11 dias
	15	Mucosite Quimioinduzida sem tratamento	15 dias
LV	7	Mucosite Quimioinduzida + Laser Vermelho ($\lambda 660\text{nm}$)	7 dias
	11	Mucosite Quimioinduzida + Laser Vermelho ($\lambda 660\text{nm}$)	11 dias
	15	Mucosite Quimioinduzida + Laser Vermelho ($\lambda 660\text{nm}$)	15 dias
LI	7	Mucosite Quimioinduzida + Laser Infravermelho ($\lambda 780\text{nm}$)	7 dias
	11	Mucosite Quimioinduzida + Laser Infravermelho ($\lambda 780\text{nm}$)	11 dias
	15	Mucosite Quimioinduzida + Laser Infravermelho ($\lambda 780\text{nm}$)	15 dias

O grupo Mucosite (M-7, M-11 e M-15) funcionou como controle, pois não houve tratamento. Nos animais deste grupo foi realizada a aplicação do quimioterápico nos dias 0 e 2 do experimento, as ranhuras para indução da MO nos dias 3 e 4, os animais não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento e foram sacrificados em diferentes tempos (7, 11 e 15 dias respectivamente).

Nos grupos irradiados (LV e LI) foi realizada a aplicação do quimioterápico nos dias 0 e 2 do experimento, as ranhuras para indução da MO nos dias 3 e 4, a irradiação com laser nos dias 0, 2, 4 e 6 para os animais sacrificados no sétimo dia do experimento; 0, 2, 4, 6, 8, e 10 para os animais sacrificados no décimo primeiro dia do experimento; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 para os animais sacrificados no décimo quinto dia do experimento.

Os grupos LV-7, LV-11 e LV-15 foram irradiados com laser vermelho com

comprimento de onda de $\lambda 660\text{nm}$, enquanto os grupos LI-7, LI-11 e LI-15 foram irradiados com laser infravermelho com comprimento de onda de $\lambda 780\text{nm}$.

4.4 QUIMIOTERAPIA E INDUÇÃO DA MUCOSITE ORAL

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (figura 2) do quimioterápico Faudfluor® (Fluorouracila 500mg/10ml, Libbs, São Paulo, Brasil) (figura 3), na dosagem de 80mg/Kg no dia zero da pesquisa, e 40mg/kg no dia dois (LOPES et al., 2009).

Com o intuito de induzir o aparecimento da MO, foram realizadas ranhuras na bolsa jugal direita dos animais (figura 4), utilizando uma agulha calibre 8 de forma firme e constante por quatro vezes consecutivas, nos dias três e quatro do experimento. Este procedimento teve a finalidade de obter uma ferida mecânica e induzir ao aparecimento da MO, por quebra de continuidade da mucosa, mimetizando um trauma oclusal em humanos. Este modelo foi descrito e desenvolvido por Sonis *et al.* (1990).



Figura 2: Injeção intraperitoneal



Figura 4: Ranhuras



Figura 3: Quimioterápico

4.5 FOTOBIMODULAÇÃO A LASER

Para a irradiação dos grupos experimentais, foi utilizado o aparelho de Laser diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAIAs), modelo *Twin Flex Evolution* (MMOptics®, São Carlos, SP) (figura 5), nos comprimentos de onda vermelho ($\lambda 660\text{nm}$) (figura 6) e infravermelho ($\lambda 780\text{nm}$) (figura 7), com emissão de radiação contínua (*Continuous Wave*), potência de 40mW e área de saída do feixe da ponteira de $0,04\text{cm}^2$. O aparelho de luz laser foi devidamente aferido e calibrado, garantindo correta entrega de energia desta pesquisa.

As aplicações de laser foram realizadas na bolsa jugal direita evertida de cada animal, em contato direto com a mucosa (figura 8), de forma pontual (em dois pontos) (figura 9), respeitando o halo de 1cm de diâmetro em torno da ponteira, evitando a sobreposição de dose. A ponta do laser foi mantida em posição perpendicular ao tecido irradiado, a fim de garantir maior absorção da energia. Em cada ponto foi depositada uma densidade de energia de $1,2\text{J}/\text{cm}^2$ com o tempo de aplicação de 30 segundos, totalizando $2,4\text{J}/\text{cm}^2$ e um tempo de aplicação total de 60 segundos por sessão. A irradiação foi iniciada no dia 0 da pesquisa, com intervalo de 48h entre as repetições até a morte dos animais (7, 11 ou 15 dias).

Para todos os procedimentos de irradiações de luz, os animais estavam sob sedação e a caneta esteve envolvida em papel filme descartável e higienizada com álcool 70% após utilização.



Figura 5: Aparelho de laser



Figura 6: Irradiação com laser vermelho (660nm)

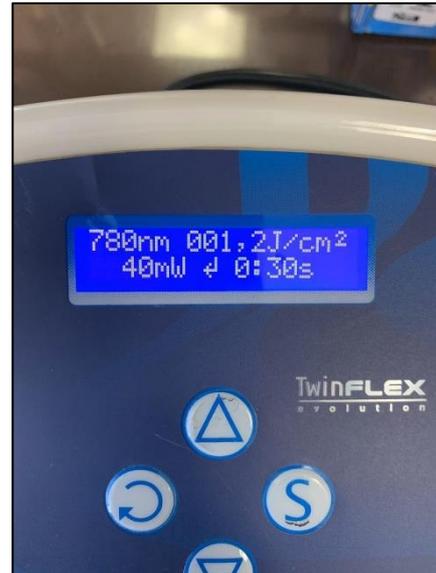


Figura 7: Irradiação com laser infravermelho (780nm)

Quadro 2: Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação

Grupos Parâmetros	Mucosite sem tratamento			Mucosite + Laser Vermelho			Mucosite + Laser Infravermelho		
	7	11	15	7	11	15	7	11	15
Comprimento de onda	-	-	-	660	660	660	780	780	780
SAEF (J/cm ² - sessão)	-	-	-	2,4 J/cm ²	2,4 J/cm ²	2,4 J/cm ²	2,4 J/cm ²	2,4 J/cm ²	2,4 J/cm ²
SAEF (J/cm ² - tratamento)	-	-	-	9,6 J/cm ²	14,4 J/cm ²	19,2 J/cm ²	9,6 J/cm ²	14,4 J/cm ²	19,2 J/cm ²
Potência Output (mW)	-	-	-	40mW	40mW	40mW	40mW	40mW	40mW
Área do spot (cm ²)	-	-	-	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²
Irradiância (mW/cm ²)				1000 mW/cm ²	1000 mW/cm ²	1000 mW/cm ²	1000 mW/cm ²	1000 mW/cm ²	1000 mW/cm ²
Tempo de irradiação (sessão)	-	-	-	60s	60s	60s	60s	60s	60s
Tempo de irradiação (tratamento)	-	-	-	240s	360s	480s	240s	360s	480s



Figura 8: Irradiação laser



Figura 9: Pontos de irradiação

4.6 PROCEDIMENTOS DE ANESTESIA, MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Durante a realização dos procedimentos (ranhura e aplicação de laser) os hamsters foram devidamente pesados e sedados por via intraperitoneal com Quetamina (Ketamina® 10ml, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., Roseira, SP, Brasil) na dosagem de 0,08ml/100g, associado a Cloridrato de Xilazina (Virbaxyl® 10ml, 16 Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., Roseira, SP, Brasil) na dosagem de 0,04ml/100g, ambos de uso veterinário.

Para a morte, após o período experimental de cada grupo (7, 11 e 15 dias), os animais receberam dose letal de analgesia via jugular. Após conferência dos sinais vitais e confirmação da morte dos mesmos, as peças foram removidas e encaminhadas para o Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, para o seu processamento.



Figura 10: Animal anestesiado



Figura 11: Peça encaminhada para processamento histológico

4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o processamento, as peças foram incluídas em parafina líquida a 60°C e até a solidificação das mesmas. Os blocos foram cortados em um micrótomo (micrótomo manual Leica RM2125 RTS) na espessura de 3µm. Os cortes foram distendidos em água destilada a 40°C e coletados em lâminas histológicas para colorações histoquímicas.

Foram realizadas as colorações Hematoxilina-eosina (HE) e Azul de Toluidina conforme protocolo do Laboratório de Patologia da FOUFBA. Após coradas, as lâminas foram montadas utilizando Entellan®.

4.7.1 Hematoxilina-eosina

Foi realizada a avaliação das lâminas coradas em HE em um estudo cego, por um patologista experiente, de forma semi-quantitativa, para análise da inflamação local, de acordo com os critérios encontrados no Quadro 3. A análise foi realizada em objetiva de 20x, através de microscopia ótica (Axiostarplus® / ZEISS, Germany 2008).

Quadro 3: Critérios utilizados para análise histológica adaptado de Paraguassu *et al.* (2014).

Variáveis	Scores		
Ausente	Sem presença de células inflamatórias		
Inflamação Aguda	Discreta Presença de até 25% de neutrófilos na área	Moderada Presença de 25 a 50% de neutrófilos na área	Intensa Presença superior a 50% de neutrófilos na área
Inflamação Mista	Discreta Presença de até 25% de neutrófilos e células inflamatórias crônicas na área	Moderada Presença de 25 a 50% de neutrófilos e células inflamatórias crônicas na área	Intensa Presença superior a 50% de neutrófilos e células inflamatórias crônicas na área
Inflamação Crônica	Discreta Presença de até 25% de células inflamatórias crônicas na área	Moderada Presença de 25 a 50% de células inflamatórias crônicas na área	Intensa Presença superior a 50% de células inflamatórias crônicas na área

4.7.2 Azul de Toluidina

As lâminas coradas em azul de toluidina foram analisadas por único examinador cego, previamente treinado, em microscopia de luz de alta potência (Axiostarplus® / ZEISS, Germany 2008). Foram realizadas fotografias de 10 campos por lâmina, utilizando a objetiva de 20x, gerando um total de 360 fotos. As fotografias foram, posteriormente, analisadas através do *software* ImageJ®, onde o número de mastócitos foi aritmeticamente calculado e tabulado como banco de dados no programa *Microsoft Excel*.

Degranulação de mastócitos

Além disso houve uma análise quantitativa dos mastócitos em degranulação. Essa análise foi realizada com base na classificação de Ribeiro *et al.* (2018), onde foi efetuada a contagem de mastócitos degranulados em cada campo e posteriormente foi realizada uma categorização, classificando cada campo com <50% ou >50% de mastócitos degranulados.

Quadro 4: Critérios utilizados para análise da degranulação dos mastócitos

DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS	SCORE
<50%	1
>50%	2

Foram considerados mastócitos em degranulação, os que apresentaram grânulos visíveis no citoplasma ou em volta da célula, e quando as células apresentavam contorno irregular da membrana, conforme observa-se na figura 12. E não degranulados os que se apresentaram menores, sem grânulos visíveis no citoplasma ou em volta da célula, além de contorno da membrana celular regular (figura 13). Os mastócitos não degranulados serão chamados mastócitos intactos.

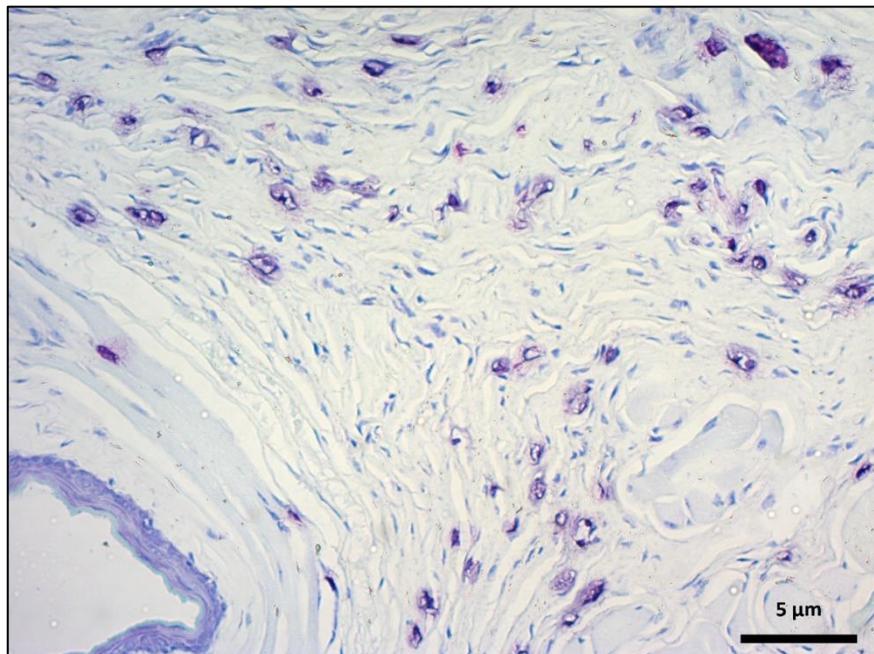


Figura 12: Mastócitos em degranulação

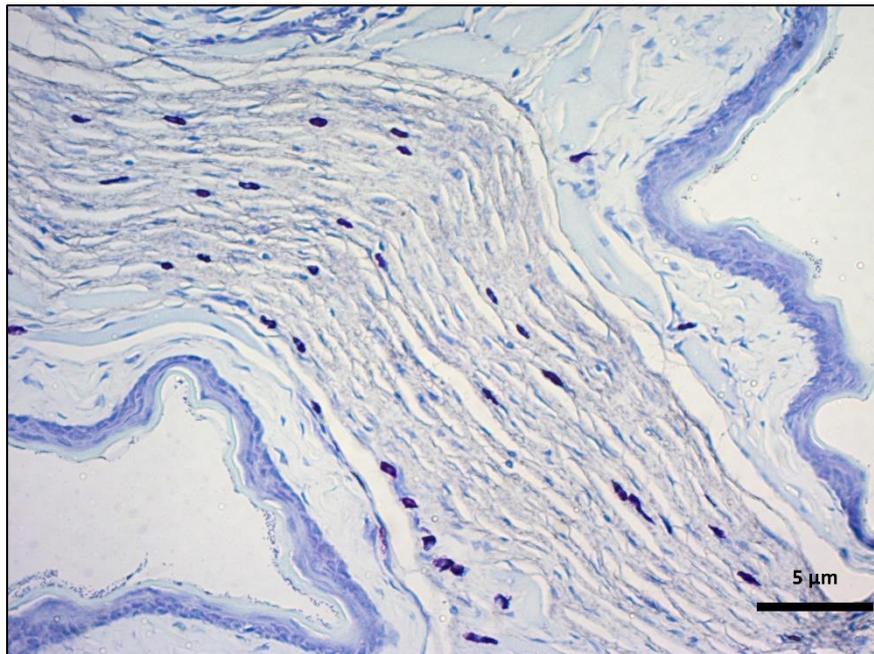


Figura 13: Mastócitos intactos

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística incluiu 36 animais, perfazendo um total de 36 lâminas. Para a análise dos mastócitos foram realizadas fotografias de 10 campos por lâmina, gerando um total de 360 fotografias.

Inicialmente, as variáveis foram descritas utilizando-se frequência absoluta (n) e relativa (%). A variável quantitativa referente à presença de mastócitos foi descrita por média e desvio padrão (\pm DP). Para comparação na variável “quantidade de mastócitos” foi utilizada a análise de variância (ANOVA) em associação ao teste de Tukey.

O Teste Friedman, complementado pelo pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os tempos de análise do grau de degranulação em cada grupo. Adicionalmente, para comparação intergrupos aplicou-se o teste Qui-quadrado, realizando as comparações a cada 2 grupos.

Para todos os testes realizados, adotou-se nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises dos dados foram realizadas utilizando o software Minitab versão 14.0 (Minitab Inc., EUA).

5 RESULTADOS

Inicialmente, será apresentada a descrição dos resultados por grupo de tratamento com os seus respectivos tempos (7, 11 e 15 dias), os quais são: Mucosite Quimioinduzida (M); Mucosite Quimioinduzida + Laser Vermelho (LV); Mucosite Quimioinduzida + Laser Infravermelho (LI). Por fim, serão apresentadas análises comparativas entre os grupos, nos diferentes tempos experimentais.

5.1 ANÁLISE INTRAGRUPPO

Comparação dos animais submetidos ao mesmo procedimento experimental em diferentes tempos de morte.

Mucosite Quimioinduzida (M)

Entre os subgrupos de M, uma média de mastócitos significativamente maior foi registrada em M-11 ($43,98 \pm 12,62$) em relação aos subgrupos M-7 ($30,83 \pm 18,54$) e M-15 ($30,93 \pm 10,67$) ($p < 0,001$), conforme pode-se observar na tabela 1.

Tabela 1. Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos sem tratamento em diferentes tempos.

	Tempo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
M	7	1233	30,83 ^a	18,54
	11	1759	43,98 ^b	12,62
	15	1237	30,93 ^a	10,67

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p < 0,001$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Quanto à degranulação pode-se observar (figura 14) que o único grupo que apresentou maior parte dos campos (70%) com degranulação de mais de 50% dos mastócitos foi o grupo de animais avaliados aos 11 dias (M-11). Todos os outros grupos apresentaram maior percentual de mastócitos intactos do que degranulados, com destaque para o M-15, o qual revelou maior percentual (97,5%) de mastócitos sem degranular.

Ao confrontar os subgrupos de M, observou-se diferenças significativas entre os animais avaliados aos 7 dias com os avaliados aos 15 dias ($p=0.008$) e entre os avaliados aos 11 e os avaliados aos 15 dias ($p<0.001$).

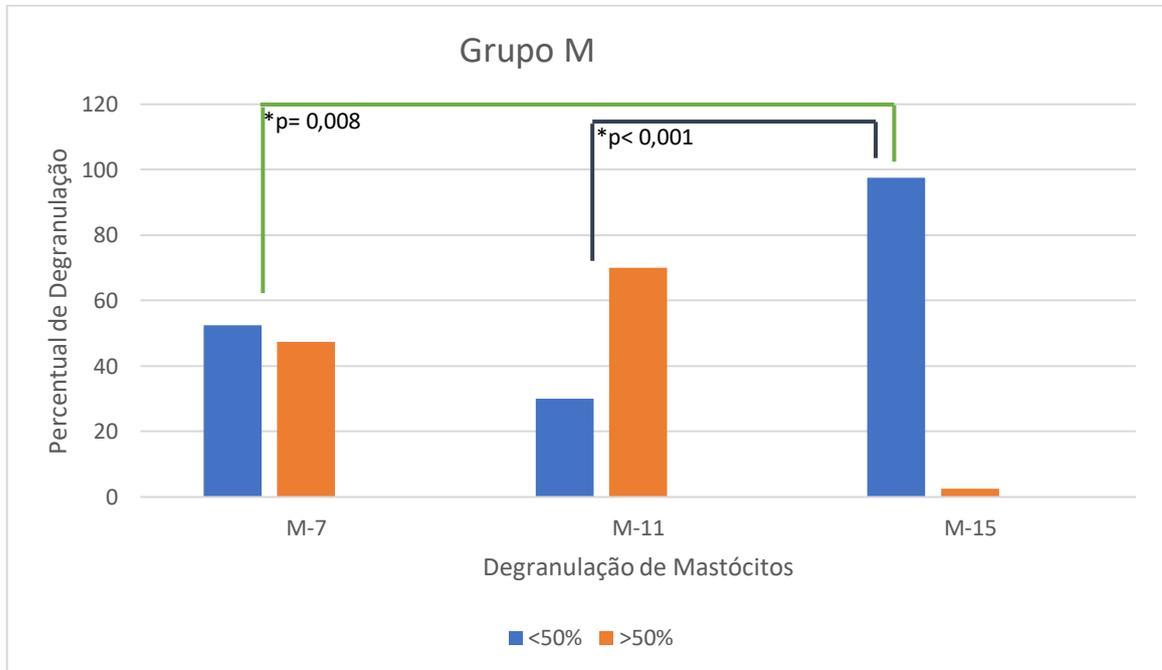


Figura 14: Percentual de degranulação de mastócitos no grupo M ao longo do tempo.

Ao analisar a relação com a inflamação (figura 15), percebe-se que o grupo que apresentou maior média de MCs e maior percentual de degranulação foi o grupo de menor percentual de inflamação. Conforme Figura 15, o subgrupo M-11 registrou presença de inflamação em apenas 50% dos campos, predominantemente crônica discreta. Em contrapartida, o subgrupo M-15 registrou uma maior parcela de campos com mastócitos intactos (97,5%), além de maior número de campos com inflamação mista (75%) e de intensidade moderada (50%). Não houve registros de inflamação aguda e de grau intensa em M.

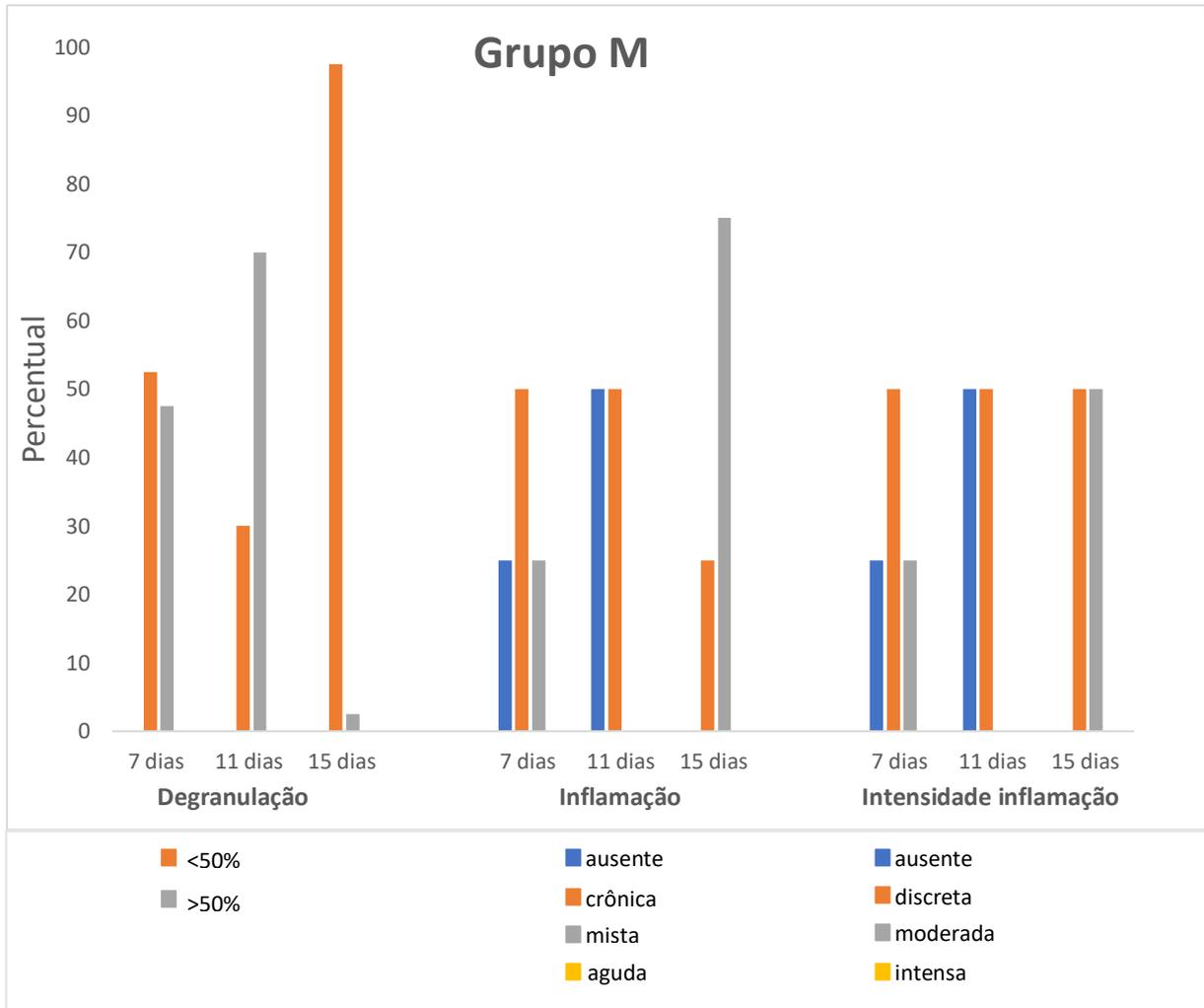


Figura 15: Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo M.

Laser Vermelho (LV)

Entre os subgrupos de LV, foi verificada uma diferença significativa entre a maior média de mastócitos registrada em LV-7 ($38,28 \pm 19,05$) e a menor em LV-11 ($28,35 \pm 12,48$) ($p=0,02$) (tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos submetidos a irradiação com laser vermelho em diferentes tempos.

	Tempo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
LV	7	1531	38,28 ^a	19,05
	11	1134	28,35 ^b	12,48
	15	1389	34,73 ^{ab}	15,95

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p=0,02$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Nesse grupo não houve subgrupo no qual o percentual de campos com mastócitos em degranulação fosse maior ao de campos com mastócitos intactos (figura 16). Contudo, LV-11 apresentou quase metade (47,5%) dos seus campos com predomínio de mais de 50% de mastócitos degranulados; apesar de ser o subgrupo com menor média de expressão de mastócitos (28,35) em relação aos demais subgrupos. Observou-se semelhanças entre os animais avaliados aos 11 dias com os avaliados aos 15 dias ($p=0.008$), sendo este último o subgrupo com maior percentual (97,5%) de campos com mastócitos intactos.

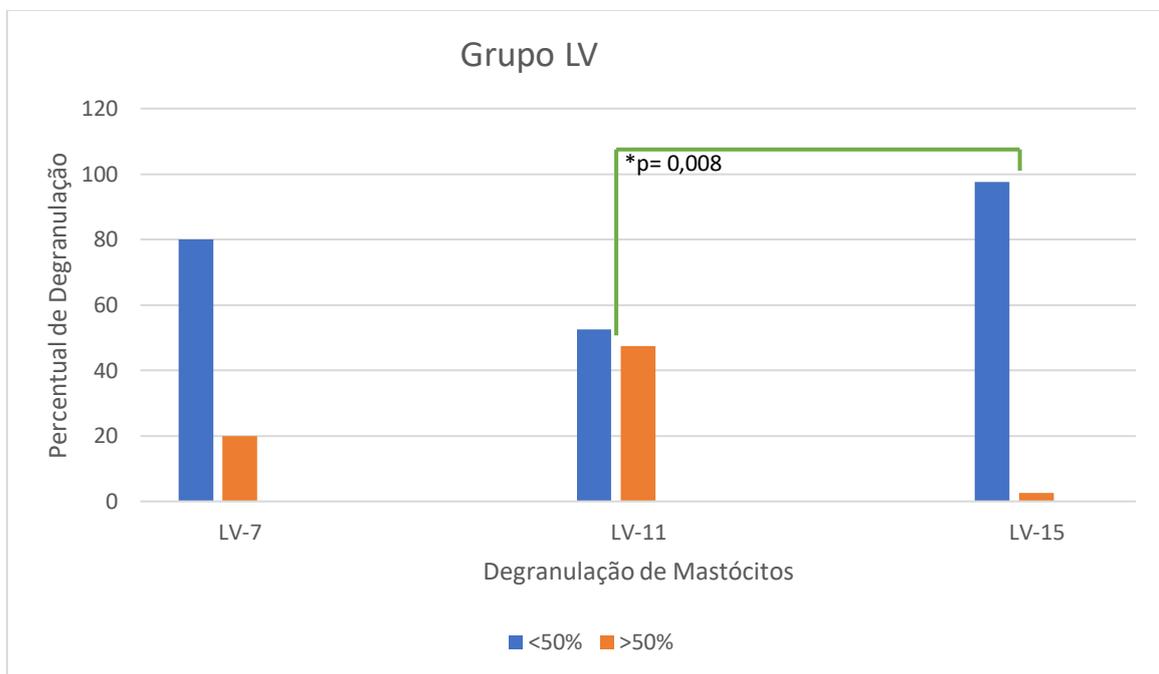


Figura 16: Percentual de degranulação de mastócitos no grupo LV ao longo do tempo.

Neste grupo, a maior expressão de MCs foi no subgrupo dos 7 dias, o qual apresentou inflamação em 50% dos campos, do tipo crônica discreta; enquanto a maior degranulação foi no subgrupo dos 11 dias, onde verifica-se presença de inflamação em 100% dos campos, onde há predomínio de inflamação crônica (75%) de intensidade discreta. Os outros 25% apresentaram inflamação mista de intensidade moderada (figura 17).

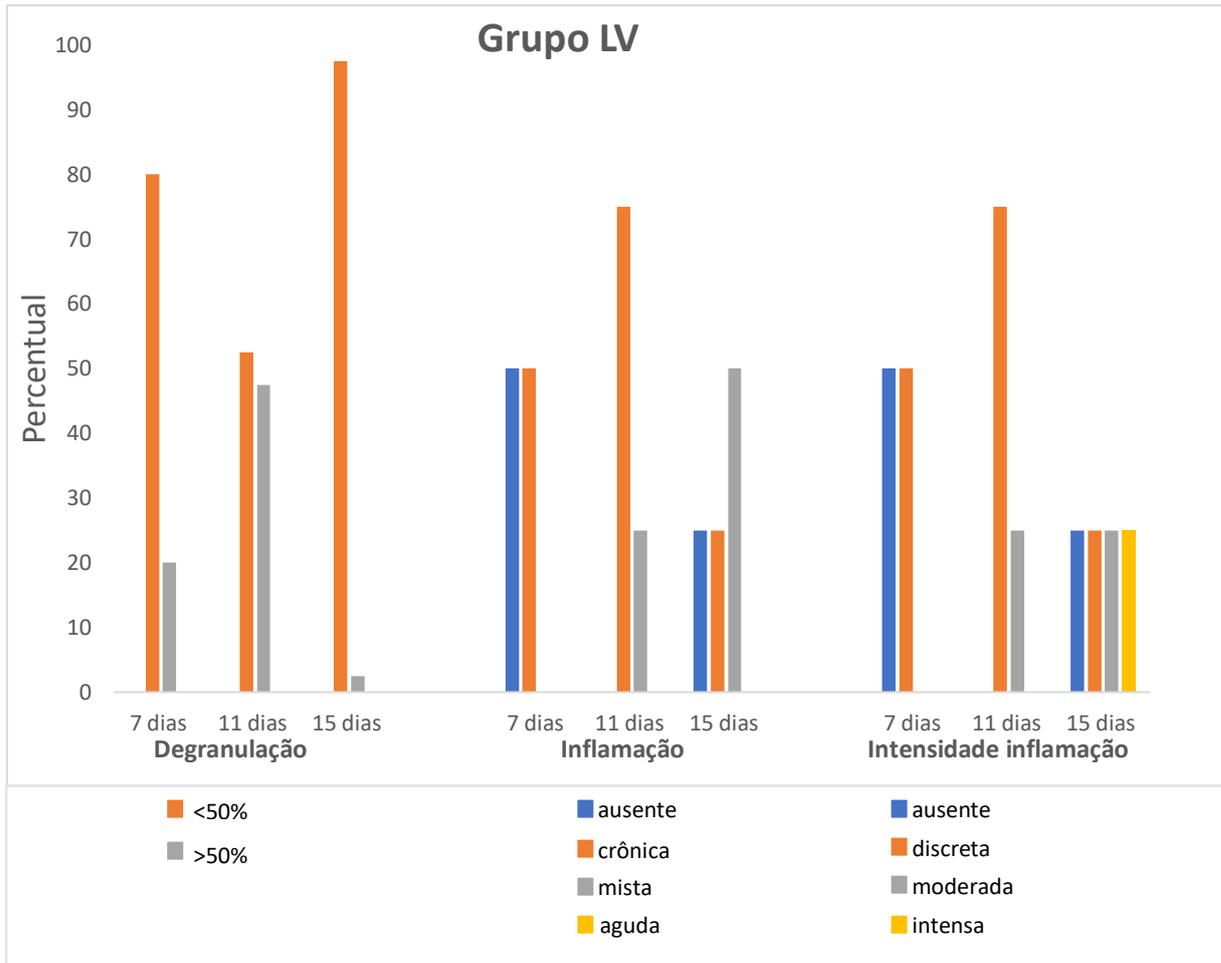


Figura 17: Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo LV.

Laser Infravermelho (LI)

Entre os subgrupos de LI uma maior contagem de mastócitos foi observada em LI-15 ($26,85 \pm 13,46$), entretanto não houve diferença significativa entre os três tempos (tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvios padrões do número de mastócitos nos grupos submetidos a irradiação com laser infravermelho em diferentes tempos.

	Tempo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
LI	7	929	23,23 ^a	9,23
	11	871	21,78 ^a	8,23
	15	1074	26,85 ^a	13,46

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p=0,09$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Em relação à degranulação de mastócitos, neste grupo não houve predominância de campos com mais de 50% dos mastócitos em degranulação (figura 18). Ou seja, os animais irradiados com laser infravermelho não apresentaram degranulação importante de mastócitos. Entre os subgrupos, o LI-15 foi o que apresentou maior percentual de mastócitos em degranulação (37,5%). O subgrupo de 11 dias obteve 100% de campos com predomínio de mastócitos intactos, além de registrar a menor média (21,78) de expressão mastocitária. Houve diferença significativa para os animais avaliados aos 11 dias e aqueles avaliados aos 15 dias ($p=0.036$).

No mesmo subgrupo que apresentou apenas mastócitos intactos (LI-11) não houve registro de células inflamatórias em 75% da área analisada, enquanto o subgrupo dos 15 dias, onde foi possível observar degranulação em 37,5% dos campos apresentou inflamação em 100% da área, com predomínio do tipo crônica com intensidade de discreta a moderada (Figura 19).

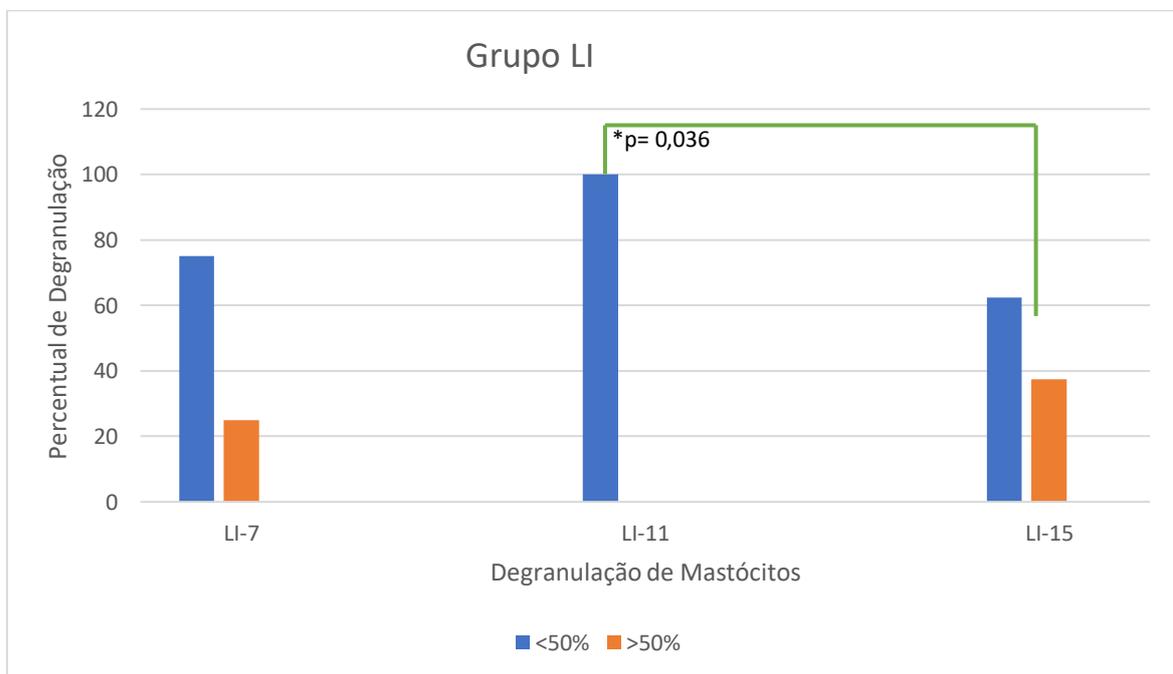


Figura 18: Percentual de degranulação de mastócitos no grupo LI ao longo do tempo.

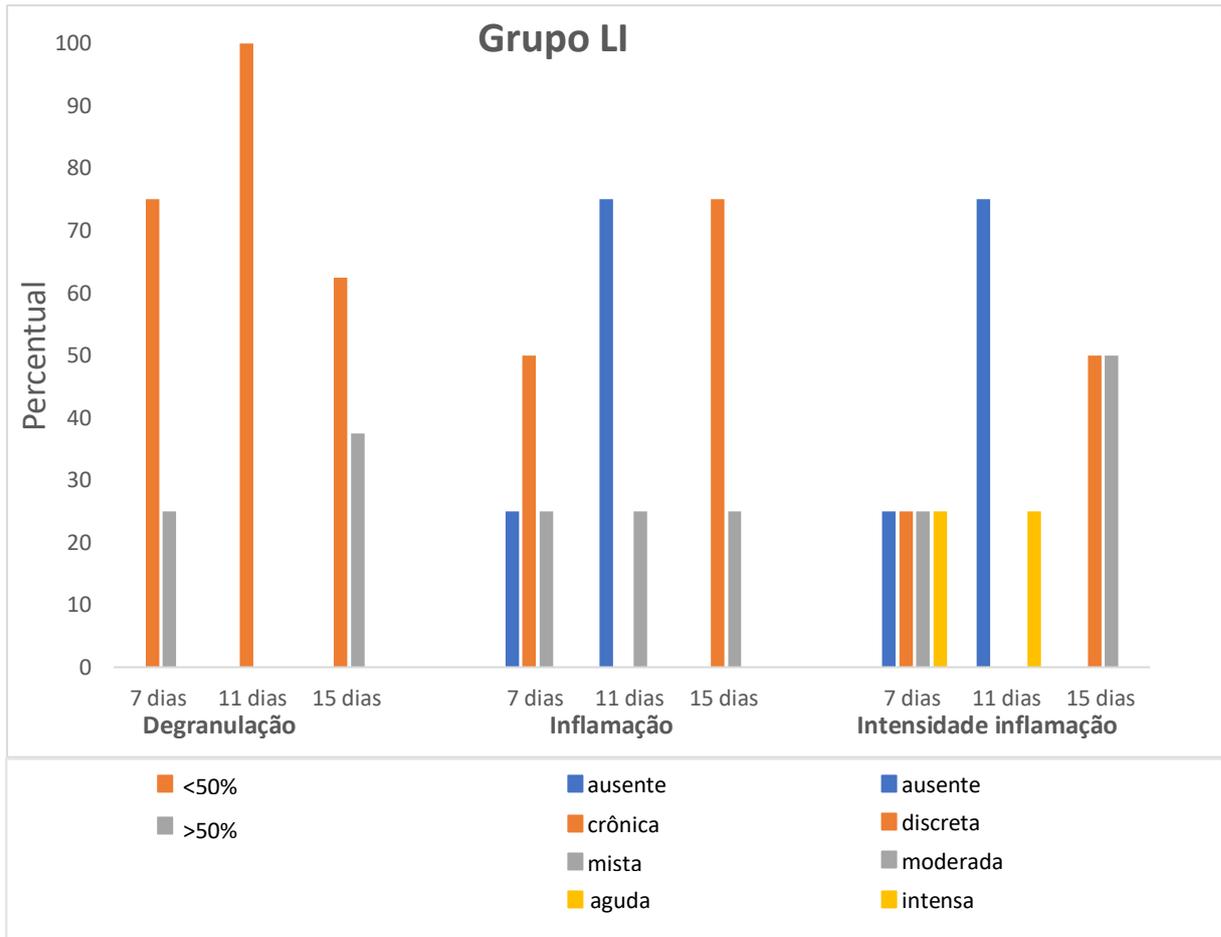


Figura 19: Avaliação da degranulação de mastócitos e inflamação local no grupo LI.

5.1 ANÁLISE INTERGRUPO

Comparação dos animais submetidos aos diferentes tratamentos dentro do mesmo tempo experimental.

7 Dias

Ao realizar a análise entre os grupos, dentro do período experimental de 7 dias, observou-se que o grupo irradiado com laser vermelho (LV-7; $38,28 \pm 19,05$) e o grupo de mucosite quimioinduzida sem tratamento (M-7; $30,83 \pm 18,54$) apresentaram uma expressão de mastócitos significativamente maior em relação ao grupo tratado com laser infravermelho (LI-7; $23,23 \pm 9,23$), não havendo diferença importante entre os grupos M e LV ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 7 dias

	Grupo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
7 DIAS	M	1233	30,83 ^a	18,54
	LV	1531	38,28 ^a	19,05
	LI	929	23,23 ^b	9,23

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p < 0,001$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Na maioria dos campos dos grupos dentro desse tempo experimental observou-se a presença de mastócitos intactos. Entretanto, o grupo M apresentou uma quantidade de campos com mastócitos degranulados (47,5%) bem próxima da quantidade de campos com mastócitos sem evidência de degranulação (52,5%).

Registrou-se significância estatística ao realizar as seguintes comparações: M x LV ($p=0.009$) e M x LI ($p=0.036$). A comparação LI x LV ($p=0.592$) não revelou significância.

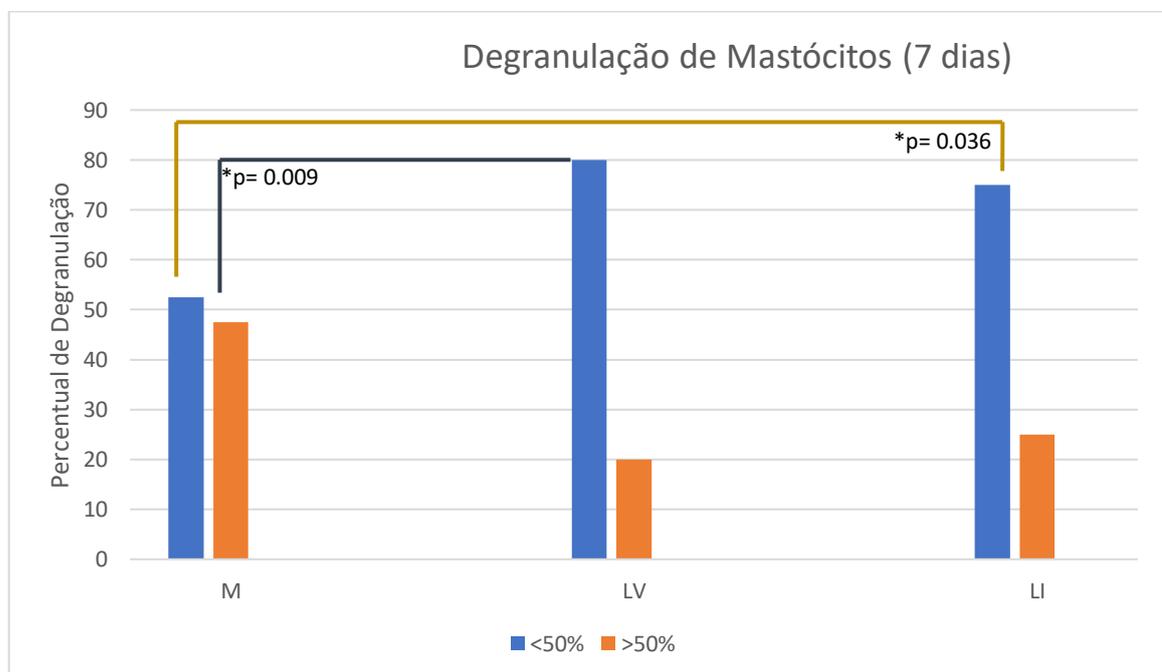


Figura 20: Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 7 dias.

11 Dias

A análise entre os grupos, dentro do período experimental de 11 dias, revelou uma contagem de mastócitos significativamente maior no M-11 ($43,98 \pm 12,62$; $p < 0,001$) em relação aos subgrupos LV-11 ($28,35 \pm 12,48$) e LI-11 ($21,78 \pm 8,23$). Entretanto, não houve diferença entre o grupo irradiado com laser vermelho (LV-11) e o irradiado com laser infravermelho (LI-11; $p < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5: Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 11 dias

	Grupo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
11 DIAS	M	1759	43,98 ^a	12,62
	LV	1134	28,35 ^b	12,48
	LI	871	21,78 ^b	8,23

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p < 0,001$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Entre os animais avaliados aos 11 dias, o único grupo que demonstrou maioria de campos (70%) com mais de 50% de mastócitos degranulados foi o grupo M. Entretanto, foi possível observar significância estatística ao confrontar todos os grupos: M x LV ($p < 0,05$); M x LI ($p < 0,001$); LI x LV ($p < 0,001$).

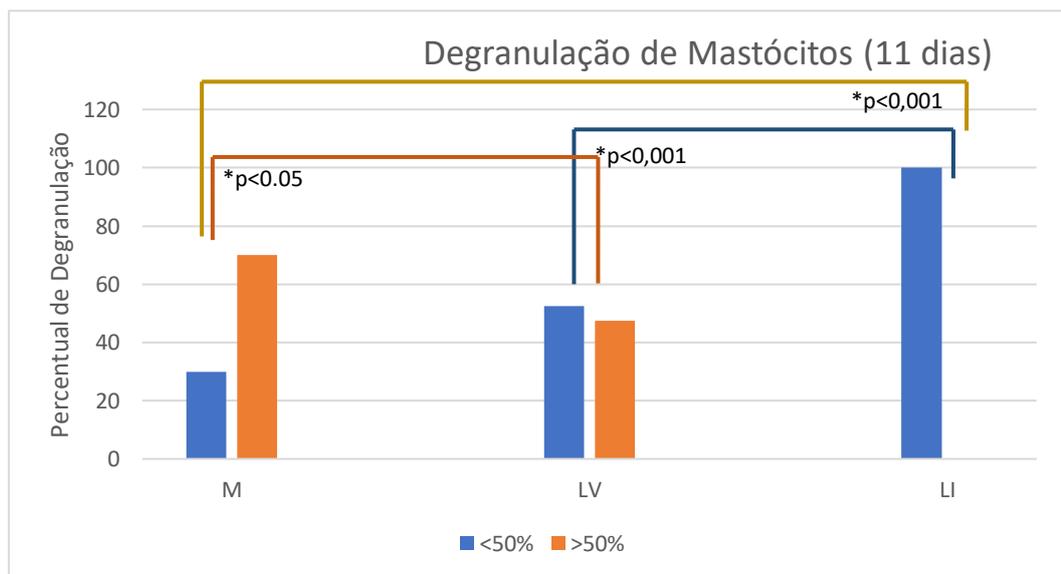


Figura 21: Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 11 dias.

15 Dias

A análise entre os grupos dentro do período de 15 dias, mostrou que o grupo LV-15 apresentou uma expressão de mastócito significativamente maior ($34,73 \pm 15,95$; $p=0,037$) em relação ao grupo LI-15 ($26,85 \pm 13,46$), entretanto não houve diferença quando comparado ao grupo M-15 ($30,93 \pm 10,67$) (Tabela 6).

Tabela 6: Teste entre os grupos submetidos a diferentes procedimentos experimentais aos 15 dias

	Grupo	Mastócitos (n)	\bar{X}	DP
15 DIAS	M	1237	30,93 ^{ab}	10,67
	LV	1389	34,73 ^a	15,95
	LI	1074	26,85 ^b	13,46

Letras distintas representam significância estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, $p=0,037$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Nesta comparação houve um percentual muito maior de grupos com predomínio de mastócitos intactos do que em degranulação, com destaque para os grupos M e LV que apresentaram 97,5% de campos com predomínio de mastócitos sem evidência de degranulação. O grupo com menor discrepância foi o LI, que demonstrou 37,5% de grupos com mais de 50% de mastócitos em degranulação. Foi possível observar significância estatística ao confrontar os seguintes grupos: M x LI ($p<0.001$); LI x LV ($p<0.001$). Não houve significância estatística ao comparar M x LV ($p>0.05$).

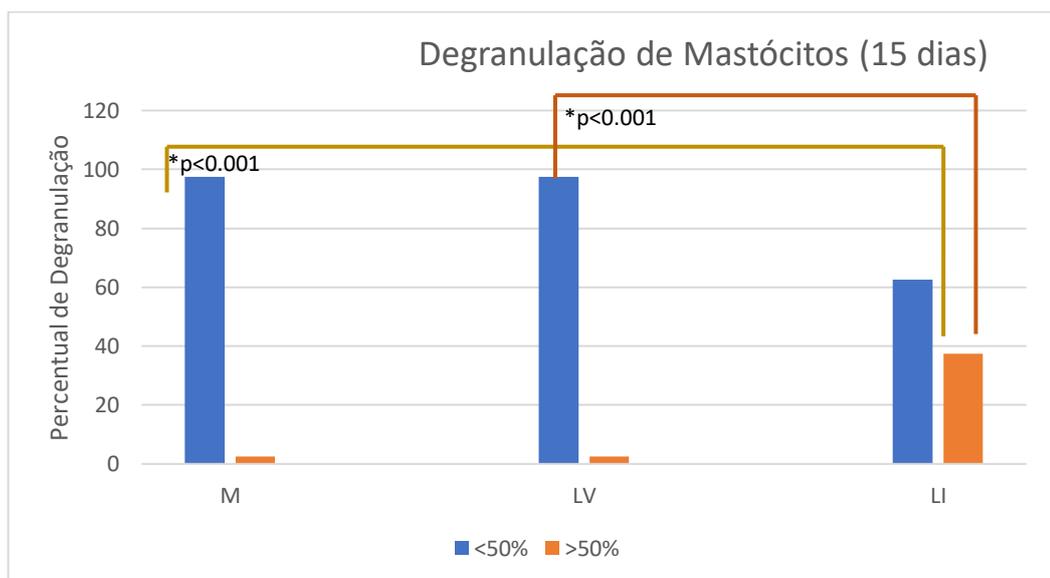


Figura 22: Percentual de degranulação de mastócitos nos diferentes grupos experimentais aos 15 dias.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o efeito da fotobiomodulação a laser no número e na degranulação de mastócitos em mucosites quimioinduzidas em hamsters. Foi possível observar que o grupo sem tratamento submetido ao tempo experimental de 11 dias (M-11) e o grupo irradiado com laser vermelho no tempo experimental de 7 dias (LV-7) foram os que apresentaram maior média de expressão de mastócitos, respectivamente. Quanto à degranulação, o grupo sob indução de mucosite sem tratamento avaliado aos 11 dias (M-11), foi o que apresentou maior percentual de campos com mais de 50% dos mastócitos em degranulação, e, entre os grupos tratados, o irradiado com laser vermelho e tempo experimental de 11 dias (LV-11), foi o que obteve maior expressão nessa variável. Observamos que não houve um padrão na resposta inflamatória de acordo com a quantidade e ativação dos MCs. O tipo de inflamação mais observado foi a crônica de intensidade discreta, independentemente da situação dos MCs.

Os mastócitos são células imunes, derivadas da medula óssea, que circulam pelo sangue periférico. Uma vez na corrente sanguínea, os precursores indiferenciados completam sua diferenciação e maturação nos tecidos para os quais foram recrutados, passando a ser encontrados em todos os tecidos conjuntivos e ambientes mucosos e nos sistemas nervoso central e periférico, especialmente adjacentes aos vasos sanguíneos (WALSH, 2003). Há evidências de que estas células estão entre os vários tipos celulares participantes do processo inflamatório, bem como na formação da matriz colagênica durante a cicatrização de feridas, e se mostram mais abundantes nesses casos (CORREIA *et al.*, 2016).

Não há na literatura estudos que analisem a expressão de mastócitos em MO. Dessa forma, buscamos confrontar nossos resultados com estudos que avaliaram a expressão de mastócitos em lesões que apresentem a inflamação local como característica, uma vez que a MO é uma condição caracterizada por agressão e inflamação local na mucosa bucal. De acordo com a literatura, MCs estão comumente presentes em lesões inflamatórias. Correia *et al.* (2016) relataram maior número dessas células em 4 tipos de lesões inflamatórias estudadas em humanos, em relação ao controle. Walsh (1995) relatou presença de grande número de mastócitos em lesões de líquen plano bucal. Kadeh; Derakhshanfar; Saravani (2016) realizaram um

estudo com o objetivo de comparar a contagem de mastócitos em várias lesões reativas orais e avaliar a correlação entre o número de mastócitos e a intensidade da inflamação. De acordo com seus resultados, houve um aumento na contagem de mastócitos nas lesões reativas em comparação com a mucosa normal da gengiva. Ribeiro *et al.* (2018) investigaram a relação entre a distribuição e degranulação dos MCs e a maturação do colágeno nos tecidos periodontais e durante a periodontite crônica. Eles observaram que a densidade de MC foi maior nos tecidos da periodontite do que nos tecidos de controle em áreas de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório. No presente estudo foi possível observar a presença de mastócitos em todos os espécimes, e essa expressão foi maior no grupo onde não houve tratamento.

Estudos sugerem que a fotobiomodulação pode aumentar o número de mastócitos nos tecidos (RIBEIRO *et al.*, 2018; PARAGUASSÚ *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2010; DAS NEVES *et al.*, 2016; TSYGANOVA, 1973). Entretanto, segundo Correia *et al.* (2016) o número de MCs pode ser facilmente subestimado, ou seja, pode ser difícil detectá-los devido ao processo de degranulação.

Em nosso estudo foi possível observar que a fotobiomodulação com laser vermelho aumentou a expressão de mastócitos aos 7 dias, revelou declínio quando avaliado o tempo experimental de 11 dias e um novo aumento aos 15 dias. Entretanto, o grupo de animais que não foi submetido a nenhum tipo de tratamento (M) demonstrou menor média de mastócitos que o grupo irradiado aos 7 dias, maior aos 11 dias (subgrupo no qual apresentou maior média que o irradiado com laser vermelho) e novo declínio aos 15 dias. Quanto ao grupo irradiado com laser infravermelho (LI), os três tempos experimentais revelaram menor média de expressão que os outros grupos. Tal fato pode ser justificado devido ao comprimento de onda infravermelho ser destinado à irradiação de estruturas mais profundas, como nervos e músculos (CHUNG *et al.*, 2012). Como o tecido irradiado nessa pesquisa foi extremamente fino, hipotetiza-se que o laser infravermelho possa ter passado sem agir diretamente nele, penetrando mais e entregando o mínimo de energia a esse tecido superficial.

Nesse contexto da ação da fotobiomodulação sobre o número de mastócitos, nossos achados corroboram com os de Bagheri *et al.* (2018), que avaliaram o número total de mastócitos e o efeito da sua degranulação na remodelação do reparo de lesões cutâneas em ratos diabéticos e constataram que, de um modo geral, a

contagem de mastócitos foi menor que a do grupo controle nos três tempos experimentais avaliados (4, 7 e 15 dias) e que, ao longo do tempo, o número de mastócitos (degranulado ou não) foi maior aos 4 dias, declinando aos 7 e aumentando novamente aos 15 dias. Dessa forma, hipotetizamos que o fato de haver uma modificação na condição sistêmica pode promover uma resposta diferente dos MCs à fotobiomodulação, uma vez que, assim como o Diabetes, o tratamento quimioterápico mantém o organismo numa condição pró-inflamatória crônica (Kleckner *et al.*, 2019).

Entretanto, em outros estudos, especialmente onde não houve comprometimento da condição sistêmica, pode-se observar resultados divergentes dos nossos. Dentre eles, Tsyganova (1973) avaliou alterações nos mastócitos do tecido conjuntivo subcutâneo em diferentes momentos após a irradiação a laser e relatou que o número de mastócitos no tecido conjuntivo frouxo após irradiação aumentou gradualmente, começando logo após a irradiação e tornando-se 187% maior do que no controle ao sétimo dia. Além deste, Pereira *et al.* (2010) analisaram o comportamento dos mastócitos e a resposta vascular sob a influência do tratamento a laser (670nm, 9 mW, 4 J/cm², 124s) em feridas cutâneas realizadas em 60 ratos divididos em grupos controle e laser e puderam observar que as populações de mastócitos intactos e degranulados juntas foram significativamente maiores três dias após o tratamento com laser em comparação aos animais do grupo controle. Diante dos achados dos trabalhos onde não houve alteração sistêmica, pode-se sugerir que as maiores influências da fotobiomodulação a laser no aumento da população de mastócitos ocorrem nos primeiros dias.

Entretanto entre os animais irradiados com laser infravermelho nesta pesquisa, a maior expressão de mastócitos só foi percebida nos animais sacrificados aos 15 dias. Esse achado pode ser devido ao fato, supracitado, de o laser infravermelho agir mais profundamente, entregando o mínimo de energia ao tecido fino e superficial analisado nesta pesquisa. Uma vez que a energia recebida pelo tecido é menor, leva-se mais tempo para que haja uma resposta do tecido à irradiação. Segundo Bagheri *et al.* (2018) o aumento tardio dos mastócitos pode impedir a regressão vascular na etapa de remodelação do reparo de lesões. Murata *et al.* (1997) mostraram que os mastócitos têm papel importante na neovascularização do tecido de granulação. No entanto, aumentando a fibrose, o que ocorre com o passar do tempo, a contagem de mastócitos diminui. Dessa forma, hipotetizamos que a irradiação com laser vermelho

pode conferir melhores resultados uma vez que, no nosso estudo, entre os subgrupos irradiados com esse comprimento de onda, o que apresentou maior número de mastócitos foi o de 7 dias, ou seja, mais precocemente, enquanto no infravermelho, o subgrupo com maior expressão foi o de 15 dias.

Os MCs produzem e liberam uma ampla gama de mediadores químicos que estão armazenados em seus grânulos citoplasmáticos e, quando liberados, exercem influência sobre diferentes processos biológicos, como proliferação vascular e vasodilatação no microambiente de uma lesão, reparo tecidual e mecanismos de defesa do hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 2010; REDDY; BHAGWATH; REDDY, 2014) Segundo alguns autores (TSYGANOVA, 1973; DAS NEVES *et al.*, 2016;) a degranulação dos mastócitos é ativada pela fotobiomodulação a laser.

Pereira *et al.* (2010) notaram em seus resultados que a degranulação dos mastócitos foi mais pronunciada após fotobiomodulação a laser. Tsyganova (1973) relatou que, em seu estudo, 2h após a irradiação, a maioria dos mastócitos apresentou citoplasma degranulado e que estes eram quatro vezes mais numerosos do que no grupo controle. Em contraste, Bagheri *et al.* (2018) notaram que o número de mastócitos degranulados foi significativamente maior no grupo controle do que no grupo submetido à fotobiomodulação. Em adição, sugeriram que os mastócitos degranulados na etapa de remodelação diminuem as propriedades tensiométricas do tecido reparador no caso do seu estudo com ratos diabéticos. Além desses, outros estudos demonstraram um aumento no número de mastócitos degranulados em animais submetidos a procedimentos cirúrgicos e tratados com diferentes comprimentos de onda (SAYED & DYSON, 1990; SAYED & DYSON, 1996) e na mucosa oral de humanos tratados com laser vermelho (SILVEIRA *et al.*, 2008; SAWASAKI *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2018).

No presente estudo a degranulação de mastócitos não seguiu um padrão de relação com a fotobiomodulação. O maior percentual de mastócitos degranulados foi observado no grupo com quimioindução de mucosite sem tratamento, mais especificamente o subgrupo submetido ao tempo experimental de 11 dias (M-11), seguido do subgrupo dos 7 dias (M-7) e do subgrupo irradiado com laser aos 11 dias (LV-11). De uma forma geral, o controle da mucosite (M) apresentou maiores valores de degranulação que os grupos irradiados, mais uma vez em similaridade com o estudo de Bagheri *et al.* (2018), ratificando a nossa suspeita de que a condição

sistêmica do animal possa modificar o padrão da ação do laser nos mastócitos. Há ainda, a possibilidade de a fotobiomodulação acelerar essa resposta dos mastócitos à irradiação, ao ponto dela ter ocorrido antes do nosso menor tempo de análise.

Estudos anteriores relataram que os mastócitos são cruciais no início do desenvolvimento da inflamação na mucosa oral, especialmente em eventos vasoindutivos iniciais, e no estágio de transformação da inflamação aguda para a crônica (DAS NEVES *et al.*, 2016; CORREIA *et al.* 2016). Entretanto, Wulff & Wilgus (2013) demonstraram que, durante o reparo de lesões cutâneas, os mastócitos aumentam a inflamação aguda. Nosso estudo avaliou tempos onde já não há presença de inflamação aguda. E, ao avaliar a variável inflamação, não houve um padrão de relação entre a quantidade de mastócitos e a presença e tipo de inflamação local. A maioria dos campos revelou presença de inflamação crônica, variando de discreta a moderada, independentemente da quantidade de mastócitos encontrados em cada um deles. Segundo Kleckner *et al* (2019) durante a quimioterapia a inflamação é tão desregulada que os pacientes experimentam um estado pró-inflamatório crônico. O que pode justificar os achados deste estudo.

Os efeitos da laserterapia dependem de parâmetros como comprimento de onda, potência, fluência, área da seção transversal do feixe emissor, energia total emitida, técnica de aplicação e frequência de tratamento (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001). No presente estudo foram utilizados os comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho próximo (780nm). Das Neves *et al.* (2016) usaram dois comprimentos de onda (830 e 660 nm), com o intuito de aumentar a viabilidade de retalhos musculocutâneos, mantendo o mesmo número de pontos de aplicação, potência, fluência, área de seção transversal do feixe emissor, total energia emitida, técnica de aplicação e frequência de tratamento. Estes autores puderam notar que a fotobiomodulação a laser foi eficaz em ambos os comprimentos de onda, entretanto o laser 830nm revelou melhores efeitos em termos da viabilidade do retalho, maior número de mastócitos e presença de vasos sanguíneos neoformados. Sharifian *et al.* (2014) analisaram a fotobiomodulação com laser infravermelho (890nm) em feridas confeccionadas em ratos diabéticos e, além de observarem que a fotobiomodulação aumentou significativamente o número total de mastócitos em comparação com os animais controle, constataram, ainda, que o número de mastócitos intactos foi significativamente maior que os mastócitos degranulados nos dias 4 e 15 da pesquisa.

Nesse aspecto, nosso estudo corrobora com a literatura pois Das Neves *et al.* (2016) avaliaram tecido muscular e obtiveram melhor resposta com o comprimento de onda infravermelho, o que reitera o conceito de que esse comprimento de onda é mais eficaz em estruturas mais profundas, justificando sua menor ação no tecido avaliado em nosso estudo; e Sharifian *et al.* no que diz respeito à quantidade de mastócitos intactos, pois esse tipo de MC foi mais abundante nos nossos grupos irradiados com laser infravermelho.

Houve uma dificuldade em encontrar estudos semelhantes ao nosso para que pudéssemos confrontar com os nossos resultados, pois não há na literatura trabalhos de pesquisa que avaliaram a presença de MCs em lesões de MO. Entretanto, foi possível observar que os dados do presente estudo se assimilaram aos achados de Bagheri *et al.* (2018), os quais analisaram a ação da fototerapia a laser sobre mastócitos em animais com diabetes. Dessa forma, presumimos que a condição sistêmica dos animais possa alterar a resposta dos MCs frente à fotobiomodulação.

Ademais, como o papel dos mastócitos na inflamação é mais evidente na fase aguda, e, aparentemente, o laser acelera o processo inflamatório, sugere-se que sejam realizadas pesquisas futuras, em menor tempo experimental para melhor análise da resposta desse tipo celular quando submetido à laserterapia de baixa intensidade.

7 CONCLUSÃO

As lesões de mucosite quimioinduzidas apresentaram predominância de mastócitos intactos. O grupo irradiado com laser vermelho apresentou maior expressão de mastócitos, entretanto sem significância estatística em relação ao grupo sem tratamento. O maior percentual de mastócitos em degranulação foi visto no grupo onde não houve tratamento. A irradiação com laser, em ambos os comprimentos de onda, diminuiu o percentual de degranulação dos mastócitos. O tipo de inflamação mais presente foi a crônica discreta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
2. ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using diferente irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, p. 179–84, 2001.
3. ANTUNES, F. et al. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. v. 101, n. 48, p. 16774–16779, 2004.
4. ARANY, P.R. Craniofacial wound healing with photobiomodulation therapy: new insights and current challenges. **J Dent Res**, n. 95, p. 977–984, 2016.
5. BAGHERI, M. et al. Effects of photobiomodulation on degranulation and number of mast cells and wound strength in skin wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 8, p. 415–423, 2018.
6. BENSADOUN, R. J. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. **Current Opinion in Oncology**, v. 30, n. 00, p. 226–232, 2018.
7. BENSADOUN, R.J; NAIR, R.G. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. **Curr Opin Oncol**, v. 24: 363– 70, 2012.
8. BJORDAL, J. M. et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. **Supportive Care in Cancer**, v. 19, n. 8, p. 1069–1077, 2011.
9. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
10. CAUWELS R.G.E.C, MARTENS L.C. low level laser therapy in oral mucositis: a pilot study. **European archives of Paediatric Dentistry**, v.12 , 2011.
11. CEDRAZ, J. DA S. B. et al. Estudo clínico-epidemiológico de pacientes com câncer bucal em um período de treze anos. **Revista Cubana de Estomatologia**, v. 53, n. 3, p. 86–96, 2016.
12. CHUNG, H. *et al.* The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann Biomed Eng.**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.
13. CHUNG, H. ET AL. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann Biomed Eng.**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.
14. CONSOLARO, Alberto. **Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas**. Maringá: Dental Press, 2009.
15. CORREIA, KA. V. D. et al. Mast cells and its relation to collagen and VEGF in oral inflammatory lesions. **Minerva Stomatologica**, v. 65, n. 3, p. 144–51, 2012.
16. DARBAR, A; DARBAR, R. Let’s talk lasers part 3: photobiomodulation (PBM). **Aesth Dent Today**, v. 5: 20–31, 2011.

17. DAS NEVES, L. M. S. et al. Laser photobiomodulation (830 and 660 nm) in mast cells, VEGF, FGF, and CD34 of the musculocutaneous flap in rats submitted to nicotine. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 2, p. 335–341, 2016.
18. DE CARVALHO MONTEIRO, J. S. et al. Effect of LED red and IR photobiomodulation in tongue mast cells in wistar rats: Histological study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 11, p. 767–771, 2011.
19. EL SAYED, O; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Lasers. Surg. Med**, v. 10, p. 559–568, 1990.
20. EL SAYED, O; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers. Surg. Med**, v. 19, p. 433–437, 1996.
21. EPSTEIN, J. B. Oral complications of cancer and cancer therapy: from câncer treatment to survivorship. **A Cancer Journal for Clinicians**, p.400-422, 2012.
22. FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2018. **Incidência e Mortalidade por Câncer no Mundo: IARC CancerBase No 15**. Lyon, França: Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer; 2019. globocan.iarc.fr. Acesso em 05 de janeiro de 2020.
23. GAUTAM, A.P. *et al.* Phase III randomised trial: low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients—a triple blinded randomized controlled trial. **Radiother Oncol**, n. 104, p. 349–54, 2012.
24. GHIRINGHELLI, F.; APETOH, L. The interplay between the immune system and chemotherapy: Emerging methods for optimizing therapy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 19–30, 2014.
25. HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low Level Laser Therapy (LLLT) as an Effective Therapeutic Modality for Delayed. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1056, p. 486–493, 2005.
26. HE, M. *et al.* A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients. **European Journal of Pediatrics**, v. 177, n. 1, p. 7–17, 2017.
27. HONG, C. H. L. et al. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 10, p. 3949–3967, 2019.
28. HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v.7 p. 358–83, 2009.
29. HUANG, Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. **Dose-Response**. n. 9. p. 602–618, 2011.
30. JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
31. KADEH, H.; DERAKSHANFAR, G.; SARAVANI, S. Comparative study of mast cell count in oral reactive lesions and its association with inflammation. **Turk**

- Patoloji Dergisi**, v. 32, n. 1, p. 22–26, 2016.
32. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691–704, 1989.
 33. KARU, T. PHOTOBIOLOGY OF LOW-POWER LASER EFFECTS. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691–704, 1989.
 34. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. 1999.
 35. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular Effects of Low Power Laser Therapy Can be Mediated by Nitric Oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. February, p. 307–314, 2005.
 36. LALLA, R. V. et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453–1461, 2014.
 37. MALLICK, S.; BENSON, R.; RATH, G. K. Radiation induced oral mucositis: a review of current literature on prevention and management. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 9, p. 2285–2293, 2016.
 38. MEDRADO, A.P. et al. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v.92, n.3, p.144-52, 2008.
 39. MELO, V.A. et al. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.26, n.2, 2011.
 40. MURATA, M; HARA, K; SAKU, T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth factor during epulis formation: Na immunohistochemical study in an enhanced healing process of the gingiva. **J Oral Pathol Med**, v. 26, p. 224-32, 1997.
 41. PANDESHWAR, P. et al. Photobiomodulation in oral medicine: a review. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 7, n. 2, p. 114–126, 2016.
 42. PARAGUASSÚ, G. M. et al. Effect of LED phototherapy ($\lambda 630 \pm 20\text{nm}$) on mast cells during wound healing in hypothyroid. **Mechanisms for Low-Light Therapy IX**, v. 8932, p. 893216, 2014.
 43. PEREIRA, M. C. M. C. et al. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 98, n. 3, p. 188–192, 2010.
 44. PÉREZ-HERRERO E; FERNÁNDEZ-MEDARDE A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 90, p.52–79,2015.
 45. RANNA, V. et al. Development of the MASCC/ISOO clinical practice guidelines for mucositis: an overview of the methods. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 10, p. 3933–3948, 2019.
 46. REDDY, V.; BHAGWATH, S. S.; REDDY, M. Mast cell count in oral reactive lesions: A histochemical study. **Dental research journal**, v. 11, n. 2, p. 187–18792, 2014.
 47. RIBEIRO, L. S. F. et al. Association Between Mast Cells and Collagen Maturation in Chronic Periodontitis in Humans. **Journal of Histochemistry and**

- Cytochemistry**, v. 66, n. 6, p. 467–475, 2018.
48. RIBEIRO, M. A. et al. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660nm. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.
 49. SANTOS, L. P. S. et al. Características de casos de câncer bucal no estado da Bahia, 1999-2012: um estudo de base hospitalar. **Rev. bras. cancerol**, v. 61, n. 1, p. 7–14, 2015.
 50. SANTOS, N.R.S. et al. Influence of the Use of Laser Phototherapy (660 or 790 nm) on the Survival of Cutaneous Flaps on Diabetic Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n.4., p. 483–488, 2010.
 51. SANTOS, P. P. DE A. et al. Relação entre Mastócitos e Células T na Inflamação \ Relationship between mast cells and T cells in inflammation. **Odontol. Clín.-Cient**, v. 9, n. 3, p. 215–217, 2010.
 52. SAWASAKI, I. et al. Effect of lowintensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. **Lasers. Med. Sci**, v. 24, n. 1, p. 113–116, 2009.
 53. SHARIFIAN Z. et al. Histological and gene expression analysis of the effects of pulsed low-level laser therapy on wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, p. 1227–1235, 2014.
 54. SILVA, B. O. *et al.* Câncer de Boca: Uma Prospecção dos Principais Fatores de Risco Para Fins Técnico-Científicos. **Rev. Saberes, Rolim de Moura**, v. 7, n. 1, 2018.
 55. SILVEIRA, J. C. et al. Investigation of mast cells in human gingiva following low-intensity laser irradiation. **Photomed. Laser. Surg**, v. 26, n. 4, p. 315–321, 2008.
 56. SONIS, S. T. et al. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 69, n. 4, p. 437–443, 1990.
 57. SONIS, S. T. et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. **Cancer**, v. 100, n. S9, p. 1995–2025, 2004.
 58. SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology**, v. 34, n. 1, p. 39–43, 1998.
 59. STRINGER, A. M.; LOGAN, R. M. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 44, n. 2, p. 81–87, 2015.
 60. THOMAS, D.W; O'NEILL, I.D; HARDING, K.G; SHEPHERD, J.P. Cutaneous wound healing: a current perspective. **J Oral Maxillofac Surg.**, n. 53, p. 442–447, 1995.
 61. TSYGANOVA, N. V. Changes in mast cells in the loose subcutaneous connective tissue after laser irradiation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 76, n. 6, p. 1407–1409, 1973.
 62. VASCONCELOS, R. M. et al. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis.

- Journal of Dental Research**, v. 95, n. 7, p. 725–733, 2016.
63. WALSH, L. J. Mast cells and oral inflammation. **Crit Rev Oral Biol Med Downloaded**, v. 14, n. 3, p. 188–198, 2003.
64. WORTHINGTON, H. et al. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. 1–28, 2011.
65. WULFF, B.C; WILGUS, T.A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? **Exp Dermatol**, v. 22, p. 507–510, 2013.
66. ZADIK, Y. et al. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 10, p. 3969–3983, 2019.
67. ZHANG, R. et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 1, p. 4–14, 2009.
68. ZECHA, J. A. E. M. et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: Proposed Applications and Treatment Protocols. **Support Care Cancer**, v. 24, n. 6, p. 2793–2805, 2017.



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da influência da Laserterapia sobre a expressão gênica das citocinas TNF α , IL1- β , IL-6 e VEGF em mucosite oral quimioinduzida – estudo em modelo experimental em hamster”, registrada com o nº 105/2016, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 12/08/2016.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2016 - 01/03/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Mesocricetus auratus (Hamster Syrian-dourado)</i>
Número de animais	8
Peso/Idade	150g/ 12 semanas
Sexo	Macho
Origem	Centro de Criação SUPRILAB, Cachoeira/Ba

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS
 Profa. Tânia Tavares Rodrigues
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA