

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS
EM ASSOCIAÇÃO COM A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DIFERENTES
PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM
MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL
EM HAMSTERS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thieni Kaefer

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER
DE BAIXA POTÊNCIA EM MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-
FLUOURACIL EM HAMSTERS**

Thieni Kaefer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, com ênfase em Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) em associação com o Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas.**

Orientadora: Prof^a Dra Manoela Domingues Martins

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Associação com o Programa de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER
DE BAIXA POTÊNCIA EM MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-
FLUOURACIL EM HAMSTERS**

elaborada por
Thieni Kaefer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA



Manoela Domingues Martins, Dra.
(Orientadora)



Laura Campos Hildebrand, Dra. (UFRGS)



Marcelo Lazzaron Lamers, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 29 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, que me educou e amou com toda sua intensidade e é o principal merecedor desse agradecimento. Agradeço por ele estar do meu lado, longe ou perto, agradeço ele por ser forte, lutador e por ter me dado incentivo em todos os momentos que pensei em desistir. Agradeço a ele pela sua coragem e, me orgulho dele tanto quanto ele se orgulha de mim, pois com as pedras do caminho dele, ele constrói um lindo castelo.

Agradeço ao meu irmão que hoje é uma estrelinha lá no céu, a mais linda de todas e iluminou meu caminho para eu chegar até aqui. Agradeço a ele pelos 19 anos de alegria que ele me trouxe, agradeço por rir até hoje das piadas “inoportunas” que ele costumava fazer em todas as situações, agradeço por ele ter me ensinado, pelo menos um pouco, a levar uma vida como ele levava.

Agradeço minha mãe, que não pode estar presente até o final da minha conquista, mas com certeza também se tornou uma estrelinha a me iluminar. Ela me deixou amor, me deixou coragem e me deixou um coração enorme, capaz de suportar a saudade que ela também deixou, e tenho certeza que de onde ela estiver, ela está olhando por mim.

Agradeço as minhas amigas que estão e estiveram do meu lado em todos os momentos, na alegria, nas festas, na dor, na saudade. Amigos são a família que Deus nos permite escolher, e modéstia parte, a minha família é a melhor do mundo!

Agradeço ao meu namorado que já vem caminhando um longo trajeto do meu lado. Ele teve paciência e soube aguentar os momentos de estresse que todos passam durante o mestrado, ele esteve do meu lado quando minha mãe se foi e me trouxe a notícia no dia de uma apresentação de projeto. Agradeço ele por ter sido forte e ter me dado força, pra mesmo longe do meu pai eu ter erguido a cabeça e seguido em frente.

Agradeço a professora Roselaine Pozzobon, pessoa maravilhosa, madura, confiante e um grande ombro amigo. Agradeço a ela todos os dias de sua atenção, ajuda e compreensão.

Agradeço a Jéssica, secretária do mestrado, uma pessoa muito competente e com soluções para todos os problemas.

Agradeço a professora Sílvia Pittan, pela oportunidade do estágio em docência. Seu conhecimento é amplo e sua companhia radiante, nela me espelho, como pessoa e profissional.

Agradeço ao professor Alexandre Pistóia, pela companhia nas quintas-feiras de estágio e pelo aprendizado que tive com ele.

Agradeço a minha orientadora pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço a equipe de colegas da UFRGS e em especial a colega Ana Carolina Peliccioli.

Agradeço a professora Paula Luce Boherer, que me mostrou o primeiro contato com a patologia.

Agradeço a CAPES, pelo apoio ao trabalho.

E por fim, agradeço aqueles que talvez possa ter esquecido aqui, mas saibam que isso é apenas um agradecimento formal, o real agradecimento, o verdadeiro agradecimento, está dentro do meu coração e não em um simples papel.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO CLÍNICA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL EM HAMSTERS

AUTORA: THIENI KAEFER

ORIENTADORA: MANOELA DOMINGUES MARTINS

Local da Defesa e Data: Santa Maria, 29 de agosto de 2012.

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de diferentes protocolos de laser de baixa potência (LBP) na mucosite bucal induzida por 5-fluouracil (5-FU) em hamsters.

Introdução: A mucosite bucal é uma complicação comum da terapia antineoplásica. O desenvolvimento de intervenções efetivas para sua prevenção e tratamento é visto como prioridade nos cuidados de suporte ao paciente oncológico.

Metodologia: Foram utilizados 96 hamsters divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle (sem tratamento), Preventivo (laser do Dia -7 ao Dia +5); Terapêutico (laser do Dia +5 ao Dia +15) e Conjugado (laser do Dia -7 ao Dia +15). Os animais receberam injeção intraperitoneal de 5-FU nos dias 0 e 2 e escarificação da mucosa jugal nos dias 3 e 4. A irradiação foi realizada com LBP de diodo (InGaAlP), 660 nm, 40 mW de potência, 6,0 J/cm² por 6 segundos/ponto. Nos dias 0, 5, 10 e 15 foram sacrificados seis animais de cada grupo, pesados e a mucosa jugal foi analisada clinicamente. Foi realizada análise estatística para a interação tempo x tratamento através do programa SPSS Statistics 18.0[®]. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Equações de Estimação Generalizada e ajustado pelo teste de Bonferroni.

Resultados: Houve significativa perda de peso dos animais do grupo controle no dia 10 do experimento. Os tratamentos com laser tanto na forma preventiva, terapêutica e conjugada exibiram redução dos escores de mucosite de forma estatisticamente significante quando comparados ao grupo controle. Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre escores de mucosites nos grupos que receberam tratamento laser.

Conclusão: O laser de baixa intensidade, independente do protocolo utilizado, é eficaz na redução clínica da mucosite bucal induzida por 5-FU em hamsters.

Palavras-chave: Laserterapia, quimioterapia, efeito adverso, mucosa bucal.

ABSTRACT

Master Course Degree
Post Graduate Program in Dental Science
Federal University of Santa Maria

CLINICAL ASSESMENT OF DIFERENT OF LOW LEVEL LASER PROTOCOLS IN INDUCED-ORAL MUCOSITIS BY 5-FLUOURACIL IN HAMSTER

AUTHOR: Thieni Kaefer

ADVISER: MANOELA DOMINGUES MARTINS

Defense Place and Date: Santa Maria, Agust 30th, 2012.

Aims: The purpose of this study was to investigate the effects of different of low level laser (LLL) protocols on induced-oral mucositis by 5-fluoracil (5-FU) in hamsters.

Introduction: The oral mucositis is a ordinary side effect from antineoplastic therapy. Development of effective interventions to its prevention and treatment are priory on caring of the oncology patients.

Metodologia: In the present study 96 hamsters were used and randomly allocated into 4 groups: Control (without treatment), Preventive (laser from day -5 to day +5), Therapeutic (laser from day +5 to day +15) and Combined (laser from day -5 to day +15). Mucositis was induced in hamsters by intraperitoneal injection of 5- fluorouracil (5-FU) at days 0 and 2 and superficial scratching in cheek pouch mucosa. The irradiation was carried out using diode LLL, 660 nm, 40mW of power, 6,0J/cm² during 6seconds/point. At days 0, 5, 10 and 15, six animals from each group were sacrificed, weighted and the cheek pouch mucosa was clinically analyzed. Statistical analysis was made considering the time x treatment interaction through the SPSS Statistics 18.0[®] software. The multiple comparison was made by the Generalized Estimation Equation test and adjusted by the Bonferroni test.

Results: The animals from the Control group had significant lose of weight at the 10th day of the experiment. The laser treatment at preventive, therapeutic and combined form presented mucosits scratching reduction in comparison to the control group. However there was no statistic difference between the mucositis scores at the groups that received treatment.

Conclusion: The low level laser, independent of the used protocol, is efficient to clinical reducing oral-induced mucositis by 5-FU in hamsters.

Key words: Laser therapy, chemotherapy, side effect, oral mucosa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	09
ARTIGO* DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA RESULTAM EM MELHORA CLÍNICA DA MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL EM HAMSTERS	14
Resumo	15
Introdução	17
Materiais e Métodos	18
Delineamento.....	18
Cálculo amostral e amostra.....	19
Parte Experimental.....	19
Protocolo da Terapia com Laser.....	20
Observação e determinação.....	20
Análise Estatística.....	21
Resultados	21
Análise do Peso.....	21
Aspectos Clínicos.....	22
Discussões	24
Conclusão	27
Figuras	28
Tabelas	31
Referências Bibliográficas	33
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	
Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	39
Anexo B – Normas para publicação na Revista Laser in Medical Science	40

*Formatado baseado nas normas da Laser in Medical Science

INTRODUÇÃO

A mucosite bucal é um importante efeito colateral da terapia antineoplásica, incluindo a radioterapia em cabeça e pescoço e a quimioterapia. As lesões podem causar dor, restringir a alimentação, serem sítios agravadores de infecção secundária, aumentar o custo do tratamento e tempo de hospitalização do paciente, interferir no curso do tratamento antineoplásico e, conseqüentemente, a sobrevida do paciente (LABBATE et al., 2003; NEVILLE et al., 2009; SONIS, 1998; SONIS et al., 2001).

A classificação clínica da severidade da mucosite mais utilizada é a estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que considera critérios objetivos e subjetivos, envolvendo o estado físico e nutricional do paciente, assim como o aspecto clínico da boca (PARULEKAR et al., 1998). De acordo com esta classificação a mucosite varia de grau 0 a 4 como descrito a seguir: 0- ausência de alterações na mucosa; 1- eritema; 2- eritema e ulceração (o paciente consegue engolir sólidos); 3- ulceração (o paciente pode apenas ingerir líquidos) e 4- não é possível se alimentar pela boca. Clinicamente, na sua forma mais branda, a mucosite se manifesta com áreas eritematosas e a mucosa parece estar intacta, o paciente sente uma leve sensação de ardência ao se alimentar e neste estágio os sintomas são facilmente controláveis. Os pacientes com mucosite em grau mais avançado passam a desenvolver úlceras que penetram completamente na submucosa, causando dor, necessitando do uso de analgesia com narcóticos (SONIS, 2004). Conforme o grau, a mucosite pode levar à modificação do tratamento anti-neoplásico ou até mesmo a necessidade da sua interrupção, promovendo assim, uma redução da qualidade de vida e/ou a sobrevida do paciente (SONIS, 2004; ELTING *et al.*, 2003)

SONIS (1998) e SONIS (2004) foram os primeiros a estudar a patobiologia da mucosite, no primeiro trabalho SONIS (1998) classificou a mucosite em quatro fases: inflamatória/vascular, epitelial, ulcerativa/microbiológica e cicatrizadora, já no segundo trabalho SONIS (2004) descreveu a mucosite cinco fases, que são: iniciação, resposta ao dano primário, fase de amplificação, fase de ulceração e por fim, cura. Nesta classificação os autores levam em consideração o papel dos radicais livres, endotélio e mesênquima na patobiologia desta doença que não anteriormente relatados.

A fase de iniciação ocorre logo após a administração da quimioterapia ou radioterapia. Estes tratamentos antineoplásicos agem no DNA das células da camada basal do epitélio e alteram seu funcionamento normal. Ao mesmo tempo aparecem os radicais livres derivados do oxigênio (EROs), desencadeando o processo de desenvolvimento da mucosite, através de diminuição da renovação celular, alteração no epitélio e nos vasos sanguíneos. Clinicamente a mucosa apresenta-se normal. (SONIS, 2004). Na fase de resposta ao dano primário ocorre a ativação dos fatores de transcrição (NF- κ B) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), estes estimulam enzimas que produzem a apoptose e acabam por bloquear o mecanismo de crescimento e diferenciação celular. O dano gerado ao tecido conjuntivo e ao endotélio reduz a oxigenação epitelial resultando na morte de células epiteliais. Clinicamente, o paciente pode apresentar quadros de ardência na mucosa (SONIS, 2004). Na fase de amplificação de sinal ocorre a ativação de fatores de transcrição que guiam a regulação ascendente dos genes e modulam a resposta ao dano. Inicia então a produção de citocinas pró-inflamatórias, essas causam agressões adicionais ao tecido e geram um *feedback* positivo das citocinas inflamatórias que amplifica o dano iniciado pela radiação ou agente quimioterápico. Clinicamente podem ser visualizado eritema, úlcera e dor (SONIS, 2004). A fase ulcerativa da mucosite é bastante significativa do ponto de vista clínico. A perda da integridade da mucosa resulta em lesões dolorosas e propensas a colonização bacteriana superficial. No caso de pacientes neutropênicos, a ruptura da mucosa serve como porta de entrada para numerosos microorganismos da cavidade bucal e que muitas vezes podem levar a bacteremia e sepse. Além disso, com a penetração das bactérias na submucosa, ocorre ativação de intenso infiltrado inflamatório, composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos, que por sua vez potencializa a lesão tecidual. Clinicamente a lesão ulcerada é dolorosa e pode estar coberta por fibrina ou um exudato que é conhecido como “pseudomembrana esbranquiçada” (SONIS, 2004). A fase de cura na maioria dos casos ocorre de forma espontânea e cerca de 2 a 3 semanas após o término da radioterapia ou por três semanas após administração de quimioterapia. (SONIS, 2004).

Na mucosite induzida pela radioterapia observam-se os primeiros sintomas logo na terceira ou quarta semana, quando as doses atingem 200 cGy. As lesões de mucosite, quando ligadas à radioterapia tendem a surgir voltadas para o local onde o feixe de radiação é recebido, essas lesões permanecem no decorrer do tratamento e

cicatrizam após a conclusão completa do tratamento radioterápico. Na quimioterapia, observam-se os primeiros sintomas entre 5 e 10 dias, sendo o décimo dia o pico da mucosite e logo em seguida inicia o processo de cicatrização, que dente a estar completo entre o 14° e 21° dia após o início do tratamento. Quando a mucosite está associada à quimioterapia as superfícies orais envolvidas são as não-ceratinizadas (mucosa jugal, palato mole, assoalho bucal e superfície ventro-lateral da língua). (NEVILLE et al. 2004; NEVILLE et al. 2009).

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 protocolos 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: antimicrobianos 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 luz laser (KEEFE et al., 2006; ANTUNES et al., 2007; KEEFE et al., 2007; SHUBERT et al., 2007; EDUARDO et al., 2009; KHOURI et al., 2009; LOPES et al., 2010; ZANIN et al., 2010; CHOR et al., 2010).

A terapia utilizando laser de baixa potência (LBP) tem sido amplamente utilizada em vários processos patológicos, dentre os quais a cicatrização de feridas e condições inflamatórias. Basicamente, a fototerapia trata-se de um tratamento alternativo, não invasivo e auxiliar na aceleração de processos cicatriciais, modulação celular e analgesia. Estes efeitos podem estar relacionados com a ação do laser aumentando o metabolismo celular, o potencial regenerativo dos tecidos, a neovascularização e a formação de tecido cicatricial (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004, CRIVELLO 2010; KARU et al. 1989).

A terapia com este tipo de laser, o de baixa potência, é baseada na utilização de irradiações de luzes capazes de influenciar no comportamento celular, a luz é absorvida por moléculas do tecido alvo (cromóforos ou fotoreceptores) que possuam afinidade por determinado comprimento de onda. A absorção de luz da energia luminosa ocorre em nível atômico, os elétrons captam a energia luminosa e partem para um estado excitado de energia, esta energia é utilizada pelas células nas suas funções metabólicas e a energia luminosa é transformada em outro tipo de energia, a qual a célula é capaz de reconhecer e responder (KARU 1987; CRIVELLO 2010).

Após as reações primárias, de fotorrecepção, é desencadeada uma cascata de reações secundárias que ocorrem na ausência de luz, amplificando as reações primárias. Existem diversas teorias, que não estão completamente elucidadas, para explicar essas reações na ausência de luz (CRIVELLO 2010). Entre essas teorias está a Teoria de Karu 1987, que utiliza a cadeia respiratória, a nível mitocondrial, para explicar essas reações secundárias. Segundo KARU 1987, após a absorção de luz do laser de baixa potência pelos componentes celulares da cadeia respiratória nas mitocôndrias, ocorrem diversas reações bioquímicas em toda célula que traduzem o estímulo sofrido e sinalizam ao núcleo, propiciando a resposta biológica (KARU 1997, CRIVELLO 2010).

Os lasers de baixa intensidade são ou baixa potência são utilizados para laserterapia, ao contrário dos de alta intensidade, que são usados com finalidade de corte ou cirúrgica. Os lasers de baixa potência mais utilizados são os de Hélio-Neônio e o laser de Diodo, que emitem luz na faixa do visível (vermelho) e na faixa do infravermelho, respectivamente. A onda emitida na faixa do vermelho apresenta um comprimento entre 630 e 690 nm, e o infravermelho está situado na faixa de 760 e 850 nm, sendo o mais utilizado o de 830 nm (ALMEIDA-LOPES 2012, CRIVELLO 2010). O laser vermelho apresenta finalidade de reparação de tecidos mais superficiais, pois seu comprimento de onda não permite uma permeabilidade da luz nos tecidos profundos. Já o laser infravermelho é utilizado quando há a necessidade de influenciar tecidos mais profundos, ou quando se espera efeito analgésico (CRIVELLO 2010).

Pesquisadores têm realizado estudos para avaliar os efeitos do LBP, isoladamente ou em combinação com outras terapêuticas para tratamento e prevenção da mucosite bucal. Resultados apresentam não somente a diminuição da intensidade da dor, como a diminuição da severidade da mucosite, sem apresentar efeitos colaterais (ANTUNES et al., 2007; ARUN MAIYA et al., 2006; BARASCH et al., 1995; BENSADOUN et al., 1999; COWEN et al., 1997; CRUZ et al., 2007; JAGUAR et al., 2007; MIGLIORATI et al., 2001; SANDOVAL et al., 2003; SCHUBERT et al., 2007; EDUARDO et al., 2009; KHOURI et al., 2009; ZANIN et al., 2010; CHOR et al., 2010). Em junho de 2011, foi publicado um estudo de Revisão Sistemática em que BJORDAL et al. (2011) mostram a validade do Laser de Baixa Potência, aplicado com doses de 1 a 6 J por ponto, mostrando que o LBP foi

estatisticamente eficaz na prevenção da mucosite bucal, promovendo redução da severidade, dor e tempo de duração das lesões.

ARTIGO – DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA RESULTAM EM MELHORA CLÍNICA DA MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-FLUOURACIL EM HAMSTERS.

Este artigo será submetido para publicação na Revista Laser in Medical Science, ISSN- 0268-8921.

Fator de impacto 2.004 (2011)

Qualis Capes A2 (2012)

**DIFERENTES PROTOCOLOS DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA
RESULTAM EM MELHORA CLÍNICA DA MUCOSITE BUCAL INDUZIDA POR 5-
FLUOURACIL EM HAMSTERS**

Thieni Kaefer¹

Ana Carolina Amorim Pellicoli²

Marina Curra³

Marco Antonio Trevizani Martins⁴

Manoel Sant' Ana Filho⁵

Isabel da Silva Lauxen⁶

Manoela Domingues Martins⁷

1- Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: thieni_kaefer@hotmail.com. Fone: +5555 9634- 9013

2- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: anacarolinapellicoli@yahoo.com.br. Fone: +5551 33085011

3- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: marinacurra@yahoo.com.br Fone: +5551 33085011

4- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:kekomartins@yahoo.com.br Fone: +5551 33085011

5- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:Manoel@ufrgs.br Fone: +5551 33085011

6- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: isabel.lauxen@ufrgs.br Fone: +5551 33085011

7- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Bucal, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:manomartins@gmail.com Fone: +5551 33085011

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de diferentes protocolos de laser de baixa potência (LBP) na mucosite bucal induzida por 5-fluouracil (5-FU) em hamsters. Foram utilizados 96 hamsters divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle (sem tratamento), Preventivo (laser do Dia -5 ao Dia +5); Terapêutico (laser do Dia +5 ao Dia +15) e Conjugado (laser do Dia -5 ao Dia +15). Os animais receberam injeção intraperitoneal de 5-FU nos dias 0 e 2 e escarificação da mucosa jugal nos dias 3 e 4. A irradiação foi realizada com LBP de diodo (InGaAlP), 660 nm, 40 mW de potência, 6,0 J/cm² por 6 segundos/ponto. Nos dias 0, 5, 10 e 15 foram sacrificados seis animais de cada grupo, pesados e a mucosa jugal foi analisada clinicamente. Foi realizada análise estatística para a interação tempo x tratamento através do programa SPSS Statistics 18.0[®]. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Equações de Estimação Generalizada e ajustado pelo teste de Bonferroni. Houve significativa perda de peso dos animais do grupo controle no dia 10 do experimento. Os tratamentos com laser tanto na forma preventiva, terapêutica como conjugada exibiram redução dos escores de mucosite de forma estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle. Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre escores de mucosites nos grupos que receberam tratamento. O laser de baixa intensidade, independente do protocolo utilizado, é eficaz na redução clínica da mucosite bucal induzida por 5-FU em hamsters.

Palavras-chave: Laserterapia, quimioterapia, efeito adverso, mucosa bucal.

INTRODUÇÃO

A mucosite bucal é uma inflamação da mucosa bucal decorrente da terapia antineoplásica, como a quimioterapia e a radioterapia em cabeça e pescoço [1, 2]. As lesões causam um grande impacto na qualidade de vida do paciente, geralmente vêm acompanhadas de dor acentuada, podem restringir a alimentação, serem sítios agravadores de infecções secundárias, aumentar o tempo de hospitalização e o custo do tratamento, interferindo assim, no curso do tratamento antineoplásico e, conseqüentemente, na sobrevida do paciente [2-6]

Clinicamente, a mucosite pode ser classificada de acordo com a severidade, em graus que variam de 0 a 4 [7]. Na sua forma mais branda, a mucosite se manifesta com áreas eritematosas e a mucosa parece estar intacta, o paciente sente uma leve sensação de ardência ao se alimentar, mas neste estágio os sintomas são facilmente controláveis. A mucosite em grau mais avançado ocasiona o desenvolvimento de úlceras que penetram completamente na submucosa, causando dor, impedindo a deglutição por via oral, necessitando do uso de analgesia com narcóticos e algumas vezes suspensão do tratamento oncológico [8].

A patobiologia da mucosite foi descrita por Sonis (2007) [9] em cinco fases denominadas: iniciação, resposta ao dano primário, fase de amplificação, fase de ulceração e a fase de cura. As duas fases iniciais representam alterações celulares e teciduais subclínicas associadas à liberação de mediadores químicos inflamatórios. Evidências morfológicas mostram um dano subepitelial e apoptose de fibroblastos e de células endoteliais da microvasculatura antes da morte epitelial. A seguir, ocorre o dano tecidual que pode ser verificado clinicamente como eritema, descamação e/ou ulcerações. O conhecimento de que as alterações na mucosite ocorrem inicialmente na submucosa e posteriormente no epitélio são fundamentais para estabelecer estratégias de prevenção e tratamento desta doença.

Inúmeros tratamentos vêm sendo testados para prevenir e tratar a mucosite, a maioria deles agindo de forma paliativa. Worthington et al. (2011) [10] realizaram uma revisão sistemática sobre intervenções terapêuticas para mucosite bucal. Dentre os 33 tipos de tratamentos encontrados 10 mostraram algum efeito na prevenção ou redução da severidade da mucosite, dentre estes: aloe vera, amifostina, crioterapia, fator estimulador de colônia (G-CSF), a glutamina intravenosa, mel, fator de crescimento de queratinócitos, laser, antibiótico (polimixina/tobramicina/anfotericina) e sulcrafato.

A fototerapia com laser de baixa potência (LBP) vem sendo utilizada como tratamento alternativo, não invasivo e auxiliar na aceleração de processos cicatriciais, modulação celular e analgesia [11-13]. Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar os efeitos do LBP no tratamento e prevenção da mucosite bucal. Resultados apresentam não somente a diminuição da intensidade da dor, como a diminuição da severidade da mucosite, sem apresentar efeitos colaterais [14-27]. Bjordal et al. (2011) [28], realizaram uma revisão sistemática com metanálise e mostraram que o LBP em doses de 1 a 6 J por ponto, foram estatisticamente eficazes na prevenção da mucosite bucal, com reduções da severidade, dor e tempo de duração das úlceras.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito clínico de três diferentes protocolos de LBP na prevenção e /ou tratamento da mucosite bucal induzida por 5-fluouracil (5-Fu).

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento

O estudo presente é um ensaio experimental em animais, controlado, cego e randomizado.

O Projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) sob número 110134.

O protocolo experimental utilizado neste estudo seguiu os princípios de ética e experimentação animal, baseado na lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e nas indicações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base nas normas internacionais, que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal.

O estudo foi realizado na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), na cidade de Porto Alegre-RS, Brasil, entre o período de junho de 2011 e abril de 2012.

Cálculo amostral e amostra

O cálculo amostral foi baseado em trabalhos da literatura que utilizam metodologia semelhante [29-31].

Foram utilizados 96 hamster sírios dourados (*Golden Syrian Hamsters*), machos, com 8 semanas de vida e massa corpórea aproximadamente de 150g. Os animais tiveram origem do Biotério da Universidade Federal de Pelotas-RS, Brasil e depois passaram por quarentena, na UEA. Após ficarem isolados por 7 dias (quarentena), foram separados aleatoriamente e alojados em número de quatro em cada caixa plástica (40x30x16 cm), com ração padrão da UEA e água *ad libitum*, temperatura de 20 à 24°C, ciclo claro/escuro de 12 horas.

Parte Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 24 animais em cada um dos grupos:

Grupo Controle (sem tratamento, porém com o procedimento anestésico e manipulação semelhante ao dos demais grupos);

Grupo Preventivo (laser do Dia -7 ao Dia +5);

Grupo Terapêutico (laser do Dia +5 ao Dia +15);

Grupo Conjugado (Preventivo + Terapêutico) -(laser do Dia -7 ao Dia +15).

Seis animais de cada grupo foram eutanizados através de câmara de CO₂ nos seguintes tempos: dia 0, dia 5, dia 10 e dia 15, a eutanásia foi necessária para serem coletados espécimes da mucosa bucal dos animais, pois haverá um estudo de seguimento deste trabalho.

O protocolo de indução de mucosite a ser utilizado foi desenvolvido por Sonis *et al.* (1990) [5] e modificado por Leitão *et al.* (2007) [32]. Para a indução da mucosite, no dia 0 foram aplicadas 60mg/Kg em cada animal de quimioterápico 5-FU via intraperitoneal e 40mg/Kg no dia 2. O quimioterápico foi preparado pelos profissionais da farmácia oncológica do HCPA em seringas individualizadas de acordo com peso de cada animal. Nos dias 3 e 4 os animais, sedados com gás isoflurano, passaram pelo procedimento de escarificação da mucosa jugal direita com a ponta de uma agulha estéril por duas vezes seguidas, pelo mesmo operador. A escarificação foi feita com o objetivo de romper a integridade da mucosa, pois a mucosa bucal destes animais apresenta maior ceratinização em relação à mucosa

jugal dos seres humanos, esta manobra visa permitir o desenvolvimento da mucosite nos hamsters.

Protocolo da Terapia com Laser

A irradiação com laser foi realizada com laser de diodo, InGaAlP (660 nm), equipamento foi utilizado é o Laser (MM Optics, São Carlos, SP) pertencente a UEA do HCPA, que gera um feixe de 660nm de comprimento de onda e a potência utilizada foi de 40 mW, 6,0 J/cm² de densidade de energia, durante 6 segundos.

Pelo método da técnica pontual, no modo contínuo e em contato, era feito uma aplicação diária na mucosa jugal conforme demonstrado na Figura 1, durante os dias estabelecidos nos grupos experimentais, os animais que receberam a laserterapia estavam sedados com gás isoflurano. Um diagrama ilustrado da metodologia experimental pode ser observado na Figura 2.

O profissional que realizou aplicação do laser fez uso dos óculos de proteção disponibilizados pelo fabricante de acordo com o comprimento de onda emitido pelo aparelho e os envolvidos na manipulação dos ratos fizeram uso do EPI (Equipamento de Proteção Individual).

Observação e determinação

Os animais foram monitorados diariamente para observação de seu estado físico.

Nos dias 0, 5, 10 e 15 foi realizada verificação do peso dos animais e avaliação da graduação clínica de mucosite. A análise clínica foi realizada de forma cega, por meio de análise das fotografias por um avaliador previamente treinado e que desconhecia o grupo experimental ao qual o animal em análise pertencia. A câmera fotográfica digital utilizada foi uma câmera digital (Sony Cyber-shot, 14.1MP-DSC-W610), as imagens foram realizadas no modo macro e sem flash. Todas as fotografias foram analisadas no mesmo computador para que não houvesse variação de contraste. O escore clínico de mucosite para cada animal foi feito de acordo com os critérios descritos por Lima *et al.* (2005) [33]. Esta classificação considera os aspectos inflamatórios como eritema, hiperemia, áreas de hemorragia, ulceração epitelial, presença de abscesso conforme descrito abaixo:

Score 0: mucosa com ausência ou discreto eritema e hiperemia, sem áreas de hemorragia, ulceração ou abscesso.

Escore 1: mucosa com moderado eritema e hiperemia, sem áreas hemorrágicas, ulcerações e/ou abscessos.

Escore 2: mucosa com severo eritema e hiperemia, presença de áreas hemorrágicas, pequenas ulcerações, mas não abscesso.

Escore 3: mucosa com severo eritema e hiperemia, presença de áreas hemorrágicas, extensas úlceras e/ou abscesso.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de médias, desvio padrão da média e intervalo de confiança de 95%. Foi realizada análise estatística para a interação tempo x tratamento através do programa SPSS Statistics 18.0. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Equações de Estimação Generalizada e ajustado pelo teste de Bonferroni. . O nível de significância foi de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Análise do Peso

Os resultados da média de peso dos quatro grupos experimentais nos diferentes tempos estão demonstrados na Figura 3.

A média de peso dos animais do grupo controle no dia 0 foi de $160,50g \pm 25,02$ e não diferiu da média de peso dos animais do dia 5 que foi de $160g \pm 24,47$. No dia 10 a média de peso foi de $92g \pm 10,31$ mostrando uma perda significativa de peso ($p < 0,05$). No dia 15 a média de peso foi de $136,6g \pm 13,52$ mostrando um ganho estatisticamente significativo quando comparado ao dia 10 ($p < 0,05$). A análise comparativa entre o peso dos animais entre os dias mostrou que entre os dias 0 e 5, 0 e 15, 5 e 15 não houve diferença significativa entre os pesos dos animais (Figura 3).

Os animais do grupo preventivo iniciaram no dia 0 com uma média de peso de $134g \pm 7,58$ e mostraram média de peso de $125,6g \pm 11,41$ aos 5 dias denotando uma pequena perda de peso. Posteriormente, na análise do dia 10 e dia 15, foram observadas médias de peso de $130,33g \pm 14,16$ e $120,2g \pm 15,40$, respectivamente. A análise estatística revelou que não houve diferença na média de peso dos animais do grupo preventivo entre nenhum dos tempos experimentais (Figura 3).

No grupo terapêutico, dia 0 os animais exibiram uma média de peso de $132g \pm 21,98$ seguido de uma média de peso de $127,2g \pm 17,54$ no dia 5, $113g \pm 6,44$ no dia 10 e $120,2g \pm 15,40$ no dia 15. A análise comparativa entre os pesos nos diferentes dias do grupo terapêutico não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

Os animais do grupo conjugado mostraram no dia 0 uma média de peso de $122,16g \pm 15,06$ seguido de $122,33g \pm 17,91$ no dia 5, $112g \pm 8,68$ no dia 10 e $114g \pm 10,20$ no dia 15. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na média de peso dos animais entre os tempos analisados neste grupo (Figura 3).

Aspectos Clínicos

Na Figura 4 e Tabela 1 estão demonstrados os resultados dos escores clínicos da análise cega em cada grupo ao longo dos tempos experimentais.

A análise clínica realizada pelo avaliador cego mostrou que os animais do grupo controle no dia 0 mostraram média de escore de 0 ± 0 , portanto, não apresentavam lesão clinicamente detectável. No dia 5, houve aumento significativo da média de escore observado nos animais do grupo controle que foi de 2 ± 0 demonstrando a presença de severo eritema e hiperemia, presença de áreas hemorrágicas e/ou pequenas ulcerações. No dia 10 os animais exibiram média de escore clínico de $2,8 \pm 0,44$ demonstrando um agravamento significativo no quadro clínico, quando comparado ao dia 5 ($p < 0,01$), com o surgimento de mucosite em grau máximo com mucosa exibindo severo eritema e hiperemia, presença de áreas hemorrágicas, extensas úlceras e/ou abscesso. No dia 15 foi observada uma média de escore de $0,8 \pm 0,4$ o que representou uma melhora significativa quando comparado aos 10 dias ($p < 0,01$). A análise comparativa entre os tempos no grupo controle mostrou diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos experimentais (Tabela 1 e Tabela 2).

Os animais do grupo preventivo não mostraram lesão bucal no dia 0 tendo em vista que a média de escore foi de 0 ± 0 . No dia 5 foi observado um agravamento significativo das lesões bucais com média de escore de 2 ± 0 ($p \geq 0,037$). O dia 5 foi o pico máximo de mucosite observada neste grupo. Isto porque, aos 10 dias a média de escore clínico reduziu de forma significativa para $0,6 \pm 0,54$ ($p < 0,01$) demonstrando a redução da severidade da mucosite. Aos 15 dias, clinicamente vários animais mostravam reparo das lesões de mucosite visto que a média de

escore clínico foi de $0,2 \pm 0,44$, porém esta diferença não foi significativa em relação aos escores do dia 10 ($p > 0,01$) (Tabela 1 e Tabela 2).

A análise clínica do grupo terapêutico mostrou que no dia 0 a média de escore foi de 0 ± 0 . Aos 5 dias houve aumento significativo das lesões ($p < 0,01$) que exibiram escore de $1,7 \pm 0,51$. No dia 10, houve uma redução significativa da severidade da mucosite quando comparado ao dia 5 ($p < 0,01$) sendo observado um valor de escore clínico de $1,4 \pm 0,89$. Aos 15 dias os animais deste grupo mostraram redução das lesões, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 10 ($p > 0,05$) e mostraram média de escore de $0,4 \pm 0,89$. Neste grupo o pico máximo de severidade de mucosite também foi observado aos 5 dias e logo após houve redução gradual da severidade clínica das lesões (Tabela 1 e Tabela 2).

O grupo que recebeu o tratamento conjugado mostrou no dia 0 média de escore de 0 ± 0 não demonstrando clinicamente a presença de lesões bucais. Aos 5 dias foi observado aumento significativo no escore clínico que passou a ser 2 ± 0 ($p < 0,01$). A seguir notou-se leve redução nos níveis de mucosite aos 10 dias, observado pela média de $1,5 \pm 0,83$, sem diferença estatisticamente significativa quando comparado ao dia 5 ($p > 0,05$). Aos 15 dias foi observada melhora clínica significativa das lesões cuja média de escore foi de $0,2 \pm 0,44$ ($p < 0,01$). Neste grupo o pico máximo de mucosite variou entre os dias 5 e 10 e posteriormente houve redução das lesões (Tabela 1 e Tabela 2).

A análise comparativa entre os grupo fixando os tempos mostrou que todos os grupos experimentais começaram a exibir lesão a partir do dia 5, porém o pico de severidade para o grupo controle foi aos 10 dias, enquanto que, para os grupos que receberam qualquer um dos protocolos de laserterapia foi aos 5 dias (Tabela 3). A principal diferença entre os grupos foi observada aos 10 dias onde clinicamente o grupo controle exibiu severos índices de mucosite enquanto que, os demais grupos apresentavam a mucosa em estágio de reparo tecidual, ou seja, baixos escores de mucosite (Figuras 4 e 5, Tabela 3).

No teste de comparação entre tratamentos pode-se observar na análise geral dos tempos experimentais que o grupo controle diferiu de todas as formas de tratamento com laser ($p < 0,01$), (Tabela 4). Porém, a análise entre os grupos que receberam a laserterapia não mostrou diferença entre as formas utilizadas ($p > 0,05$). A avaliação individual por tempo mostrou que nos dias 0 e 5 não houve diferença nos escores clínicos entre todos os grupos experimentais. No dia 10 foram

observados escores significativamente ($p < 0,01$) maiores de severidade de mucosite no grupo controle quando comparado com os grupos de laserterapia. No dia 15 o grupo controle não diferiu do grupo terapêutico e conjugado, assim como, entre os grupos que receberam a laserterapia. Porém, foi observada diferença significativa apenas entre o grupo controle e o grupo preventivo ($p < 0,01$) sendo que o último exibiu os menores escores clínicos (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A mucosite bucal é um importante efeito colateral e de grande incidência durante os tratamentos com quimio e/ou radioterapia. Devido ao fato da mucosite causar grande debilidade na qualidade de vida do paciente e interferir no curso do tratamento oncológico, vem se buscado diversas formas de minimizar esse efeito colateral. Uma das modalidades terapêuticas mais pesquisadas nos últimos anos é o LBP que tem mostrado efeitos positivos, especialmente na redução de dor e na prevenção das lesões.

No presente estudo pretendeu-se verificar o efeito clínico de três diferentes protocolos de laserterapia (preventivo, terapêutico e conjugado), num modelo experimental animal. Os resultados mostraram que independentemente do protocolo de laser aplicado houve diminuição da mucosite.

O modelo animal utilizado neste estudo seguiu o protocolo de indução de mucosite com 5-FU desenvolvido por Sonis et al. 1990 [5] e modificado por Leitão et al. 2007 [32]. Esse modelo de estudo possui grande importância, pois as terapias de laser, entre outros tratamentos para mucosite utilizadas até o presente momento, foram testadas em animais antes de serem aplicadas em seres humanos, permitindo a descoberta de novos e eficazes protocolos na tentativa de minimizar os sintomas da mucosite bucal [5, 32, 34-36].

O protocolo de LBP usada de forma preventiva utilizado no presente estudo foi delineado com base no trabalho de Bjordal et al (2011) [28] que realizou uma revisão sistemática com meta-análise do efeito do LBP na mucosite bucal e recomendou parâmetros para laserterapia nestas lesões. O protocolo de laserterapia sete dias antes do início do tratamento antineoplásico difere dos demais utilizados até o presente momento nos modelos animais. França et al. (2009) [34] utilizaram laser preventivo, entretanto, realizando aplicações de laser diárias de laser do dia 1, após a quimioterapia, até o dia 4.

Clinicamente pode-se observar que o grupo controle obteve um pico máximo de mucosite no dia 10 e, ao mesmo tempo, significativa perda de peso. Estes achados evidenciam que a indução da mucosite foi efetiva no modelo experimental, pois, como descrito por Sonis et al. (1990) [5] no dia 10 após o início da quimioterapia, tem-se um estágio de leucopenia avançada, ao mesmo tempo que percebe-se o rompimento da integridade da mucosa, possíveis infecções oportunistas e debilidade dos animais. Os grupos que receberam tratamento com laser mostraram maior escore clínico de mucosite no dia 5 e, não obtiveram o pico máximo usualmente esperado aos 10 dias. Paralelamente, esses animais também não apresentaram perda significativa de peso. Esses resultados mostram que o maior grau de alteração tecidual visível clinicamente nos grupos tratados com laser foi no dia 5, decorrente da escarificação da mucosa realizada nos dias 3 e 4 e não em função do desenvolvimento da mucosite, que deveria ocorrer em um pico máximo por volta do 10º dia. Portanto, podemos afirmar que os animais que receberam laserterapia não chegaram aos estágios mais severos de mucosite, diferentemente do grupo controle, que chegou ao pico máximo no dia 10 do experimento, aumentando a gravidade das lesões após a escarificação.

Apesar dos efeitos positivos no controle da gravidade das lesões da mucosite terem sido demonstrados em todos os grupos que receberam LBP, os grupos que iniciaram laserterapia sete dias antes da quimioterapia (grupo preventivo e grupo conjugado) mostraram menores escores clínicos no dia 15, último dia de avaliação, o que representa um reparo mais eficiente das lesões. Estudos clínicos em humanos [17, 23] e em modelos animais [34] tem demonstrado que o laser preventivo tem eficácia na redução da graduação e severidade da mucosite.

Os animais que receberam laserterapia não exibiram perda significativa de peso ao longo do experimento, já os animais do grupo controle tiveram significativa perda de peso, mostrando que a presença de lesões bucais ulcerativas pode gerar dor e desconforto, levando a dificuldade na ingestão de alimentos e alterando negativamente o *status* nutricional dos animais. Estes achados corroboram os de França et al. (2009) [34] que compararam laser preventivo vs. crioterapia e laser terapêutico vs. placebo utilizando modelo experimental semelhante ao utilizado neste estudo e que observaram menor perda de peso nos grupos tratados com laser.

A patobiologia da mucosite é descrita em cinco fases: iniciação, resposta ao dano primário, fase de amplificação, fase de ulceração e por fim, cura [8]. As primeiras fases dentre elas a de iniciação e de resposta ao dano são consideradas sub-clínicas, ou seja, modificações celulares e moleculares são desencadeadas pelo tratamento antineoplásico sem manifestação clínica. A amplificação da resposta tecidual resultará no surgimento clínico de alterações como eritema e ulcerações que tendem a repara após duas a três semanas [9]. Desta forma, medidas preventivas de mucosite são aquelas que agem nas fases iniciais fazendo com que haja redução do aparecimento clínico das lesões. Enquanto que, protocolos terapêuticos são aqueles instituídos uma vez que as lesões já estão presentes clinicamente e o conjugado conseqüentemente aborda ambas as formas previamente descritas.

O LBP vem sendo utilizado como opção terapêutica em doenças que possuam na sua fisiopatologia o desenvolvimento de um processo inflamatório/imunológico, como a mucosite. A terapia com LBP, utilizada para acelerar processos reparativos, está baseada em efeitos como morfodiferenciação, proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução do edema, maior regeneração celular, aumento da microcirculação local e permeabilidade vascular [37]. Entre estes efeitos, a angiogênese é desejada, pois um aporte sanguíneo mais eficiente permite a proliferação tecidual e contribui para que o processo de reparo ocorra de forma mais rápida e eficaz [38-40]. Além disso, o LBP está associado a modulação da inflamação, regulando os efeitos indesejados através da diminuição dos níveis teciduais citocinas pró-inflamatórias [41, 42]. Todos estes efeitos descritos acima podem justificar os resultados encontrados no presente estudo. A ação anti-inflamatória do LBP seria responsável pela diminuição da severidade clínica da mucosite em todos os protocolos. A maior cicatrização aos 15 dias, nos animais do grupo preventivo e do conjugado, mais uma vez evidencia a necessidade de utilizar a terapia laser nos estágios sub-clínicos do processo inflamatório.

Vários trabalhos vêm sendo realizados com intuito de compreender a ação do LBP por meio de diferentes protocolos na mucosite bucal. Estes têm mostrado efeitos positivos especialmente reduzindo dor e severidade das lesões [14, 17, 19, 23, 27] Entretanto, muitas diferenças podem ser observadas quando comparamos os diferentes trabalhos, em especial, na análise dos protocolos de laser. Alguns

estudos utilizam comprimento de onda de 660 nm [14] enquanto outros utilizam o laser de 780 nm [19], diferentes potências, tempo e forma de aplicação. Assim sendo, muitas vezes se torna difícil a comparação entre os diversos estudos e, para auxiliar na comparação dos estudos, tem sido sugerido que parâmetros ideais e padronizados de uso do laser devam ser adotados mundialmente.

Mais estudos *in vivo* com modelos animais devem ser realizados, para que não somente seja constatado o efeito benéfico do LBP no controle da mucosite bucal, mas também se consiga o entendimento desse processo, o que poderia ajudar a encontrar inclusive protocolos clínicos de prevenção da mucosite, que é o objetivo principal daqueles que lidam com esta complicação comum no tratamento do câncer e que muitas vezes pode ser determinante para a sobrevivência dos mesmos.

CONCLUSÃO

A fototerapia com laser em baixa intensidade com protocolo preventivo, terapêutico e conjugado mostrou efeitos positivos no controle clínico da mucosite bucal assim como, a forma preventiva esteve associada ao reparo acelerado das lesões.

Figura 1. Ilustração dos pontos de aplicação do Laser de Baixa Potência



Figura 2. Diagrama da metodologia aplicada neste estudo.

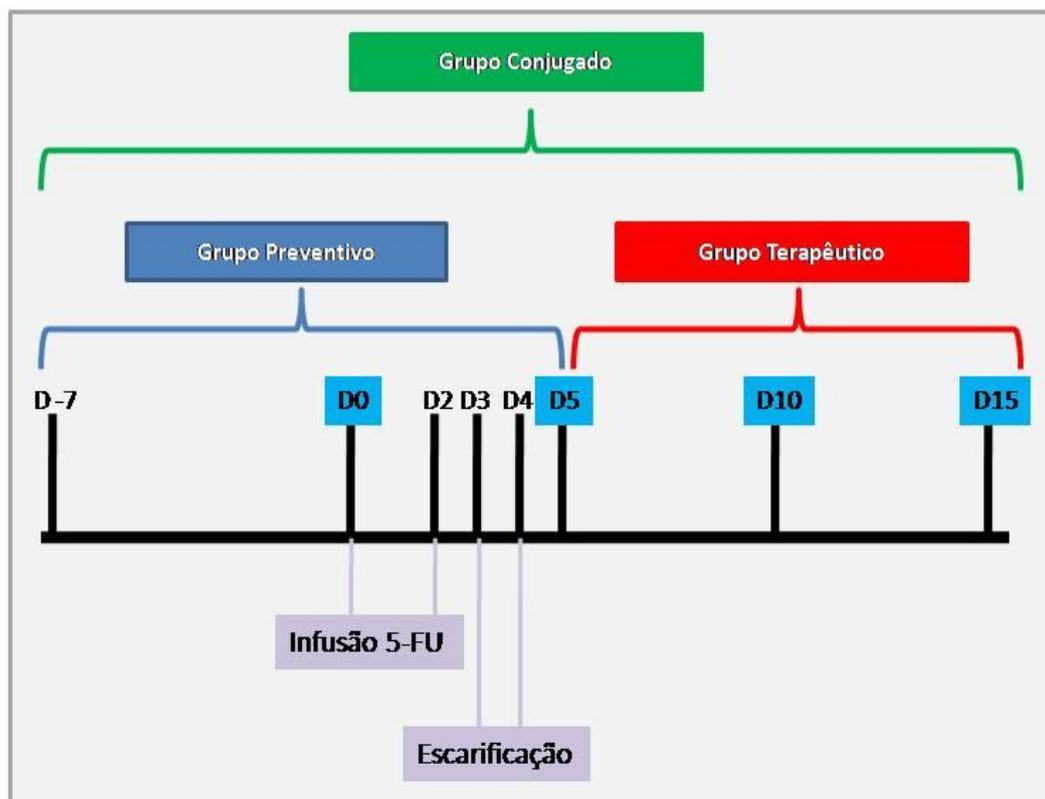


Figura 3: Média dos pesos dos animais por grupo ao longo dos tempos experimentais.

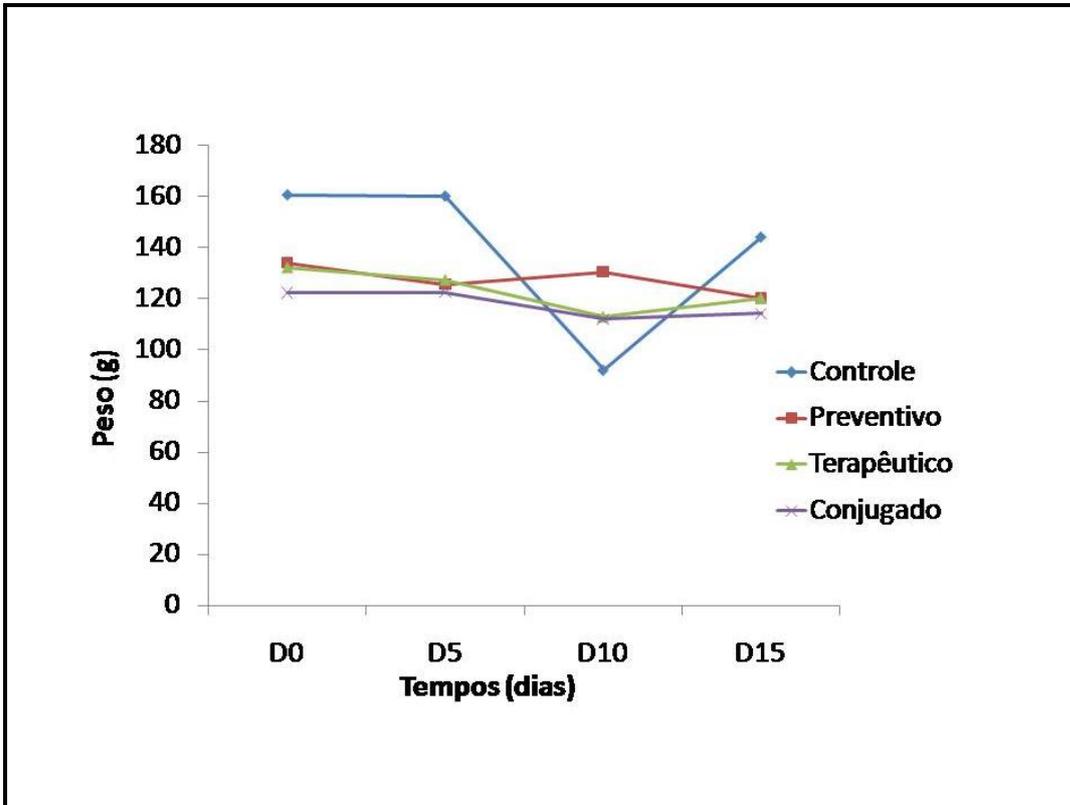


Figura 4: Graduação de mucosite nos quatro grupos experimentais ao longo do tempo.

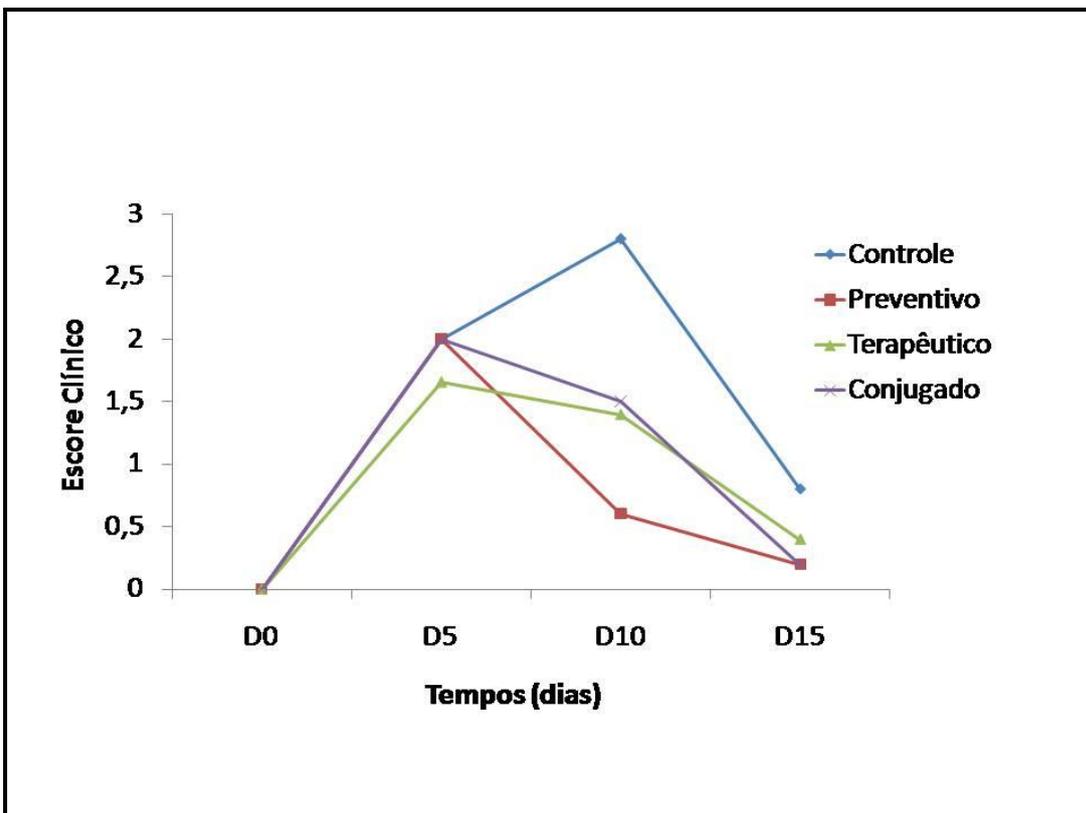


Figura 5. Aspecto clínico da mucosa jugal dos hamsters durante os períodos experimentais nos 4 grupos (controle, preventivo, terapêutico e conjugado).

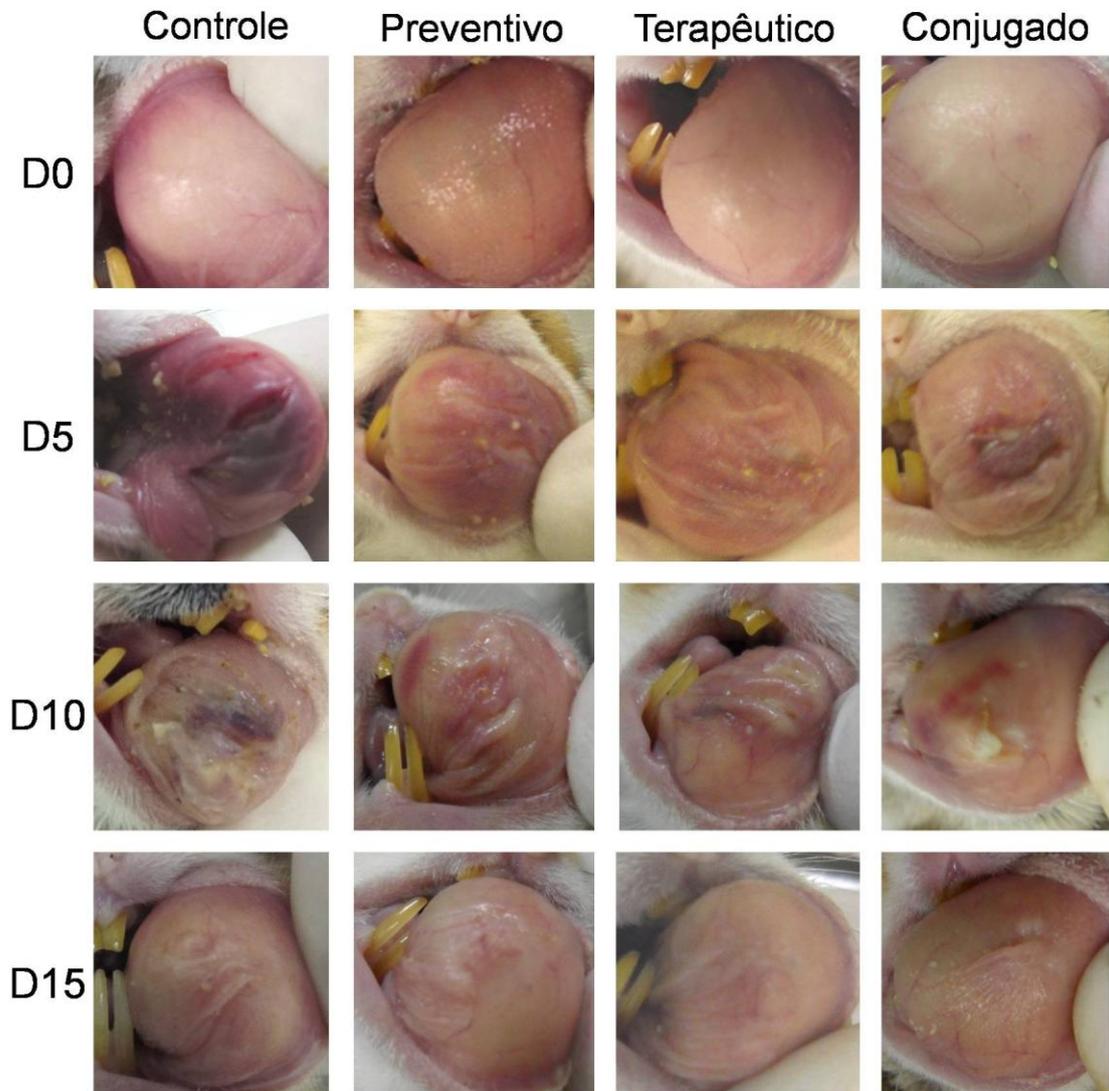


Tabela 1. Comparação entre os tempos experimentais dentro de cada grupo

	Grupos Experimentais				<i>p</i>
	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	
Controle	0,00 (0,00-0,00) ^a	2,00 (2,00-2,00) ^{bc}	2,80 (2,45-3,15) ^{bd}	0,83 (0,54-1,13) ^{be}	0,00
Preventivo	0,00 (0,00-0,00) ^{ae}	2,00 (2,00-2,00) ^{bc}	0,60 (0,17-1,03) ^{bde}	0,20 (-0,15-0,55) ^{abde}	≥0,037
Terapêutico	0,00 (0,00-0,00) ^{ae}	1,67 (1,29-2,04) ^{bcd}	1,40 (0,70-2,10) ^{bcde}	0,40 (-0,30-1,10) ^{abde}	≥0,011
Conjugado	0,00 (0,00-0,00) ^{ae}	2,00 (2,00-2,00) ^{bcd}	1,50 (0,89-2,11) ^{bcd}	0,20 (-0,15-0,55) ^{abe}	≥0,002

*** Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística dentro do grupo experimental.

Tabela 2. Comparação dos escores clínicos entre os tempos experimentais dentro de cada grupo.

		Tempos Experimentais	
		Média	(IC95%)
Controle	0	0,00	(0-0) ^a
	5	2,00	(2-2) ^b
	10	2,80	(2,45-3,15) ^c
	15	0,83	(0,54-1,13) ^d
Preventivo	0	0,00	(0-0) ^{†a}
	5	2,00	(2-2) ^{†b}
	10	0,60	(0,17-1,03) ^c
	15	0,20	(-0,15-0,55) ^{ac}
Terapêutico	0	0,00	(0-0) ^a
	5	1,67	(1,29-2,04) ^b
	10	1,40	(0,70-2,10) ^{bc}
	15	0,40	(-0,30-1,10) ^{ac}
Conjugado	0	0,00	(0-0) ^a
	5	2,00	(2-2) ^b
	10	1,50	(0,89-2,11) ^b
	15	0,20	(-0,15-0,55) ^a

* Não foi possível testar esta diferença devido a todos os valores serem constante em ambos os tempos.

*** Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Comparação dos escores clínicos entre os grupos fixando os tempos experimentais.

	Grupos Experimentais				<i>p</i>
	Controle	Preventivo	Terapêutico	Conjugado	
Dia 0	0,00 (0,00-0,00) ^A	0,00 (0,00-0,00) ^A	0,00 (0,00-0,00) ^A	0,00 (0,00-0,00) ^A	1,00
Dia 5	2,00 (2,00-2,00) ^A	2,00 (2,00-2,00) ^A	1,67 (1,29-2,04) ^A	2,00 (2,00-2,00) ^A	1,00
Dia 10	2,80 (2,45-3,15) ^A	0,60 (0,17-1,03) ^B	1,40 (0,70-2,10) ^B	1,50 (0,89-2,11) ^B	≥0,003
Dia 15	0,83 (0,54-1,13) ^A	0,20 (-0,15-0,55) ^B	0,40 (-0,30-1,10) ^{AB}	0,20 (-0,15-0,55) ^B	≥0,042

*** Diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

Tabela 4. Comparação dos escores clínicos entre os grupos ao longo do tempo experimental.

	N	Média	IC95%	<i>p</i>-valor
Controle	23	1,41 ^a	1,29-1,52	-
Preventivo	19	0,70 ^b	0,56-0,84	,000
Terapêutico	22	0,87 ^b	0,60-1,13	,001
Conjugado	21	0,93 ^b	0,75-1,10	,000

*** Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Neville B, Damm DD, Allen CM. (2009) Patologia Oral e Maxilofacia. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 296-297.
2. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Hayden V, et al. (2001) Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 19(8):2201-2205.
3. Fernández AH, Sánchez REO, Merino CC, Fuente FA, Fernando IH, García VV (2012) Influence of oral health on mucositis in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation (HPCT). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17(1):94-101.
4. Labbate R, Lehn CN, Denardin OVP (2003) Efeito da clorexidina na mucosite induzida por radioterapia em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorrinolaringo* 69(3):349-354.
5. Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D (1990) An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69:437-43.
6. Sonis ST (1998) Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncology* 34:39-43.
7. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC (1998) Scoring oral mucositis. *Oral Oncol* 34(1):63-71
8. Sonis ST (2004) Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 20:11-5.
9. Sonis ST (2007) Pathobiology of Oral Mucositis: Novel Insights and Opportunities *The Journal Of Supportive Oncology*. 5(9):3-11.
10. Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, Furness S, Glenny AM, Littlewood A, McCabe MG, Meyer S, Khalid T (2011) . Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. Apr 13;(4):CD000978
11. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guiduli-Neto J, Jaeger MMM (2001) Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184
12. Crivelo-Jr O (2010) Laser em Odontologia (II Fundamentos de Odontologia). 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 18-24.
13. Karu T (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56(5):691-704.
14. Antunes HS, de Azevedo AM, da Silva LFB, Adao CA, Pinheiro CT, Mayhe R, et al (2007) Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood* 109:2250-5.
15. Arun MG, Sagar MS, Fernandes D (2006) Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention and treatment of radiation induced mucositis in head and neck cancer patients. *Indian J Med Res* 124:399–402.
16. Barasch A, Peterson DE, Tanzer JM, D'Ambrosio JA, Nuki K, Schubert MM, et al. (1995) Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer*. 76:2550-6.
17. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al (1999) Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer* 7:244-52.

18. Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. (1997) 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* 38:697-703.
19. Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LG, Castro CGJr, Brunetto AL (2007) Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 48:435–440.
20. Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, Pinheiro MC, de Castro DOJr, da Cruz Perez DE, et al. (2007) Low energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis* 13:538–543.
21. Migliorati C, Massumoto C, Eduardo FP, Muller KP, Carrieri T, Haypec P, et al (2001) Low-energy laser therapy in oral mucositis. *J Oral Laser Appl* 1:97–101.
22. Sandoval RL, Koga DH, Buloto LS, Suzuki R, Dib LL (2003) Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with lowenergy *laser*: initial results of A. C. Camargo Hospital. *J Appl Oral Sci* 11: 337-341.
23. Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, et al. (2007) A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer* 15:1145-5.
24. Eduardo dePF, Bezinelli L, Luiz AC, Correa L, Vogel C, Eduardo dePC (2009) Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. *Photomed Laser Surg.* 27:137-44.
25. Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, Moraes DA, Pieroni F, Simões BP, et al (2009) Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. *Braz Dent J* 20:215-20.
26. Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, Castro PH, Pacheco MT, Zanin IC, et al. (2010) Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. *Photomed Laser Surg* 28:233-7.
27. Chor A, Torres SR, Maiolino A, Nucci M (2010) Low-power laser to prevent oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 84:178-9.
28. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RAB (2011) A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 19:1069–1077.
29. Lopes NN, Plapler H, Chavantes MC, Lalla RV, Yoshimura EM, Alves MT (2009) Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. *Support Care Cancer* 17:1409-15.
30. Murray LA, Kramer MS, Hesson DP, Watkins BA, Fey EG, Argentieri RL, et al. (2010) Serum amyloid P ameliorates radiation-induced oral mucositis and fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 5:3-11.
31. Watanabe S, Suemaru K, Yamaguchi T, Hidaka N, Sakanaka M, Araki H (2009) Effect of oral mucosal adhesive films containing ginsenoside Rb1 on 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *European Journal of Pharmacology* 15;616(1-3):281-6.
32. Leitao RF, Ribeiro RA, Bellaguarda EA, Macedo FD, Silva LR, Oria RB, et al. (2007) Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol* 59:603-12.

33. Lima V, Brito GA, Cunha FQ, Reboucas CG, Falcao BA, Augusto RF, Souza ML, Leitao BT, Ribeiro RA (2005) Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci* 113:210-7.
34. França CM, França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, et al. (2009) Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 94:25-31.
35. Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MA, et al. (2010) Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med* 42:546-52.
36. Pavesi VC, Lopez TC, Martins MA, Sant'ana Filho M, Bussadori SK, Fernandes KP, et al. (2010) Healing action of topical chamomile on 5-fluorouracil induced oral mucositis in hamster. *Support Care Cancer*. Apr 28.
37. Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL (2010) Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. *Revisão da literatura*. *Ver Col Bras* 37:295-302.
38. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS (2007) Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomedicine and Laser Surgery* 25(2):102-106.
39. Lim WB, Kim JS, Ko YJ, Kwon H, Kim SW, Min HK (2011) Effects of 635nm Light-Emitting Diode Irradiation on Angiogenesis in CoCl₂-Exposed HUVECs. *Lasers Surg. Med* 43:344-352.
40. Gonçalves RV, Novaes RD, Matta SLP, Benevides GP, Faria FR, Pinto MVM (2010). Comparative Study of the Effects of Gallium- Aluminum-Arsenide Laser Photobiomodulation and Healing Oil on Skin Wounds in Wistar Rats: A Histomorphometric Study. *Photomedicine and Laser Surgery* 28(5):597-602
41. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MTT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PSLM, Iversen VV, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM (2006) Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF- α Levels in Acute Inflammation. *Photomedicine and Laser Surgery* 24(1)33-37.
42. Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DAS, Oliveira JR. Anti-Inflammatory (2008) Effects of Low-Level Laser Therapy (660 nm) in the Early Phase in Carrageenan-Induced Pleurisy in Rat. *Lasers in Surgery and Medicine* 40:500–508.

CONCLUSÃO

A fototerapia com laser em baixa intensidade com protocolo preventivo, terapêutico e conjugado mostrou efeitos positivos no controle clínico da mucosite bucal assim como, a forma preventiva esteve associada ao reparo acelerado das lesões.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LOPES L. Laserterapia: conceitos e aplicações. Disponível em: http://www.nupen.com.br/Revista_port/introducao.php. Acessado em: 10/09/2012.
- ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level therapy effects on cultured gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, p. 179–184, 2001.
- ANTUNES, H.S. et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood**, v. 109, p. 2250-5, 2007.
- ARUN, M.G. et al. D. Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention and treatment of radiation induced mucositis in head and neck cancer patients. **Indian J. Med. Res**, v. 124, p. 399–402, 2006.
- BARASCH, A. et al. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **Cancer**, v. 76, p. 2550-6, 1995.
- BENSADOUN, R.J. et al. Low-energy He/Ne *laser* in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. **Support Care Cancer**, v. 7, p. 244-52, 1999.
- 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. **Support Care Cancer**, v. 19, p. 1069–1077, 2011.
- CHOR, A. et al. Low-power laser to prevent oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Haematol**, v. 84, p. 178-9, 2010.
- COWEN, D. 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**, v. 38, p. 697-703, 1997.
- CRIVELLO-JR, O. Laser em Odontologia (II Fundamentos de Odontologia). 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- CRUZ, L.B. et al. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 48, p. 435–440, 2007.
- EDUARDO, deP.F. Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. **Photomed Laser Surg**, v. 27, p. 137-44, 2009.
- ELTING, L.S. et al. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v. 98, p. 1531-9, 2003.
- JAGUAR, G.C. et al. Low energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. **Oral Dis**, v. 13, p. 538–543, 2007.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56(5):691-704,1989.
- KEEFE, D.M.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.M. Developing evidence-based guidelines for management of alimentary mucositis: process and pitfalls. **Support Care Cancer**, v. 14, p. 492-8, 2006.
- KEEFE, D.M. et al. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, v. 109, p. 820-31, 2007.

- KHOURI, V.Y. et al. Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. **Braz Dent J**, v. 20, p. 215-20, 2009.
- LABBATE, R.; LEHN, C.N.; DENARDIN, O.V.P. Efeito da clorexidina na mucosite induzida por radioterapia em câncer de cabeça e pescoço. **Rev Bras Otorrinolaringo**, v. 69, n. 3, p. 349-354, 2003.
- LOPES, N.N. et al. Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **Lasers Surg Med**, v. 42, p. 546-52, 2010.
- MARQUES, M.M. et al.. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 34, p. 260–265, 2004.
- MIGLIORATI, C. *et al.* Low-energy laser therapy in oral mucositis. **J. Oral Laser Appl**, v. 1, p. 97–101, 2001.
- NEVILLE, B.W, DAMM, D.D.; ALLEN, C.M. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.251-256.
- NEVILLE, B.W, DAMM, D.D.; ALLEN, C.M. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 296-297, 2009.
- PARULEKAR, W. et al.. Scoring oral mucositis. **Oral Oncol**, v. 34, n. 1, p. 63-71, 1998.
- PEREIRA, N.A. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Méd**, v. 31, p. 263–267, 2002.
- SANDOVAL, R.L. et al.. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with lowenergy *laser*: initial results of A. C. Camargo Hospital. **J Appl Oral Sci**, v. 11, p. 337-341, 2003.
- SCHUBERT, M.M. et al. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Support Care Cancer**, v. 15 p. 1145-5, 2007.
- SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology**, v. 34, p. 39-43, 1998.
- SONIS, S.T. et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **J Clin Oncol**, v. 19, n.8,p. 2201-2205, 2001.
- SONIS, S.T. Pathobiology of mucositis. **Semin Oncol Nurs**, v. 20, p. 11-5, 2004.
- ZANIN, T. et al. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 28, p. 233-7, 2010.

ANEXOS

Anexo I – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110134

Data da Versão do Projeto: 14/04/2011

Pesquisadores:

URSULA DA SILVEIRA MATTE

ISABEL DA SILVA LAUXEN

MANOELA DOMINGUES MARTINS

ANA CAROLINA ANDRIM PELLICOLI

MARCO ANTONIO TREVIZANI MARTINS

MANOEL SANTANA FILHO

Título: EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA PATOBIOLOGIA DA MUCOSITE QUÍMICOINDUZIDA EM HAMSTER

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabeleça procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Dr. Alessandro Bersch Oswaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

Porto Alegre, 25 de maio de 2011.

Anexo II – Normas de publicação da revista Laser Medical in Science.

Types of papers

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ⌘ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ⌘ Use italics for emphasis.
- ⌘ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ⌘ Do not use field functions.
- ⌘ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ⌘ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ⌘ Use the equation editor or MathType for equations.
- ⌘ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

» Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

» LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].
- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

⌘ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

⌘ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

⌘ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

⌘ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

⌘ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

⌘ Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

☞ www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- ⌘ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ⌘ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ⌘ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ⌘ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ⌘ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

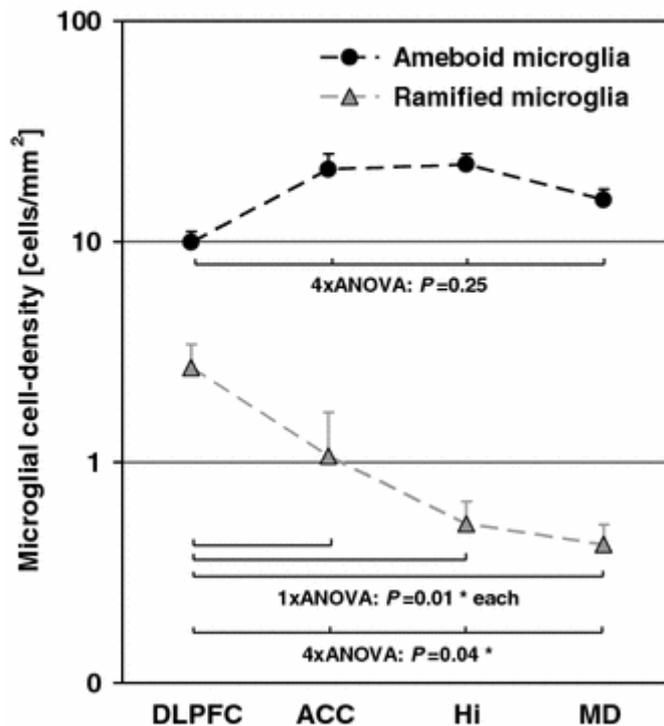
Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- ⌘ Supply all figures electronically.
- ⌘ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ⌘ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ⌘ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

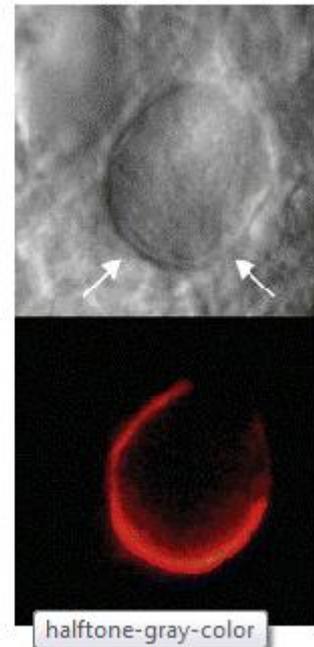
Line Art



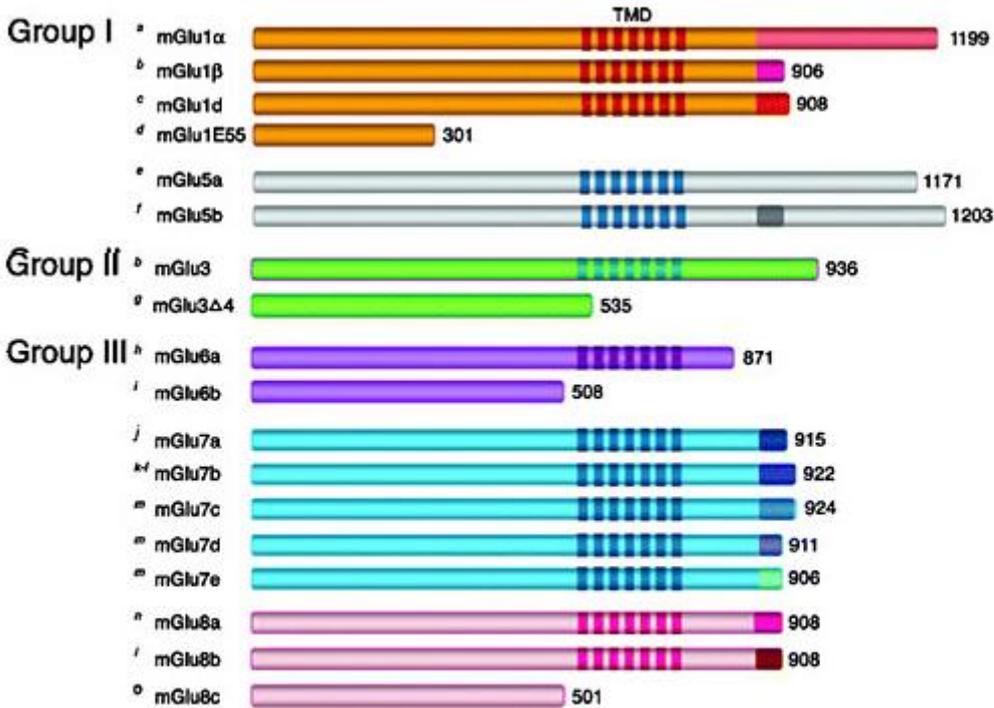
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



- ☛ Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- ☛ Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- ☛ Color art is free of charge for online publication.
- ☛ If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- ☛ If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- ☛ Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ☛ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ☛ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ☛ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ☛ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ☛ Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- ✦ All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- ✦ Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ✦ Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- ✦ If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ✦ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ✦ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ✦ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ✦ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ✦ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- ✦ When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- ✦ For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- ✦ For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- ✦ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ✦ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ✦ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

[Edanz Editing Global](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

[理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

[エダンズグループジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

[Edanz Editing Global](#)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

 Springer Open Choice