

00650
25/12/05
Tese / FAP

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA
HUMANA EM CULTURA IRRADIADAS POR
LASER EM BAIXA INTENSIDADE**

LUÍS MARCELO SÊNEDA

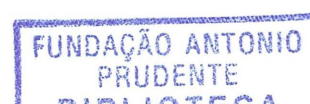
**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Co-Orientadora: Dra Márcia Martins Marques

**São Paulo
2005**



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Ariovaldo José Sêneda e Neide Aparecida Silva Sêneda**, pelo apoio incondicional, a dedicação, o exemplo e o amor que de forma natural moldaram meu caráter e permitiram que eu chegasse até aqui.

À minha esposa **Maria Cristina de F. Pires Sêneda**, que com paciência, amor e carinho soube de forma sábia, passar por este período em que muitas vezes me mantive ausente.

Aos meus irmãos **Silvia, João e Marília**, que sempre torceram por mim para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao mestre **Cesar A. Migliorati**, pelo exemplo de conduta profissional, pela amizade e pelo incentivo sempre presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, pela oportunidade, pela orientação e pela confiança em mim depositadas.

À professora **Prof. Dra. Márcia M. Marques**, pelo carinho com que se dedicou ao nosso projeto, e pela humildade em nos auxiliar em diversos momentos em mais esta etapa de minha vida.

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo** por nos abrir a porta do departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP para que pudéssemos executar nosso experimento.

Aos amigos **Marco Antonio Martins e Manoela Domingues Martins**, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, e principalmente pela amizade.

Ao amigo **Renato Palo Mito**, com quem dividi momentos de nervosismo, ansiedade e expectativa, já que também estava para defender sua tese.

À **Prof. Dra. Márcia Mayer e ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, que muito gentilmente nos forneceram as linhagens celulares que permitiram o desenvolvimento deste estudo.

À amiga e mestra **Fernanda de Paula Eduardo**, que dedicou grande parte de seu tempo nos auxiliando na execução final do experimento, e sem a qual se tornaria muito difícil a condução.

Às bibliotecárias **Suely Francisco** do Hospital A. C. Camargo e **Rita de Cássia Ortega Borges** do Hospital Sírio Libanês, pela gentileza e presteza com que me auxiliaram nos momentos em que busquei ajuda.

Aos meus **pacientes** que gentilmente abdicaram de suas horas de consulta em prol da minha necessidade em terminar o projeto.

RESUMO

Sêneda LM. **Análise da proliferação e viabilidade de células de carcinoma epidermóide de boca humana em cultura irradiadas por laser em baixa intensidade.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

A mucosite bucal é decorrente de tratamentos radioterápicos em cabeça e pescoço e/ou quimioterápicos. A terapia com laser em baixa intensidade (*low level laser therapy*-LILT) tem sido empregada para a sua prevenção e tratamento. As lesões decorrentes de quimio e/ou radioterapia em pacientes com câncer de boca aparecem concomitantemente com a neoplasia. Para melhoria da qualidade de vida desses pacientes a LILT poderia ser utilizada. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da LILT na proliferação de células cultivadas do carcinoma epidermóide de boca em cultura. Para essa análise foram utilizadas duas linhagens celulares (KB, HN-30) cultivadas em déficit nutricional (5% de soro fetal bovino) em placas com 96 poços. Foram plaqueadas 10^3 células por poço que foram irradiadas, ou não (controle), duas vezes com intervalo de 6 h com laser em baixa intensidade (3 J/cm^2 , 660 nm, vermelho ou 780 nm no infravermelho). Doze, 16 e 20 h após a última irradiação a atividade mitocondrial de células foi analisada através do teste MTT e a absorbância foi mensurada em leitora ELISA, utilizando filtro de 540 nm. Os resultados, em quadruplicata, foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA. Para ambas as linhagens celulares não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de células viáveis em função dos diferentes tratamentos. Portanto, nas condições experimentais desse estudo, a LILT não exerceu efeito na proliferação de células de carcinoma bucal *in vitro*, indicando uma atividade inócua que não contraindica seu uso na prevenção e tratamento de mucosite em pacientes com câncer de boca e em tratamento radio e/ou quimioterápico.

SUMMARY

Sêneda LM. **[Analysis of the proliferation and viability of epidermoid carcinoma cells of human mouth in culture irradiated by low laser intensity]**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The oral mucositis is a side effect of head and neck radiotherapy and/or chemotherapy. The low level laser therapy (LILT) has been used for its prevention and treatment. The lesions found after chemo and/or radiotherapy in patients with mouth cancer appear simultaneously with a neoplasm. In order to improve the life quality of these patients the LILT could be used. The objective of this study was the evaluation of the effects of LILT in the proliferation of cells grown from an epidermoid carcinoma of mouth in culture. For this analysis two types of cells were used (KB, HN-30) grown in nourishment deficit (fetal bovine serum 5%) on board with 96 wells. In each well 10^3 cells were used that were irradiated or not (control), two times at 6 h interval with LILT ($3\text{J}/\text{cm}^2$, 660 nm, red or 780 nm in the infrared). Twelve, 16 and 20 h after the last irradiation the mitochondrial activity of cells were analysed through the MTT test and the absorbability was measured by ELISA reading machine using a 540 nm filter. The results, in quadruplicate were analysed statistically by ANOVA method. For both cell lines statistically significant differences were not observed in the number of viable cells in function due to different treatments. However, in experimental conditions of this study, the LILT didn't have effect in cell proliferation of oral carcinoma *in vitro*, indicating an innocuous activity that couldn't reject its use in prevention and treatment of mucositis with mouth cancer in radio/chemotherapy treatment.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Linhagem celular HN-30 vista em microscópio invertido de fase.	
Figura 2	Linhagem KB vista em microsc.	
Figura 3	Distribuição das células nos poços das placas.	32
Figura 4	Aparelho Twim Laser da MMOPTICS Ltda, São Carlos, SP, Brasil	32
Figuras 5	Equipamento de suporte para aplicação do laser	34
Figura 6	Equipamento de suporte, com a ponta do laser fixa, pronta para aplicação.	34
Figura 7	Medidor de potência utilizado antes e depois dos experimentos.	35
Figura 8	Leitora de ELISA.	37
Figura 9	Observação dos cristais lidos pela leitora de ELISA, vistos em microscópio invertido de fase.	37
Figura 10	Gráfico que representa os valores de atividade mitocondrial das células KB.	39
Figura 11	Gráfico que representa os valores de atividade mitocondrial das células NH30.	41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Valores da média e erro padrão da média correspondente à atividade mitocondrial medida em densidade óptica (DO) para as células KB cultivadas com 5% de soro fetal bovino.	38
Tabela 2	Valores da média e erro padrão da média correspondentes à atividade mitocondrial medida com densidade óptica (DO) para as células HN30 cultivadas em meio contendo 5% de soro fetal bovino.	41
Quadro 1	Especificações técnicas do Twin Laser.	33
Quadro 2	Parâmetros utilizados durante as irradiações com laser.	33
Quadro 3	Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondente às densidades ópticas (DO) relativas à atividade mitocondrial de células KB cultivadas em meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino pelo teste ANOVA.	40
Quadro 4	Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondente às densidades ópticas (DO) relativa à atividade mitocondrial de células HN30 cultivadas em meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino pelo teste ANOVA.	42

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	Mucosite	5
3.1.1	Manifestações clínicas	6
3.1.2	Patobiologia da mucosite	8
3.2	Laser	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Linhagens celulares	27
4.2	Cultivo celular	29
4.3	Irradiação laser	32
4.4	Curvas de crescimento celular	36
4.5	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	39
6	DISCUSSÃO	44

7	CONCLUSÃO	51
---	-----------	----

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
---	----------------------------	----

ANEXOS

Anexo1 Dados originais das linhagens celulares

Anexo 2 Dados analisados estatisticamente pelo método Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors)

1 INTRODUÇÃO

A mucosite bucal é uma complicação comum no tratamento citorrredutor do câncer de cabeça e pescoço, onde são empregadas a quimioterapia e/ou a radioterapia (SONIS et al. 2004). Sua incidência é variável, entretanto, é especialmente comum em pacientes que recebem quimioterapia mieloblástica agressiva como, por exemplo, durante o condicionamento para transplante de medula óssea (TMO) e em pacientes que recebem terapia com radiação para cânceres de bocal, orofaringe, nasofaringe e de glândulas salivares (TARDIEU et al. 1996; BENSADOUN et al. 1999).

Clinicamente, a mucosite varia de lesões eritematosas pouco sintomáticas a quadros severos de ulceração e dor que pode levar a modificação do tratamento anti-neoplásico ou até mesmo a necessidade da interrupção do mesmo, promovendo assim, uma redução da qualidade de vida e/ou a sobrevida do paciente (SONIS 1998). Além disso, a mucosite severa pode aumentar a duração de internação hospitalar e necessitar de cuidados especiais, incluindo contínua infusão intravenosa de barbitúricos, outros medicamentos e alimentação parenteral (PETERSON 1990; BARASCH et al. 1995).

Os mecanismos exatos através dos quais as drogas quimioterápicas citotóxicas e a radioterapia provocam a mucosite não foi completamente elucidado. Entretanto, a mucosite parece resultar de uma série de interações

dinâmicas e de eventos moleculares e celulares que envolvem todos os elementos da mucosa (epitélio e conjuntivo). Nos últimos anos, vários estudos vêm mostrando que alterações na superfície endotelial dos vasos da submucosa, nos mecanismos reguladores da apoptose dos fibroblastos da submucosa bem como, na síntese de metaloproteinases (MMPs) e citocinas inflamatórias ocorrem na mucosa bucal afetada e precedem o dano epitelial (SONIS et al. 2004).

O controle da mucosite bucal está se tornando cada vez mais importante e o desenvolvimento de intervenções efetivas são visto como de alta prioridade nos cuidados de suporte ao paciente oncológico. Os tratamentos para mucosite bucal, de modo geral, são apenas paliativos, visando refrear os sintomas e controlar possíveis quadros infecciosos e/ou hemorrágicos. Os tipos mais comuns de tratamentos para mucosite são: antimicrobacterianos tópicos, citocinas para estimulação da medula, vitaminas, fatores de crescimento, bochechos com corticóides e colutórios não alcoólicos, aminoácidos suplementares, crioterapia, e mais recentemente, tratamento com lasers emissores em baixas intensidades (MIGLIORATI et al. 2001; BENSADOUN e CIAIS 2002).

Vários estudos utilizando laser em baixa intensidade de potência demonstraram sua eficácia no tratamento da mucosite bucal, agindo principalmente na atenuação da dor, duração da mucosite bucal, maior facilidade para a deglutição e efeito cicatrizante (BARASCH et al. 1995; COWEN et al. 1997; MIGLIORATI et al. 2001; BENSADOUN e CIAIS 2002; SANDOVAL et al. 2003).

A despeito do sucesso clínico e alguns dados experimentais, o mecanismo dos efeitos do laser ainda são pobremente entendidos (PEREIRA et al. 2002). A ação do laser de baixa intensidade na atividade proliferativa celular é um assunto controverso, já que a luz laser tem mostrado hora como estimulante, hora com inibidora da proliferação de células em cultura (PINHEIRO et al. 2002).

Em alguns casos, pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço antes de realizar a cirurgia são submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia e também podem desenvolver a mucosite. As lesões de mucosite nesses casos aparecem concomitantemente com a neoplasia na cavidade bucal. Em outras situações, a presença de tumor residual macroscópico ou microscópico submetido a radioterapia pós-operatória, e nesses casos também há células tumorais viáveis. Para controlar a mucosite e aliviar a sintomatologia desses pacientes a LILT pode ser utilizada. No entanto, nessas situações células neoplásicas também podem estar sendo irradiadas e não se conhece a resposta destas células à irradiação laser em baixa intensidade. Dessa forma, antes de se indicar o uso da LILT para pacientes com mucosite e carcinoma epidermóide de boca torna-se importante, como primeiro passo, analisar os efeitos da radiação laser em baixa intensidade sobre células cultivadas do carcinoma epidermóide.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da LILT na proliferação de células cultivadas do carcinoma epidermóide de boca em cultura.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MUCOSITE

A mucosite é definida como uma consequência debilitante da terapia anti-neoplásica caracterizada por inflamação e ulceração da mucosa bucal e gastrointestinal e representa um dos efeitos colaterais mais importantes do tratamento contra o câncer (LOCKHART e SONICS 1981; SONIS et al. 2004).

A real prevalência da mucosite é difícil de ser estabelecida tendo em vista a ampla variedade de populações estudadas, diagnósticos, formas de relatar seu aparecimento, protocolos de tratamento, tempo e sistemas de graduação utilizados nos diversos trabalhos acerca deste tema (PSYRRI et al. 2004).

Entretanto, sabe-se que a mucosite é uma complicação especialmente comum em pacientes que recebem quimioterapia mieloblástica agressiva como, por exemplo, durante o condicionamento para transplante de medula óssea (TMO) e em pacientes que recebem terapia com radiação para cânceres de cavidade bucal, orofaringe, nasofaringe e de glândulas salivares (TARDIEU et al. 1996).

Pacientes com neoplasias hematológicas, como por exemplo a doença de Hodgkin, tem mais propensão a desenvolver mucosite que os pacientes com tumores sólidos, talvez porque essas doenças atingem mais

pacientes jovens e pelas drogas utilizadas, geralmente mucosite-indutoras (SONIS 1998).

A incidência de mucosite em crianças e pacientes jovens é maior do que em pacientes idosos, mesmo quando submetidos a regimes de tratamento com quimioterápicos semelhantes e para o mesmo tipo de neoplasia, provavelmente devido ao maior índice mitótico do epitélio dos mesmos (SONIS 1998).

De acordo com SONIS et al. (2004) a incidência de mucosite varia de 12% nos casos de pacientes que recebem quimioterapia adjuvante, ou até 100%, nos casos em que os pacientes submetidos a TMO que recebem TBI (Total Body Irradiation) associado a quimioterapia em altas doses. Alguns fatores tais com o tipo de doença, as condições de higiene oral, o tipo, a dose e freqüência da administração das drogas associadas ou não com a radioterapia podem modificar a incidência da mucosite (SCHUBERT et al. 1992).

SONIS (1998) relata que em protocolos de tratamento para pacientes de alto risco, as lesões bucais são tão severas que em muitos casos, se faz necessária a modificação do tratamento anti-neoplásico ou até mesmo a necessidade da interrupção do mesmo, promovendo assim, uma redução da qualidade de vida e/ou a sobrevida do paciente.

3.1.1 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da mucosite variam de formas leves a severas, mas representam um espectro da mesma doença. Na sua forma

leve, se apresenta como lesão atrófica, eritematosa, na qual a mucosa permanece intacta. Nestes casos o paciente pode ter sensibilidade como à observada nos casos de queimadura por alimentos quentes e pode ser facilmente tratado. Em contrapartida, pacientes com formas mais severas de mucosite desenvolvem ulcerações que penetram profundamente na submucosa e causam dor severa, o que rotineiramente exige uso de analgésicos potentes (SONIS et al. 2004). Nestes quadros observa-se exacerbação da dor nos momentos de higienização e respiração bucal do paciente (COWEN et al. 1997).

O quadro clínico de mucosite severa pode levar a modificações nos protocolos de tratamento, necessitando de administração de medicamentos intravenosos ou nutrição parenteral. Isto vem quase sempre acompanhado de sintomas gerais, tais como náuseas, vômitos, diarreia, associada a dor, aumento do desconforto que leva a anorexia, perda de peso e queda drástica na qualidade de vida do paciente (PETERSON 1990).

O sistema de graduação mais utilizado atualmente é o da Organização Mundial de Saúde (OMS) no qual leva-se em consideração critérios objetivos e subjetivos, que consideram o estado físico geral e nutricional do paciente bem como a inspeção da cavidade bucal. Segundo esta classificação a mucosite varia do grau 0 ao grau 4 da seguinte forma: 0-Inexistência de alterações da mucosa; 1-Inflamação e eritema; 2-Eritema e úlceras (paciente consegue ingerir sólidos); 3-Ulceração (ingestão apenas de líquidos) e 4-impossível a alimentação bucal (PARULEKAR et al. 1998).

A mucosite afeta principalmente as superfícies não queratinizadas da mucosa bucal provavelmente devido ao menor índice de renovação celular destas áreas. As lesões tendem a recorrer na mesma localização em cada episódio de mucosite (KOSTLER et al. 2001).

Tendo em vista que a boca possui uma ampla variedade de microrganismos, a perda da integridade epitelial, como ocorre em alguns casos de mucosite (Graus 3 e 4), aumenta marcadamente o risco de bacteremia, fungemia e sepse (EPSTEEIN e SHUBERT 1999).

Em pacientes submetidos a TMO observa-se um risco maior de desenvolverem febre e infecções sistêmicas na presença de mucosite, quando comparados aos pacientes sem mucosite. Paralelamente, a necessidade de nutrição parenteral e analgesia com narcóticos também aumenta (SONIS et al. 2004).

De acordo com ELTING et al. (2003) e TROTTI et al. (2003) os níveis de infecção estão aumentados na presença de mucosite bucal quimioinduzida em pacientes com tumores sólidos e que recebem TMO, assim como a duração da hospitalização e custos do tratamento.

3.1.2 Patobiologia da Mucosite

O controle da mucosite bucal está se tornando cada vez mais importante e o desenvolvimento de intervenções efetivas são vistos como de alta prioridade nos cuidados de suporte ao paciente oncológico. Tanto é assim, que a Associação de Suporte e Cuidados em Câncer e a Sociedade Internacional de Oncologia Oral criaram uma Divisão de Estudos da

Mucosite no ano de 2000 e um painel de especialistas foi nomeado para desenvolver diretrizes baseadas em evidências para prevenir e tratar mucosite bucal e gastrointestinal associadas com a terapia anti-câncer (SONIS et al. 2004). Entretanto, formas promissoras de tratamento estão sendo propostas a partir dos avanços da compreensão da patobiologia da mucosite.

Historicamente, mucosite era pensada como apenas uma consequência do dano ao epitélio da cavidade bucal. Isto era uma hipótese denominada de efeito direto-indireto. O efeito direto estava relacionado com a radiação ou a quimioterapia que afetava de forma não específica às células que proliferavam rapidamente da camada basal do epitélio causando a perda da habilidade de renovação tecidual. Assim, como consequência o epitélio sofreria atrofia, afinamento, e ulceração. De qualquer maneira, acreditava-se que o trauma e microrganismos facilitavam este processo. Os efeitos indiretos seriam a toxicidade da droga na medula óssea promovendo leucopenia, anemia, trombocitopenia, que agravariam os efeitos diretos (BARASCH e PETERSON 2003; SCULLY et al. 2003).

Em 1998, SONIS propôs uma classificação para descrever as fases da mucosite bucal, sendo elas: fase inflamatória ou vascular; epitelial; ulcerativa ou bacteriana e fase cicatricial. Segundo BARASCH e PETERSON (2003), esse modelo foi muito importante, pois elucidou e completou a antiga teoria do efeito “direto-indireto” de toxicidade das drogas, que persistiu até o final da década de 1990. Ressaltou ainda a importância de que as fases da mucosite são interdependentes e que existem fatores de

risco relacionados aos pacientes, e que podem interferir no prognóstico da mucosite.

Os mecanismos exatos através dos quais as drogas citotóxicas e a radioterapia provocam a mucosite não foram completamente elucidados. Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que estes agentes, por atuarem nas células tumorais, que tem rápida divisão, também danificam as células epiteliais e do conjuntivo da mucosa resultando em inflamação e ulceração do epitélio (LOPRINZI et al. 2000; BICUDO 2004).

A mucosite parece resultar de uma série de interações dinâmicas e de eventos moleculares e celulares que envolvem todos os elementos da mucosa (epitélio e conjuntivo). Nos últimos anos, vários estudos vêm mostrando que alterações na superfície endotelial dos vasos da submucosa, nos mecanismos reguladores da apoptose dos fibroblastos da submucosa bem como, na síntese de metaloproteinases (MMPs) e citocinas inflamatórias ocorrem na mucosa bucal afetada e precedem o dano epitelial (SONIS et al. 2004).

Mucosite freqüentemente é caracterizada como uma desordem inflamatória, entretanto, resultados histológicos não estão de acordo com este conceito. De fato, o infiltrado de leucócitos é tipicamente visto durante os últimos estágios do processo e associado a fase ulcerativa da mucosite.

Em 2004, SONIS et al. relatou que apesar do desenvolvimento da mucosite ser um processo dinâmico com a finalidade didática é necessário dividi-la em estágios e classificou-a em 5 estágios biológicos definidos como iniciação, resposta ao dano primário, amplificação de sinal, ulceração e

reparação. De acordo com o autor, no caso dos regimes de dose fracionados, que compreende protocolos típicos de radiação, estes estágios se sobrepõem tendo em vista que o dano causado ocorre em pequenas doses diariamente. Em contraste, regimes quimioterápicos estomatotóxicos como aqueles que são comumente utilizados nos regimes de condicionamento para TMO mantém o intuito de regime curto, intenso e por um período específico.

Na fase de iniciação que ocorre após a radioterapia e a quimioterapia se evidencia o dano tecidual que pode ser causado por mecanismos relacionados ou não a alteração do DNA. As células da camada basal do epitélio e da submucosa são consideradas as células alvo da injúria celular direta e sofrem dano associado a quebra das cadeias de DNA. Simultaneamente, são gerados radicais livres derivados de oxigênio, iniciando o processo de desenvolvimento da mucosite, através de diminuição da renovação celular, alteração o epitélio e nos vasos sanguíneos. Estas alterações resultam na morte de algumas células epiteliais e da submucosa (DENHAM e HAUER-JENSEN 2002). Entretanto, clinicamente a mucosa bucal apresenta aspecto de normalidade.

A fase seguinte é denominada de resposta primária à injúria. Nesta fase o dano ao DNA, o dano não relacionado ao DNA, e espécies reativas de oxigênio iniciam uma série complexa de eventos que estão sendo ainda definidos que parecem agir na ativação dos fatores de transcrição da família kappa-B (NF-kB) que afetam a regulação da apoptose, síntese de citocinas

(TNF-alfa, IL-1beta, e IL-6) e de metaloproteinases (MMPs) (SONIS et al. 2004).

A quebra do DNA resulta na ativação de vias de transdução de sinal que ativam fatores de transcrição tais como a p53 e o fator kB nuclear (NF-kB). Estes fatores são ativados em resposta a radiação, algumas drogas citotóxicas e radicais livres derivados de oxigênio. Dentre os fatores de transcrição o NF-kB tem sido sugerido como um dos mais importantes, em relação à toxicidade e resistência à terapia tumoral. Ativação de NF-kB pode resultar na super-regulação de mais de 200 genes, muitos dos quais têm efeito na toxicidade da mucosa. De qualquer forma, os achados de que a ativação do NF-kB pode ter ações pro-apoptóticas e anti-apoptóticas faz dele um significativo fator na determinação do que acontecerá com o tecido normal após a radioterapia e quimioterapia. O balanço normal entre membros de famílias pró-apoptóticas (BAX) e anti-apoptóticas (BCL-X) pode ser quebrado pela administração de terapia para mucosite. Como resultado, a super-expressão de BAX nos tecidos normais deve precipitar a morte dos mesmos. Dada a habilidade do NF-kB de superregular um variada gama de moléculas de adesão celular faz com que estes seja um importante regulador dos estágios iniciais das alterações endoteliais que são associadas com a iniciação da injúria a mucosa (SONIS et al. 2004).

A super-regulação de genes devido à radiação e quimioterapia induz a ativação de fatores de transcrição que ativam a produção de citocinas pró inflamatórias incluindo, TNF-alfa, IL-1b e IL-6. Aumento nos níveis destas proteínas tem sido relatado na mucosa. Parece que a presença destas

proteínas estimulam o dano precoce do tecido conjuntivo e do endotélio e inicia as sinalizações entre epitélio e mesênquima, reduzindo a oxigenação epitelial e por fim leva à morte e injúria das células da camada basal do epitélio (SONIS et al. 2004).

Outros mecanismos para injúria da mucosa relacionados ao tratamento anti-neoplásico têm sido propostos. A ceramida, gerada através do caminho da espinogomeilina, também pode ser envolvida na apoptose induzida pela radiação e parece ser um potencial iniciador de mucosite (BILLIS et al. 1998). Fibroblastos da mucosa também são alvos do dano causado pela radiação e quimioterapia. Um efeito direto da radiação e da quimioterapia parece ser mediado pela ativação do AP1, que estimula a secreção de metaloproteinases (MMPs). A MMP1 (colagensase intersticial) causa destruição do colágeno da matriz subepitelial enquanto que a MMP3 (também chamada de stromelisina 1) leva a quebra da membrana basal epitelial e promove a disseminação de outros sinais destrutivos (SONIS et al. 2004).

Na fase de amplificação de sinal ocorrem diversas lesões no endotélio, fibroblastos e epitélio. Como consequência da maior estimulação dos genes que iniciam a ativação de fatores de transcrição, uma ampla variação de proteínas biologicamente ativas vão se acumulando e se ligando na submucosa. Algumas dessas, em particular citocinas pró-inflamatórias, não apenas danificam o tecido como também fazem um efeito *feedback* positivo para amplificar o dano primário que foi iniciado pela radioterapia e quimioterapia.

Apesar de várias modificações moleculares estarem acontecendo no tecido já nestas fases iniciais, clinicamente o panorama é assintomático ou pouco sintomático. Apesar de existir algum eritema durante estes estágios, os pacientes relatam pouca sintomatologia e constata-se integridade tecidual (SONIS et al. 2004).

A fase ulcerativa da mucosite é a mais significativa tanto para o paciente como para toda a equipe que trata e acompanha o paciente. Nesta fase observa-se a perda da integridade da mucosa (ulceração) devido a inibição da replicação celular e pelo fato do epitélio já estar atrófico. Estas úlceras são lesões extremamente sintomáticas, debilitantes e permitem a adesão de colônias bacterianas na superfície. No caso dos pacientes neutropênicos, estas úlceras podem servir como porta de entrada de numerosos microrganismos da flora bucal e que freqüentemente levam a bacteremia e sepse. Conjuntamente, os produtos das paredes celulares das bactérias que colonizaram a superfície parecem penetrar na submucosa onde podem ativar as células inflamatórias mononucleares a produzirem e sintetizarem outras citocinas pró-inflamatórias. Isto promove a expressão de genes pró-apoptóticos e potencializam o dano tecidual. Células inflamatórias então migram por quimiotaxia para a base da lesão onde elas produzem enzimas danificadoras (SONIS et al. 2004).

Na fase de cicatrização ocorreria o reparo tecidual simultaneamente no epitélio através da proliferação e migração epitelial e no conjuntivo adjacente com diferenciação do tecido de granulação (fibroplasia e

angiogênese) regidos pelos sinais da matriz extracelular e dos fibroblastos da submucosa (SONIS et al. 2004).

Na maior parte dos casos, a mucosite é um fenômeno agudo que se auto resolve quando a terapia para o câncer acaba. O curso do comportamento tecidual depende do tipo de tratamento de câncer (radioterapia X quimioterapia), do agente selecionado e da dose e tempo da terapia.

No tratamento da mucosite, inúmeras terapias vêm sendo propostas no intuito de prevení-la, tendo como finalidade evitar a redução nas doses das drogas quimioterápicas e a não interrupção do tratamento, aumentando assim as chances de cura para o paciente (LOPRINZI et al. 2000). Para o controle da higiene bucal e efeito bactericida local, vem sendo utilizadas pomadas anestésicas tais como a lidocaína, e em algumas ocasiões, analgésicos mais potentes como a morfina (LOPRINZI et al. 2000).

Tais tratamentos não têm demonstrado a efetividade que se espera nem na prevenção e nem no controle da dor provocado pela mucosite, além do que, podem apresentar efeitos colaterais (SONIS 1998).

3.2 LASER

O termo *laser* vem do acrônimo *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. O primeiro equipamento *laser* foi desenvolvido em 1960, pelo pesquisador norte americano Theodore Harold Maiman. A partir disto, outros tipos de *lasers* foram sendo desenvolvidos, com diferentes comprimentos de onda no espectro eletromagnético (EDUARDO 2003).

Nas áreas médicas, podemos dividir os efeitos dos *lasers* em dois tipos: HILT (High Intensity Laser Treatment) e LILT (Low Intensity Laser Therapy); ou seja, tratamento *laser* em alta intensidade e terapia *laser* em baixa intensidade, respectivamente.

A tecnologia do laser tem sido considerada um avanço na medicina e na odontologia. Ela tem sido utilizada em diferentes campos da odontologia, como a cirurgia bucal, endodontia, periodontia, dentística restauradora entre outras (PEREIRA et al. 2002).

O uso do *laser* em alta intensidade (HILT) na medicina e odontologia engloba a ações como aquecimento tecidual, desnaturação protéica, coagulação, vaporização, ablação, até a carbonização. Exemplos de procedimentos como vaporização excisional de lesões praticamente sem sangramento, preparos cavitários com sensibilidade dolorosa reduzida, clareamento dental, hemostasia, entre outras indicações são possíveis com a irradiação com *lasers* de alta potência (WHITE et al. 1993; GOLD e VILARDI 1994).

A terapia *laser* em baixa intensidade (LLLT) foi inicialmente descrita na década de 1960, com propósitos terapêuticos. Os lasers com emissão de comprimentos de onda no visível (vermelho) e infravermelho próximo possuem capacidade de penetração no tecido biológico que, por sua vez, desencadeia uma resposta biológica como a biomodulação por suas características de baixa intensidade de energia e comprimento de ondas capazes de penetrar nos tecidos. Os equipamentos de *lasers* de baixa potência mais descritos na literatura são os de Hélio-Neônio (He-Ne) e Diodos (Ga-Al-As, Ga-As, Ga-I-As) (BENSADOUN et al. 1999; AL-WATBAN e ANDRES 2000; MIGLIORATI et al. 2001; EDUARDO 2003; KREISLER et al. 2003; RUBENSTEIN et al. 2004).

Nos últimos anos, evidências clínicas e laboratoriais foram acumuladas continuamente dando suporte ao uso de LLLT para promover a bioestimulação tecidual. Foi relatado que o LLLT promove cicatrização de feridas e reduz dor e inflamação (SONIS et al. 2004).

A efetividade do tratamento com laser ocorre em tecidos inflamados ou lesados, onde a absorção da luz promove um aumento na proliferação celular. Tal estímulo já não é observado quando a luz laser é empregada em tecidos saudáveis (KARU 1997).

O efeito da terapia com laser de baixa intensidade são dependentes do comprimento de onda do laser, da dose de aplicação, da potência e de característica do tecido (BENSADOUN e CIAIS 2002; KARU 1997; SONIS et al. 2004). Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade antiinflamatória deste tipo de luz laser (MESTER et al. 1974; EDUARDO 2001;) bem como,

sua ação na redução da dor (KAWAKAMI et al. 1989; BOLOGNANI e VOLPI 1992; KUDO et al. 1998; LIEVENS e VEEN 2001). O efeito antiinflamatório é baseado na dilatação de vasos linfáticos e na redução da permeabilidade vascular.

Os efeitos da LILT também incluem propriedades antiinflamatórias, em que alguns autores relatam a diminuição da produção da prostaglandina PGE2, enquanto outros apontam para efeitos no metabolismo linfocitário, incluindo a ativação dos linfócitos T supressores e a modulação da secreção da histamina, prostaglandina, quininas e TNF (fator de necrose tumoral), o que levaria a uma diminuição da resposta inflamatória (ALMEIDA-LOPES et al. 2001).

A ação dos lasers em baixa intensidade na reparação tecidual está ligada portanto, a uma estimulação do tecido, que leva à ativação da produção de energia (ATP) pela mitocôndria (BENSADOUN e CIAIS 2002; KARU 1997; SIMUNOVIC et al. 2000; RIBEIRO e ZECELL 2004; ENWEMEKA et al. 2004), aceleração do metabolismo celular, neovascularização, aumento da proliferação de fibroblastos (SIMUNOVIC et al. 2000; ALMEIDA-LOPES et al. 2001; WHELAN et al. 2001; RIBEIRO e ZECELL 2004; ENWEMEKA et al. 2004) e aumento da síntese de colágeno.

Efeitos como vasodilatação local dos capilares também foi descrito por diversos autores como (KAWAKAMI et al. 1989; BARASCH et al. 1995).

A energia dos fótons de uma radiação laser absorvida por uma célula será transformada em energia bioquímica e utilizada em sua cadeia respiratória. KARU em 1989 descreveu um mecanismo diferente para os

lasers emitindo radiação na região do visível e do infravermelho próximo. A luz laser visível induz uma reação fotoquímica, tendo como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células e resultando num incremento de ATP mitocondrial que favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular.

No modelo proposto por KARU (1989), a luz visível produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram metabolismo, conduzindo à transdução do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas) que finalmente conduzem à fotorresposta (bioestimulação). Smith (1991), citado por KARU (1999, p.1) sugere que por causa das propriedades fotofísicas e fotoquímicas da irradiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais de cálcio), conduzindo à mesma resposta final.

A ação fotoquímica do laser visível atuando na ceia redox da mitocôndria e a ação fotofísica do laser infravermelho na membrana celular, ambos desencadeiam uma resposta celular que gera uma cascata bioquímica de reações a alterações em processos fisiológicos com conotações terapêuticas (MESTER et al. 1974).

Clinicamente, estes efeitos podem se manifestar de três formas. Primeiramente podem agir diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, aumentando o metabolismo celular tais como aumento da síntese de endorfinas e liberação de transmissores nosceptivos, como a bradicinina e a serotonina (KARU 1989). Também pode ter uma ação

estimulativa e analgésica. Pode ocorrer também um efeito secundário ou indireto, aumentando o fluxo sanguíneo e a drenagem linfática (LIEVENS e VEEN 2001). Desta forma, clinicamente pode-se observar uma ação mediadora do laser na inflamação. Por fim, pode haver a instalação de efeitos terapêuticos gerais ou efeitos tardios e clinicamente pode-se observar a ativação do sistema imunológico (MESTER et al.1974).

DYSON e YOUNG (1986) demonstraram que o laser possui grande importância no início da cicatrização, acelerando os eventos biológicos da fase exsudativa com aparecimento mais rápido dos eventos que caracterizam a fase proliferativa.

A terapia utilizando lasers em baixa intensidade não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim, nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e no tecido. Quando a luz interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas (KARU 1997). Esse efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem sua função debilitada (SCHINDL et al. 2000).

KARU (1989) relatou que a terapia com luz laser em baixa intensidade tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúria ao tecido. KARU (1997) relata que a energia da luz tem um maior proveito onde é mais necessária.

Vários autores apontam que o efeito biológico da LILT tem maior potencial na reparação tecidual e no alívio da dor. Em relação aos fibroblastos, foi encontrado tanto aumento de divisão celular como o aumento da produção de colágeno. Com relação à sintomatologia dolorosa, um dos mecanismos propostos para a diminuição desta é a modulação de nociceptores pela modificação da condução dos impulsos nervosos de dor e pela liberação de endorfinas e encefalinas. Também tem sido mostrado que a estimulação dos nervos periféricos pela LILT diminui a hiperpolarização da membrana celular e aumenta a concentração de ATP, o que poderia contribuir para a manutenção da estabilidade da membrana (EDUARDO 2003; GARCIA et al. 2001; BRADLEY 2002; SIMUNOVIC et al. 2000).

Assim sendo, a aplicação do laser em baixa intensidade, largamente utilizada em processos inflamatórios, não como inibidor do processo, mas na sua ação moduladora, vem se mostrando uma ferramenta útil em casos de condições patológicas inflamatórias (KARU 2000; BENSADOUN et al. 2001; RIBEIRO e ZECELL 2004).

De acordo com MESTER et al. (1974), com uma dosagem baixa do laser em baixa intensidade, pode ocorrer pouco ou nenhum efeito terapêutico, ao passo que altas doses podem levar à inibição do efeito.

Nos últimos anos, a laserterapia de baixa intensidade vem sendo utilizada neste arsenal de medidas empregadas para prevenir e/ou amenizar o quadro clínico da mucosite. Ela tem mostrado bons resultados na prevenção e controle local da mucosite, reduzindo o quadro álgico e o processo inflamatório dos tecidos bucais, sem que ocorra desconforto ou

efeitos colaterais ao paciente, e é considerado um procedimento seguro e eficiente (COWEN et al. 1997; BARASCH et al. 1995; BENSADOUN e CIAIS 2002; EDUARDO 2003).

A laserterapia de baixa intensidade requer um equipamento específico e treinamento especializado. A Divisão de Estudos da Mucosite classificou a laserterapia de baixa intensidade como nível de evidência II e grau de recomendação B, para o tratamento de pacientes submetidos altas doses de quimioterapia ou radio e quimioterapia antes do transplante de medula óssea (TMO) (SONIS et al. 2004).

A bioestimulação tecidual com laser parece levar a uma redução da severidade bem como da duração do quadro de mucosite. Os comprimentos de onda que mais freqüentemente estão sendo utilizados com a finalidade descrita são 680,730 e 880 nm (WHELAN et al. 2003).

Estudos utilizando laser de Hélio-Neônio, com uma dose de tratamento de $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ e 60mW de potência foram os primeiros a demonstrar a eficácia do laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite bucal, e os resultados demonstraram que o laser foi bem tolerado pelos pacientes, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre o grupo laser e o grupo controle (COWEN et al. 1997). No mesmo período, outro estudo desenvolvido com laser de Hélio-Neônio relatou a redução da dor e da severidade das lesões de mucosite bucal em pacientes submetidos a TMO (BARASCH et al. 1995).

BENSADOUN et al. (1999) avaliou a eficácia do laser de Hélio-Neônio na prevenção e/ou redução da mucosite orofaríngea causada pela

radioterapia e quimioterapia. E neste estudo duplo cego randomizado, demonstrou a atenuação da dor e duração da mucosite bucal, e a maior facilidade para a deglutição. Este tratamento possibilitou a redução da utilização de morfina no grupo laser comparado ao grupo controle sem aplicação do mesmo (BENSADOUN e CIAIS 2002). Neste trabalho, as doses terapêuticas com LLLT foram de $2\text{J}/\text{cm}^2$, e com o aparelho de 60mW de potência.

Em 2003, EDUARDO utilizou o laser de AsGaAl em estudo duplo cego randomizado, utilizando-se de 70 pacientes previamente selecionados, e que foram divididos em três grupos: grupo placebo, grupo laser com comprimento de onda de 650nm e 40mW de potência, e grupo laser com comprimento de onda 780nm e 60mW de potência. Todos os pacientes receberam altas doses de quimioterapia, seguida ou não de radioterapia, como preparo para posterior TMO. Os pacientes receberam irradiações diárias de laser ou o placebo de acordo com os grupos, e com uma dose de $2\text{J}/\text{cm}^2$, iniciando no dia do condicionamento e terminando dois dias após o TMO, completando um total de sete dias (EDUARDO 2003). Foi demonstrado que o laser de ArGaAl apresenta também a eficácia, no que concerne ao controle da dor e cicatrização.

MIGLIORATI et al. (2001) estudando a utilização de laser de ArGaAl no controle da dor provocada pela mucosite bucal em pacientes submetidos a TMO e altas doses de quimioterapia obteve resultados semelhantes, e relatou boa tolerância dos pacientes ao tratamento (MIGLIORATI et al. 2001).

SANDOVAL et al. (2003) demonstraram a eficiência do laser terapêutico no manejo da mucosite bucal induzida por quimioterapia e radioterapia quando as lesões já estavam manifestadas na boca. Foi utilizado o laser de ArGaAl com 660nm de comprimento de onda, $2\text{J}/\text{cm}^2$, e 30mW de potência. Os resultados mostraram alívio imediato da dor e redução do grau de mucosite bucal, representando uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes (SANDOVAL et al. 2003).

A ação do laser de baixa intensidade na atividade proliferativa celular é um assunto controverso, já que a luz laser tem mostrado hora como estimulante, hora com inibidora da proliferação de células em cultura (PINHEIRO et al. 2002).

As culturas de células *in vitro* constituem um excelente meio para o estudo dos efeitos de diversos agentes, permitindo verificar as reações entre dose e efeito (PINHEIRO et al. 2002).

A maior vantagem deste tipo de modelo experimental é que se pode isolar uma parte específica de um determinado processo (ALMEIDA-LOPES et al. 2001).

Um estudo realizado por ALMEIDA-LOPES et al. (2001) envolveu a ação do laser de baixa intensidade em diferentes comprimentos de onda em cultura de fibroblasto humano. Com o intuito de simular a agressão tecidual *in vitro*, um dos grupos de células foi submetido ao crescimento em meio de cultivo com déficit nutricional (5% de soro fetal bovino). Estas apresentaram um índice de proliferação menor do que as células cultivadas em meio normal (controle). Entretanto, quando irradiadas mostraram um aumento na

taxa de proliferação celular similar ou maior do que as células controle. Neste estudo também foi evidenciada uma maior proliferação das células submetidas ao laser infravermelho (invisível) quando comparado ao laser visível e submetidos à mesma dose total de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Entretanto, não houve diferença no índice proliferativo com as variações nas potências utilizadas. Estes autores concluem que o laser em baixa intensidade melhora a proliferação de fibroblastos *in vitro* e que quanto menor o tempo de exposição à luz laser maior será o índice proliferativo.

PEREIRA et al. (2002) estudaram a ação do LLLT em cultura de fibroblastos, e observaram que as culturas irradiadas com 3 ou $4\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram significativo aumento do número de células comparado ao grupo controle (não irradiado). As culturas irradiadas com $5\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram padrão de crescimento similar ao do grupo controle, e as culturas irradiadas com $3\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram crescimento similar quando comparado com culturas irradiadas com $4\text{J}/\text{cm}^2$. Este crescimento celular foi significativamente maior do que o das culturas irradiadas com $5\text{J}/\text{cm}^2$ (PEREIRA et al. 2002).

GROSSMAN et al. (1998) utilizou o laser de diodo de baixa intensidade, com 780nm de comprimento de onda e com a potência de 6,5 mW em cultura de keratinócitos. Neste estudo, observou aumento significativo das células de keratinócitos expostos a uma dose terapêutica que variou de $0,45 - 0,95\text{J}/\text{cm}^2$.

AL-WATBAN e ANDRES (2001) irradiou culturas de fibroblasto de pele humana e epitélio de ovário de hamster Chines. A irradiação de epitélio

de ovário de hamster Chines utilizando o laser de He-Ne, no comprimento de onda de 632,8nm, na potência de 1,25 mW/cm² e com uma dose cumulativa que variou de 60-600 mJ/cm² mostrou aumento significativo da proliferação celular. Quando adicionou uma não proteína (Solcoseryl), derivada de sangue hemodializado de bezerro, este crescimento mostrou-se mais expressivo.

KREISLER et al. (2003) mostrou que células de carcinoma de laringe humana, submetidas à laserterapia no comprimento de onda de 809nm e a uma potência de 10mW apresentam crescimento significativo nas primeiras 24 horas para as 72 horas após a irradiação.

SCHAFFER et al. (1997) estudando o laser no comprimento de onda de 809nm, aplicado a linhagens de célula urotelial normal (HCV29), e carcinoma urotelial (J82) apresentaram crescimento significativo até a fluência de 4J/cm², apresentando redução do crescimento após esta dose. Ainda neste estudo, a linhagem de carcinoma de mucosa gengival humana (ZMK) mostrou redução da atividade celular, que persistiu mesmo após a dose de 4J/cm².

A potência utilizada para cada linhagem celular são 10mW para HCV, 10mW para J82 e 50mW para ZMK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Na execução deste trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares, a saber:

- 1 HN30 - linhagem originada a partir de células epiteliais de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de humano (YEUDALL et al. 1994; CARDINALI et al. 1995; JEON et al. 2004). Essa linhagem, pertencente ao laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior (Figura 1).
- 2 KB (ATCC CCL 17)- linhagem originada de células epiteliais de carcinoma epidermóide de boca humana (FOLEY e HANDLER 1957; EAGLE e FOLEY 1958) (Figura 2).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar. A parte experimental desse trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Profa. Dra. Márcia M. Marques.

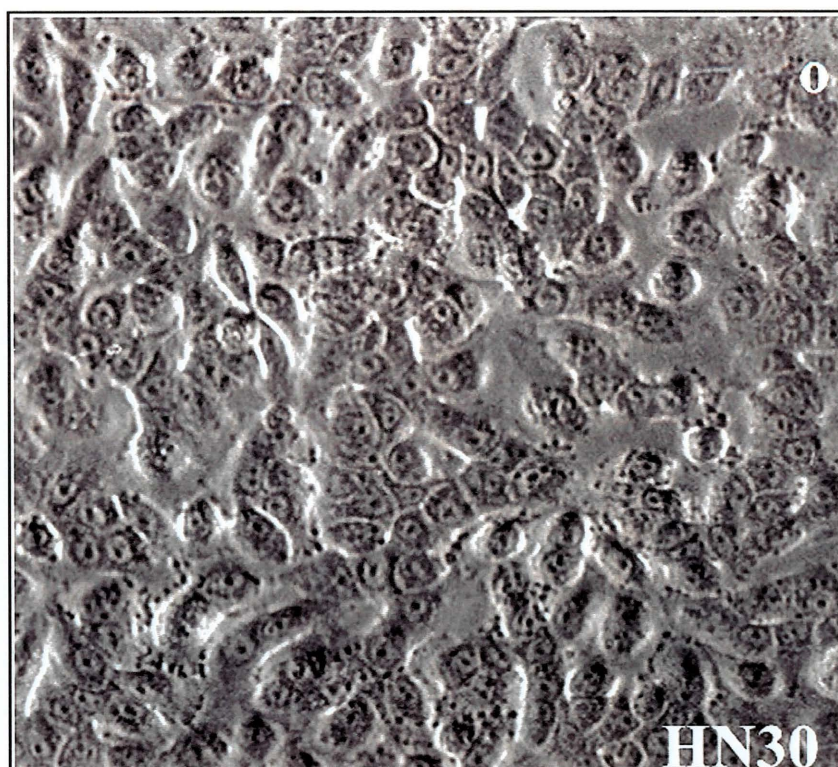


Figura 1 - Linhagem celular HN-30 vista em microscópio invertido de fase.

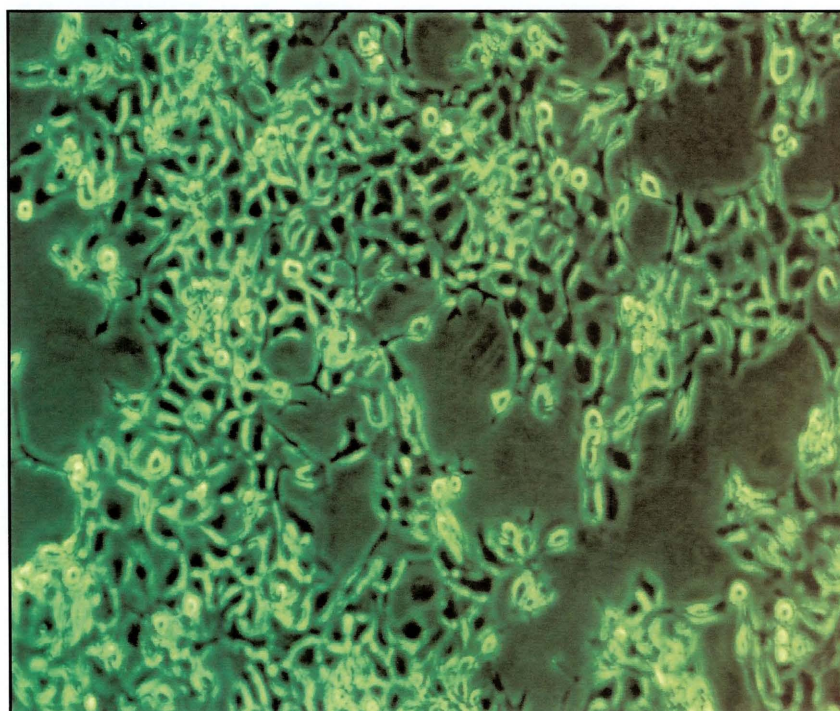


Figura 2 - Linhagem KB vista em microsc.

4.2 CULTIVO CELULAR

Os procedimentos de cultivo descrito a seguir foram os mesmos para ambas as linhagens celulares. Um tubo criogênico contendo as células congeladas de cada linhagem celular foi descongelado rapidamente (60 segundos) em banho de água a 37° C. Para remover a substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido-DMSO), o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e centrifugado a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células resultante da centrifugação, ressuspenso em 1 ml de meio de cultura fresco. A suspensão de células foi transferida para um frasco plástico de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável contendo 5 ml de meio de cultura fresco. O meio de cultivo utilizado foi o Meio Mínimo de Eagle modificado por Dubelco (DMEM- Sigma Co. St Louis, MO, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (sfbc- Cultrilab, São Paulo, Brasil) e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase.

Para o subcultivo celular o meio do frasco foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com uma solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. A seguir, as células foram separadas com 2 ml de solução de tripsina 0,25 % durante 5 minutos a 37 °C. A tripsina foi então inativada com 5 ml de meio de cultura contendo

soro fetal bovino e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuscitado em 1 ml de DMEM fresco. Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento que dará origem a novas passagens da cultura. Para a manutenção da viabilidade das células a troca dos meios de cultivo dos frascos e das placas foi feita a cada 2 ou 3 dias. Frações dessas culturas foram congeladas para manter estoques das linhagens.

Grupos experimentais

Linhagem KB-

GRUPO 1: cultura celular que não recebeu irradiação laser

GRUPO 2- cultura celular que recebeu irradiação laser 660nm

GRUPO 3- cultura celular que recebeu irradiação laser 780nm

Linhagem HN-30 -

GRUPO 1: cultura celular que não recebeu irradiação laser

GRUPO 2- cultura celular que recebeu irradiação laser 660nm

GRUPO 3- cultura celular que recebeu irradiação laser 780nm

Experimentos

Para os experimentos de proliferação celular foram plaqueadas as mesmas quantidades de células em placas tipo ELISA (96 poços) (3 placas

no total, sendo 36 poços para cada grupo experimental). Essa quantidade foi de 1×10^3 células por poço. E as mesmas foram cultivadas em déficit nutricional, ou seja, com somente 5% de soro fetal bovino, porque a LILT tem mostrado resultados positivos em cultivo de células mesenquimais somente sobre células em déficit nutricional (ALMEIDA-LOPES et al. 2001).

Para a obtenção dessas 10^3 células, foi realizada a contagem de células viáveis através do uso de hemocitômetro e o método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan (FRESHNEY 2000), a saber: as células que cresceram nos frascos foram separadas através de tripsinização e, após a obtenção da suspensão de células, estas foram centrifugadas por 5 min (300g) e o precipitado de células ressuspense em 1 ml de tampão salina-fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBSA). Parte desta suspensão de células (0,1 ml) foi transferida para um novo tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de azul de Trypan. Ambas as câmaras de um hemocitômetro receberam essa nova suspensão de células, as quais foram contadas sob microscópio de luz. O número total de células originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células contadas x diluição x 10^4 / Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem.

Somente as células mortas apareceram coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan, devido a lesões na membrana celular. A exclusão destas células da contagem geral serviu para a determinação da viabilidade celular.

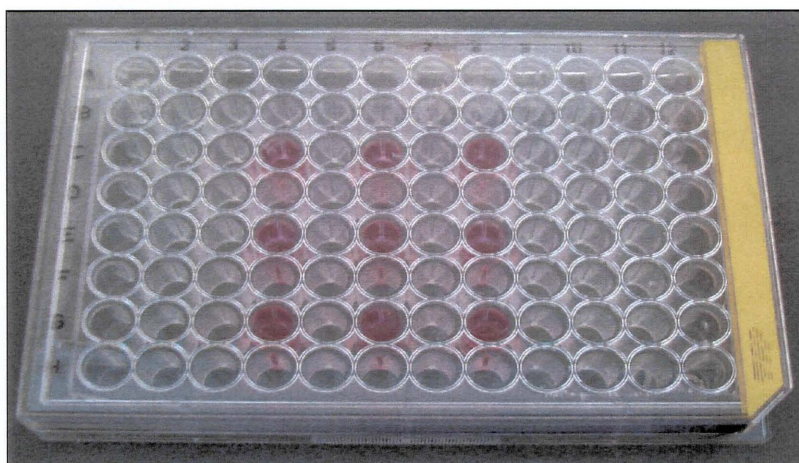


Figura 3 - Distribuição das células nos poços das placas.

4.3 IRRADIAÇÃO LASER

Foi utilizado o aparelho de laser Twin Laser ilustrado abaixo (Figura 2) (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil) possuidor das seguintes especificações técnicas do Quadro 1.



Figura 4 - Aparelho Twim Laser da MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil.

Características de emissão	Comprimento de onda	Potência do emissor	Potência útil	Meio ativo
Emissor Laser visível	660 nm	40 mW	40mW	InGaAlP
Emissor Laser infravermelho	780 nm	70mW	70mW	AsGaAl

Quadro 1 - Especificações técnicas do Twin Laser.

Após 6 h do plaqueamento, tempo suficiente para que as células aderissem à placa, foram feitas as irradiações de forma dupla com intervalo de 6 horas (PEREIRA et al. 2002), pontual, por contato, com emissão na faixa do vermelho (G5-8) ou infravermelho (G9-12) contínua seguindo os seguintes parâmetros descritos abaixo:

	Vermelho	Infravermelho
Comprimento de onda	nm	nm
Potência	mW	mW
Densidade de Energia	J/cm ²	J/cm ²
Diâmetro de fibra	mm ²	mm ²

Quadro 2 - Parâmetros utilizados durante as irradiações com laser.

As placas de 96 poços foram posicionadas com auxílio de equipamento de suporte com um apoio específico para aplicação do laser desenvolvido para esse intuito como ilustra a Figuras 5 e 6. As placas que não sofreram irradiação (controle-G1) receberam os mesmos tratamentos experimentais dos poços irradiados simulando cada passo da aplicação do laser em baixa intensidade anteriormente descrito, porém sem ligarmos o equipamento de laser.

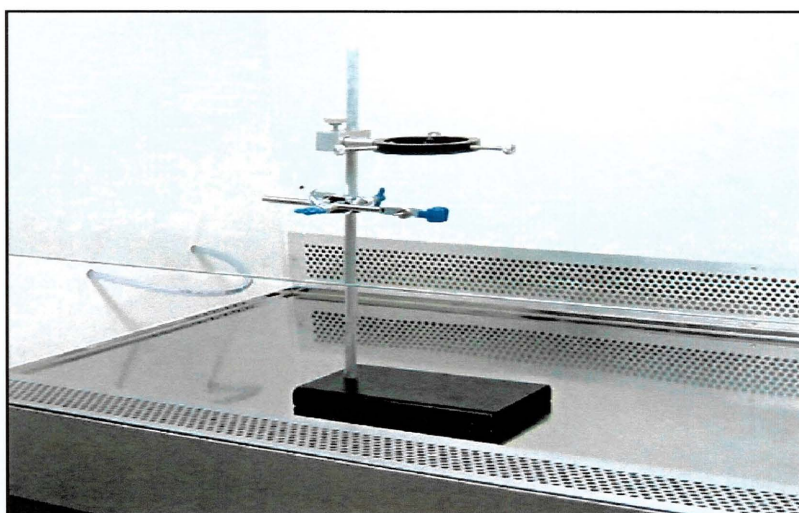


Figura 5 - Equipamento de suporte para aplicação do laser.

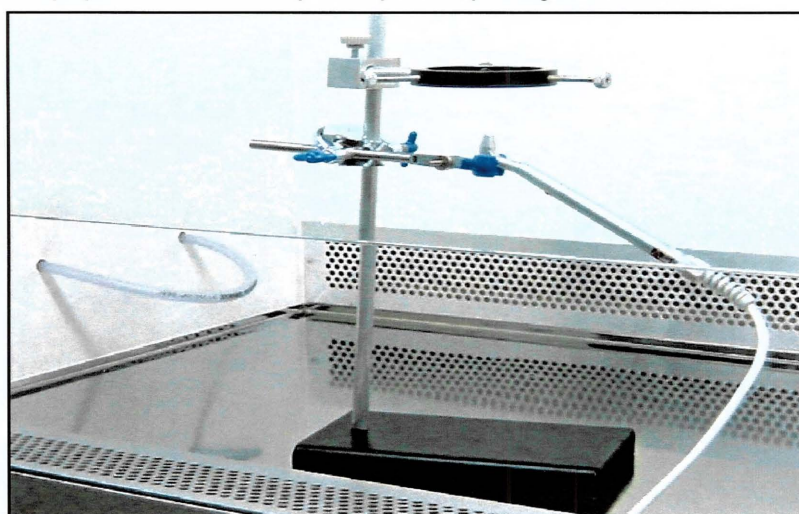


Figura 6 - Equipamento de suporte, com a ponta do laser fixa, pronta para aplicação.

Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada. Sabendo que a distância entre o laser e a superfície de aplicação é crítica, a distância entre o feixe laser e as células foi constante. A aplicação do laser foi feita através da base das placas de cultivo celular (ELISA), portanto o feixe laser não teve que atravessar o meio de cultura sendo aplicado diretamente na monocamada celular. A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura, deixando somente a área a ser irradiada exposta (PEREIRA et al. 2002).

Para verificar a saída de potência do equipamento foi utilizado um medidor de potência antes e depois dos experimentos (Figura 7).

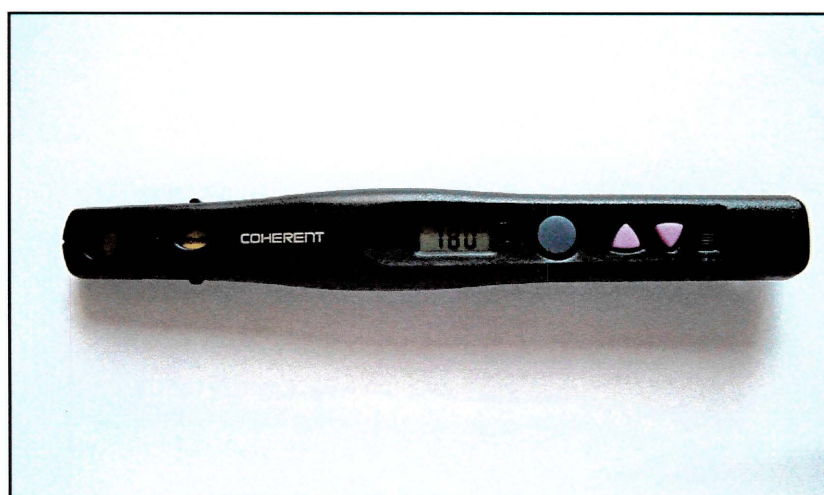


Figura 7 - Medidor de potência utilizado antes e depois dos experimentos

Todos os procedimentos com os lasers de GaAlAs foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

4.4 CURVAS DE CRESCIMENTO CELULAR

A contagem celular foi realizada utilizando a técnica da mensuração da atividade mitocondrial utilizando um kit de ensaio de proliferação celular baseado em MTT (Vybrant MTT Cell Proliferation Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Após cada período experimental (12, 16 e 20 horas após a irradiação) uma placa contendo a quadruplicata dos grupos experimentais controle (G1), tratados com laser vermelho (G2) e infravermelho (G3) tiveram seus meios de cultura substituídos por meio fresco (100 μ l), onde foi adicionado o MTT (10 μ l de uma solução estoque 12mM). As placas foram então envolvidas com papel alumínio e incubadas por no mínimo 4 h na estufa úmida a 37 °C. Após essa incubação foram adicionados mais 10 μ L de uma solução de SDS-HCl. A seguir, o meio dos poços, contendo o MTT, foi parcialmente removido deixando-se 25 μ L onde foram acrescentados 50 μ L de DMSO, para dissolver o precipitado de MTT-formazan, durante 10 min a 37 °C. A seguir, adicionou-se 25 μ l de tampão de glicina e as placas foram colocadas na leitora de ELISA (Amersham) para a leitura da absorbância em 540 nm (Figuras 8 e 9). Poços com o meio contendo MTT, mas sem células foram utilizados como controle negativo para a leitura.



Figura 8 - Leitora de ELISA.

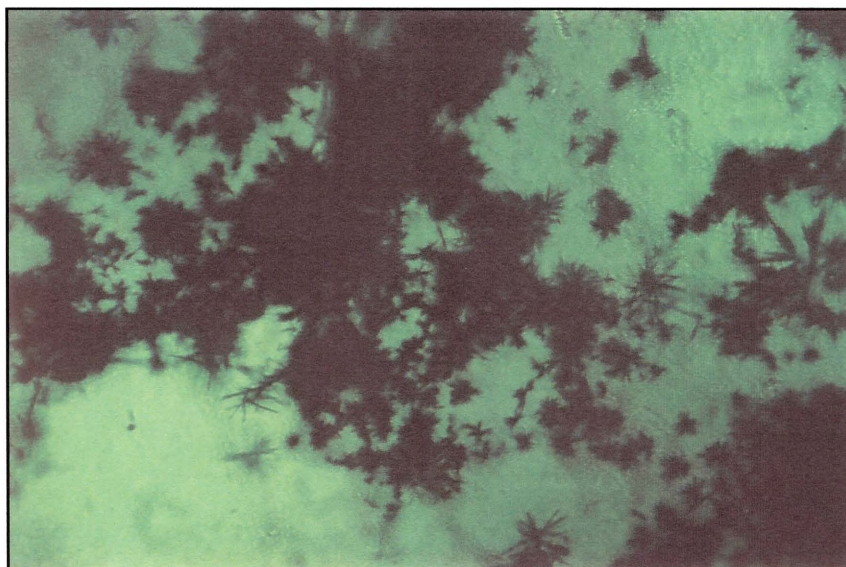


Figura 9 - Observação dos cristais lidos pela leitora de ELISA, vistos em microscópio invertido de fase.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das absorbâncias foram analisados estatisticamente utilizando o Programa BioEstat. Inicialmente, utilizamos o método Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) que revelou uma distribuição normal dos resultados. Como a distribuição foi normal os dados foram comparados pelo método multifatorial ANOVA. O nível de significância adotado foi o de 5% ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Os dados originais, em quadruplicata, das densidades ópticas medidas para as duas linhagens celulares estudadas (KB e NH30) nos experimentos utilizando ou não irradiação com laser de diodo em baixa intensidade nos dois comprimentos de onda (660 e 780 nm) estão apresentados no Anexo 1-A e B respectivamente.

Os valores de média e erro padrão da média das densidades ópticas das células KB estão expressos na Tabela 1 e estão ilustrados graficamente na Figura 10.

Tabela 1 - Valores da média e erro padrão da média correspondente à atividade mitocondrial medida em densidade óptica (DO) para as células KB cultivadas com 5% de soro fetal bovino.

Grupos	Período	12 Horas	16 Horas	20 Horas
Grupo 1 controle)		2,44 ± 0,59	4,74 ± 0,26	5,02 ± 0,27
Grupo 2 (660 nm)		4,76 ± 0,92	3,8 ± 0,6	4,69 ± 1,45
Grupo 3 (780 nm)		3,12 ± 0,91	4,51 ± 0,92	4,33 ± 0,78

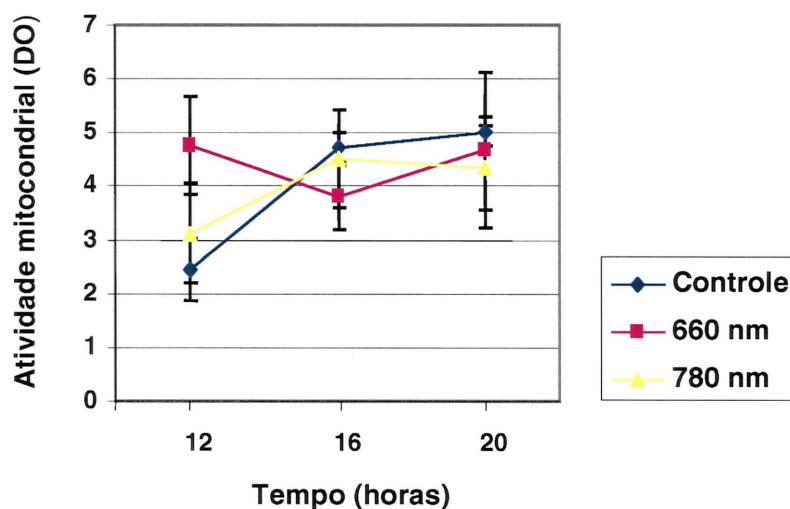


Figura 10 - Gráfico que representa os valores de atividade mitocondrial das células KB.

Os dados referentes às células KB foram analisados estatisticamente primeiro pelo método Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) que revelou uma distribuição normal dos resultados. A análise de normalidade encontra-se no Anexo 2-A.

Como a distribuição foi normal os dados foram comparados pelo método multifatorial ANOVA que mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes nem entre os diferentes tratamentos (controle sem irradiação, irradiação com 660 nm e irradiação com 780 nm de comprimento de onda), nem entre os diferentes tempos experimentais (12,

16 e 20 horas). A interação entre os tratamentos e os blocos (períodos experimentais) também não mostrou diferenças estatisticamente significantes (Quadro 3).

Fontes de Variação	GL*	SQ**	QM***
Tratamentos	2	1,7797	0,8898
Blocos	2	9,3960	4,6980
Interação	4	11,8788	2,9697
Erro	27	54,6588	2,0244
F (Tratamento) =	0,4396	---	---
Graus de Liberdade =	2,27	---	---
p (Tratamento) =	0,6542	---	---
F (Blocos) =	2,3207	---	---
Graus de Liberdade =	2,27	---	---
p (blocos) =	0,1158	---	---
F (Interação) =	1,4670	---	---
Graus de Liberdade =	4,27	---	---
p (Interação) =	0,2390	---	---

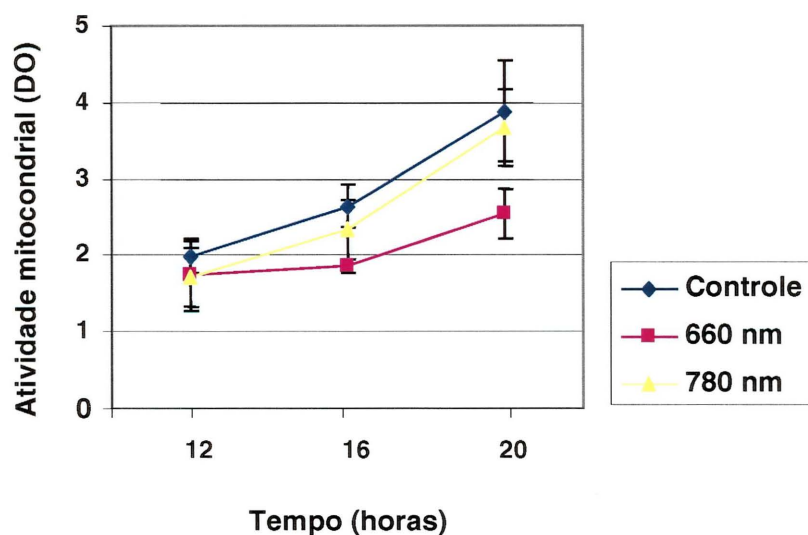
*GL - Grau de liberdade (n=1); **SQ - Soma dos quadrados; ***QM - Quadrados médios

Quadro 3 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondente às densidades ópticas (DO) relativas à atividade mitocondrial de células KB cultivadas em meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino pelo teste ANOVA.

Os valores de média e erro padrão da média das densidades ópticas das células HN30 estão expressos na Tabela 2 e estão ilustrados graficamente na Figura 11.

Tabela 2 – Valores da média e erro padrão da média correspondentes à atividade mitocondrial medida com densidade óptica (DO) para as células HN30 cultivadas em meio contendo 5% de soro fetal bovino.

Grupos	Período	12 Horas	16 Horas	20 Horas
Grupo 1 (controle)		1,98 ± 0,4	2,64 ± 0,29	3,88 ± 0,65
Grupo 2 (660 nm)		1,73 ± 0,45	1,87 ± 0,08	2,55 ± 0,32
Grupo 3 (780 nm)		1,73 ± 0,38	2,33 ± 0,39	3,66 ± 0,49



HN30 5%

Figura 11 - Gráfico que representa os valores de atividade mitocondrial das células HN30.

Os dados referentes às células HN30 foram analisados estatisticamente primeiro pelo método Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) que revelou uma distribuição normal dos resultados. A análise de normalidade encontra-se no Anexo 2-B).

Como a distribuição foi normal os dados foram comparados pelo método multifatorial ANOVA que mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes nem entre os diferentes tratamentos (controle sem irradiação, irradiação com 660 nm e irradiação com 780 nm de comprimento de onda), nem entre os diferentes tempos experimentais (12, 16 e 20 horas). A interação entre os tratamentos e os blocos (períodos

experimentais) também não mostrou diferenças estatisticamente significantes (Quadro 4).

Fontes de Variação	GL*	SQ**	QM***
Tratamentos	2	1,7797	0,8898
Blocos	2	9,3960	4,6980
Interação	4	11,8788	2,9697
Erro	27	54,6588	2.0244
F (Tratamento) =	3,0249	---	---
Graus de Liberdade =	2,27	---	---
p (Tratamento) =	0,0638	---	---
F (Blocos) =	11,9339	---	---
Graus de Liberdade =	2,27	---	---
p (blocos) =	0,0004	---	---
F (Interação) =	6,6396	---	---
Graus de Liberdade =	4,27	---	---
p (Interação) =	0,6415	---	---

*GL - Grau de liberdade (n=1); **SQ - Soma dos quadrados; ***QM - Quadrados médios

Quadro 4 - Comparação das diferenças entre as médias dos valores correspondente às densidades ópticas (DO) relativa à atividade mitocondrial de células HN30 cultivadas em meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino pelo teste ANOVA.

6 DISCUSSÃO

A LILT vem sendo amplamente utilizada na área de saúde, principalmente com propósitos terapêuticos, ou para bioestimulação por suas características de baixa intensidade de energia e comprimento de ondas capazes de penetrar nos tecidos (GROSSMAN et al. 1998; PEREIRA et al. 2002; EDUARDO 2003; KREISLER et al. 2003). Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade antiinflamatória deste tipo de luz laser bem como, sua ação na redução da dor e estímulo à cicatrização (DYSON e YOUNG 1986; KAWAKAMI et al. 1989; BOLOGNANI e VOLPI 1992, KUDO et al. 1998; LIEVENS e VEEN 2001; KREISLER et al. 2003; EDUARDO 2003).

Na década de 90 começaram a surgir pesquisas a cerca do efeito do laser em baixa intensidade no tratamento e prevenção da mucosite bucal (POURREAU-SCHNEIDER et al. 1992). Vários trabalhos demonstram uma boa efetividade clínica, entretanto, ainda há resultados controversos (MIGLIORATI et al. 2001; SANDOVAL et al. 2003; EDUARDO 2003; BENSADOUN e CIAIS 2002).

Neste estudo nos propusemos a avaliar o efeito do laser em baixa intensidade em células cultivadas de carcinoma de boca baseado no fato de que muitos pacientes em tratamento oncológico, principalmente os portadores de tumores na região de cabeça e pescoço, apresentam

mucosite bucal durante a quimioterapia e a radioterapia, e concomitantemente podem apresentar tumor na boca.

Optamos pela utilização do método de cultura de células *in vitro* pois este, consiste em um excelente meio para estudo do comportamento celular frente a diversos agentes, bem como para verificação entre dose e efeito (PINHEIRO et al. 2002). A principal vantagem do cultivo celular é permitir o estudo do comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo, além do controle ambiental das células a facilidade de execução, rapidez e baixo custo (FRESHNEY 2000).

Foram utilizadas duas linhagens celulares (KB e HN30), cultivadas em déficit nutricional, tendo em vista que a ação do laser em baixa intensidade parece ser mais efetiva em tecidos com alteração (sob estresse). Assim, tentamos simular esta condição *in vitro* através da redução na concentração de soro fetal bovino. Esta metodologia foi utilizada anteriormente para avaliação do efeito do laser em baixa intensidade no crescimento de fibroblastos (ALMEIDA-LOPES 2001; PEREIRA et al. 2002) bem como na síntese de colágeno (PEREIRA et al. 2002).

Os parâmetros adotados para a utilização do laser neste estudo foram escolhidos por serem os mesmos usualmente empregados em pacientes oncológicos recebendo tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, e que manifestam o quadro clínico de mucosite bucal.

A densidade de energia de 3J/cm² já tem mostrado atividade proliferativa *in vitro* sobre células mesenquimais crescidas em déficit nutricional (PEREIRA et al. 2002). E os comprimentos de onda de 680nm e

780nm têm demonstrado atividade no controle de dor e na prevenção da mucosite bucal in vivo (MIGLIORATI et al. 2001; EDUARDO 2003; SANDOVAL et al. 2003).

A terapia utilizando lasers em baixa intensidade baseia-se na utilização da energia dos fótons para gerar efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e nos tecidos. Quando a luz laser interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas. De acordo com o modelo proposto por KARU (1989) os fótons de comprimento de onda vermelho são absorvidos pelas mitocôndrias, o que desencadeia efeitos fotoquímicos nas organelas, aumenta a síntese de ATP, altera o pH, promove mudanças na atividade bioquímica, e maior transferência de elétrons. Esse processo resulta no aumento do metabolismo e proliferação celular.

No entanto, as condições realizadas neste estudo, os resultados obtidos mostram que o laser em baixa intensidade não foi capaz de incrementar o crescimento dessas células epiteliais tumorais.

Esses resultados podem ser justificados através da análise de alguns pontos importantes tais como: tempo de experimento, número de células iniciais do experimento, tipo de célula (célula epitelial), parâmetros de utilização do laser e pelo fato das células serem malignas.

As culturas controle, bem como as experimentais não apresentaram crescimento significativo durante as doze horas do experimento. Isto poderia ter sido resultante do número de células plaqueadas inicialmente que para a área de um poço da placa de 96 poços poderia ter sido excessivo, não

deixando espaço para o aumento do número de células na monocamada celular. É sabido que algumas células em cultura apresentam inibição de contato, portanto uma vez coberto todo o fundo do poço as células em contato uma com as outras perdem a capacidade proliferativa. Para eliminarmos esta hipótese pretendemos repetir os experimentos agora com uma quantidade menor de células inicialmente plaqueadas.

Por outro lado, se o número de células plaqueadas não foi excessivo outra possibilidade para a ausência de proliferação significativa poderia residir no tempo dos experimentos. Talvez 12h fosse pouco para se observar crescimento significativo. Portanto, há a necessidade de se obter o tempo de dobramento (“doubling-time”) destas células, ou realizar experimentos mais longos na busca do melhor modelo experimental para estudar o efeito do laser na proliferação destas linhagens celulares estudadas.

KREISLER et al. (2003), utilizando laser diodo de ArGaAl no comprimento de onda de 809nm, com 10mW de potência, doses totais de tratamento variando de 1,96 a 7,84 J/cm², irradiando cultura de células de carcinoma de laringe, observou crescimento estatisticamente significativo 24, 48 e 72 horas de irradiação.

Quando comparamos nossos métodos e resultados com os de KREISLER et al. (2003), verificamos que mesmo com uma potência menor estes autores conseguiram crescimento significativo das células epiteliais neoplásicas. Acreditamos que o maior tempo experimental utilizado pelos pesquisadores foi determinante para a obtenção do resultado.

Neste estudo trabalhamos com células de linhagem epitelial e na literatura, existem estudos controversos a respeito da ação do laser em baixa intensidade sob células epiteliais normais ou neoplásicas (KREISLER et al. 2003). Alguns autores acreditam que o laser não tem efeito estimulatório em células epiteliais (POGREL et al. 1997; SCHAFFER et al. 1997). Por outro lado, outros autores mostraram crescimento (GROSMAN et al. 1998; AL-WATBAN e ANDRES 2000 e 2001; KREISLER et al. 2003).

Com o laser na faixa do infravermelho, alguns autores demonstraram efeito proliferativo sobre queratinócitos (GROSMAN et al. 1998), epitélio de ovário (AL-WATBAN e ANDRES 2000 e 2001) e em especial sobre células de carcinoma de laringe (KREISLER et al. 2003).

AL-WATBAN e ANDRES (2000 e 2001), utilizando laser de He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, 35mW de potência e doses cumulativas variando de 60 a 600 mJ/cm², acrescentaram outros componentes ao meio de cultura, tal como Scoceryl e Polygen, também mostraram crescimento celular estatisticamente significativo principalmente quando a dose acumulada estava em 180mJ/cm².

A comparação de resultados entre os diferentes estudos investigativos encontrados na literatura algumas vezes se torna difícil, e isto muito se deve ao fato destes experimentos não apresentarem condições padronizadas (KREISLER et al. 2003). Geralmente aceita-se que os efeitos estimulatórios e inibitórios do laser sobre células são dependentes do comprimento de onda utilizado e da dose total aplicada (KREISLER et al. 2003).

ALMEIDA-LOPES et al. (2001) demonstrou que pequenas diferenças em densidades de energia são capazes de ter diferentes ações no crescimento celular. Relatou também, que a resposta bioestimuladora do laser de baixa intensidade depende de uma combinação entre comprimento de onda, densidade de energia, potência e tempo de irradiação.

O resultado por nós obtido foi contrário aos encontrados por esses autores citados, porém, cabe salientar que os parâmetros utilizados são diferentes com relação à potência e/ou a dose total de laser aplicada sobre a cultura em estudo.

Nosso estudo utilizou o laser de diodo de InGaAlP (luz visível), no comprimento de onda de 660 nm, com uma potência útil de 40 mW, e AsGaAl (luz infravermelho), no comprimento de onda de 780 nm, com uma potência útil de 60 mW. Nos dois comprimentos de onda utilizados a dose total aplicada foi de $6\text{J}/\text{cm}^2$. E o tempo de crescimento celular após irradiação com laser foram de 12, 16 e 20 horas respectivamente.

Outro aspecto importante é que as células neoplásicas malignas exibem normalmente alto índice proliferativo e perda de diferenciação celular devido a modificações em genes que regulam a proliferação celular. Esse perfil proliferativo é diferente das células normais ou em condições de estresse. Assim, a luz laser talvez não tenha exercido efeito estimulatório na proliferação de células originárias de carcinomas de boca porque as mesmas já exibem alterações em grupos de genes que participam de processos carcinogênicos e que em condições normais desempenham importantes papéis em vias relacionadas ou à ativação ou à proliferação

celular (PARISE Jr 2000). Portanto, o laser pode não conseguir atuar nas células neoplásicas malignas porque elas possuindo alterações em receptores de membranas, vias de transdução de sinal e em outros pontos importantes da regulação do crescimento celular fruto das lesões gênicas que estas células apresentam podem não responder ao laser como células normais o fazem.

Como podemos observar os resultados encontrados na literatura no que concerne à laserterapia sobre cultura de células são bastante controversos, e novos estudos devem ser realizados, testando diferentes linhagens celulares e diferentes parâmetros para que possamos ter uma melhor compreensão de como as células tumorais se comportam quando submetidas à laserterapia.

7 CONCLUSÃO

A irradiação com laser em baixa intensidade nas condições experimentais deste estudo não foi capaz de induzir crescimento de células de carcinoma de boca in vitro.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med** 2001; 29:179-84.

Al-Watban FA, Andres BL. Effect of He-Ne laser (632.8 nm) and Polygen on CHO cells. **J Clin Laser Med Surg** 2000; 18:145-50.

Al-Watban FA, Andres BL. The effect of He-Ne laser (632.8 nm) and solcoseryl in vitro. **Lasers Med Sci** 2001; 16:267-75.

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

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

Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. **Support Care Cancer** 1999; 7:244-52.

Bensadoun RJ, Magne N, Marcy PY, Demard F. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2001; 258:481-7.

Bensadoun RJ, Ciais G. Radiation and chemotherapy induced mucositis in oncology: results of multicenter phase iii studies. **J Oral Laser Applications** 2002; 2:115-20.

Bicudo LL. **Utilização de Leds na prevenção de mucosite oral em pacientes com linfoma de hodgkin clássico-estudo de caso.** São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares].

Billis W, Fuks Z, Kolesnick R. Signaling in and regulation of ionizing radiation-induced apoptosis in endothelial cells. **Recent Prog Horm Res** 1998; 53:85-92; discussion 93.

Bolognani L, Volpi N. Low power laser-enzyme interaction laser application in medicine & surgery. In: **Proceedings of 3rd World congress, International Society of Low Power Laser Application in Medicine.** Monduzzi Editore, 1992.

Bradley P. The orofacial region: laser practice. In: Oswal V, Remacle M, editors. **Principles and practice of lasers in otorhinolaryngology and head and neck surgery.** Netherlands: Kugler Pu; 2002. p.361-80.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer** 1995; 61:98-103.

Cowen D, Tardieu C, Schubert M, et al. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 38:697-703.

Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury- a complex wound. **Radiother Oncol** 2002; 63:129-45.

Dyson M, Young SR. Effects of laser therapy on wound healing contraction and cellularity in mice. **Lasers Med Sci** 1986; 1:125-30.

Eagle H, Foley GE. Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. **Cancer Res** 1958; 18:1017-25.

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

Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer** 2003; 98:1531-9.

Enwemeka C, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Stanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg** 2004; 22:323-9.

Epsteein JB, Shubert MM. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod** 1999; 88:273-6.

Foley GE, Handler AH. Differentiation of normal and neoplastic cells maintained in tissue culture by implantation into normal hamsters. **Proc Soc Exp Biol Med** 1957; 94:661-4.

Freshney RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 4th ed. New York: John Wiley & Sons; 2000.

Garcia VG, Okamoto T, Theodoro LH, Milanezi LA, Garcia JLV. Processo de reparo em feridas de extração dental tratadas com laser em baixa intensidade (904nm), com diferentes energias de irradiação: estudo histológico em ratos. **Rev Faculdade Odontol Lins** 2001; 13:9-13.

Gold SI, Vilardi MA. Pulsed laser beam effects on gingiva. **J Clin Periodontol** 1994; 21:391-6.

Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med** 1998; 22:212-8.

Jeon GA, Lee JS, Patel V, et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. **Int J Cancer** 2004; 112:249-58.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. **Heath Phys** 1989; 56:691-704.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum Eletron** 1997; QE23:1703-7.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B** 1999; 49:1-17.

Karu T. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: Simunovic Z, editor. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low level laser therapy**. Rijeka: Vitagraf; 2000. p.97-125.

Kawakami T, Ibaraki I, Haraguchi K, et al. The effectiveness of GaAlAs semiconductor laser treatment do decrease pain after irradiation. **Higashi Nippon Shigaku Zasshi** 1989; 8:57-10.

Kostler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA Cancer J Clin** 2001; 51:290-315.

Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers Med Sci** 2003; 18:100-3.

Kudo HC, Inomata K, Okajima K, Moteji M, Oshiro T. Low level laser therapy pain atenuation mechanisms I. **Laser Ther** 1998; 1:3-8.

Lockhart PB, Sonics ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. **J Dermatol Surg Onco** 1981; 7:1019-25.

Loprinzi CL, Gastineau DA, Foote RL. Oral complications In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, et al. **Clinical oncology**. 2nd ed. St. Louis: Churchill Livingstone; 2000. p.965-79.

Mester E, Jaszagi-Nagy E, Hamar M. The influence of laser radiation on stimulated Lynphocytes. **Radiobiol Radiother** 1974; 15:767-9.

Migliorati CA, Massumoto C, Eduardo FP, et al. Low-energy laser therapy in oral mucositis. **J Oral Laser Applications** 2001; 1:97-101.

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

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med** 2002; 31:263-7

Peterson ND. Pretreatment strategies for infection prevention in chemotherapy patients. **Natl Cancer Inst Monogr** 1990; (9):61-71.

Pinheiro ALB, Nascimento SC, Vieira ALB, et al. Stimulate laryngeal carcinoma cells? an in vitro study. **Braz Dent J** 2002; 13:109-12.

Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Lasers Surg Med** 1997; 20:426-32.

Pourreau-Schneider N, Soudry M, Franquin JC, et al. Soft-laser therapy for iatrogenic mucositis in cancer patients receiving high-dose fluorouracil: a preliminary report. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:358-9.

Psyrr A, Kwong M, DiStasio S, et al. Cisplatin, fluorouracil, and leucovorin induction chemotherapy followed by concurrent cisplatin chemoradiotherapy for organ preservation and cure in patients with advanced head and neck cancer: long-term follow-up. **J Clin Oncol** 2004; 22:3061-9.

Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade In: Gutknecht N, Eduardo CP, editores **A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica**. São Paulo: Quintessence; 2004. p.217-40.

Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, et al. Mucositis study section of the multinational association for supportive care in Cancer; International Society for Oral Oncology: clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer** 2004; 100:2026-46.

Sabaga J. Oncogenes e antioncogenes. In: Parise Junior O, editor. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier; 2000. p.23-8.

Sandoval RL, Koga DH, Buloto LS, Suzuki R, Dib LL. Manejo da mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia com laser de baixa potência: resultados iniciais do Hospital A C. Camargo. **J Appl Oral Sci** 2003; 11:337-41.

Schaffer M, Sroka R, Fuchs C, et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **J Photochem Photobiol B** 1997; 40:253-7.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. **J Invest Med** 2000; 8:312-26.

Schubert M, Williams BE, Lloid ME, Donalson G, Chapko MK. Clinical assessment scale for the rating of oral mucosal changes associates with bone marrow transplantation: development of an oral mucositis index. **Cancer** 1992; 69:2469-77.

Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **Head Neck** 2003; 25:1057-70.

Simunovic Z, Ivankovich AD, Depolo A. Wound healing if animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **J Clin Laser Med Surg** 2000; 18:67-73.

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

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer** 2004; 100(9 Suppl):1995-2025.

Tardieu C, Cowen D, Thirion X, Franquin JC. Quantitative scale of oral mucositis associated with autologous bone marrow transplantation. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1996; 32B:381-7.

Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother Oncol** 2003; 66:253-62.

Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **J Clin Laser Med Surg** 2001; 19:305-14.

Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J Clin Laser Med Surg** 2003; 21:67-74.

White JM, Goodis HE, Setcos JC, Eakle S, Hulscher BE, Rose CL. Effects of pulsed Nd:YAG laser energy on human teeth: a three-year follow-up study. **J Am Dent Assoc** 1993; 124:45-51.

Yeudall WA, Crawford RY, Ensley JF, Robbins KC. MTS1/CDK4I is altered in cell lines derived from primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis** 1994; 15:2683-6.

Anexo 1 - Dados originais das linhagens celulares.

Grupos	Período	12 horas	16 horas	20 horas
Grupo 1 (controle)		3,38	4,25	5,10
		2,61	4,82	5,46
		1,77	4,25	4,16
		1,34	5,15	4,52
Grupo 2 (660 nm)		3,14	3,09	4,17
		6,35	5,01	7,43
		4,80	3,30	2,48
		3,01	2,85	2,34
Grupo 3 (780 nm)		4,95	2,05	3,50
		2,04	5,06	5,91
		2,38	2,71	3,60
		1,26	5,78	2,58

A – Dados originais em quadruplicata das densidades ópticas da linhagem celular KB.

Grupos	Período	12 horas	16 horas	20 horas
Grupo 1 (controle)		2,45	3,00	4,03
		2,02	3,00	2,71
		1,39	2,80	5,68
		2,08	1,78	3,12
Grupo 2 (660 nm)		3,04	1,90	1,98
		1,07	1,78	2,66
		1,66	2,10	2,14
		1,16	1,71	3,42
Grupo 3 (780 nm)		2,66	1,76	4,85
		0,81	3,22	2,69
		1,90	1,60	4,09
		1,55	2,75	3,03

B - Dados originais em quadruplicata das densidades ópticas da linhagem celular HN30.

Anexo 2 – Dados analisados estatisticamente pelo método Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors)

	G1	G1	G1	G2	G2	G2	G3	G3	G3
Tamanho Amostra =	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Desvio Máximo =	0,2114	0,2954	0,1911	0,2738	0,3553	0,2538	0,3189	0,2457	0,3331
Valor Crítico (0,05) =	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810
Valor Crítico (0,01) =	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170
P(valor)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

KB

A – Mostra a distribuição normal dos resultados obtidos com o as células

KB.

	G1	G1	G1	G2	G2	G2	G3	G3	G3
Tamanho Amostra =	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Desvio Máximo =	0,2817	0,3546	0,2192	0,2818	0,2060	0,2364	0,1625	0,2685	0,2394
Valor Crítico (0,05) =	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810	0,3810
Valor Crítico (0,01) =	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170	0,4170
P(valor)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

HN30

B - Mostra a distribuição normal dos resultados obtidos com o as células

HN30.q